
BOLETIN

del centro panamericano de fiebre aftosa

Nº 35-36, julio-diciembre, 1979.

No. 35-36, July-December, 1979.

contenido

contents

	p.
El brote de fiebre aftosa de 1922 en Jamaica	3
The 1922 outbreak of foot-and-mouth disease in Jamaica	11
<i>Roberto Goić M.; F. C. Alexander; P. Arambulo III</i>	
Vacuna antiaftosa con adyuvante oleoso para cerdos. III. Respuesta inmunitaria con vacunas emulsificadas por vibración ultrasónica o por agitación mecánica.	19
Foot-and-mouth disease oil adjuvanted vaccines for pigs. III. Immune response of vaccines emulsified by ultrasonic or mechanical equipment	27
<i>Ivo Gomes; P. Augé de Mello; A. Alonso Fernández; Kleise de Freitas Costa</i>	
Análisis de la relación dosis/respuesta en la vacunación antiaftosa del cerdo	35
Analysis of the dose/response relationship in foot-and-mouth disease vaccination of pigs.	45
<i>J. A. Obiaga; A. Alonso Fernández</i>	

Consideraciones sobre la profilaxis de la fiebre aftosa en la especie porcina.	55
Reflections on the prevention of foot-and-mouth disease in swine.	59
<i>P. Augé de Mello</i>	
Noticias — News	
Suero bovino tratado por PEG para uso en cultivos de células	63
PEG-treated bovine serum for use in cell cultures.	64
<i>Julio A. Mesquita; Antonio Vieira</i>	
Resúmenes — Abstracts	65
Bibliografía sobre enfermedades vesiculares Vesicular diseases bibliography.	76

CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA
Caixa Postal 589, 20000 Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

EL BROTE DE FIEBRE AFTOSA DE 1922 EN JAMAICA

Roberto Goic M.¹; F. C. Alexander²; P. Arambulo III³

INTRODUCCION

La isla de Jamaica, que es libre de fiebre aftosa, sufrió un ataque de la enfermedad en 1922. Se resume aquí el relato de ese brote publicado en un suplemento de la *Gazeta de Jamaica* del 15 de mayo de 1924, por considerarlo un ejemplo de un éxito notable de erradicación de fiebre aftosa mediante la ejecución de medidas planificadas con un criterio epidemiológico, en una época en que no se contaba con el recurso de la vacuna y sin acudir al uso del rifle sanitario. Se complementa ese relato con la información, sobre el mismo asunto, contenida en la carta H-88, que con fecha de 2 de abril de 1952 dirigió el Director de Agricultura de Jamaica al Instituto de Investigación de Fiebre Aftosa de Pirbright, Inglaterra, con copia al Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (CPFA).

CRONOLOGIA

La investigación retrospectiva estimó que los primeros casos aparecieron el 29 de junio de 1922, en el establecimiento Copse de la parroquia de Hanover (ver Fig. 1). Las autoridades del gobierno tuvieron noticias el día 18 de julio, o sea, 3 semanas más tarde, por una notificación del propietario de la ganadería Montpelier, de la vecina parroquia de St. James. Al día siguiente, el Departamento de Agricultura envió un consultor veterinario, quien hizo un diagnóstico de estomatitis necrótica de

carácter contagioso, urgiendo la inclusión de esta enfermedad en la Ley de Enfermedades Contagiosas de los Animales. El 22 de julio informó que calculaba entre 300 y 400 los bovinos enfermos en Montpelier, que la enfermedad también existía en los establecimientos Copse, Lethe y Burnt de la vecina parroquia Hanover y que la tendencia parecía ser hacia una rápida difusión. El 24 de julio menciona la posibilidad de tratarse de fiebre aftosa, transcurrido probablemente un mes desde la presentación del primer caso y sólo recién el 11 de septiembre confirma oficialmente el diagnóstico. Esta actitud, que se consideró perjudicial para la erradicación del brote, motivó el despido del consultor y su reemplazo por otro veterinario del Ministerio de Agricultura de Gran Bretaña.

Parecería ser que el primer diagnóstico, de estomatitis necrótica, se hizo, en un principio, para evitar pánico entre los ganaderos y evitar acciones que pudieran contribuir a una mayor difusión del brote, antes que se pusieran en efecto medidas de control.

En este episodio la última propiedad afectada se registró el 6 de febrero de 1923 (ver Figs. 2 y 3), o sea, el brote tuvo una duración aproximada de 8 meses. En total la enfermedad se presentó en 114 establecimientos con una población de 34.467 bovinos, distribuidos en parte de las 4 parroquias (ver Fig. 1): Hanover, St. Elizabeth, St. James y Westmoreland. Permanecieron indemnes los dos tercios occidentales de Hanover y la mayor parte oriental de St. James y en St. Elizabeth sólo se afectó un establecimiento en la vecindad de Westmoreland.

Se mantuvieron medidas de cuarentena durante 16 meses, desde el 25 de julio de 1922 hasta el 1 de noviembre de 1923.

El 3 de diciembre de ese año la enfermedad reapareció en la propiedad Fontabelle, de la parroquia Westmoreland. El ataque anterior había sido el 28 de septiembre, o sea, 15 meses antes. Se

¹ Jefe de Cooperación Técnica, Centro Panamericano de Fiebre Aftosa, OPS/OMS, Caixa Postal 589, 20000 Rio de Janeiro - RJ, Brasil.

² Director Interino del Servicio Veterinario, Ministerio de Agricultura, Hope, Kingston 6, Jamaica.

³ Jefe Técnico del Proyecto, Salud Animal/Salud Pública Veterinaria, OPS/OMS, P.O. Box 384, Kingston, Jamaica.

extendió a un predio vecino y el episodio se dio por terminado en tres semanas, el 25 de diciembre. El día 8 de diciembre se restablecieron las medidas cuarentenarias en toda el área cuarentenada en 1922. La segunda cuarentena se mantuvo 9 meses, suspendiéndose el 4 de septiembre de 1924.

Por tanto, el brote completo cubrió un período de 2 años y 2 meses. Desde entonces, no hay cualquier otro registro de enfermedad vesicular en Jamaica.

ORIGEN DEL BROTE

Aun cuando no hay pruebas substanciales, se supone que el brote se originó con la introducción de bovinos de la India. De ese país partieron 13 toros el 7 de enero de 1922, desembarcando en Kingston el 27 de febrero, donde estuvieron en cuarentena, con bovinos de la isla, durante poco más de 1 mes, sin que se observara cualquier signo patológico. Cinco de estos toros fueron llevados el 6 de abril a la hacienda Montpelier. Aproximadamente 3 meses más tarde la fiebre aftosa se declaró en una propiedad vecina y una semana después se descubrió en el propio rebaño de Montpelier. En el suplemento se lee que en Jamaica era frecuente que los animales pasasen de un potrero a otro de una misma propiedad o entre propiedades vecinas. En tales circunstancias, podría pensarse en el fenómeno de la transmisión del virus por animales sanos portadores.

También se examinaron otras posibilidades, como la llegada de 9 toros de Gran Bretaña en el período diciembre de 1921 a junio de 1922, y la importación de vacuna contra el carbunco sintomático, heno, paja, etc. Los toros británicos fueron destinados al área posteriormente afectada, pero no a los rebaños que enfermaron en primer lugar.

Si bien no hubo una conclusión definitiva, la principal sospecha recayó en los toros importados de la India.

MORBILIDAD

El informe de la *Gazeta* indica que no se hizo

inspección para discriminar el número de enfermos, considerándose simplemente que estaban infectados todos los bovinos de los 114 establecimientos comprometidos. Esto puede interpretarse como un justo criterio de operar en base a unidades de rebaños y no con atención a individuos, aparte de evitar un esfuerzo irrelevante y, al mismo tiempo, contraindicado desde un punto de vista sanitario. Recuérdese que en esa época no existía el apoyo de hoy para la identificación de virus vesiculares en el laboratorio y que en lugares donde existía estomatitis vesicular se recurría a inoculaciones en bovinos, porcinos y equinos, para tratar de diferenciar los virus. El diagnóstico de Jamaica se basó en las características epidemiológicas de la enfermedad, si bien durante la confusión inicial se inoculó material vesicular en un ternero, por escarificación de la mucosa bucal. El ternero reaccionó con lesiones bucales y podales.

Sin embargo, en varios establecimientos se estimó que no habían enfermado la totalidad de los bovinos, explicándose por el fenómeno de inmunidad natural. Se menciona la mayor gravedad del ataque en algunos rebaños y tan suave en otros, que los propietarios dudaban que se tratara de fiebre aftosa. Se cita el caso de uno de los primeros establecimientos atacados, donde se calculó que enfermó la totalidad del rebaño de 600 bovinos, con la muerte de 12 de ellos.

MEDIDAS APLICADAS

El 27 de julio, aproximadamente un mes después de la presentación del foco primario, se puso en cuarentena parte de las parroquias de Hanover, St. James y Westmoreland. Dos días más tarde, en vista de la rapidez de la difusión, toda el área de esas parroquias fue puesta en cuarentena.

Viendo que la enfermedad continuaba propagándose, a mediados de septiembre se amplió nuevamente el área, incluyendo una parte de la parroquia de St. Elizabeth, de tal forma de constituir en el sureste una barrera natural formada por colinas muy poco pobladas de animales, el río Black y los grandes pantanos vecinos. En el mes de octubre se observó, por primera vez, una disminución significativa de focos.

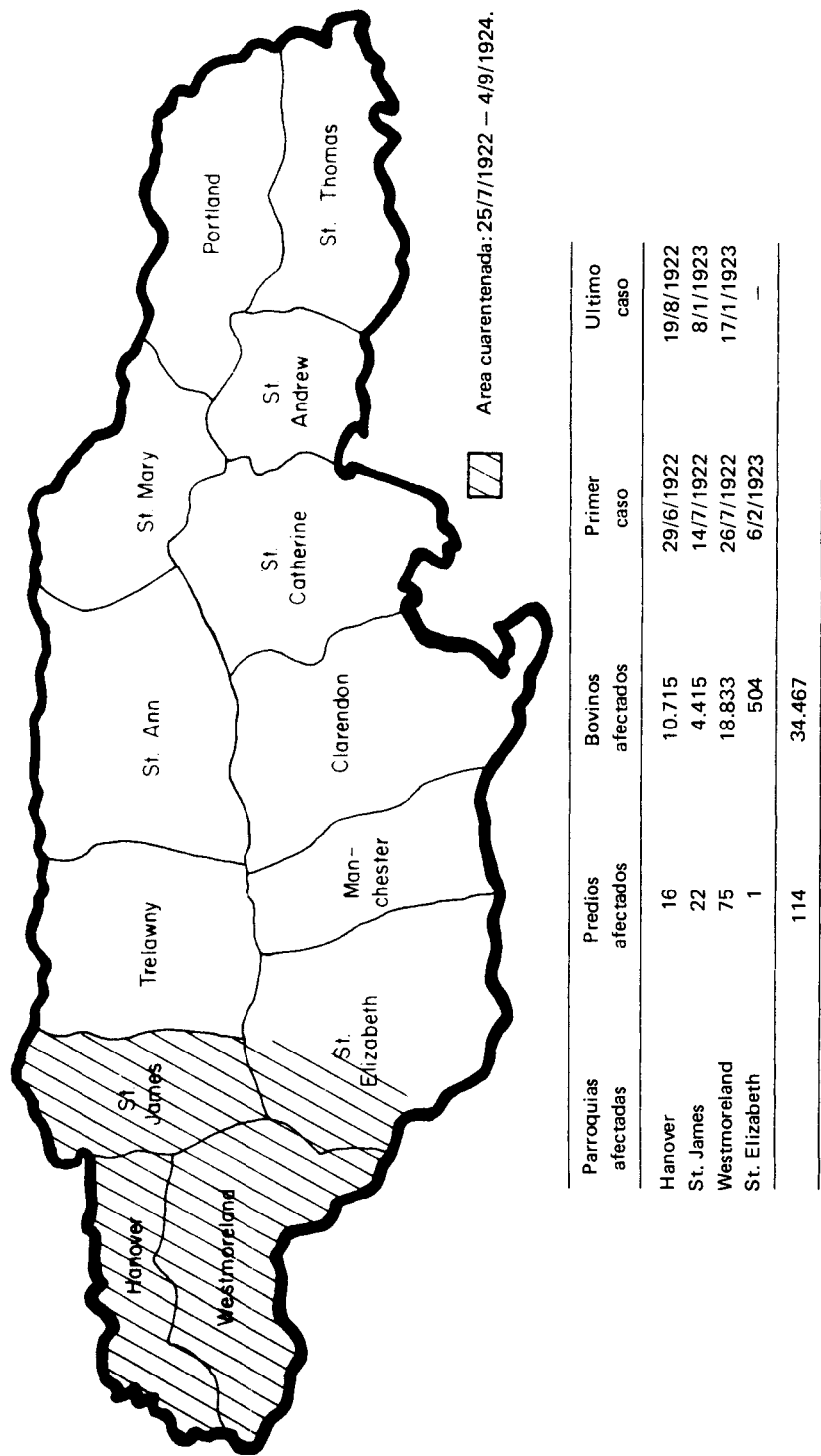
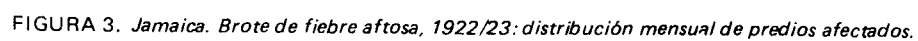
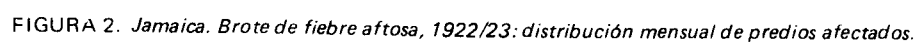


FIGURA 1. Jamaica. Brote de fiebre aftosa, 1922/1923.



El fracaso de las medidas iniciales se atribuyó a la inexperiencia y falta de preparación para enfrentar brotes de enfermedades exóticas, al falso diagnóstico de estomatitis necrótica y a la falta de legislación para impedir el movimiento de animales dentro de áreas en cuarentena.

Para enfrentar la situación se fueron dictando reglamentos conforme lo indicaban las circunstancias, dentro de una nueva ley, la Ley 29 de 1922. Se designó un Comisionado Jefe, a cargo de un cuerpo de Comisionados e Inspectores de campo y apoyado por un Comité Asesor Central. Este Comité tuvo la función de revisar periódicamente la situación y hacer recomendaciones al Gobernador. También se establecieron Comités Asesores Locales, en cada parroquia, para vigilar y colaborar con el comisionado del lugar y con las autoridades centrales.

El Comisionado Jefe propuso el sacrificio, con indemnización, de todos los animales de especies menores, dentro del área infectada, debido a la imposibilidad de mantenerlos debidamente confinados y por el peligro que representaban para la recurrencia de la enfermedad. Por diversas razones, que no se especifican, el Gobierno no aceptó esta proposición. Sin embargo, en algunos de los lugares considerados de mayor riesgo se mataron numerosos cerdos y cabras encontrados en los caminos. No se mencionan cifras ni los métodos de eliminación. Se admite que en ningún momento hubo un control eficiente sobre estos animales. Por suerte, los hechos parecieron demostrar que las especies menores no diseminaron ni mantuvieron la infección, como se temía. No se observaron casos en caprinos, pero sí en cerdos, en algunas propiedades y siempre simultáneamente con los bovinos.

Sólo con permisos especiales se permitió el movimiento de animales entre establecimientos del área, prohibiéndose cuando se consideraba desaconsejable. No se permitió la salida del área de cualquier animal y todo el transporte se restringió a vehículos motorizados y al ferrocarril. Se instalaron puestos de desinfección dentro del área y en sus límites y se establecieron guardias en los caminos. El rigor impuesto por el nuevo comisionado en el mes de septiembre marca un vuelco favorable muy significativo en el control del brote.

El 22 de febrero de 1923, alrededor de 6 meses después del primer ataque reapareció la enfermedad en los establecimientos Barham y Friendship, en el este de la parroquia Westmoreland. Se extremaron las medidas en la vecindad, procediéndose a la matanza, con fusil, de los cerdos y cabras sueltos en los caminos. Durante el período de marzo a junio se mantuvieron los esfuerzos para impedir, en lo posible, la introducción de bovinos recuperados en rebaños indemnes o viceversa, teniendo en cuenta la potencialidad de los "portadores" de virus. Se permitió juntar animales recuperados, o sea, inmunes con inmunes. En julio comenzaron a liberarse estas medidas, atendiendo a la necesidad de aliviar los problemas creados por un año de cuarentena. Para aliviar situaciones de sobrepoblación se permitió el traslado de bovinos únicamente entre predios ubicados en el centro del área cuarentenada y nunca en los sectores que no fueron invadidos. La mezcla de animales recuperados y susceptibles se aprovechó como una experiencia para observar la posible transmisión de la enfermedad por portadores.

Como no hubo otro reaparecimiento de la enfermedad, 8 meses después del último caso, el 1º de noviembre de 1923, se levantó la cuarentena, excepto en los predios afectados en febrero, los cuales se liberaron un mes más tarde.

A falta de informaciones, se puede suponer que la reaparición de la enfermedad en Barham y Friendship se debió a la presencia de animales que, por algún motivo, escaparon a la infección durante el primer ataque o por la introducción de susceptibles, a pesar de las medidas de cuarentena. Las medidas adoptadas a partir de marzo sugieren, más bien, esta posibilidad. En ese caso, se trataría de un ejemplo del fenómeno de transmisión del virus por portadores sanos.

Entre el 31 de marzo y el 31 de octubre de 1923 se puso en operación un matadero en la estación de ferrocarril de Montpelier, en la parroquia de St. James. Se sacrificaron 990 bovinos destinados a la capital, Kingston. Las carcasas y los cueros (desinfectados) se enviaban en un tren nocturno especial.

En diciembre la enfermedad tuvo su última manifestación, en Westmoreland, en el establecimiento Fontabelle, que había sufrido un ataque en

octubre de 1922. En marzo del año siguiente recibió 12 novillos originarios de 2 predios nunca afectados. El 3 de diciembre se encontraron enfermos 5 de estos novillos, que se sacrificaron. Se colocó en cuarentena Fontabelle y 4 vecinos. En total enfermaron los 12 novillos introducidos y sólo 10 de 213 bovinos que estaban en Fontabelle desde el brote de 1922. No se describe el tipo de animales que enfermó, pero, la morbilidad parecería revelar un buen nivel de inmunidad del rebaño 13 meses después del primer ataque. Constituye, asimismo, quizá otra prueba circunstancial del fenómeno de sobrevivencia del virus en animales portadores y su capacidad de transmitirse y enfermar a otros animales, por mecanismos que aún hoy día se desconocen.

El episodio se consideró terminado el 25 de diciembre, pero, la cuarentena estricta de Fontabelle y de los vecinos se mantuvo hasta el 4 de septiembre de 1924, seguida de 4 meses de observación. Toda el área cuarentenada en 1922 se declaró "área sospechosa", sujeta a restricciones. De ahí se prohibió la salida de rumiantes y cerdos, excepto bovinos destinados directamente a sacrificio en el matadero de Kingston. En su interior se permitió libertad de movimientos, excepto en el caso de los establecimientos cuarentenados.

En resumen, la región occidental de Jamaica estuvo bajo cuarentena 2 años y 2 meses, de julio de 1922 a septiembre de 1924, excepto los 3 meses que van de noviembre de 1923 a enero de 1924.

Se consideró que el clima, predominando un calor y una luminosidad intensa, con períodos de sequía, más el relieve accidentado del país, especialmente por las barreras de montañas y pantanos, fueron factores que contribuyeron mucho a la erradicación del brote. Sin embargo, se señala, asimismo, la dedicación, perseverancia y esfuerzo del personal, con una planificación bien elaborada, dirigida enérgicamente por el Comisionado Jefe, con la cooperación de los ganaderos afectados y dentro de una comunidad respetuosa de la ley.

COMENTARIOS

La erradicación del brote de fiebre aftosa de 1922 en Jamaica puede considerarse un episodio

digno de reflexión. La idea de que quizá igual resultado se hubiera obtenido sin tanto esfuerzo, por autoeliminación del virus en una población susceptible de tamaño relativamente reducido, parece poco factible si se consideran los casos de reaparecimiento de focos y la existencia en la isla de una población ganadera mucho mayor que la del área afectada en el extremo occidental.

Es interesante observar el éxito de la aplicación de un criterio epidemiológico racional, adaptado a las circunstancias y posibilidades de la ocasión, dejando a un lado la metodología estricta basada en el sacrificio y eliminación de los animales infectados, que hasta hoy sigue siendo la recomendación universal para la erradicación de brotes de fiebre aftosa en países libres de la enfermedad. La eliminación que se hizo habría tenido más bien el propósito de destruir uno de los posibles eslabones de la difusión del virus y a la vez inducir a los propietarios a mantener confinados sus animales. Es probable que la extensión del brote a mediados de julio, cuando ya había por lo menos 7 establecimientos con fiebre aftosa, y la tendencia observada hacia una rápida difusión fueran factores que descartaron el método del sacrificio y eliminación de los animales enfermos y de sus contactos. Con justicia pudo haberse decidido que era un tributo muy pesado para la economía del país e injustificable dentro de la característica insular de Jamaica.

Quizá la lección más valiosa de Jamaica consiste en demostrar la importancia que tiene la cuarentena para impedir la difusión del virus, mientras se extingue en los rebaños infectados.

Destaca, también, la necesidad de que el área cuarentenada sea amplia y con límites que signifiquen verdaderas barreras geográficas.

Es notable el uso del concepto de animales sanos portadores de virus que, por lo visto, fue un factor determinante en las medidas y en la duración de la cuarentena. Se debe recordar que este asunto fue motivo de discusiones entre veterinarios europeos, en la época del brote de Jamaica, en base a observaciones y pruebas circunstanciales que apuntaban hacia la ocurrencia de ese fenómeno, que después pasó prácticamente olvidado y vino a revivirse con investigaciones

realizadas alrededor de 40 años más tarde.

El que las autoridades del Gobierno conocieran la existencia del problema sólo 3 semanas después del apareamiento del primer foco revela la importancia de la concientización de la comunidad y en especial de los ganaderos y la necesidad de tener un sistema activo de vigilancia epidemiológica.

En un párrafo, el informe del suplemento de la *Gazeta de Jamaica* señala que la erradicación de un brote extenso requiere tiempo para el reconocimiento de la situación, decidir la extensión del área de operaciones, elaborar y aprobar reglamentos legales, contratar, organizar y adiestrar suficientes recursos humanos y, sobre todo, para informar e instruir a la comunidad del área afectada sobre la naturaleza de la enfermedad y de los métodos necesarios para su control. Se entiende que el éxito depende esencialmente de la cooperación y el apoyo sostenido de los propietarios y cuidadores del ganado.

Es interesante observar que entre los defectos

que se mencionan en la iniciación del combate se cuentan aquellos que son previsibles cuando no existe una organización preparada para prevenir y erradicar brotes de enfermedades exóticas, como ser: falta de personal organizado y adiestrado, ausencia de equipos de desinfección y desinfectantes rápidamente disponibles, insuficiencia de la legislación y demora en el diagnóstico.

El informe resume, en realidad, los principales elementos que entran en juego en las acciones de prevención y erradicación de un brote de fiebre aftosa en un país o lugar libre de la enfermedad y revela la importancia de tener planes alternativos para enfrentar las diversas situaciones que pueden presentarse, el papel decisivo de la conciencia de la comunidad, la necesidad de una erradicación técnico-administrativa sólida, la capacidad de decidir con el apoyo oficial del más alto nivel y la condición de supeditar los procedimientos conforme indique el análisis socioeconómico y epidemiológico de cada situación.

THE 1922 OUTBREAK OF FOOT-AND-MOUTH DISEASE IN JAMAICA

Roberto Goiç M.¹; F. C. Alexander²; P. Arambulo III³

INTRODUCTION

The island of Jamaica, which is free from foot-and-mouth disease (FMD), suffered an outbreak of this disease in 1922. Summarized herein is the report of said outbreak published in a supplement of the Jamaica Gazette of May 15, 1924, for consideration as an example of a notably successful eradication of FMD through the execution of measures planned with epidemiologic criterion, in an epoch when there is no recourse to a vaccine and without resort to mass shooting and sanitary disposal of sick and susceptible animals. Complementing this report are informations on the same subject contained in the letter H-88 dated April 2, 1952, sent by the Director of Agriculture of Jamaica to the Foot-and-Mouth Disease Research Institute at Pirbright, England, a copy of which was forwarded to the Pan American Foot-and-Mouth Disease Center.

SEQUENCE OF EVENTS

Through retrospective investigation, it was estimated that the first cases of FMD appeared on June 29, 1922, at Copse Estate in the parish of Hanover (see Fig. 1). The Government authorities took notice of the event on July 18, that is three weeks later, through a notification from a herd owner at Montpelier in the neighboring parish of St. James. The following day, the Depart-

ment of Agriculture sent a Veterinary Advisor, who made a diagnosis of necrotic stomatitis of contagious character and urged to include the said disease in the Law on Contagious Diseases of Animals. On July 22, the Veterinary Advisor reported that between 300 to 400 cattle in Montpelier were estimated to be ill, that the disease also existed at Copse, Lethe and Burnt Estates in the neighboring parish of Hanover, and that it appeared to have a tendency to spread rapidly. On July 24, the possibility that he was dealing with FMD was mentioned by the Veterinary Advisor, after one month had probably elapsed from the recognition of the first case. It was not until September 11 that diagnosis of FMD was made official. This delay, which was considered prejudicial to the eradication of the outbreak, motivated the dismissal of the Veterinary Advisor and his replacement with another veterinarian from the Ministry of Agriculture of Great Britain.

It would appear that the initial diagnosis of necrotic stomatitis was made on principle in order to avoid panic among the cattle owners and at the same time to avoid actions that may contribute to the major spread of the outbreak before control measures could be put into effect.

In this episode the last affected property was recorded on February 6, 1923 (see Figs. 2 and 3), that is the outbreak had a duration of approximately 7 to 8 months. The disease was observed in a total of 114 estates with a population of 34,467 cattle, distributed in part in 4 parishes (see Fig. 1): Hanover, St. Elizabeth, St. James and Westmoreland. Indemnity was maintained for the western third of the parish of Hanover and the major eastern parts of St. James. In St. Elizabeth only one state was affected, in the vicinity of Westmoreland.

Quarantine measures were maintained for a duration of 16 months, From July 25, 1922 to November 1, 1923.

¹Chief, Technical Cooperation, Pan American Foot-and-Mouth Disease Center, PAHO/WHO, Caixa Postal 589, 20000 Rio de Janeiro-RJ, Brazil.

²Acting Director of Veterinary Services, Ministry of Agriculture, Hope, Kingston 6, Jamaica.

³Project Manager and Chief Technical Advisor, Animal Health/Veterinary Public Health, PAHO/WHO, P.O. Box 384, Kingston, Jamaica.

On December 3, 1923, the disease reappeared at Fontabelle property in the parish of Westmoreland. The last attack of the disease was on September 28, 1922, that is, 15 months previous. This new outbreak extended to a neighboring property and the episode was said to have terminated in three weeks, on December 25. On December 8, quarantine measures were re-established in all areas quarantined in 1922. The second quarantine was maintained for 9 months, and lifted on September 4, 1924.

The complete outbreak, therefore, lasted for 2 years and 2 months. Since then, there has been no other recorded case of any vesicular disease in Jamaica.

ORIGIN OF THE OUTBREAK

Even if there are no substantial proofs, it is supposed that the outbreak originated from the introduction of cattle from India. From that country departed 13 bulls on January 7, 1922, which disembarked in Kingston on February 27, where the animals were placed in quarantine together with local cattle for a period of one month, with no pathological sign observed. On April 6, five of the imported bulls were taken to Montpelier Estate. Approximately three months later, FMD was declared in a neighboring property. One week after, the disease was recognized in the Montpelier herd. It was noted in the supplement that, in Jamaica, animals are frequently able to pass through gates within the same property or enter neighboring properties. In such circumstances, one is able to assume of the phenomenon of virus transmission through healthy animal carriers.

Other possibilities are also considered, such as the arrival of 9 bulls from Great Britain between the period December 1921 to June 1922, the importation of anthrax vaccine, hay, straw, etc. But the bulls from Britain were destined to areas later affected, not in initially infected herds.

Although no definite conclusion could be made, bulls imported from India fall again as the principal suspects.

MORBIDITY

The report in the Gazette indicated that no examination was made to differentiate the number of sick animals. It was simply considered that all cattle were infected in the 114 establishments involved. This interpretation, based on infection of single herds with no attention to individual animals, is a fair criterion to assume. This in fact avoided any irrelevant efforts and is equally indicated from a sanitary point of view. It must be remembered that during that epoch there existed no support similar to what we have today for the laboratory identification of the virus and, in areas where vesicular stomatitis existed, a resort was the inoculation of cattle, swine and horses for differentiation of the virus. The diagnosis in the Jamaican outbreak of 1922-24 was based on the epidemiological characteristics of the disease; although during the initial confusion vesicular material was inoculated in a calf by scarification of the buccal mucosa. The calf reacted with lesions in the mouth and feet.

Nevertheless, in the various establishments, it was estimated that not all the cattle have been ill due to the phenomenon of natural immunity. It was mentioned that the attack was more serious in some herds and very mild in others that the owners doubted they were dealing with FMD. It cited the case of one of the first establishments affected, where it was calculated that the total herd of 600 cattle was ill, 12 of which died.

MEASURES APPLIED

On July 27, approximately one month after presentation of the primary focus, part of the parishes of Hanover, St. James and Westmoreland were placed under quarantine. Two days later, in view of the rapid spread of the disease, the entire area of the parishes involved was placed under quarantine.

Seeing that the disease continued to spread, the area of quarantine was again enlarged to include a part of the parish of St. Elizabeth. The extent of the area of quarantine was of such form as to

constitute in the southeast a natural barrier formed by hills sparsely populated by animals, the Black River and the adjacent large marshes. In October, a diminution of the significant foci was observed for the first time.

The failure of the initial measures taken was attributed to inexperience and want of preparation to deal with outbreaks of exotic diseases, the false diagnosis of necrotic stomatitis, and lack of legislation to stop the movement of animals within the quarantine areas.

To meet the situation, regulations were made according to the circumstances indicated within a new law, Law 29 of 1922. A Commission Chief was designated in charge of the group of Commissioners and Field Inspectors and supported by a Committee of Central Assessors. This Committee took the function of reviewing periodically the situation and making recommendations to the Governor. Also, Committee of Local Assessors were established in each parish to do surveillance work and to collaborate with the local Commissioner and the central authorities.

The Chief Commissioner proposed the sacrifice, with indemnification, of all small species of animals within the infected area due to the impossibility of keeping them properly confined and because of the danger they pose for the re-occurrence of the disease. For various reasons which were not specified, the Government did not accept this proposal. Nevertheless, numerous stray goats and pigs were killed in some areas considered of major risk. The exact figures or the method of elimination were not mentioned. It was admitted that the stray animals were never efficiently controlled. By chance, it appeared that the smaller livestock species did not disseminate nor maintain the infection as feared. No cases were observed among goats but only in swine in some properties and always simultaneous with cases in cattle.

Movement of animals within the area was only permitted through a special permit. Movement was highly prohibited unless otherwise ordered. No animal was permitted to leave the area and all transport was restricted to motor cars, trucks and trains. Disinfection posts were installed within the area and their boundaries, and check points were established on the roads. The rigors imposed by

the new Commission during the month of September marked a very significant favorable turn in the control of the outbreak.

On February 22, 1923, around six months after the first outbreak, the disease reappeared at Barham and Friendship Estates in the east of the parish of Westmoreland. Extreme measures were taken in the vicinity, proceeding with shooting and slaughter of pigs and goats straying on the roads. During March to July, efforts were maintained to prevent whenever possible the introduction of recovered cattle into non-infected herds or vice versa, taking into account the potential of virus "carriers". It was permitted to gather recovered animals together, that is immuned with immuned. In July, liberalization of measures was started to alleviate the problem created attendant to one year of quarantine. To alleviate problems of over-population, transfer of cattle was permitted but solely within properties located in the center of quarantine area and never into non-infected areas. The mixing of recovered and susceptible animals was made use of to observe the possible transmission of the disease through "carriers".

Since there were no other reappearance of the disease 8 months after the last case, quarantine was lifted on November 1, 1923, with the exception of those properties affected in February which were otherwise released from quarantine a month later.

Due to the lack of information, it could be assumed that the reappearance of the disease at Barham and Friendship was due to the presence of animals which for some reason escaped the infection during the first outbreak, or the introduction of susceptibles following the relaxation of quarantine measures. The measures adopted at some part in March suggested much better this possibility. In which case, this could be dealt with as an example of the phenomenon of virus transmission by healthy carriers.

Between March 31 and October 31, 1923 a slaughterhouse was put into operation at the train station in Montpelier in the parish of St. James. Nine hundred and ninety (990) cattle destined for the capital of Kingston were slaughtered. The carcasses and hides (after disinfection) were shipped by a special night train.

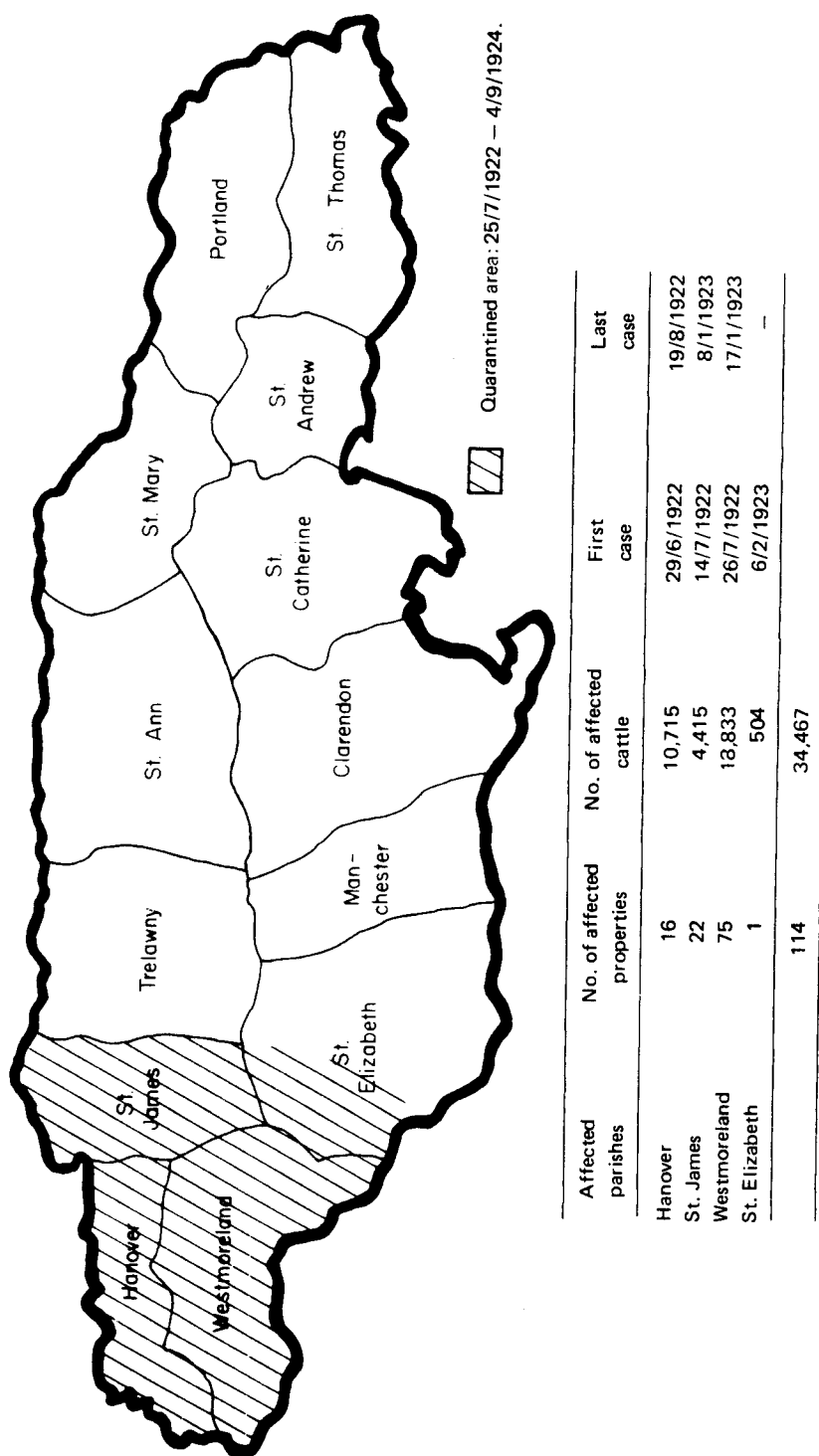


FIGURE 1. 1922/1923 outbreak of foot-and-mouth disease in Jamaica.

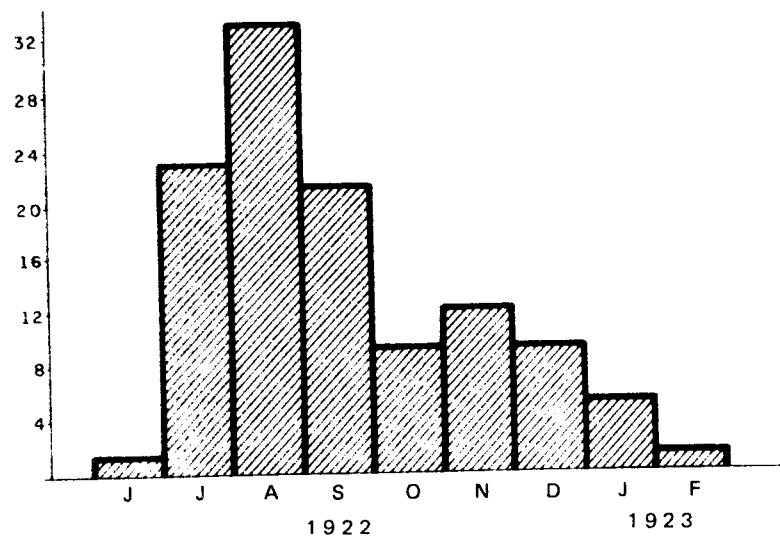


FIGURE 2. Monthly distribution of number of affected properties: 1922/23 outbreak of foot-and-mouth disease in Jamaica.

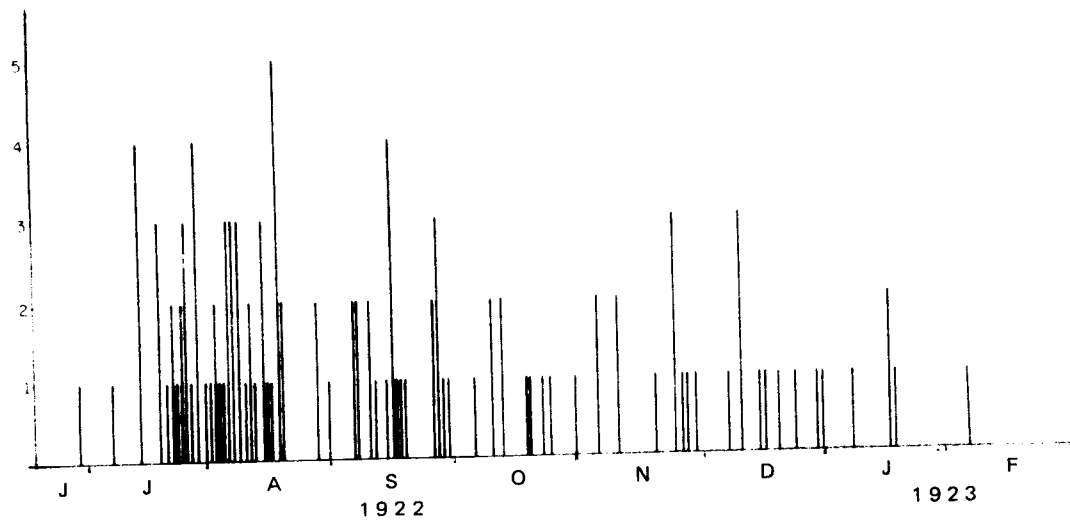


FIGURE 3. Monthly distribution of affected properties: 1922/23 outbreak of foot-and-mouth disease in Jamaica.

The disease had its last appearance at Fontabelle Estate in Westmoreland, which had suffered an outbreak in October 1922. In March of the following year, 12 bull calves originating from two properties that were never affected were received into the herd. On December 3, five of the calves were discovered to be sick and were sacrificed. Fontabelle and four properties were placed under quarantine. In total, all of the 12 calves that were introduced became ill, but only 10 of the 213 cattle which had been in Fontabelle since the outbreak of 1922. The type of animals that were ill was not described, but the morbidity pattern reveals a good level of herd immunity 13 months following the first attack. Likewise, this perhaps constituted another circumstantial proof of the phenomenon of virus survival in carrier animals and their capacity to transmit and infect other animals, a mechanism which still was not known until today.

The episode was considered terminated on December 25, but strict quarantine was maintained at Fontabelle and its neighboring properties until September 4, 1924, followed by four months of observation. All the areas that were quarantined in 1922 were declared as "suspect areas", subject to restrictions. Ruminants and pigs were prohibited to leave from yonder, with the exception of cattle destined directly for slaughter at the Kingston Abattoir. Within the interior of the "suspect area" free movement was permitted with the exception of the case of the quarantined establishments.

In summary, the western region of Jamaica was under quarantine for two years and two months, from July 1922 to September 1924, except for the three months of November 1923 to January 1924.

It was considered that the climate, predominantly hot and intense sunshine with periods of droughts, plus the natural terrain of the country, especially the barriers of mountains and marshes, were factors that contributed much to the eradication of the outbreak. Nevertheless, the dedication, perseverance and efforts of the personnel, the well elaborated plan, the energetic direction of the Commission Chief, the cooperation of the affected cattle owners and a community respectful of the

law likewise contributed to the successful eradication of the outbreak.

COMMENTS

The eradication of the outbreak of FMD in Jamaica in 1922 is an episode worthy of consideration. The idea that perhaps the same result could have been achieved without as much effort, by self-elimination of the virus in a susceptible population of a relatively reduced size, appears less possible considering the reappearance of foci and the existence in the island of a livestock population much larger than the affected area in the western part.

It is interesting to observe the success of a rational epidemiologic criterion, adapted to the circumstances and possibilities of the occasion, leaving on one side the strict method of slaughter and elimination of infected animals, which up to now is still the universal recommendation for the eradication of FMD outbreaks in countries free of the infection. The elimination applied had mainly the purpose to destroy possible links in virus spread, and at the same time urge the owners to maintain their animals in confinement. It is probable that the extension of the outbreak in the middle of July, when some 7 establishments already had FMD, and the tendency for rapid spread observed were factors that lead to disregard the method of slaughter and elimination of sick and contact animals. Soundly, this decision could have been made but it would have caused heavy losses on the economy of the country and unjustifiable due to the nature of the island of Jamaica.

Perhaps the most valuable lesson from the outbreak of FMD in Jamaica consisted of the demonstration of the importance of quarantine to halt the spread of the virus while extinguishing it in the infected herds.

The necessity for the quarantine area to have been extended and with limits corresponding with the true geographical boundaries of the parishes also stands out.

Notable is the use of the concept of healthy animal carriers of the virus, which was a determinant factor in the measures and in the duration

of quarantine. It is proper to record that this was the subject of discussion among veterinarians in Europe in the period of outbreak in Jamaica based on observation and circumstantial evidence that made them note the occurrence of this phenomenon. Afterwards, this was practically forgotten and was revived through investigations carried out around 40 years later.

That the Government authorities learned only of the existence of the problem 3 weeks after the appearance of the first focus revealed the importance of consciousness in the community, especially the cattle raisers, and the necessity of having an active system of epidemiological surveillance.

Briefly, the report in the supplement of the Jamaica Gazette points out that eradication of an extensive outbreak requires time to recognize the situation; decide as to the extent of the area of operation; prepare and approve legal regulations; control, organize and train sufficient human resources; and, above all, to inform and instruct the community in the affected areas on the nature of the disease and the methods necessary for its con-

trol. It is understood that the success depended essentially on the cooperation and sustained effort of the livestock owners and caretakers.

It is interesting to observe that among the deficiencies mentioned in the initiation of the control measures were foreseeable, when there exist no organization for the prevention and eradication of exotic diseases, such as lack of trained and organized personnel, absence of immediately available disinfectants and disinfecting equipment, inadequate legislation and delay in diagnosis.

The report summarizes in reality the principal elements that come into play in acting to prevent and eradicate and outbreak of FMD in a country or place that is free of the disease, and reveals the importance of having alternate plans to meet diverse situations that may be presented, the decisive role of the community, the necessity of a solid machinery both technical and administrative for eradication, the capacity to decide with official support at the highest level, and the condition to subject the procedures according to that indicated by socioeconomic and epidemiologic analysis of each situation.

VACUNA ANTIAFTOSA CON ADYUVANTE OLEOSO PARA CERDOS. III. RESPUESTA INMUNITARIA CON VACUNAS EMULSIFICADAS POR VIBRACION ULTRASONICA O POR AGITACION MECANICA¹

Ivo Gomes²; P. Augé de Mello²; A. Alonso Fernández²; Kleise de Freitas Costa²

RESUMEN

La respuesta inmunitaria y la protección de cerdos vacunados por vía intraperitoneal con vacunas antiaftosas de emulsión doble con adyuvante oleoso fue evaluada por comprobación y por examen de anticuerpos. Una vacuna fue emulsificada con un equipo de ultrasonido (Vacuna 1) y la otra con un equipo mecánico (Vacuna 2). Ambas vacunas fueron analizadas por las DP₅₀ en cobayos. Todas las pruebas indicaron que las dos vacunas eran satisfactorias. Sin embargo, la Vacuna 2 fue ligeramente superior a la 1.

También se demostró que un índice de seroprotección (ISP) de 3,0 o un título de microneutralización de 2,5 indican un alto grado de protección de los cerdos. Un valor bajo de ISP no necesariamente indica ausencia de protección.

De los 22 cerdos que presentaron lesiones, 20 se tornaron VIA positivos. Sin embargo, sólo 6 de los 38 cerdos sin lesiones desarrollaron anticuerpos VIA a los 15 días postinoculación. Esta observación merece ser destacada ya que un alto porcentaje de bovinos vacunados que no desarrollaron lesiones después de inoculados, se tornaron VIA positivos (9). Esta diferencia podría indicar una diferencia fundamental en la presentación subclínica de fiebre aftosa en bovinos y porcinos.

INTRODUCCION

En un trabajo anterior (2) fue comunicado el éxito obtenido con la vacunación intraperitoneal de cerdos jóvenes con vacunas antiaftosas inactivadas con adyuvante oleoso en emulsión doble.

En un estudio posterior (3) con vacunas similares aplicadas por vía intraperitoneal, a los 30 días postvacunación (DPV) fue observada una buena correlación entre el nivel de anticuerpos y los resultados a la comprobación. En estas experiencias se obtuvieron resultados semejantes en las comprobaciones, por inoculación y por contacto.

Este experimento se realizó para comparar vacunas oleosas de emulsión doble preparadas con emulsificadores de ultrasonido³ o mecánico⁴. Los resultados de este estudio también contribuyen para el desarrollo de un método adecuado para determinar la potencia de las vacunas antiaftosas.

MATERIALES Y METODOS

Virus

Las cepas de virus de la fiebre aftosa usadas para la producción de la vacuna fueron O₁ Campos, A Bagé, A Venceslau y C₃ Indaial.

Todas las cepas usadas para la producción de vacunas eran de origen bovino y fueron pasadas en células BHK₂₁ de 7 pasajes como máximo.

El virus O₁ Campos usado para la inoculación de los porcinos fue del 11^o pasaje en bovino.

Vacunas

Los antígenos usados para la preparación de las vacunas fueron producidos en la Planta Piloto de Producción de Vacunas del Centro en frascos rotantes con células BHK₂₁ Clon 13. Las suspensiones de virus fueron inactivadas con 0,001 M de etileneimina binaria (BEI) durante 24 horas (4).

Las características de los antígenos se indican en el Cuadro 1. Las vacunas fueron preparadas con igual volumen de las suspensiones de los antígenos

¹ Este trabajo fue realizado en parte con un subsidio del Instituto Vallée S/A, Uberlândia, MG, Brasil.

² Centro Panamericano de Fiebre Aftosa, OPS/OMS, Caixa Postal 589, 20000 Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

³ Minisonic, Ultrasonic Ltd. Otley Road Shipley, West Yorkshire, England.

⁴ Silversson Machine (Sales) Ltd., London.

O, A y C. La valencia A se preparó con iguales volúmenes de las suspensiones A Bagé y A Venceslau.

CUADRO 1. Características de los antígenos usados para la preparación de las vacunas

Virus	Título infeccioso en cultivos celulares/ml	Título FCs ₀ ^a
O ₁ Campos	10 ^{6,6}	1:24
A Bagé	10 ^{7,6}	1:28
A Venceslau	10 ^{7,4}	1:26
C ₃ Indaial	10 ^{7,2}	1:16

^aPrueba de fijación del complemento (4 UHCs₀/90 min.).

Vacuna 1: Fue preparada con un equipo de ultrasonido. Para tal fin, 450 ml de una mezcla de 9 partes de aceite mineral⁵ y una parte de monooleato de manitol⁶ fueron emulsificadas con 450 ml de una suspensión de antígeno trivalente para formar una emulsión agua en aceite (emulsión primaria).

Esta emulsión tenía características similares a las vacunas usadas en las experiencias anteriores (5). La emulsión primaria fue nuevamente emulsificada con 900 ml de solución buffer fosfato (SBF), pH 7,4 conteniendo 2% de polioxietileno 20 monooleato de sorbitol⁷ y mertiolato (concentración final 1:30.000 p/v) para formar una emulsión de agua en aceite en agua (emulsión doble).

Vacuna 2: Fue preparada a partir de la misma suspensión de antígeno, usando un emulsificador mecánico.

La emulsión primaria contenía 150 ml de la fase oleosa preparada como fue descrito en la Vacuna 1 y 150 ml de suspensión del antígeno trivalente.

Para preparar la emulsión doble fueron añadidos 300 ml de SBF, pH 7,4, conteniendo 2% de polioxietileno 20 monooleato de sorbitol y mertiolato, 1:30.000.

⁵Marcol 52 — Exxon Corporation, USA.

⁶Arlacel A — ICI America Inc., Atlas Chemicals Division.

⁷Tween 80 — ICI America Inc., Atlas Chemicals Division.

Prueba de potencia en cobayos

Fueron preparadas las diluciones de la vacuna (1:3, 1:9 y 1:27) en SBF, pH 7,4. Con la vacuna sin diluir y con cada dilución fueron inoculados por vía intramuscular con 0,25 ml, 6 cobayos de 3 a 4 meses de edad y con 550 ± 50 g de peso.

A los 30 DPV los cobayos fueron inoculados por vía intradermopltar con 10³ dosis generalizantes 50% (DG₅₀) de la cepa O₁ Campos. Las lesiones en las patas no inoculadas fueron observadas a los 5 días después de inoculados. La vacuna emulsificada con ultrasonido proporcionó 9 DP₅₀ y la preparada con el emulsificador mecánico tuvo 27.

Prueba de potencia en cerdos

Se utilizaron cerdos híbridos Humus-Seghers⁸, recién destetados, de dos meses de edad y con un peso aproximado de 20 kg. Grupos de 8 cerdos fueron vacunados por vía intraperitoneal con 3 ml de la vacuna pura o con diluciones similares a las preparadas para los cobayos.

A los 30 DPV los animales vacunados fueron colocados en contacto con dos cerdos sin vacunar, inoculados por vía intradermopltar con 10⁴ DI₅₀ RL de la cepa O₁ Campos y con tres cerdos controles sin vacunar.

Los animales fueron examinados únicamente a los 10 días después de la inoculación.

Examen de anticuerpos

Los cerdos fueron sangrados antes de la vacunación, a los 30 DPV y 15 días después de la comprobación.

El examen de anticuerpos fue realizado por se-roprotección (6), microneutralización (7) y por doble difusión en gel de agar para anticuerpos VIA (1).

⁸Humus Agrícola S/A. Via Armando Salles Oliveira, SP-322 km 356, Pitangueiras, SP, Brasil.

RESULTADOS

Las medias de los títulos de neutralización de los sueros a los 30 DPV están indicadas en el Cuadro 2. Se puede observar que los antígenos O y A indujeron mejor respuesta que el C y que los títulos obtenidos con la vacuna emulsificada con el equipo de Silverson (Vacuna 2) son más altos que los obtenidos con el equipo de ultrasonido (Vacuna 1). También se observa que es una constante la buena relación de la respuesta título de anticuerpo/dosis.

En la comprobación uno de los cerdos control inoculado murió. El otro inoculado, así como los tres contactos sin vacunar desarrollaron severas lesiones de fiebre aftosa. Las respuestas individuales para el virus O₁ de cada uno de los cerdos vacunados están indicadas en los Cuadros 3 y 4. Aquí, también se puede observar el descenso gradual en los índices de seroprotección (ISP) y en el título de microneutralización (TMN) con la dilución de la vacuna, a excepción del ISP de la dilución 1:3 de la Vacuna 1. Además se observa la misma correlación de la respuesta lesiones podales/dosis, con excepción del grupo correspondiente a la dilución 1:3 de la Vacuna 2 en la que tres cerdos muestran lesiones en 1 ó 2 patas.

La elevación del ISP y del TMN después de la comprobación es indicación de que hubo una buena exposición al virus de comprobación. En relación a esto, se destaca el alto número de cerdos que no desarrollaron lesiones y permanecieron negativos para los anticuerpos VIA a los 15 días des-

pues de la comprobación. No obstante, varios cerdos presentaron una elevación de anticuerpos en las pruebas de seroprotección o microneutralización.

Los efectos de la enfermedad en cerdos con lesiones en una o dos patas fueron menores que en los controles sin vacunar o aquellos correspondientes a la dilución 1:27 de la Vacuna 1 que fueron afectados severamente. Los cerdos con lesiones benignas continuaron comiendo, sus movimientos no fueron perjudicados y las lesiones cicatrizaron rápidamente.

El Cuadro 5 resume los resultados de la comprobación de los cerdos en relación al nivel de anticuerpos. De 27 cerdos con ISP entre 0,0–0,9, sólo 11 generalizaron. Por tanto, un bajo valor de seroprotección en un cerdo vacunado no necesariamente indica falta de protección. Los 19 cerdos con ISP $\geq 3,0$ estaban protegidos. Siete cerdos con TMN $\leq 1,4$ generalizaron y 31 de los que tenían valores $\geq 2,5$ estaban protegidos.

La media de los ISP y TMN de los cerdos con lesiones en las 4 patas fue de $0,43 \pm 0,08^9$ y $1,54 \pm 0,16$ respectivamente. Estos valores para los cerdos sin lesiones fueron $3,02 \pm 0,35$ y $2,96 \pm 0,10$ respectivamente. Los ISP y TMN de los cerdos que tenían una o dos patas afectadas fueron más bajos pero no significativamente diferentes de los totalmente protegidos (ISP $2,11 \pm 0,57$ y TMN $2,64 \pm 0,18$).

⁹Media y error típicos de la media.

CUADRO 2. Promedio de los títulos de microneutralización en cerdos a los 30 días después de vacunados con series de diluciones de vacunas antiaftosa con adyuvante oleoso

Dilución de la vacuna	Vacuna 1 (Ultrasonido)			Vacuna 2 (Mecánico)		
	Virus			Virus		
	O	A	C	O	A	C
1:1	$3,2 \pm 0,25^a$	$3,3 \pm 0,22$	$2,7 \pm 0,45$	$\geq 3,5$	$\geq 3,5$	$3,3 \pm 0,22$
1:3	$2,5 \pm 0,54$	$2,2 \pm 0,30$	$2,0 \pm 0,25$	$3,3 \pm 0,22$	$2,9 \pm 0,37$	$2,8 \pm 0,49$
1:9	$1,7 \pm 0,45$	$1,7 \pm 0,53$	$1,6 \pm 0,59$	$3,0 \pm 0,39$	$3,0 \pm 0,36$	$2,6 \pm 0,39$
1:27	$\leq 1,2$	$\leq 1,5$	$\leq 1,2$	$2,2 \pm 0,31$	$2,2 \pm 0,25$	$1,9 \pm 0,39$

^aPromedio y error típico.

CUADRO 3. Respuesta de cerdos vacunados con vacuna de fiebre aftosa con adyuvante oleoso en forma de emulsión doble (Vacuna 1 — ultrasonido) e inoculados con el virus O₁ Campos

Dilución de la vacuna	Suero N°	30 días postvacunación			15 días postinoculación		
		ISP	TMN	Lesiones	ISP	TMN	VIA
1/1	1	≥ 5,3	3,2	Neg.	≥ 5,5	3,3	—
	2	≥ 4,3	2,9	Neg.	≥ 5,5	3,3	—
	3	≥ 5,3	3,0	Neg.	4,8	4,1	—
	4	2,6	3,5	Neg.	≥ 5,5	2,9	—
	5	2,5	3,0	Neg.	2,1	2,3	—
	6	≥ 5,3	3,6	Neg.	≥ 5,5	3,2	—
	7	4,9	3,2	Neg.	≥ 5,5	4,1	—
	8	≥ 5,3	3,2	Neg.	≥ 5,5	2,9	—
1/3	9	0,8	2,9	Neg.	≥ 4,5	2,9	—
	10	1,0	2,9	Neg.	≥ 4,5	3,3	—
	11	0,8	2,3	Neg.	≥ 4,5	2,2	—
	12	0,0	1,7	Neg.	≥ 4,5	2,9	+
	13	0,8	3,2	Neg.	≥ 4,5	2,6	—
	14	0,5	2,6	4 P	≥ 5,5	≥ 3,5	+
	15	0,7	2,9	Neg.	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>
	16	0,0	1,8	Neg.	≥ 4,5	≥ 3,5	+
1/9	17	0,4	1,7	4 P	≥ 5,4	2,9	+
	18	0,4	2,3	Neg.	≥ 5,4	3,3	—
	19	0,7	≤ 1,2	4 P	≥ 5,4	3,3	+
	20	0,9	2,0	2 P	≥ 5,4	3,3	+
	21	0,7	1,8	4 P	≥ 5,4	3,2	+
	22	0,4	≤ 1,2	4 P	≥ 5,4	≥ 3,6	+
	23	1,3	2,4	2 P	≥ 5,4	≥ 3,6	—
	24	0,4	1,5	Neg.	≥ 4,4	3,3	—
1/27	25	0,4	≤ 1,2	4 P	5,4	2,7	+
	26	0,4	≤ 1,2	4 P	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>b</i>
	27	0,4	1,7	Neg.	5,4	≥ 3,5	—
	28	0,0	≤ 1,2	4 P	5,4	3,2	+
	29	0,2	≤ 1,2	4 P	5,4	≥ 3,5	+
	30	0,2	≤ 1,2	4 P	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>b</i>

^aMuertos después de inoculados con virus, no relacionados con FA.

^bMuertos después de inoculados con virus, probablemente debido a FA.

+ = Positivo.

— = Negativo.

ISP = Índice de seroprotección.

TMN = Título de microneutralización.

P = Patas.

CUADRO 4. Respuesta de cerdos vacunados con vacuna de fiebre aftosa con adyuvante oleoso en forma de emulsión doble (Vacuna 2 – mecánico) e inoculados con el virus O₁ Campos

Dilución de la vacuna	Suero N°	30 días postvacunación			15 días postinoculación		
		ISP	TMN	Lesiones	ISP	TMN	VIA
1/1	36	≥ 5,3	≥ 3,5	Neg.	≥ 4,9	≥ 3,5	–
	37	≥ 5,3	≥ 3,5	Neg.	≥ 4,9	3,5	–
	38	≥ 5,3	≥ 3,6	Neg.	≥ 4,9	≥ 4,2	–
	39	≥ 5,3	≥ 3,5	Neg.	≥ 4,9	≥ 3,5	–
	40	≥ 5,3	≥ 3,5	Neg.	≥ 4,9	2,9	–
	41	≥ 5,3	≥ 3,6	Neg.	≥ 4,9	2,7	–
	42	≥ 5,3	3,2	Neg.	≥ 4,9	≥ 3,5	–
1/3	43	4,4	3,0	Neg.	≥ 4,9	≥ 3,5	+
	44	≥ 5,3	3,3	Neg.	≥ 4,9	≥ 3,6	+
	45	2,0	3,2	1 P	≥ 4,9	≥ 3,6	–
	46	≥ 5,3	≥ 3,5	2 P	≥ 4,9	≥ 4,5	+
	47	3,8	3,3	2 P	≥ 4,9	≥ 4,8	+
	48	≥ 5,2	≥ 3,8	Neg.	≥ 4,9	≥ 4,8	–
	49	≥ 5,2	≥ 3,6	Neg.	≥ 4,9	2,9	–
1/9	50	1,0	3,2	Neg.	3,9	3,2	–
	51	1,5	3,0	Neg.	4,4	3,5	+
	52	≤ 0,8	3,0	Neg.	≥ 4,8	3,8	+
	53	2,9	≥ 3,6	Neg.	≥ 5,8	3,2	–
	54	0,9	2,6	Neg.	≥ 4,8	≥ 3,6	–
	55	≥ 5,2	3,2	Neg.	≥ 5,8	≥ 3,9	–
	56	1,5	2,4	1 P	≥ 5,8	2,6	+
1/27	57	1,8	3,2	Neg.	≥ 4,8	≥ 3,6	–
	58	≥ 5,2	3,3	Neg.	≥ 5,8	3,5	–
	59	3,4	2,3	2 P	≥ 5,8	3,3	+
	60	0,4	1,8	Neg.	≥ 4,8	2,9	–
	61	0,4	1,8	Neg.	≥ 4,8	3,2	–
	62	0,2	2,1	2 P	≥ 5,8	≥ 3,5	+
	63	0,9	2,4	4 P	≥ 5,8	≥ 3,6	+
1/27	64	0,6	2,6	1 P	≥ 5,8	≥ 3,5	+

+ = Positivo.

– = Negativo.

CUADRO 5. Lesiones podales en los cerdos inoculados con la cepa de fiebre aftosa O₁ Campos a los 30 días después de vacunados con series de diluciones de vacunas con adyuvante oleoso

Pruebas	Nº de cerdos	Nº de patas afectadas				
		0	1	2	3	4
Índice de Seroprotección						
0,0 – 0,9	27	13	1	2	—	11
1,0 – 1,9	6	4	1	1	—	—
2,0 – 2,9	7	3	1	3	—	—
≥ 3,0	19	19	—	—	—	—
Total	59	39	3	6	0	11
Título de Microneutralización						
≤ 1,4	7	—	—	—	—	7
1,5 – 1,9	8	6	—	—	—	2
2,0 – 2,4	8	2	1	4	—	1
2,5	36	31	2	2	—	1
Total	59	39	3	6	0	11

DISCUSION

Ambas vacunas proporcionaron excelente protección a los cerdos comprobados por una severa prueba por contacto. Sin embargo, la vacuna preparada con el equipo de Silverson tuvo un desempeño ligeramente superior. Otras pruebas son necesarias para demostrar si las diferencias entre las dos técnicas de emulsificación son consistentes.

Es alentador comprobar que las DP₅₀ en cobayos, la seroneutralización, la seroprotección y la prueba de descarga en porcinos utilizadas para determinar la potencia de las vacunas dieron resultados semejantes.

Es importante observar la eficiencia de la exposición por contacto usada en esta experiencia. Los cerdos vacunados, los contactos no vacunados y los donadores de virus fueron mantenidos juntos. Los contactos no vacunados enfermaron severamente y la alta elevación de los niveles de anticuerpos en todos los cerdos con bajos títulos de anticuerpos antes de la comprobación, muestra que todos los animales estuvieron expuestos al virus. Todos los cerdos vacunados con un ISP ≥ 3,0 y 31 de

36 con un TMN ≥ 2,5 estaban completamente protegidos.

En varios de los cerdos con títulos elevados de anticuerpos la replicación del virus fue inhibida, ya que no se detectó la formación de anticuerpos VIA.

De los 22 cerdos que desarrollaron lesiones después de la comprobación, 20 fueron VIA positivos. Sin embargo, sólo 6 de los 38 sin lesiones desarrollaron anticuerpos VIA a los 15 días después de la comprobación. Esta observación es importante pues un alto porcentaje de bovinos que no desarrollan lesiones después de inoculados, se tornan VIA positivos (9). Esta diferencia puede indicar una presentación distinta en la infección subclínica de la fiebre aftosa en bovinos y porcinos.

Uno de los principales problemas que aún permanece sin respuesta es la clasificación de los cerdos con lesiones en una o dos patas, que por lo demás están perfectamente sanos. Gomes (8) observó que aun cerdos convalecientes pueden desarrollar lesiones locales cuando son mantenidos en un ambiente altamente contaminado. Es probable que cerdos con una o dos patas afectadas tengan lesiones locales causadas particularmente por la infección de las abrasiones de la piel y de acuerdo con el nivel de anticuerpos, corresponden más al grupo de los completamente protegidos que al de los generalizados.

REFERENCIAS

1. ALONSO FERNANDEZ, A.; AUGÉ DE MELLO, P.; GOMES, I.; ROSENBERG, F. El uso del antígeno asociado a la infección viral (VIA) en la detección de ganado expuesto al virus de la fiebre aftosa. (The use of virus-infection-associated antigen (VIA) in the detection of cattle exposed to foot-and-mouth disease virus). *Bltm Centro Panamericano Fiebre Aftosa* 17-18: 17-22, 1975.
2. 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 vaccine for pigs. I. Double emulsion vaccine applied by different routes). *Bltm Centro Panamericano Fiebre Aftosa* 31-32: 1-6, 7-12, 1978.
3. AUGÉ DE MELLO, P.; GOMES, I.; ALONSO FERNANDEZ, 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. II. Intraperitoneal vaccination of young pigs with double emulsion vaccine). *Bltn Centro Panamericano Fiebre Aftosa* 31-32: 13-19, 21-27, 1978.
4. BAHNEMANN, H.G. Binary ethylenimine as an inactivant for foot-and-mouth disease virus and its application for vaccine production. *Arch. Virol.* 47: 47-56, 1975.
 5. CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA; DIRECCION DE LUCHA CONTRA LA FIEBRE AFTOSA. Prueba de potencia para vacunas contra la fiebre aftosa de adyuvante oleoso: Ensayos de DP_{50} en cobayos y en bovinos de una vacuna preparada en forma semi-industrial con una emulsión del tipo agua en aceite. (Potency testing of oil adjuvanted foot-and-mouth disease vaccine: PD_{50} assays of semi-industrial water-in-oil type emulsion in guinea pigs and cattle). *Bltn Centro Panamericano Fiebre Aftosa* 29-30: 55-59, 61-65, 1978.
 6. CUNHA, R.G.; BAPTISTA, Jr., J.A.; SERRÃO, U.M.; TORTURELLA, I. El uso de los ratones lactantes en la evaluación de los anticuerpos contra el virus de la fiebre aftosa y su significación inmunológica. *Gac. Vet., B. Aires*, 19 (110): 243-267, 1957.
 7. FERREIRA, M.E.V. Prueba de microneutralización para estudios de anticuerpos de la fiebre aftosa. (Microtiter neutralization test for the study of foot-and-mouth disease antibodies). *Bltn Centro Panamericano Fiebre Aftosa* 21-22: 17-20, 21-24, 1976.
 8. GOMES, I. Fiebre aftosa: Reacción de cerdos convalecientes de la exposición de virus homólogos. (Foot-and-mouth disease: Reaction of convalescent pigs to homologous virus exposure). *Bltn Centro Panamericano Fiebre Aftosa* 26: 15-18, 19-22, 1977.
 9. McVICAR, J.W.; SUTMÖLLER, P. Foot-and-mouth disease: The agar gel diffusion precipitation test for antibody to virus-infection-associated (VIA) antigen as a tool for epizootiologic surveys. *Am. J. Epidem.* 92 (4): 273-278, 1970.

FOOT-AND-MOUTH DISEASE OIL ADJUVANTED VACCINES FOR PIGS. III. IMMUNE RESPONSE OF VACCINES EMULSIFIED BY ULTRASONIC OR MECHANICAL EQUIPMENT¹

Ivo Gomes²; P. Augé de Mello²; A. Alonso Fernández²; Kleise de Freitas Costa²

SUMMARY

The immune response and protection of pigs vaccinated intraperitoneally with double emulsion oil adjuvanted foot-and-mouth disease (FMD) vaccines were evaluated by antibody tests and challenge. One vaccine was prepared with ultrasonic equipment (Vaccine 1) and the other vaccine with a mixer-emulsifier (Vaccine 2). Both vaccines were also evaluated in a guinea pig PD₅₀ test. All systems used indicated that both vaccines were satisfactory but that Vaccine 2 was slightly superior to Vaccine 1.

It was also found that a mouse protection index (MPI) of 3.0 or a neutralization titer of 2.5 indicate a high degree of protection of the pigs. A low MPI not necessarily indicates lack of protection.

Of 22 pigs which developed lesions after exposure, 20 pigs became VIA antibody positive. However, only six of the 38 pigs without lesions developed VIA antibodies at 15 days post-exposure. This observation is noteworthy because a high percentage of vaccinated cattle which do not develop lesions after exposure to virus become VIA antibody positive (9). This difference might indicate a fundamental difference between subclinical FMD infection of cattle and pigs.

INTRODUCTION

In an earlier paper (2) the successful intraperitoneal vaccination of young pigs with inactivated foot-and-mouth disease (FMD) double emulsion oil vaccine was reported. In a further study (3) using similar vaccines by the intraperitoneal route

it was observed that a good correlation existed between antibody levels at 30 days post-vaccination (DPV) and challenge results. It was shown in those experiments that the challenge results were similar with needle or contact exposure.

The present experiments were done to compare double emulsion FMD vaccines prepared with ultrasonic³ or mechanical⁴ emulsification equipment. The results of this study also contribute towards the development of suitable potency assay methods for this type of FMD vaccine in pigs.

MATERIALS AND METHODS

Virus

The FMD virus strains used for vaccine production were O₁ Campos, A Bage, A Venceslau and C₃ Indaial.

All strains used for vaccines production were of bovine origin and had received a maximum of 7 passages in BHK₂₁ cells.

The O₁ Campos virus used for pigs inoculation was of the 11th bovine passages.

Vaccines

The antigens used for the formulation of the vaccines were produced in the vaccine production pilot plant of this Center in roller bottles with BHK₂₁ clone 13 cells. Virus suspensions were inactivated with 0.001 M binary ethyleneimine (BEI) for 24 hours (4).

The characteristics of the antigens are listed in Table 1. Equal volumes of O, A and C antigen suspensions were used in the trivalent suspension

¹This work was made possible in part by a grant from the Instituto Vallée S/A, Uberlandia, MG, Brazil.

²Pan American Foot-and-Mouth Disease Center, PAHO/WHO, Caixa Postal 589, 20000 Rio de Janeiro-RJ, Brazil.

³Minisonic, Ultrasonic Ltd. Otley Road Shipley, West Yorkshire, England.

⁴Silverson Machine (Sales) Ltd., London.

used to formulate the vaccine. The A component consisted of equal volumes of the A Bage and A Venceslau suspensions.

TABLE 1. *Characteristics of the antigens used for the formulation of the vaccines*

Virus	Cell culture infectivity titer/ml	CF ₅₀ ^a titer
O1 Campos	10 ^{6.6}	1:24
A Bage	10 ^{7.6}	1:28
A Venceslau	10 ^{7.4}	1:26
C3 Indaial	10 ^{7.2}	1:16

^aCF = complement fixation test (4 HCF₅₀ as 90 min.).

Vaccine 1: was prepared in a Minisonic apparatus. First, 450 ml of a mixture of 9 parts mineral oil⁵ and one part of mannide monooleate⁶ were emulsified with 450 ml of the trivalent antigen suspension to form a water-in-oil type of suspension (primary emulsion).

This emulsion had similar characteristics as vaccines used in earlier experiments (5). The primary emulsion was re-emulsified with 900 ml PBS, pH 7.4 containing 2% polyoxyethylene 20 sorbitan monooleate⁷ and merthiolate (final concentration 1:30.000 w/v) to form a water-in-oil-in-water type emulsion (double emulsion).

Vaccine 2: was prepared from an identical antigen suspension using a mechanical bench top mixer-emulsifier.

The primary emulsion consisted of 150 ml of the oily phase as described for Vaccine 1 and 150 ml of the trivalent antigen suspension.

For the double emulsion 300 ml of PBS pH 7.4 was added which contained 2% polyoxyethylene 20 sorbitan monooleate and merthiolate 1:30.000.

Guinea pigs potency tests

Dilutions of the vaccines were made in PBS pH

⁵Marcol 52 — Exxon Corporation, USA.

⁶Arlacel A — ICI America Inc., Atlas Chemicals Division.

⁷Tween 80 — ICI America Inc., Atlas Chemical Division.

7.4 (1:3, 1:9 and 1:27). Six guinea pigs, 3-4 months old, weighing 550 ± 50 g each were inoculated by intramuscular route with 0.25 ml of the undiluted vaccines or with the dilutions.

After 30 days the guinea pigs were inoculated intradermalplantar in one foot pad and with 10³ generalizing doses 50% (GD₅₀) of the O₁ Campos strain. The lesions in the non-inoculated foot pads were observed at 5 days after inoculation. The estimation of the GP PD₅₀/0.25 ml of the vaccine prepared with the minisonic apparatus was 9 and for vaccine prepared by mechanical emulsification with the Silverson equipment was 27.

Pig potency test

Two months old recently weaned hybrid Humus-Seghers⁸ pigs of approximately 20 kg were used in this experiment. Groups of 8 pigs were inoculated intraperitoneally with 3 ml of the vaccines or with dilutions similar to those used in the guinea pigs.

At 30 DPV vaccinated animals were placed in contact with two unvaccinated pigs inoculated intraplantar with 10⁴ mouse ID₅₀ of type O₁ Campos virus strain and with 3 unvaccinated contact pigs. The animals were examined on day 10 after the start of the exposure, when the only and final reading of the lesions was made.

Antibodies

Pigs were bled before vaccination at 30 DPV and 15 days after the start of virus exposure.

Antibody assay was done by the mouse protection test (6), microneutralization (7) and by agar gel double diffusion for VIA antibodies (7).

RESULTS

The mean neutralization titers of the sera 30 DPV are listed in Table 2. It can be observed that the O and A antigens induced a better response

⁸Humus Agrícola S/A. Via Armando Salles Oliveira, SP-322 km 356, Pitangueiras, SP, Brasil.

than the C antigen and that the titers observed with the vaccine emulsified with the Silverson equipment (Vaccine 2) are higher than those obtained with the Minisonic apparatus (Vaccine 1). Also, as a rule there is a very consistent antibody titer/dose response.

At challenge one of the inoculated donor pigs died. The other donor pig as well as 3 non-vaccinated contact pigs developed severe FMD. The individual responses of each of the vaccinated pigs for type O₁ virus are listed in Tables 3 and 4. Here, also, the graded decrease in the mouse protection indices (MPI) and microneutralization test (MNT) with diluting the vaccine can be observed, perhaps with the exception of the MPI for the 1:3 group of Vaccine 1. The same dose response can be noted for the development of foot lesions, with exception of the 1:3 group of Vaccine 2, in which 3 pigs had lesions on 1 or 2 feet.

The post-challenge boost of the MPI and MNT indicate that the pigs were well exposed to the challenge virus. It is noteworthy in this connection that a high portion of the pigs which did not develop lesions remained VIA antibody negative at 15 days post-challenge, even though several pigs got a boost of the neutralization titer or MPI.

The pigs with one or two feet affected did not suffer from the disease as did the unvaccinated control pigs or some of the more severely affected pigs in the 1:27 group of Vaccine 1. Pigs with such limited lesions continued to eat, their movements were not impaired and their lesions healed quickly.

Table 5 summarizes the challenge results of the pigs in relation to their antibody response. Of the 27 pigs with an MPI in the 0.0–0.9 range only 11 generalized. Thus, a low MPI of a vaccinated pig not necessarily indicates lack of protection. The 19 pigs with an MPI ≥ 3.0 all were protected. Seven pigs with an MNT ≤ 1.4 generalized and 31 of those with ≥ 2.5 were protected.

The mean MPI and MNT for the pigs with lesions as 4 feet were 0.43 ± 0.08^9 and 1.54 ± 0.16 respectively. These values for the pigs without lesions were 3.02 ± 0.35 and 2.96 ± 0.10 , respectively. The MPI and MNT of the pigs which had 1 or 2 feet affected were lower but not significantly different from those of the fully protected pigs (MPI 2.11 ± 0.57 and MNT 2.64 ± 0.18).

⁹Mean and standard error of the mean.

TABLE 2. Mean serum microneutralization titers of pigs at 30 days after vaccination with dilution series of trivalent oil adjuvanted FMD vaccine

Vaccine dilution	Vaccine 1 (Minisonic)			Vaccine 2 (Silverson)		
	Virus			Virus		
	O	A	C	O	A	C
1:1	3.2 ± 0.25^a	3.3 ± 0.22	2.7 ± 0.45	≥ 3.5	≥ 3.5	3.3 ± 0.22
1:3	2.5 ± 0.54	2.2 ± 0.30	2.0 ± 0.25	3.3 ± 0.22	2.9 ± 0.37	2.8 ± 0.49
1:9	1.7 ± 0.45	1.7 ± 0.53	1.6 ± 0.59	3.0 ± 0.39	3.0 ± 0.36	2.6 ± 0.39
1:27	≤ 1.2	≤ 1.5	≤ 1.2	2.2 ± 0.31	2.2 ± 0.25	1.9 ± 0.39

^aMean and standard deviation.

TABLE 3. *Response of pigs vaccinated with double emulsion FMD oil vaccine No. 1 (Minisonic) and exposure to FMD virus type O₁*

Vaccine dilution	Serum No.	30 days post-vaccination			15 days post-exposure		
		MPI	MNT	Lesions	MPI	MNT	VIA
1/1	1	≥ 5.3	3.2	Neg.	≥ 5.5	3.3	—
	2	≥ 4.3	2.9	Neg.	≥ 5.5	3.3	—
	3	≥ 5.3	3.0	Neg.	4.8	4.1	—
	4	2.6	3.5	Neg.	≥ 5.5	2.9	—
	5	2.5	3.0	Neg.	2.1	2.3	—
	6	≥ 5.3	3.6	Neg.	≥ 5.5	3.2	—
	7	4.9	3.2	Neg.	≥ 5.5	4.1	—
	8	≥ 5.3	3.2	Neg.	≥ 5.5	2.9	—
1/3	9	0.8	2.9	Neg.	≥ 4.5	2.9	—
	10	1.0	2.9	Neg.	≥ 4.5	3.3	—
	11	0.8	2.3	Neg.	≥ 4.5	2.2	—
	12	0.0	1.7	Neg.	≥ 4.5	2.9	+
	13	0.8	3.2	Neg.	≥ 4.5	2.6	—
	14	0.5	2.6	4 F	≥ 5.5	≥ 3.5	+
	15	0.7	2.9	Neg.	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>
	16	0.0	1.8	Neg.	≥ 4.5	≥ 3.5	+
1/9	17	0.4	1.7	4 F	≥ 5.4	2.9	+
	18	0.4	2.3	Neg.	≥ 5.4	3.3	—
	19	0.7	≤ 1.2	4 F	≥ 5.4	3.3	+
	20	0.9	2.0	2 F	≥ 5.4	3.3	+
	21	0.7	1.8	4 F	≥ 5.4	3.2	+
	22	0.4	≤ 1.2	4 F	≥ 5.4	≥ 3.6	+
	23	1.3	2.4	2 F	≥ 5.4	≥ 3.6	—
	24	0.4	1.5	Neg.	≥ 4.4	3.3	—
1/27	25	0.4	≤ 1.2	4 F	5.4	2.7	+
	26	0.4	≤ 1.2	4 F	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>b</i>
	27	0.4	1.7	Neg.	5.4	≥ 3.5	—
	28	0.0	≤ 1.2	4 F	5.4	3.2	+
	29	0.2	≤ 1.2	4 F	5.4	≥ 3.5	+
	30	0.2	≤ 1.2	4 F	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>b</i>

a = Died after exposure to virus, not related to FMD.

b = Died after exposure to virus, likely due to FMD.

+ = Positive.

— = Negative.

MPI = Mouse protection indices.

MNT = Microneutralization test.

F = Feet.

TABLE 4. *Response of pigs vaccinated with double emulsion FMD oil vaccine No. 2 (Silverson) and exposure to FMD virus type O₁*

Vaccine dilution	Serum No.	30 days post-vaccination			15 days post-exposure		
		MPI	MNT	Lesions	MPI	MNT	VIA
1/1	36	≥ 5.3	≥ 3.5	Neg.	≥ 4.9	≥ 3.5	—
	37	≥ 5.3	≥ 3.5	Neg.	≥ 4.9	3.5	—
	38	≥ 5.3	≥ 3.6	Neg.	≥ 4.9	≥ 4.2	—
	39	≥ 5.3	≥ 3.5	Neg.	≥ 4.9	≥ 3.5	—
	40	≥ 5.3	≥ 3.5	Neg.	≥ 4.9	2.9	—
	41	≥ 5.3	≥ 3.6	Neg.	≥ 4.9	2.7	—
	42	≥ 5.3	3.2	Neg.	≥ 4.9	≥ 3.5	—
1/3	43	4.4	3.0	Neg.	≥ 4.9	≥ 3.5	+
	44	≥ 5.3	3.3	Neg.	≥ 4.9	≥ 3.6	+
	45	2.0	3.2	1 F	≥ 4.9	≥ 3.6	—
	46	≥ 5.3	≥ 3.5	2 F	≥ 4.9	≥ 4.5	+
	47	3.8	3.3	2 F	≥ 4.9	≥ 4.8	+
	48	≥ 5.2	≥ 3.8	Neg.	≥ 4.9	≥ 4.8	—
	49	≥ 5.2	≥ 3.6	Neg.	≥ 4.9	2.9	—
1/9	50	1.0	3.2	Neg.	3.9	3.2	—
	51	1.5	3.0	Neg.	4.4	3.5	+
	52	≤ 0.8	3.0	Neg.	≥ 4.8	3.8	+
	53	2.9	≥ 3.6	Neg.	≥ 5.8	3.2	—
	54	0.9	2.6	Neg.	≥ 4.8	≥ 3.6	—
	55	≥ 5.2	3.2	Neg.	≥ 5.8	≥ 3.9	—
	56	1.5	2.4	1 F	≥ 5.8	2.6	+
	57	1.8	3.2	Neg.	≥ 4.8	≥ 3.6	—
1/27	58	≥ 5.2	3.3	Neg.	≥ 5.8	3.5	—
	59	3.4	2.3	2 F	≥ 5.8	3.3	+
	60	0.4	1.8	Neg.	≥ 4.8	2.9	—
	61	0.4	1.8	Neg.	≥ 4.8	3.2	—
	62	0.2	2.1	2 F	≥ 5.8	≥ 3.5	+
	63	0.9	2.4	4 F	≥ 5.8	≥ 3.6	+
	64	0.6	2.6	1 F	≥ 5.8	≥ 3.5	+

+ = Positive.

— = Negative.

TABLE 5. Foot lesions of pigs challenged with *O*₁ type FMD virus 30 days after vaccination with dilution series of oil adjuvanted FMD vaccine

Tests	Number of pigs	Number of feet affected				
		0	1	2	3	4
Mouse protection index						
0.0 — 0.9	27	13	1	2	—	11
1.0 — 1.9	6	4	1	1	—	—
2.0 — 2.9	7	3	1	3	—	—
≥ 3.0	19	19	—	—	—	—
Total	59	39	3	6	0	11
Microneutralization titer						
≤ 1.4	7	—	—	—	—	7
1.5 — 1.9	8	6	—	—	—	2
2.0 — 2.4	8	2	1	4	—	1
2.5	36	31	2	2	—	1
Total	59	39	3	6	0	11

DISCUSSION

Both vaccines gave excellent protection of pigs against severe contact challenge. However, the vaccine prepared with the Silverson equipment was slightly superior in performance. Further tests are needed to show if the difference between the two emulsification techniques is consistent.

It is encouraging that the GP PD₅₀, the neutralization test, the mouse protection test and the challenge test used to estimate the potency of the vaccines all gave this same indication.

It is important to note the efficiency of the contact exposure used in this experiment. The vaccinated pigs, unvaccinated contact pigs and virus donors all were housed together. The unvaccinated contact pigs became severely ill and an antibody boost of all of the pigs with lower pre-challenge titers showed that all animals were well exposed to virus. All vaccinated pigs with MPI ≥ 3.0 and 31 out of 36 with MNT ≥ 2.5 were fully protected.

In several of the pigs with the higher antibody titers virus replication apparently was inhibited to

the extent that VIA antibody formation could not be detected.

Of 22 pigs which developed lesions after exposure 20 pigs became VIA antibody positive. However, only six of the 38 pigs without lesions developed VIA antibodies at 15 days post-exposure. This observation is noteworthy because a high percentage of vaccinated cattle which do not develop lesions after exposure to virus become VIA antibody positive (9). This difference might indicate a fundamental difference between subclinical FMD infection of cattle and pigs.

One of the main problems which still remains to be resolved is the classification of pigs with lesions on one or two feet which remain perfectly healthy otherwise. Gomes (8) already noted that even convalescent pigs can develop local lesions when they are in a heavily contaminated environment. It is likely that pigs with only one or two affected feet have local lesions caused by the infectious skin abrasions, particularly, since according to their antibody responses those pigs more likely belong to the fully protected group than to the group of fully generalized pigs.

REFERENCES

1. ALONSO FERNANDEZ, A.; AUGÉ DE MELLO, P.; GOMES, I.; ROSENBERG, F. El uso del antígeno asociado a la infección viral (VIA) en la detección de ganado expuesto al virus de la fiebre aftosa. (The use of virus-infection-associated antigen (VIA) in the detection of cattle exposed to foot-and-mouth disease virus). *Bltn Centro Panamericano Fiebre Aftosa* 17-18: 17-22, 1975.
2. 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 vaccine for pigs. I. Double emulsion vaccine applied by different routes). *Bltn Centro Panamericano Fiebre Aftosa* 31-32: 1-6, 7-12, 1978.
3. AUGÉ DE MELLO, P.; GOMES, I.; ALONSO FERNANDEZ, 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. II. Intraperitoneal vaccination of young pigs with double emulsion vaccine). *Bltn Centro Panamericano Fiebre*

- Aftosa 31-32*: 13-19, 21-27, 1978.
4. BAHNEMANN, H.G. Binary ethylenimine as an inactivant for foot-and-mouth disease virus and its application for vaccine production. *Arch. Virol.* 47: 47-56, 1975.
 5. CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA; DIRECCION DE LUCHA CONTRA LA FIEBRE AFTOSA. Prueba de potencia para vacunas contra la fiebre aftosa de adyuvante oleoso: Ensayos de DP_{50} en cobayos y en bovinos de una vacuna preparada en forma semi-industrial con una emulsión del tipo agua en aceite. (Potency testing of oil adjuvanted foot-and-mouth disease vaccine: PD_{50} assays of semi-industrial water-in-oil type emulsion in guinea pigs and cattle). *Bltn Centro Panamericano Fiebre Aftosa 29-30*: 55-59, 61-65, 1978.
 6. CUNHA, R.G.; BAPTISTA, Jr., J.A.; SERRÃO, U.M.; TORTURELLA, I. El uso de los ratones lactantes en la evaluación de los anticuerpos contra el virus de la fiebre aftosa y su significación inmunológica. *Gac. Vet., B. Aires*, 19 (110): 243-267, 1957.
 7. FERREIRA, M.E.V. Prueba de microneutralización para estudios de anticuerpos de la fiebre aftosa. (Microtiter neutralization test for the study of foot-and-mouth disease antibodies). *Bltn Centro Panamericano Fiebre Aftosa 21-22*: 17-20, 21-24, 1976.
 8. GOMES, I. Fiebre aftosa: Reacción de cerdos convalecientes de la exposición de virus homólogos. (Foot-and-mouth disease: Reaction of convalescent pigs to homologous virus exposure). *Bltn Centro Panamericano Fiebre Aftosa 26*: 15-18, 19-22, 1977.
 9. McVICAR, J.W.; SUTMÖLLER, P. Foot-and-mouth disease: The agar gel diffusion precipitation test for antibody to virus-infection-associated (VIA) antigen as a tool for epizootiologic surveys. *Am. J. Epidem.* 92 (4): 273-278, 1970.

ANALISIS DE LA RELACION DOSIS/RESPUESTA EN LA VACUNACION ANTIAFTOSA DEL CERDO

J. A. Obiaga¹; A. Alonso Fernández¹

RESUMEN

Con base en modelos de primer orden para las relaciones entre dosis de vacuna y respuestas inmunológicas, se analizaron series de pruebas de vacunas antiaftosa en cerdos en términos de protección al desafío, niveles de anticuerpos circulantes al tiempo del desafío, y presencia de anticuerpos antiVIA 15 días posdesafío. De acuerdo con los modelos, las dos primeras relaciones dosis/respuesta mostrarían pendientes positivas mientras que la última, sería negativa. Los análisis estadísticos confirmaron los resultados esperados mostrando que es posible inmunizar cerdos contra la fiebre aftosa con vacunas de buena calidad y que la protección al desafío, la presencia de anticuerpos antiVIA y los niveles de anticuerpos circulantes específicos están en función de la dosis de inmunógeno aplicada. Esas relaciones indican que la estimación de la potencia de las vacunas puede hacerse siguiendo los diseños comunes de los ensayos biológicos u otros que involucren desafío directo. Los niveles de anticuerpos, aunque muestran correlación significativa con el estado inmunitario de los cerdos, no presentan suficiente validez como para sustituir al desafío directo en la estimación de la potencia de las vacunas.

INTRODUCCION

Si las pruebas biológicas para la estimación de la potencia de las vacunas antiaftosa en cerdos siguen los lineamientos generales de los ensayos biológicos, debe existir una relación directa entre la dosis de vacuna (estímulo) y la respuesta inmunitaria de los cerdos (reactivos biológicos). La respuesta se presenta como una variable dicotomizada artificial-

mente en "protección" y "no protección", variando la interpretación de los resultados según el tipo de desafío con virus aftoso, que constituye el instrumento de medida de la inmunidad. Si el desafío es por inoculación de cierta cantidad de virus—generalmente en la banda coronaria o en el cojinete plantar de un miembro posterior—, la aparición de cualquier lesión específica en cualquier otro punto es considerada como indicativa de no protección (infección o generalización); cuando el desafío es por exposición al contacto con cerdos infectados por inoculación, cualquier animal que no presente lesiones de fiebre aftosa es considerado protegido o resistente. Un método alternativo para la estimación de la potencia de las vacunas sería la determinación de los niveles de anticuerpos específicos circulantes por medio de técnicas de seroneutralización.

Los resultados de la vacunación del cerdo han variado desde los muy pobres, como los obtenidos con algunas vacunas adsorbidas con hidróxido de aluminio—coadyuvadas o no con saponina—(5, 21) hasta los muy buenos producidos con vacunas con adyuvante oleoso (3, 22, 25, 26) o DEAE-dextrano (30) o con dosis grandes de vacuna con hidróxido de aluminio-saponina (10). Algunas comunicaciones afirman que no hay correlación entre el estado inmunitario de los cerdos y los niveles de anticuerpos séricos que presentan en el momento del desafío (9, 18, 29, 30). Por otra parte, Lucam *et al.* (21) afirman que las lesiones presentadas por los cerdos vacunados fuera del sitio de inoculación serían debidas a reinfecciones o reinoculaciones a través de la piel como consecuencia del manipuleo durante las observaciones; estos autores las llaman "lesiones primarias de reinoculación" y no las consideran como secundarias o de generalización. Basado en la discordancia entre los niveles de anticuerpos y la inmunidad en cerdos convalecientes inoculados con el virus homólogo, Gomes (16) sugiere la sustitución de las pruebas de desafío

¹Centro Panamericano de Fiebre Aftosa, OPS/OMS, Caixa Postal 589, 20000 Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

directo por la determinación de los niveles de anticuerpos circulantes para la estimación de la potencia de las vacunas. Otras experiencias (2, 3, 10, 25, 26) indican, por el contrario, que la respuesta inmunológica de los cerdos vacunados está en función de la cantidad y calidad del inmunógeno y que los niveles de anticuerpos están relacionados con la protección. Algunos autores sugieren, todavía, que vacunas coadyuvadas con aceites, que contengan una buena cantidad de inmunógeno, deberían inmunizar mejor y por más tiempo que la propia infección con virus aftoso (4, 23).

En 1966, Cowan y Graves (8) comunicaron la existencia de un antígeno asociado a la infección viral (VIA) que inducía la formación de anticuerpos específicos en animales infectados. McVicar y Suttmoller (24) resaltaron la utilidad potencial de la investigación de anticuerpos antiVIA para seroepidemiología y Alonso Fernández *et al.* (1) usaron la detección de esos anticuerpos para estimar la exposición a la fiebre aftosa del ganado bovino. Gomes *et al.* (17) comunicaron que los cerdos vacunados que estaban protegidos frente al desafío por contacto presentaban menor porcentaje de presencia de anticuerpos antiVIA que los que no estaban protegidos. Sin embargo, el tipo de relación entre vacunación y presencia de sueros VIA positivos (VIA+) luego del desafío no ha sido estudiada.

Este trabajo presenta el análisis estadístico de algunos resultados experimentales de vacunación de cerdos contra la fiebre aftosa (2, 3, 5, 10, 17, 20, 25, 26) siguiendo el modelo teórico delineado en la Fig. 1. Ese modelo implica: a) una relación directa entre la dosis de vacuna y la protección al desafío, b) una relación indirecta entre la dosis de vacuna y la infección consecuente al desafío y, c) una relación directa entre la dosis de vacuna y los niveles de anticuerpos circulantes.

MATERIALES Y METODOS

El sustrato principal de este análisis es el contenido en los Cuadros 3 y 4 del trabajo de Gomes *et al.* (17). La metodología para el cálculo de la potencia de las vacunas y de la estimación de los parámetros de las regresiones dosis/efecto es la indicada por Finney (14, 15) para el análisis de

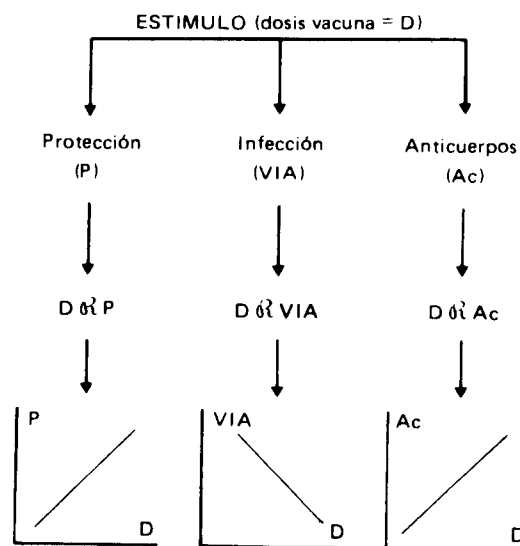


FIGURA 1. Modelo teórico de las relaciones dosis/respuesta producidas por la vacunación antiaftosa en el cerdo

próbit. Las transformaciones usadas fueron: $x = \log$ dosis de vacuna expresada en unidades fijadoras de complemento (UFC) (3, 17²) en nanogramos de virus (25, 26) o en mililitros (10); $Y = \text{próbit}$ porcentaje de protegidos o de VIA+. Para el análisis dosis/nivel de anticuerpos, posible sólo con los datos de Gomes *et al.* (17) se usó $x = \log$ UFC e $Y = \log$ dosis neutralizante 50% (DN_{50}) de los sueros individuales determinados por la microtécnica de seroneutralización descrita por Ferreira (13). Para el análisis de variancia de la regresión dosis/nivel de anticuerpos se usó la metodología encontrada en Ostle (27).

RESULTADOS

Relación dosis/protección

Un análisis preliminar mostró que la potencia de las dos vacunas usadas en el experimento de Gomes *et al.* (17) no difería significativamente ($p = 0,1028...$) y que sus coeficientes de regresión

² La dosis en UFC fue calculada con base en los datos del Cuadro 1 de la Ref. 17.

eran prácticamente paralelos ($p = 0,1687...$) justificando la acumulación de los resultados correspondientes a cada dosis (Cuadro 1).

CUADRO 1. Distribución de la protección según la dosis de antígeno en cerdos desafiados por contacto a los 30 días posvacunación^a

Dosis (UFC) ^b	Vacuna 1	Vacuna 2	Total (1+2)
30,0	8/8 ^c	7/7	15/15
10,0	7/8	5/8	12/16
3,3	2/8	7/8	9/16
1,1	1/6	2/6	3/12
DP ₅₀ (UFC)	4,13	1,54	2,91
L. inf.	2,41	0,37	1,70
L. sup.	7,08	6,44	4,98
a	3,43	4,78	4,19
b	2,55	1,16	1,75
χ^2 (2 gl)	1,787	4,816	1,293

^aTomado de Gomes *et al.* (17).

^bUnidades fijadoras de complemento.

^cProtegidos/total.

La Fig. 2 muestra la regresión dosis/efecto de los resultados acumulados. El análisis de variancia para el paralelismo de las pendientes individuales dio una suma de cuadrados $\chi^2 = 2,077$ que, con 1 grado de libertad (gl) no es significativo; tampoco resultó significativa la suma de cuadrados debida a la heterogeneidad entre los valores experimentales

y los esperados según las regresiones, que dio $\chi^2 = 6,604$ con 3 gl. Los resultados se ajustaron bien al modelo correspondiente propuesto en la Fig. 1.

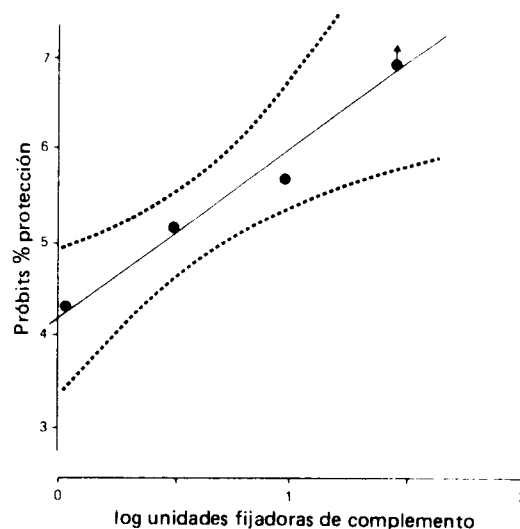


FIGURA 2. Relación dosis de antígeno/protección en cerdos a los 30 días posvacunación. Resultados acumulados por dosis de las Vacunas 1 y 2 (17).

$$\hat{Y} = 4,19 + 1,75x, \quad \chi^2 (2 \text{ gl}) = 1,293.$$

Los resultados de los análisis de las otras pruebas están consignados en el Cuadro 2 y en el Cuadro 3 se muestra el análisis de variancia de las pendientes y la heterogeneidad. Puede observarse que,

CUADRO 2. Comparación y análisis de las pendientes de regresión dosis/respuesta de ocho pruebas de potencia de vacunas anti-aftosa en cerdos

Virus	Vacuna	DE50%	Unidades	Regresión	χ^2	gl	Ref.
C ^a	DEAE-D	10,98	UFC ^b	$\hat{Y} = 3,516 + 1,426x$	0,804	2	(3)
A ^a	O-EP	209,41	ngr	$\hat{Y} = 0,643 + 2,431x$	0,697	1	(25)
O ₁	O-ED	4,13	UFC ^c	$\hat{Y} = 3,431 + 2,547x$	1,787	2	(17)
O ₁	O-ED	1,54	UFC ^c	$\hat{Y} = 4,781 + 1,165x$	4,817	2	(17)
A ₂₂	O-ED	13,49	ngr	$\hat{Y} = 1,390 + 3,194x$	0,058	3	(26)
Asia 1	O-ED	5,36	ngr	$\hat{Y} = 3,456 + 2,119x$	1,404	3	(26)
SAT 2	O-ED	6,96	ngr	$\hat{Y} = 4,076 + 1,096x$	6,846	3	(26)
C ^a	HA	2,39	ml	$\hat{Y} = 4,139 + 2,274x$	1,278	2	(10)

^aSin especificación de subtipo. ^bUnidades fijadoras de complemento: técnica del AVRI, Pirbright, Reino Unido. ^cUnidades fijadoras de complemento: técnica del CPFA.

DEAE-D = dietilaminoetil dextrano; O-EP = oleosa, emulsión primaria; O-ED = oleosa, emulsión doble; HA = hidróxido de aluminio; ngr = nanógramos.

a pesar de que los valores de las pendientes varían desde 1,096 a 3,194, las diferencias no son significativas dando $\chi^2 = 8,757$ con 7 gl. Todas las pendientes fueron significativamente diferentes de cero ($p < 0,05$).

CUADRO 3. *Análisis de los componentes de χ^2 de las regresiones de ocho pruebas de potencia de vacunas antiaftosa en cerdos*

Componente	gl	χ^2	Significación
Heterogeneidad	11	17,691	0,098033...
Paralelismo	7	8,757	0,270576...
Total	18	26,448	0,089947...

Relación dosis/infección

Como criterio de infección se tomó la positividad al VIA de los sueros obtenidos a los 15 días posexposición. Se consideró que la negatividad de los sueros indicaba la ausencia de infección o una infección local y pasajera incapaz de inducir la formación de anticuerpos en cantidades detectables. El Cuadro 4 muestra la distribución de sueros VIA+ y VIA- según la dosis de inmunógeno, la dosis que permitió la presencia de 50% de VIA+ y los parámetros de las regresiones correspondientes a cada vacuna y a la acumulación de resultados por dosis.

CUADRO 4. *Distribución de cerdos VIA(+) y VIA(-) según dosis de antígeno^a*

Dosis (UFC) ^b	Vacuna 1	Vacuna 2	Total (1+2)
30,0	0/8 ^c	0/7	0/15
10,0	3/7	4/8	7/15
3,3	5/8	3/8	8/16
1,1	3/4	4/6	7/10
DP ₅₀ (UFC)	4,6	2,9	3,7
L. inf.	9,7	8,9	7,1
L. sup.	3,1	3,4	4,3
a	6,16	5,53	5,80
b	-1,74	-1,15	-1,40
χ^2 (2 gl)	1,872	3,444	4,802

^aTomado de Gomes *et al.* (17).

^bUnidades fijadoras de complemento.

^cNº VIA(+)/Nº total.

En la Fig. 3 se representa la regresión correspondiente a los resultados acumulados y sus respectivos límites para 95% de confianza. Esta línea se ajusta bien al modelo correspondiente de la Fig. 1. El análisis de variancia mostró que el alejamiento de la linealidad no era significativo ($p > 0,3$); el coeficiente de regresión $b = -1,4$ era significativamente diferente de cero ($p < 0,025$).

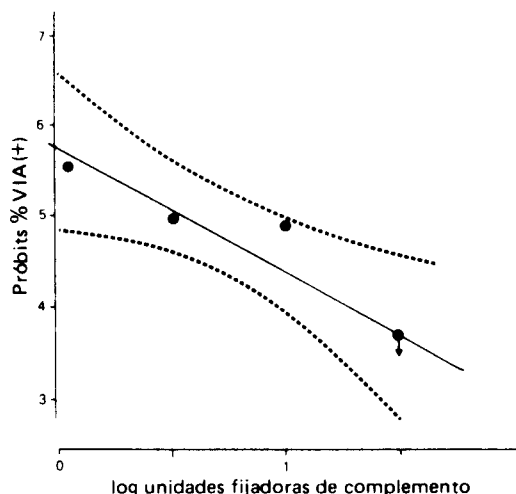


FIGURA 3. *Relación dosis de antígeno/VIA(+) a los 15 días posdesafío en cerdos. Resultados acumulados por dosis de las Vacunas 1 y 2 (17).*

$$\hat{Y} = 5,80 - 1,40x, \quad \chi^2 (2 \text{ gl}) = 4,802.$$

El Cuadro 5 presenta la distribución de cerdos VIA+ y VIA- según su estado de protección. El coeficiente de concordancia $\phi = -0,70$ es significativo a $p < 0,001$, indicando una fuerte correlación negativa entre protección y presencia de anticuerpos antiVIA. Este dato adicional confirma el ajuste de los resultados al modelo teórico correspondiente (Fig. 1).

Relación dosis/niveles de anticuerpos

La correlación dosis (log UFC)/niveles de anticuerpos fue analizada para cada vacuna particular. Para los valores originales de Gomes *et al.* (Ref. 17, cuadros 3 y 4) las pendientes de las regresiones log UFC/DN₅₀ de las Vacunas 1 y 2 diferían significativamente entre ellas $|b_1 - b_2| = 0,882$, $t = 9,91$ ($p < 0,001$) aunque ambas resultaron positivas y diferentes de cero. La gran proporción de valores

indeterminados (iguales o mayores que) correspondientes a las dosis más altas de la Vacuna 2 produjo un marcado alejamiento del modelo lineal: $F_{(2,25)} = 6,06$ ($p < 0,001$) mientras que las $DN_{50} \leq 1,2$ producidas por la dosis menor de la Vacuna 1 no produjeron una falta de ajuste significativa ($p > 0,6$). Luego de expurgar todos los valores indeterminados, lo que significó no considerar ningún valor de la dosis menor de la Vacuna 1 ni aquellos de la dosis mayor de la Vacuna 2, las pendientes para ambas vacunas resultaron casi paralelas $|b_1 - b_2| = 0,211$, $t = 0,17$ y su alejamiento de la linealidad dejó de ser significativo.

CUADRO 5. Distribución de cerdos VIA(+) y VIA(-) según estado de protección^a

VIA	Protegidos		Total
	Si	No	
(+)	6	16	22
(-)	32	2	34
Total	38	18	56

$\phi = -0,70$, $\chi = 24,38$ ($p < 0,001$).

Protección % = 67,9.

VIA(-) % = 60,7.

$t = 1,26$ ($p > 0,1$).

^aTomado de Gomes *et al.* (17).

En el Cuadro 6 se presentan las medias expurgadas de valores indeterminados y el análisis de variancia de los datos agrupados. Como puede verse, la relación de variancia de falta de ajuste a la linealidad no es significativa. La Fig. 4 muestra las regresiones lineares para cada vacuna, calculadas después de la expurgación de los valores indeterminados, que están indicados con flechas.

La correlación entre títulos de anticuerpos y protección a la exposición también fue analizada. Esa correlación, $r_{bp} = 0,53$, $t = 4,73$ con 57 gl, es altamente significativa aunque la distribución de protección sea algo irregular, como puede verse en el Cuadro 7. El Cuadro 8 muestra la sensibilidad y especificidad de varios valores tamiz de DN_{50} para la clasificación de los cerdos en protegidos y no protegidos. El valor que muestra mejor equilibrio es $DN_{50} = 2,6$, al cual corresponde una sensibilidad de 79,5% y una especificidad de 75,0%.

CUADRO 6. Análisis de la regresión dosis de antígeno/nivel de anticuerpos en cerdos 30 DPV contra la fiebre aftosa

Dosis (UFC)	Vacunas	
	1	2
30,0	$3,20 \pm 0,24$	$> 3,50$
10,0	$2,54 \pm 0,55$	$3,20 \pm 0,12$
3,3	$1,95 \pm 0,35$	$2,96 \pm 0,34$
1,1	$< 1,2$	$2,17 \pm 0,33$
a =	1,247	2,213
b =	1,314	1,103
$ b_1 - b_2 = 0,211$, $t = 0,17$ (no significativos)		

Análisis de variancia

Fuente de variación	gl	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	R.V.
Total	41	17,3848	—	—
Regresión	1	5,0805	5,0805	15,87 ^a
Ajuste	2	0,1381	0,0691	0,22 ^b
Error	38	12,1662	0,3202	—

^a $p < ,001$

^bNo significativo.

R.V. = Relación de variancia.

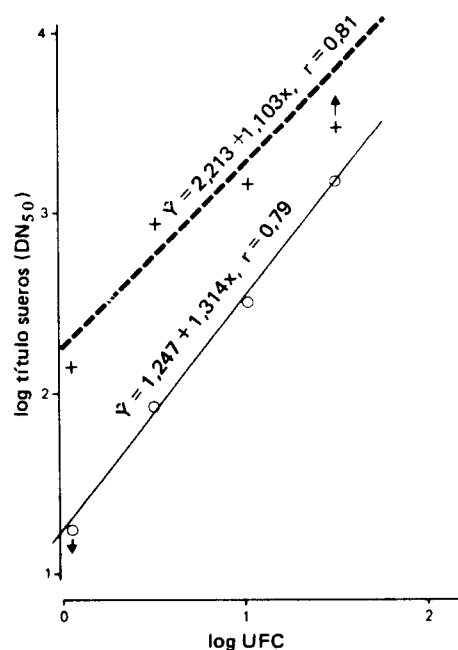


FIGURA 4. Regresión dosis de antígeno/niveles de anticuerpos en cerdos 30 DPV. — = Vacuna 1, - - = Vacuna 2. Las flechas indican valores indeterminados.

CUADRO 7. Distribución de la protección según nivel de anticuerpos en cerdos a los 30 días posvacunación antiaftosa^a

-log DN ₅₀	Protección		Total
	Si	No	
<1,2	0	7	7
1,2 - 1,7	3	1	4
1,8 - 2,3	5	4	9
2,4 - 2,9	5	5	10
3,0 +	26	3	29
Total	39	20	59

$r_{(bp)} = 0,53$, $t_{(57)} = 4,73$ ($p < ,001$).

^aTomado de Gomes *et al.* (17).

CUADRO 8. Sensibilidad y especificidad de algunos valores de seroneutralización para la indicación de cerdos según protección

Valor	Porcentajes	
	Sensibilidad	Especificidad
1,8	92,3	40,0
2,3	81,6	60,0
2,6	79,5	75,0
3,0	66,7	85,0

DISCUSION

El análisis estadístico de los resultados de Gomes *et al.* (17) muestra que hay relaciones significativas entre las variables consideradas y que protección, infección y niveles de anticuerpos se ajustan bien a los modelos teóricos esquematizados en la Fig. 1. De estos análisis y de los realizados con datos encontrados en otras publicaciones, surgen algunos comentarios:

1. La protección en cerdos vacunados, cualquiera que sea el método de desafío (contacto o inoculación) aparece como una variable dependiente de la dosis de inmunógeno administrada; esta dependencia muestra que es posible efectuar pruebas de control de vacunas antiaftosa siguiendo diseños experimentales basados en el desafío directo con virus (dosis protectora 50% u otros). Además, la respuesta aparece como independiente del tipo de co-

adyuvante de la vacuna siempre que el diseño cumpla con requisitos mínimos para el análisis de los ensayos biológicos, como ser la utilización de dosis que produzcan resultados cercanos al 100% y otras cercanas al 0%. Entre los 8 resultados publicados que pudieron ser analizados (Cuadro 2) se encuentran vacunas de hidróxido de aluminio-saponina (10), dietilaminoetil dextrano (3), coadyuvante oleoso en emulsión primaria (25) y en emulsión doble (26) —todas con desafío por inoculación— y emulsión doble (17) desafiadas por contacto. La hipótesis de Lucam *et al.* (21) de que en el cerdo se encontrarían muchas lesiones "primarias de reinoculación" no tendría base y esas lesiones, cualquiera fuera su origen, deberían interpretarse como que las vacunas empleadas, como los propios autores lo sugieren, serían de baja eficacia para el cerdo. También Burrows (7) encontró que las vacunas experimentadas por él no ofrecían buenos resultados y observó que, a pesar de que la mayoría de las lesiones de generalización aparecían en los cerdos vacunados en el segundo y tercer días posdesafío, todavía era dable observar nuevas lesiones hasta el cuarto y quinto días, siendo éstas, generalmente, de carácter leve. Esta descripción coincide con la de Lucam *et al.* (21).

El análisis de los coeficientes de regresión dosis/protección de los resultados de Durand *et al.* (10), Anderson *et al.* (3), Morgan *et al.* (25) y Gomes *et al.* (17) bajo la hipótesis de una pendiente común $b = 1,61$, calculada con las sumas totales de cuadrados ponderados, mostró que las pendientes individuales no diferían significativamente de ella, ni tampoco entre sí; el valor de $\chi^2 = 8,351$ con 7 gl encontrado para verificar la hipótesis de paralelismo no es significativo. Este resultado no es sorprendente dado el pequeño número de animales usados en cada prueba. La variancia de la pendiente, $V(b) = 1/\sum nwx$, es decir, la recíproca de la suma ponderada de cuadrados de log dosis, depende del número de réplicas por dilución (n) y el número de dosis que entran en la prueba (k); como ambos números son pequeños ($n \leq 8$ y $k \leq 5$) las variancias de las pendientes son grandes para cada prueba. Es posible que en ensayos con números mayores de animales por dosis, las pendientes para cada tipo de vacuna, y aún de virus, puedan ser caracterizadas.

Aunque no es el propósito de este trabajo comparar la potencia de vacunas analizadas —lo que resultaría imposible por la diversidad de unidades usadas para expresar la dosis— es oportuno un breve comentario sobre la diferencia de potencia expresada en nanógramos de virus encontrada entre los resultados de Morgan *et al.* (25) y Mowat (26). Este último sugiere que la menor potencia mostrada por el inmunógeno de Morgan *et al.* podría ser debida al almacenamiento por más de 9 meses. Sin embargo, la diferencia en la cantidad de virus usada en el desafío puede haber tenido alguna influencia. Mientras que Mowat desafió sus vacunas con 100 dosis infectantes/cerdo, Morgan *et al.* emplearon 40000 dosis infectantes/ratón lactante. La relación es de alrededor de 1/400 y puede haber influido en los resultados porque el cerdo muestra una clara relación dosis/respuesta con respecto a la cantidad de virus inoculada lo que permite la titulación de virus en esa especie. En este aspecto son concluyentes los trabajos de Graves y Cunliffe (18), Burrows (5, 6, 7) y Thomas *et al.* (28) en cerdos susceptibles y los de Fédida *et al.* (12) en cerdos vacunados. Estos últimos autores presentan tablas de resultados cuyo análisis muestra pendientes dosis/efecto significativas, tanto en cerdos susceptibles como en vacunados ($p < 0,01$). El significado de estos hechos debería ser considerado en el diseño de las pruebas de potencia de vacunas anti-aftosa en cerdos, sea con fines experimentales o de control oficial, para evitar la introducción de variaciones no controlables a las inherentes a las propias pruebas.

2. La distribución de cerdos con sueros VIA+ a los 15 días posdesafío mostró una clara dependencia con respecto a la dosis de vacuna. En ese caso, la relación dosis/respuesta, al ajustarse al modelo previsto, indicó que la vacunación protegió a los animales contra la aparición de lesiones clínicas pero, además, evitó la aparición de infecciones suficientemente extensas y duraderas como para inducir la producción de anticuerpos antiVIA en cantidades detectables. Este hecho está en concordancia con los resultados experimentales de de Leeuw *et al.* (19, 20) que indicaron que cerdos vacunados desafiados por inoculación en aislamientos individuales, mostraban correlación entre la cantidad de virus recogido en la cavidad oral con el nivel de anti-

cuerpos inducidos por la vacuna y el puntaje de lesiones.

Cuando las respuestas pareadas de protección y VIA+ fueron analizadas se encontró un coeficiente de concordancia $\phi = -0,70$ ($\chi^2 = 24,38$, $p < 0,001$) indicando que ambas variables estaban inversamente correlacionadas. Es de notar también, que los valores correspondientes a las dosis efectivas para protección y VIA+ de las vacunas individuales y de los resultados acumulados son muy similares, como también lo son las pendientes respectivas, en valores absolutos, independientemente del signo (Cuadros 1 y 4).

3. Los niveles de anticuerpos circulantes, al mismo tiempo que están correlacionados con la dosis de vacuna, lo están con la protección (Cuadro 7) de acuerdo con los trabajos de otros autores (3, 5, 7, 19, 26). Este hecho estaba implícito en el modelo correspondiente de la Fig. 1. A pesar de esa buena correlación, la validez de la seroneutralización para la clasificación de cerdos en protegidos y no protegidos no es suficientemente buena porque su sensibilidad y su especificidad no son satisfactorias, por lo menos en lo que respecta a la técnica empleada en el trabajo de Gomes *et al.* (17). Tomando $DN_{50} \geq 2,3$ como valor tamiz, la sensibilidad, es decir el porcentaje clasificado como positivo cuando realmente lo era, es de 81,6% y la especificidad —porcentaje clasificado correctamente como negativos— es de 60% lo que significa que un 40% de los cerdos hubieran sido clasificados como protegidos por la seroneutralización mientras que no hubieran estado protegidos frente a la exposición. Si el valor de tamiz es llevado a $DN_{50} \geq 2,6$, la sensibilidad queda en 79,5% mientras que la especificidad mejora, situándose alrededor del 75% (Cuadro 8). Esos porcentajes de sensibilidad y especificidad son comparables con los que se obtienen analizando los datos presentados por Burrows (5) con el método de inhibición metabólica y por de Leeuw *et al.* (19) con una prueba de reducción de placas. Para los datos de Burrows, con un valor $DN_{50} \geq 1,4$, la sensibilidad es de 72,7% y la especificidad del 93,5%, mientras que para $DN_{50} \geq 1,7$ la sensibilidad cae a 40% y la especificidad llega a 100%. El análisis de los datos de de Leeuw *et al.* (19) muestra que existe una buena correlación entre protección y niveles de anticuerpos; esa

correlación es altamente significativa para los cerdos desafiados por inoculación, $r_{bp} = 0,69$, $t = 5,48$ con 33 gl y para los desafiados por contacto es apenas significativa al nivel del 5%: $r_{bp} = 0,35$, $t = 2,15$ con 33 gl. En cuanto a la sensibilidad y la especificidad, los porcentajes obtenidos en las pruebas por inoculación también son mejores que los correspondientes a los de contacto: sensibilidad 84 y 73% respectivamente y especificidad 88 y 58%, tomando un valor de separación $DN_{50} \geq 1,5$. Para los resultados de inoculación y contacto, acumulados, la sensibilidad se ubica en 80% y la especificidad en 70%.

La correlación niveles de anticuerpos/protección, aunque no sea suficientemente válida para sustituir al desafío directo en las pruebas de potencia de vacunas antiaftosa —porque, finalmente, los anticuerpos circulantes son solamente un aspecto parcial de la inmunidad, como lo señalara Cunliffe (9) y la presencia de anticuerpos no siempre significa inmunidad (11)— puede constituir una herramienta de importancia en seroepidemiología una vez que sus errores de clasificación y otras limitaciones sean mejor conocidos.

4. Las relaciones dosis/respuesta analizadas en este trabajo muestran que los cerdos se ajustan a las condiciones generales requeridas por los ensayos biológicos para la estimación de potencia de productos con actividad biológica. Por tanto, debería diseñarse una metodología de control de vacunas para esa especie basada en la protección al desafío directo para satisfacer condiciones mínimas de calidad.

REFERENCIAS

1. ALONSO FERNANDEZ, A.; AUGÉ DE MELLO, P.; GOMES, I.; ROSENBERG, F. The use of virus-infection-associated antigen (VIA) in the detection of cattle exposed to foot-and-mouth disease virus. *Bln Centro Panamericano Fiebre Aftosa* 17-18: 17-22, 1975.
2. ANDERSON, E.C. Some observations on the serological response of pigs to emulsified foot-and-mouth disease vaccine. *Europ. Comm. Control FMD Mtg. Res. Group. Stdg. Techn. Committee, Brescia, Italy*, 1969.
3. ANDERSON, E.C.; MASTERS, R.C.; MOWAT, G.N. Immune response of pigs to inactivated foot-and-mouth disease vaccines. *Res. vet. Sci.* 12: 342-350, 1971.
4. BACHRACH, H.L.; McKERCHER, P.D. Immunology of foot-and-mouth disease in swine: Experimental inactivated-virus vaccines. *J. Am. Vet. med. Assn.* 160: 9-16, 1972.
5. BURROWS, R. The behavior of some modified strains of foot-and-mouth disease virus in pigs. II. Immunogenicity. *Bull. Off. int. Epizoot.* 61: 1277-1293, 1964.
6. BURROWS, R. The infectivity assay of foot-and-mouth disease virus in pigs. *J. Hyg., Camb.*, 64: 419-429, 1966.
7. BURROWS, R. Notes on the results of experiments using inactivated foot-and-mouth disease virus vaccines in pigs. *EUFGD/Mtg. Stdg. Techn. Comm.*, Pirbright, Great Britain, 1966.
8. COWAN, K.M.; GRAVES, J.H. A third antigenic component associated with foot-and-mouth disease infection. *Virology* 30: 528-540, 1966.
9. CUNLIFFE, H.R. Antibody response in a group of swine after infection with foot-and-mouth disease virus. *Can. J. med. vet. Sci.* 26: 182-185, 1962.
10. DURAND, M.; GUILLOTEAU, B.; GIRAUD, M.; GUERCHE, M.; PESSON, M.; PRUNET, P. Étude d'agents alkylants pour l'inactivation des virus aphteux et la préparation d'un nouveau vaccin inactivé. *Bull. Off. int. Epizoot.* 69: 429-465, 1968.
11. FAZEKAS de St. GROTH, S. Neutralization of viruses. *Adv. Virus Res.* 9: 1-116, 1962.
12. FEDIDA, M.; COUDERT, M.; THOMAS, J.-P.; DANNACHER, G.; PEILLON, M.; LUCAM, F. Mesure de l'immunité anti-aphteuse post-vaccinal du porc par épreuve virulente. *Rcl. Méd. Vét.* 147: 309-325, 1972.
13. FERREIRA, M.E.V. Prueba de microneutralización para estudios de anticuerpos de la fiebre aftosa. (Microtiter neutralization test for the study of foot-and-mouth disease antibodies). *Bln Centro Panamericano Fiebre Aftosa* 21-22: 17-20, 21-24, 1976.
14. FINNEY, D.J. Statistical methods in biological assays. Griffin & Co., London, 2nd ed., 1964.
15. FINNEY, D.J. Probit analysis. Cambridge University Press ed., 1971.
16. GOMES, I. Fiebre aftosa: reacción de cerdos convalecientes a la exposición de virus homólogos. (Foot-and-mouth disease: reaction of convalescent pigs to

- homologous virus exposure). *Bltm Centro Panamericano Fiebre Aftosa* 26: 15-18, 19-22, 1977.
17. GOMES, I.; AUGÉ DE MELLO, P.; ALONSO FERNANDEZ, A.; FREITAS COSTA, K. Vacuna anti-aftosa 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). *Bltm Centro Panamericano Fiebre Aftosa* 35-36: 19-25, 27-33, 1979.
18. GRAVES, J.H.; CUNLIFFE, H.R. The infectivity assay of foot-and-mouth disease virus in swine. In: 63th ann. Proc. U.S. Livestock Sanit. Assoc.: 340-345, 1959.
19. LEEUW, P.W. de; TIESSINK, W.A.; FRENKEL, S. Vaccination of pigs with formaldehyde inactivated aluminium hydroxide foot-and-mouth disease vaccines, potentiated with diethylaminoethyl-dextran (DEAE-D). *Zbl. Vet. Med. B* 26: 85-97, 1979.
20. LEEUW, P.W. de; TIESSINK, W.A.; van BEKKUM, J.G. The challenge of vaccinated pigs with foot-and-mouth disease virus. *Zbl. Vet. Med. B* 26: 98-109, 1979.
21. LUCAM, F.; DHENNIN, L.; DHENNIN, L.; FEDIDA, M. Essais de vaccination anti-aftreuse intradermique chez le porc; résultats obtenues au laboratoire. *Bull. Off. int. Épizoot.* 57 (5-6): 924-936, 1962.
22. McKERCHER, P.D.; GAILIUNAS, P. Response of swine to inactivated foot-and-mouth disease vaccine. *Arch. ges. Virusforsch.* 28: 165-176, 1969.
23. McKERCHER, P.D.; GIORDANO, A.R. Foot-and-mouth disease in swine. I. The immune response of swine to chemically-treated and non-treated foot-and-mouth disease virus. *Arch. ges. Virusforsch.* 20: 39-53, 1967.
24. McVICAR, J.W.; SUTMOLLER, P. Foot-and-mouth disease: The agar precipitation test for antibodies to virus-infection associated (VIA) antigen as a tool for epidemiologic surveys. *Am. J. Epid.* 92: 273-278, 1970.
25. MORGAN, D.O.; McKERCHER, P.D.; BACHRACH, H.L. Quantitation of antigenicity and immunogenicity of purified foot-and-mouth disease virus vaccine for swine and steers. *Appl. Microbiol.* 20 (5): 770-774, 1970.
26. MOWAT, G.N. Quantities of purified antigens required to immunize swine against foot-and-mouth disease. *Bull. Off. int. Épizoot.* 77: 887-897, 1972.
27. OSTLE, B. *Statistic in research*. Iowa State University Press, 2nd ed., 1963.
28. THOMAS, J.P.; FEDIDA, M.; COUDERT, M.; DAN-NACHER, G.; PEILON, M.; LUCAM, F. Mise au point d'une méthode de titrage du virus aphteux sur le porc. *Bull. Acad. vét.* 44: 353-357, 1972.
29. WITTMANN, G.; BAUER, K.; MUSSGAY, M. Essais de vaccination de porcs avec des vaccins à base de virus aphteux inactivé. I. Essais avec du virus O inactivé par l'hydroxylamine, le formol, la chaleur et le pH. *Bull. Off. int. Épizoot.* 71: 351-379, 1969.
30. WITTMANN, G.; BAUER, K.; MUSSGAY, M. Experiments on vaccination of pigs with ethyl-ethyl-eneimine (EEI) diethylaminoethyl-Dextran (DEAE-D) foot-and-mouth disease vaccines. Influence of route of inoculation and dose of antigen on the duration of immunity. *Arch. ges. Virusforsch.* 36: 251-264, 1972.

ANALYSIS OF THE DOSE/RESPONSE RELATIONSHIP IN FOOT-AND-MOUTH DISEASE VACCINATION OF PIGS

J. A. Obiaga¹; A. Alonso Fernandez¹

SUMMARY

Based on first-order models for vaccine dose/immunological response relationships, a series of foot-and-mouth disease (FMD) vaccine assays in pigs were analyzed in terms of protection against challenge, levels of circulating antibodies contemporaneous to challenge, and presence of VIA antibodies at 15 days post challenge. According to the models, the first two dose/response relationships would show positive slopes, whereas the last one would be negative. Statistical analysis confirmed the expected results, showing that it is possible to immunize pigs against FMD using good-quality vaccines, and that protection against challenge, presence of VIA antibodies and levels of specific circulating antibodies are functions of the dose of immunogen applied. These relationships indicate that vaccine potency can be estimated by means of the common biological assays or others that involve direct challenge. The antibody levels, although they show a significant correlation with the immune status of pigs, do not present sufficient validity to replace direct challenge in estimating potency.

INTRODUCTION

If the biological assays for estimating the potency of foot-and-mouth disease (FMD) vaccines in pigs follow the general features of biological assays, a direct relationship should exist between the vaccine dose (stimulus) and the pigs' immune response (biological reagents). The response is presented as a variable artificially classed as "protected" and "unprotected"; the interpretation varies according to the type of FMD virus chal-

lenge, which comprises the instrument for immunity measurement. If the challenge is by inoculation of a certain quantity of virus—generally in the coronary band or in the heel bulb of a hind hoof—the appearance of any specific lesions elsewhere is considered as indicating an "unprotected" status (infection or generalization). When the challenge is by exposure through contact with pigs previously infected by inoculation, any animal not exhibiting FMD lesions is considered protected or resistant. An alternative method of estimating vaccine potency would be by determining the specific circulating antibody levels by means of serum neutralization techniques.

The results of pig vaccinations have ranged from very poor, like those obtained with some aluminum hydroxide adsorbed vaccines—saponin coadjuvanted or not—(5, 21) to very good, produced with mineral oil-adjuvanted vaccines (3, 22, 25, 26) or DEAE-Dextran (30), or with large doses of aluminum-hydroxide saponin vaccine (10). Some reports state that there is no correlation between the pigs' immune status and their serum antibody levels when challenged (9, 18, 29, 30). Conversely, Lucam *et al.* (21) state that the lesions exhibited by vaccinated pigs in places other than the point of inoculation would be due to reinfection or reinoculation through the skin as a consequence of handling during observation; these authors call them "primary reinoculation lesions" and do not consider them as either secondary or generalization lesions. Based on the discrepancy between antibody levels and immunity in convalescent pigs inoculated with the homologous virus, Gomes (16) suggests that determination of the circulating antibody levels could replace the direct challenge test as a means of vaccine potency estimation. On the other hand, other experiments (2, 3, 10, 25, 26) indicate that the vaccinated pigs' immunological response is a function of the quantity and quality of the immunogen, and that

¹Pan American Foot-and-Mouth Disease Center, PAHO/WHO, Caixa Postal 589, 20000 Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

there is a correlation between antibody levels and protection. Other authors even suggest that oil-adjuvanted vaccines containing an appreciable quantity of immunogen should provide better and longer-lasting immunization than through infection with FMD virus (4, 23).

In 1966, Cowan and Graves (8) reported the existence of a virus-infection-associated (VIA) antigen that induced the formation of specific antibodies in infected animals. McVicar and Suttmöller (24) emphasized the potential usefulness of VIA antibodies research for serological epidemiology. Alonso Fernandez *et al.* (1) used the detection of these antibodies to estimate cattle exposure to FMD. Gomes *et al.* (17) reported that vaccinated pigs that were protected against challenge by contact showed a lower percentage of VIA antibodies than unprotected pigs. However, the type of relationship between vaccination and presence of positive VIA sera (VIA+) immediately after challenge has not been studied.

This work presents the statistical analysis of several experimental results of pig vaccination against FMD (2, 3, 5, 10, 17, 20, 25, 26), following the theoretical model outlined in Figure 1.

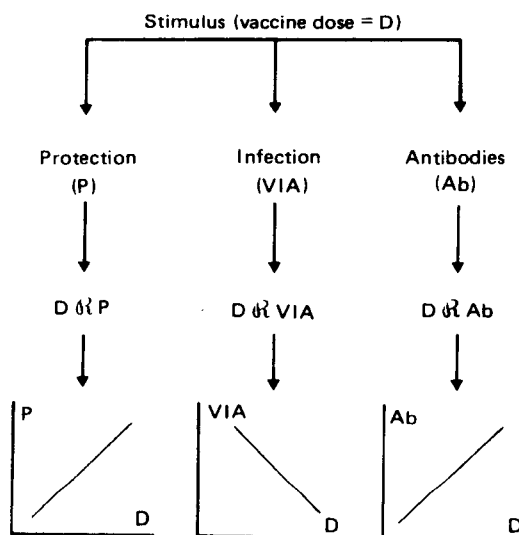


FIGURE 1. Theoretical model of dose/response relationships produced by FMD vaccination in pigs.

The model implies: (a) a direct relationship between vaccine dose and protection against challenge; (b) an indirect relationship between vaccine dose and infection after challenge, and; (c) a direct relationship between vaccine dose and levels of circulating antibodies.

MATERIALS AND METHODS

The main substratum of this analysis is the content of Tables 3 and 4 of the work by Gomes *et al.* (17). The methodology for calculating the vaccines' potency and estimating the parameters of the dose/effect regression is as indicated by Finney (14, 15) for the probit analysis. The transformations used were: $x = \log$ vaccine dose expressed in complement fixing units (CFU) (3, 17²) in virus nanograms (25, 26) or in milliliters (10); $Y = \text{probit percentage of protected or VIA+}$. For the dose/antibody level study, with the data presented by Gomes *et al.* (17), the following was used: $x = \log$ CFU and $Y = \log$ neutralizing dose 50% (ND₅₀) of the individual sera determined through the micro-titer neutralization test described by Ferreira (13). The methodology proposed by Ostle (27) was utilized for the analysis of variance of the dose/antibody level regression.

RESULTS

Dose/protection relationship

A preliminary analysis showed that the potency of the two vaccines used in the experiment by Gomes *et al.* (17) did not differ significantly ($p = 0.1028 \dots$) and that the coefficients of regression were practically parallel ($p = 0.1687 \dots$), which justified the pooling of the results corresponding to each dose (Table 1).

Figure 2 illustrates the dose/response regression of the pooled results. The variance analysis for the parallelism of the individual slopes yielded a sum of squares $\chi^2 = 2.077$ which, with one degree of freedom (df), is not significant; likewise, the sum of squares ($\chi^2 = 6.604$ with 3 df) due to the heterogeneity between the experimental values

²Calculation of the CFU dose was based on the data in Table 1, Reference 17.

and those forecast according to the regressions was not significant either. The results fitted well to the corresponding model proposed in Figure 1.

TABLE 1. Distribution of protection according to antigen dose in pigs challenged by contact at 30 days post-vaccination^a

Dose (CFU) ^b	Vaccine 1	Vaccine 2	Total (1+2)
30.0	8/8 ^c	7/7	15/15
10.0	7/8	5/8	12/16
3.3	2/8	7/8	9/16
1.1	1/6	2/6	3/12
PD ₅₀ (CFU)	4.13	1.54	2.91
Lower limit	2.41	0.37	1.70
Upper limit	7.08	6.44	4.98
a	3.43	4.78	4.19
b	2.55	1.16	1.75
χ^2 (2 d.f.)	1.787	4.816	1.293

^aTaken from Gomes *et al.* (17).

^bComplement fixing units.

^cProtection/total.

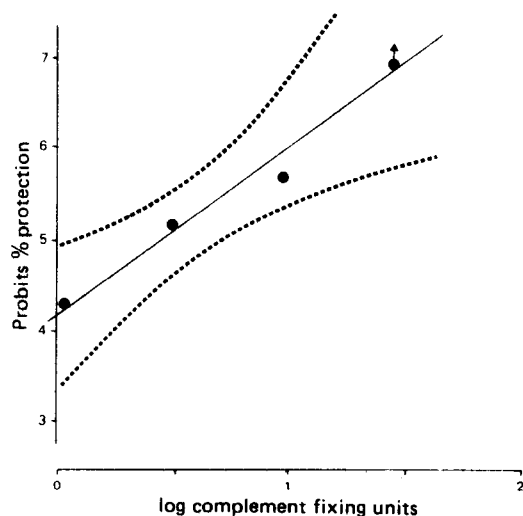


FIGURE 2. Antigen dose/protection relationship in pigs at 30 days post vaccination. Cumulative results per dose of Vaccines 1 and 2 (17).

$$\hat{Y} = 4.19 + 1.75x, \chi^2 (2 \text{ d.f.}) = 1.293.$$

The results of the analyses of the other assays are given in Table 2; the slope variance comparison and heterogeneity are shown in Table 3. It can be observed that although the values of the slopes vary from 1.096 to 3.194, the differences are not significant and yield $\chi^2 = 8.757$ with 7 df. All the slopes differed significantly from zero ($p < 0.05$).

Dose/infection relationship

As a criterion of infection the positivity of sera to the VIA antigen at 15 days post exposure was taken. The negativity of the sera was considered as indicating either the absence of infection or a local, transient infection incapable of inducing the formation of detectable quantities of antibodies. Table 4 shows the distribution of VIA+ and VIA- sera according to the immunogen dose, the vaccine dose that permitted the presence of 50% VIA+ and the regression parameters corresponding to each vaccine and to the per-dose pooled results.

Figure 3 illustrates the regression corresponding to the cumulative results and their respective limits for 95% reliability. This line fits well into the corresponding model in Figure 1. The variance analysis showed that the departure from linearity was not significant ($p > 0.3$), whereas the coefficient of regression $b = -1.4$ differed significantly from zero ($p < 0.025$).

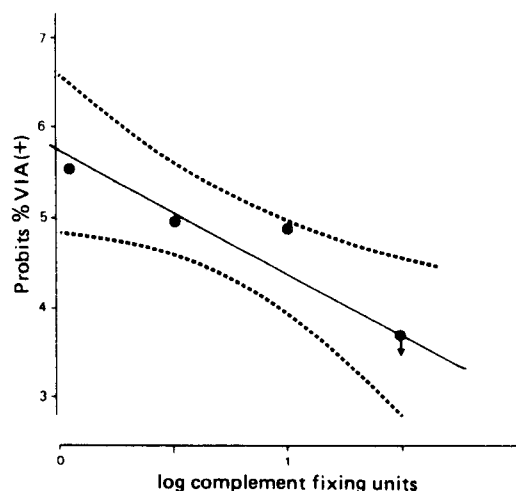


FIGURE 3. Antigen dose/VIA(+) relationship at 15 days post challenge in pigs. Cumulative results per dose of Vaccines 1 and 2 (17).

$$\hat{Y} = 5.80 - 1.40x, \chi^2 (2 \text{ d.f.}) = 4.802.$$

TABLE 2. Comparison and analysis of dose/response regression slopes in eight potency tests of FMD vaccines in pigs

Virus	Vaccine	ED50%	Units	Regression	χ^2	d.f.	Ref.
C ^a	DEAE-D	10.98	CFU ^b	$\hat{Y} = 3.516 + 1.426x$	0.804	2	(3)
A ^a	O-PE	209.41	ngr	$\hat{Y} = 0.643 + 2.431x$	0.697	1	(25)
O ₁	O-DE	4.13	CFU ^c	$\hat{Y} = 3.431 + 2.547x$	1.787	2	(17)
O ₁	O-DE	1.54	CFU ^c	$\hat{Y} = 4.781 + 1.165x$	4.817	2	(17)
A ₂₂	O-DE	13.49	ngr	$\hat{Y} = 1.390 + 3.194x$	0.058	3	(26)
Asia 1	O-DE	5.36	ngr	$\hat{Y} = 3.456 + 2.119x$	1.404	3	(26)
SAT 2	O-DE	6.96	ngr	$\hat{Y} = 4.076 + 1.096x$	6.846	3	(26)
C ^a	AH	2.39	ml	$\hat{Y} = 4.139 + 2.274x$	1.278	2	(10)

^aSubtype not indicated.

^bComplement fixing units; AVRI technique, Pirbright, United Kingdom.

^cComplement fixing units; PAFMDC technique.

DEAE-D = Diethylaminoethyl-Dextran; O-PE = oil, primary emulsion; O-DE = oil, double emulsion; AH = aluminum hydroxide; ngr = nanograms.

TABLE 3. Analysis of the regression χ^2 components of eight potency tests of FMD vaccines in pigs

Component	d.f.	χ^2	Significance
Heterogeneity	11	17.691	0.098033...
Parallelism	7	8.757	0.270576...
Total	18	26.448	0.089947...

TABLE 4. Distribution of VIA(+) and VIA(-) pigs according to antigen dose^a

Dose (CFU) ^b	Vaccine 1	Vaccine 2	Total (1+2)
30.0	0/8 ^c	0/7	0/15
10.0	3/7	4/8	7/15
3.3	5/8	3/8	8/16
1.1	3/4	4/6	7/10
PD ₅₀ (CFU)	4.6	2.9	3.7
Lower limit	9.7	8.9	7.1
Upper limit	3.1	3.4	4.3
a	6.16	5.53	5.80
b	-1.74	-1.15	-1.40
χ^2 (2 d.f.)	1.872	3.444	4.802

^aTaken from Gomes *et al.* (17).

^bComplement fixing units.

^cNo. VIA(+)/No. total.

Table 5 indicates the distribution of VIA+ and VIA- pigs according to their immune status. The coefficient of concordance $\phi = -0.70$ is significant at $p < 0.001$, indicating a strong negative correlation between protection and presence of antibodies to VIA antigen. This additional data confirms that the results fit the corresponding theoretical model (Figure 1).

TABLE 5. Distribution of VIA(+) and VIA(-) pigs according to protection^a

VIA	Protection		Total
	Yes	No	
(+)	6	16	22
(-)	32	2	34
Total	38	18	56

$\phi = -0.70$, $\chi = 24.38$ ($p < 0.001$).

Protection % = 67.9.

VIA(-) % = 60.7.

$t = 1.26$ ($p > 0.1$).

^aTaken from Gomes *et al.* (17).

Dose/antibody level relationship

The dose (log CFU)/antibody levels correlation was analyzed for each particular vaccine. For

Gomes *et al.* original values (Ref. 17, Tables 3 and 4) the log CFU/ND₅₀ regressions slopes of Vaccines 1 and 2 differed significantly between themselves $|b_1 - b_2| = 0.882$, $t = 9.91$ ($p < 0.001$), although both are positive and different from zero. The large proportion of indeterminate values (equal to or greater than) corresponding to the highest doses of Vaccine 2 produced a marked departure from the linear model: $F_{(2,25)} = 6.06$ ($p < 0.001$) whereas the ND₅₀ ≤ 1.2 produced by the lower dose of Vaccine 1 did not produce a significant lack of fit ($p > 0.6$). After sorting out all the indeterminate values, which meant disregarding all Vaccine 1 lower dose values and all Vaccine 2 higher dose values, the slopes for both vaccines turned out to be almost parallel $|b_1 - b_2| = 0.211$, $t = 0.17$ and their departure from linearity ceased to be significant.

Table 6 lists the expurgated means of indeterminate values and the analysis of the pooled data. It can be seen that the ratio of variance for the lack of fit to linearity is not significant. Figure 4 shows the linear regressions for each vaccine calculated after expurgating the indeterminate values (indicated by arrows).

TABLE 6. Analysis of regression
antigen dose/antibody levels in pigs
at 30 DPV against FMD

<i>Dose</i>	Vaccines			
(CFU)	1	2		
30.0	3.20 ± 0.24	> 3.50		
10.0	2.54 ± 0.55	3.20 ± 0.12		
3.3	1.95 ± 0.35	2.96 ± 0.34		
1.1	< 1.2	2.17 ± 0.33		
a =	1.247	2.213		
b =	1.314	1.103		
b ₁ - b ₂ = 0.211, t = 0.17 (not significant)				
Analysis of variance				
Source of variation	d.f.	Sum of squares	Mean of squares	R.V.
Total	41	17.3848	—	—
Regression	1	5.0805	5.0805	15.87 ^a
Fit of results	2	0.1381	0.0691	0.22 ^b
Error	38	12.1662	0.3202	—

^a $p < .001$.

^bNot significant.

R.V. = Ratio of variance.

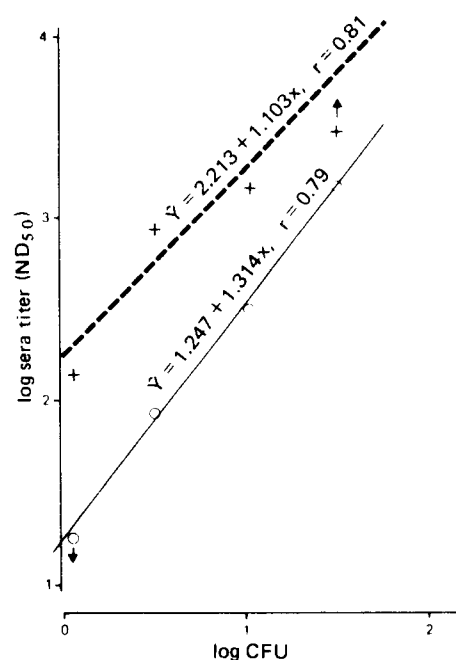


FIGURE 4. Antigen dose/antibody levels regression in pigs at 30 days post-vaccination. — = Vaccine 1, --- = Vaccine 2. Indeterminate values are indicated by arrows.

The correlation between antibody titers and protection to exposure was also studied. That correlation ($r_{bp} = 0.53$, $t = 4.73$ with 57 df) is highly significant although, as seen in Table 7, the distribution of protection is somewhat irregular.

TABLE 7. Distribution of protection according to
antibody levels in pigs at 30 DPV against FMD^a

-log ND ₅₀	Protection		Total
	Yes	No	
<1.2	0	7	7
1.2 - 1.7	3	1	4
1.8 - 2.3	5	4	9
2.4 - 2.9	5	5	10
3.0 +	26	3	29
Total	39	20	59

$r_{(bp)} = 0.53$, $t_{(57)} = 4.73$ ($p < .001$).

^aTaken from Gomes *et al.* (17).

Table 8 illustrates the sensitivity and specificity of several ND_{50} screening values for classifying the pigs as either "protected" or "unprotected". $ND_{50} = 2.6$ is the value showing the best equilibrium, corresponding to a sensitivity of 79.5% and a specificity of 75.0%.

TABLE 8. Sensitivity and specificity of some values of serum neutralization to indicate protected pigs

Value	Percentages	
	Sensitivity	Specificity
1.8	92.3	40.0
2.3	81.6	60.0
2.6	79.5	75.0
3.0	66.7	85.0

DISCUSSION

Statistical analysis of the results presented by Gomes *et al.* (17) shows that there are significant relationships among the variables considered, and that protection, infection and antibody levels fit well to the theoretical models shown in Figure 1. Those analyses and others conducted with data found in other publications lead to several observations:

1. Protection in vaccinated pigs, regardless of the method of challenge employed (contact or inoculation), appears as a variable dependent on the immunogen dose administered; this dependency shows that it is possible to conduct FMD vaccine control tests following experimental designs based on direct virus challenge (50% protective dose or others). Moreover, the response appears to be independent of the type of vaccine adjuvant whenever the design complies with minimum requirements for the analysis of the biological assays such as the utilization of doses yielding results close to 100% and others near 0%. The 8 published results that were analyzed (Table 2) included the following vaccines: aluminum hydroxide-saponin (10), diethylaminoethyl dextran (3), primary emulsion oil-adjuvanted (25) and double emulsion (26) oil-adjuvanted vaccines—all with challenge by inoculation—and double-emulsion vaccines (17) challenged through contact. The assumption of

Lucam *et al.* (21) that many "primary reinoculations" lesions would appear in the pig would be baseless and such lesions, regardless of their origin, should be interpreted as being due to vaccines of low efficacy for pigs, as the authors themselves suggest. Burrows (7) also found that the vaccines he tested did not yield good results and also observed that although most of the generalization lesions appeared in the vaccinated pigs on the second and third days after challenge, new lesions could be observed up to the fourth and fifth days post challenge. These new lesions were usually minor. This description coincides with that reported by Lucam *et al.* (21).

Analysis of the dose/response regression coefficients in the results presented by Durand *et al.* (10), Anderson *et al.* (3), Morgan *et al.* (25) and Gomes *et al.* (17), under the assumption of a common slope $b = 1.61$ calculated from the total sums of weighted squares, showed that the individual slopes did not differ significantly from it, nor among themselves; the value of $\chi^2 = 8.351$ with 7 df, found to verify the assumption of parallelism, is not significant. Given the small number of animals used in each assay, this result is not surprising. The variance of the slope $V(b) = 1/\sum nwx$, i.e., the reciprocal of the weighted sum of squares of x (log dose), depends on the number of replicates per dose (n) and the number of doses in the assay (k); because both figures are small ($n \leq 8$ and $k \leq 5$), the slope variances are large for each assay. It is possible that the slopes for each vaccine type, and even each virus type, can be characterized in assays with larger numbers of animals per dose.

Although the scope of this study is not to compare the potency of vaccines analyzed—an impossibility because of the diversity of units used to express a dose—a short comment is in order on the potency difference expressed in virus nanograms and found between the results reported by Morgan *et al.* (25) and by Mowat (26). The latter suggests that the lower potency shown by the Morgan *et al.* immunogen could be due to its being stored for more than 9 months. However, the difference in the quantity of virus used in the challenge may have had some influence; whereas Mowat challenged his pigs with 100 infective doses/pig, Morgan *et al.* used 40,000 infective doses/suckling

mouse. The ratio is about 1/400 and may have influenced the results because pigs show a clear dose/response relationship with respect to the quantity of virus inoculated, which permits the titration of virus in that species. The studies by Graves and Cunliffe (18), Burrows (5, 6, 7) and Thomas *et al.* (28) on susceptible pigs, and those by Fedida *et al.* (12) on vaccinated pigs, are conclusive in this respect. The latter authors present Tables of results whose analysis reveals significant dose/response slopes in both susceptible and vaccinated pigs ($p < 0.01$). The significance of these facts should be considered in the design of FMD vaccine potency tests in pigs, whether for experimental or official control purposes, in order to prevent adding uncontrollable variations to those inherent in the tests themselves.

2. The distribution of pigs with VIA+ sera at 15 days post challenge indicated a clear dependency on the vaccine dose. In that case, when the dose/response relationship fitted the forecast model, it indicated that the vaccine not only protected the animals against the appearance of clinical lesions, but also prevented the appearance of infections that were long-lasting and extensive enough to induce the production of detectable quantities of VIA antibodies. This fact is in agreement with the experimental results reported by de Leeuw *et al.* (19, 20), who found that individually isolated vaccinated pigs challenged by inoculation showed a correlation between the quantity of virus collected in the oral cavity and the level of antibodies induced by the vaccine and the score of lesions.

Analysis of the paired protection and VIA+ responses disclosed a coefficient of concordance $\phi = -0.70$ ($\chi^2 = 24.38$, $p < 0.001$), which indicated that both variables were inversely correlated. It is likewise noteworthy that the values corresponding to the effective doses for protection and VIA+ of the individual vaccines and of the pooled results are very similar, as are the respective slopes, in absolute values regardless of the sign (Tables 1 and 4).

3. As well as being correlated with the vaccine dose, the circulating antibody levels are also positively correlated with protection (Table 7), according to other authors (3, 5, 7, 19, 26). This fact was implicit in the corresponding model in Figure 1. In

spite of that good correlation, the validity of serum neutralization for classifying pigs in protected and unprotected categories is not good enough because it lacks satisfactory sensitivity and specificity, at least with respect to the technique utilized in the study by Gomes *et al.* (17). Taking $ND_{50} \geq 2.3$ as the screening value, the sensitivity—the percentage of pigs classed as positive and actually protected—is 81.6%, while the specificity—the percentage correctly classed as negative—is 60%; this means that some 40% of the pigs would have been classified as protected by serum neutralization whereas they actually had not been protected. If the screening value is raised to $ND_{50} \geq 2.6$, the sensitivity remains at 79.5%, whereas the specificity improves to about 75% (Table 8). These sensitivity and specificity percentages are comparable with those obtained from analyzing the data presented by Burrows (5) with the metabolic inhibition test and by de Leeuw *et al.* (19) with a plaque reduction assay. For Burrows' data, a screening value of $ND_{50} \geq 1.4$ yields 72.7% sensitivity and 93.5% specificity, while sensitivity drops to 40% and specificity reaches 100% for $ND_{50} \geq 1.7$. Analysis of the de Leeuw *et al.* (19) data shows good correlation between protection and antibody levels; that correlation is highly significant for the pigs challenged by inoculation ($r_{bp} = 0.69$, $t = 5.48$ with 33 df), while for animals challenged through contact it is only significant at the 5% level ($r_{bp} = 0.35$, $t = 2.15$, with 33 df). With respect to sensitivity and specificity, the percentages obtained in the inoculation assays are also better than the contact values: sensitivity 84% and 73% respectively, and specificity 88% and 58%, for $ND_{50} \geq 1.5$ screening values. The pooled inoculation and contact results are 80% sensitivity and 70% specificity.

The antibody level/protection correlation, even though not valid enough to substitute direct challenge in FMD potency tests—because, in the final analysis, circulating antibodies are only a partial aspect of immunity (as pointed out by Cunliffe (9) and the presence of antibodies does not always mean immunity (11)—may nevertheless be an important tool in serological epidemiology once its classification errors and other limitations are more accurately known.

4. The dose/response relationships analyzed herein show that pigs fit the general conditions required for biological assays for estimating the potency of biologically active products. Therefore, a vaccine control method designed for that species should be based on direct challenge protection to satisfy minimum quality conditions.

REFERENCES

1. ALONSO FERNANDEZ, A.; AUGÉ DE MELLO, P.; GOMES, I.; ROSENBERG, F. The use of virus-infection-associated antigen (VIA) in the detection of cattle exposed to foot-and-mouth disease virus. *Bltn Centro Panamericano Fiebre Aftosa* 17-18: 17-22, 1975.
2. ANDERSON, E.C. Some observations on the serological response of pigs to emulsified foot-and-mouth disease vaccine. *Europ. Comm. Control FMD Mtg. Res. Group. Stdg. Techn. Committee, Brescia, Italy*, 1969.
3. ANDERSON, E.C.; MASTERS, R.C.; MOWAT, G.N. Immune response of pigs to inactivated foot-and-mouth disease vaccines. *Res. vet. Sci.* 12: 342-350, 1971.
4. BACHRACH, H.L.; McKERCHER, P.D. Immunology of foot-and-mouth disease in swine: Experimental inactivated-virus vaccines. *J. Am. Vet. med. Assn.* 160: 9-16, 1972.
5. BURROWS, R. The behavior of some modified strains of foot-and-mouth disease virus in pigs. II. Immunogenicity. *Bull. Off. int. Épizoot.* 61: 1277-1293, 1964.
6. BURROWS, R. The infectivity assay of foot-and-mouth disease virus in pigs. *J. Hyg., Camb.*, 64: 419-429, 1966.
7. BURROWS, R. Notes on the results of experiments using inactivated foot-and-mouth disease virus vaccines in pigs. *EUFMD/Mtg. Stdg. Techn. Comm.*, Pirbright, Great Britain, 1966.
8. COWAN, K.M.; GRAVES, J.H. A third antigenic component associated with foot-and-mouth disease infection. *Virology* 30: 528-540, 1966.
9. CUNLIFFE, H.R. Antibody response in a group of swine after infection with foot-and-mouth disease virus. *Can. J. med. vet. Sci.* 26: 182-185, 1962.
10. DURAND, M.; GUILLLOTEAU, B.; GIRAUD, M.; GUERCHE, M.; PESSON, M.; PRUNET, P. Étude d'agents alkylants pour l'inactivation des virus aphteux et la préparation d'un nouveau vaccin inactivé. *Bull. Off. int. Épizoot.* 69: 429-465, 1968.
11. FAZEKAS de St. GROTH, S. Neutralization of viruses. *Adv. Virus Res.* 9: 1-116, 1962.
12. FEDIDA, M.; COUDERT, M.; THOMAS, J.-P.; DANNACHER, G.; PEILLON, M.; LUCAM, F. Mesure de l'immunité anti-aphteuse post-vaccinal du porc par épreuve virulente. *Rcl. Méd. Vét.* 147: 309-325, 1972.
13. FERREIRA, M.E.V. Prueba de microneutralización para estudios de anticuerpos de la fiebre aftosa. (Microtiter neutralization test for the study of foot-and-mouth disease antibodies). *Bltn Centro Panamericano Fiebre Aftosa* 21-22: 17-20, 21-24, 1976.
14. FINNEY, D.J. Statistical methods in biological assays. Griffin & Co., London, 2nd ed., 1964.
15. FINNEY, D.J. Probit analysis. Cambridge University Press ed., 1971.
16. GOMES, I. Fiebre aftosa: reacción de cerdos convalecientes a la exposición de virus homólogos. (Foot-and-mouth disease: reaction of convalescent pigs to homologous virus exposure). *Bltn Centro Panamericano Fiebre Aftosa* 26: 15-18, 19-22, 1977.
17. GOMES, I.; AUGÉ DE MELLO, P.; ALONSO FERNANDEZ, A.; FREITAS COSTA, K. Vacuna anti-aftosa 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). *Bltn Centro Panamericano Fiebre Aftosa* 35-36: 19-25, 27-33, 1979.
18. GRAVES, J.H.; CUNLIFFE, H.R. The infectivity assay of foot-and-mouth disease virus in swine. In: 63th ann. Proc. U.S. Livestock Sanit. Assoc.: 340-345, 1959.
19. LEEUW, P.W. de; TIESSINK, W.A.; FRENKEL, S. Vaccination of pigs with formaldehyde inactivated aluminium hydroxide foot-and-mouth disease vaccines, potentiated with diethylaminoethyl dextran (DEAE-D). *Zbl. Vet. Med. B* 26: 85-97, 1979.
20. LEEUW, P.W. de; TIESSINK, W.A.; van BEKKUM, J.G. The challenge of vaccinated pigs with foot-and-mouth disease virus. *Zbl. Vet. Med. B* 26: 98-109, 1979.
21. LUCAM, F.; DHENNIN, L.; DHENNIN, L.; FEDIDA, M. Essais de vaccination anti-aphteuse intradermique chez le porc; résultats obtenus au laboratoire. *Bull. Off. int. Épizoot.* 57 (5-6): 924-936, 1962.

-
22. McKERCHER, P.D.; GAILIUNAS, P. Response of swine to inactivated foot-and-mouth disease vaccine. *Arch. ges. Virusforsch.* 28: 165-176, 1969.
 23. McKERCHER, P.D.; GIORDANO, A.R. Foot-and-mouth disease in swine. I. The immune response of swine to chemically-treated and non-treated foot-and-mouth disease virus. *Arch. ges. Virusforsch.* 20: 39-53, 1967.
 24. McVICAR, J.W.; SUTMÖLLER, P. Foot-and-mouth disease: The agar precipitation test for antibodies to virus-infection associated (VIA) antigen as a tool for epidemiologic surveys. *Am. J. Epid.* 92: 273-278, 1970.
 25. MORGAN, D.O.; McKERCHER, P.D.; BACHRACH, H.L. Quantitation of antigenicity and immunogenicity of purified foot-and-mouth disease virus vaccine for swine and steers. *Appl. Microbiol.* 20 (5): 770-774, 1970.
 26. MOWAT, G.N. Quantities of purified antigens required to immunize swine against foot-and-mouth disease. *Bull. Off. int. Épizoot.* 77: 887-897, 1972.
 27. OSTLE, B. *Statistic in research.* Iowa State University Press, 2nd ed., 1963.
 28. THOMAS, J.P.; FEDIDA, M.; COUDERT, M.; DAN-NACHER, G.; PEILON, M.; LUCAM, F. Mise au point d'une méthode de titrage du virus aphteux sur le porc. *Bull. Acad. vét.* 44: 353-357, 1972.
 29. WITTMANN, G.; BAUER, K.; MUSSGAY, M. Essais de vaccination de porcs avec des vaccins à base de virus aphteux inactivé. I. Essais avec du virus O inactivé par l'hydroxylamine, le formol, la chaleur et le pH. *Bull. Off. int. Épizoot.* 71: 351-379, 1969.
 30. WITTMANN, G.; BAUER, K.; MUSSGAY, M. Experiments on vaccination of pigs with ethyl-ethyl-eneimine (EEI) diethylaminoethyl-Dextran (DEAE-D) foot-and-mouth disease vaccines. Influence of route of inoculation and dose of antigen on the duration of immunity. *Arch. ges. Virusforsch.* 36: 251-264, 1972.

CONSIDERACIONES SOBRE LA PROFILAXIS DE LA FIEBRE AFTOSA EN LA ESPECIE PORCINA¹

P. Augé de Mello²

Desde el trabajo (9) "¿Qué se puede esperar en lo relacionado con la vacunación antiaftosa en cerdos?" presentado por el Prof. Lucam y colaboradores en la "Reunión Anual del Grupo de Investigación" realizada en septiembre de 1966 en Pirbright, Inglaterra, la inmunoprofilaxis de la fiebre aftosa en el cerdo ha realizado un considerable progreso.

En su presentación, el Prof. Lucam dejó bien claro que las vacunas contra la fiebre aftosa producidas en Francia, de eficacia comprobada para la especie bovina, no presentaban inmunogenicidad para la especie porcina puesto que era necesaria una aplicación de 30 DP₅₀ bovina para proteger el 50% de los cerdos vacunados. Y, en respuesta a la pregunta los autores concluyen:

"Con las mejores vacunas contra la fiebre aftosa actualmente a nuestra disposición y con las limitaciones de uso en condiciones de campo, parece bastante ilusorio esperar la obtención de una correcta inmunización en porcinos."

En la actualidad, esa situación ya no es la misma y, si se volviese a realizar un trabajo semejante, ciertamente la conclusión sería mucho más optimista y tal vez la respuesta sería:

"Los últimos adelantos en el campo de la inmunoprofilaxis tornaron factible la protección de los cerdos destinados al sacrificio, con una sola aplicación de vacuna a los lechones en el momento del destete y a los reproductores con intervalos de 6 meses."

Las vacunas contra la fiebre aftosa con adyuvante oleoso (1, 4, 5, 6, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17) y DEAE-dextrano (18, 19) tornaron una realidad la inmunización de los cerdos contra la fiebre aftosa.

En estos últimos años el Centro Panamericano de Fiebre Aftosa ha dado prioridad a los estudios sobre la inmunización de los cerdos contra esa enfermedad y al control de las vacunas para esa especie. Los resultados obtenidos son bastante satisfactorios con el desarrollo de una vacuna de adyuvante oleoso en forma de emulsión doble y aplicada por vía intraperitoneal (2, 3, 7).

Los resultados más recientes son bien diferentes de los que obtuvo el Prof. Lucam y sus colaboradores en 1966 (2, 3, 7). Una vacuna trivalente, oleosa, en forma de emulsión doble, aplicada por vía intraperitoneal en la dosis de 3 ml, en cerdos de 2 meses de edad, proporcionó 11 DP₅₀ a los 30 días postvacunación (7).

Algunos países europeos como Francia, España y Alemania ya producen en forma industrial vacunas antiaftosas con adyuvante oleoso y DEAE-dextrano destinadas a la especie porcina y en el control de la fiebre aftosa incluyen la inmunoprofilaxis de los cerdos.

Es de esperar que en un futuro próximo los países sudamericanos, sobre todo aquellos cuya explotación porcina tiene expresión socioeconómica relevante, revisen sus programas y vuelvan su atención al problema de la fiebre aftosa en los cerdos e incluyan esa especie animal en los programas oficiales de control.

En este momento parece oportuno preguntarse: ¿Desde el punto de vista epidemiológico, se justifica la inclusión de los cerdos en los programas oficiales de control de la fiebre aftosa?

Para responder la pregunta es necesario analizar el comportamiento epidemiológico de la enfermedad en esa especie animal.

Reviendo la literatura (16) en contraste con los

¹Presentado en las VI Jornadas Internacionales de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Plata, La Plata, Argentina, 5-11 de noviembre de 1978.

²Centro Panamericano de Fiebre Aftosa, OPS/OMS, Caixa Postal 589, 20000-Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

innumerables trabajos publicados sobre el desarrollo de vacunas, se encuentra una gran laguna sobre la patogenia de la enfermedad en los cerdos y sobre su comportamiento epidemiológico.

Ante esa falta de información, y sólo con la intención de traer al plenario elementos para discusión, se destacan brevemente algunos puntos de mayor relevancia.

Tipos de explotación

Fundamentalmente, se pueden distinguir las siguientes formas de explotación: a) como actividad doméstica, predominando animales comunes o productos de cruzamiento de razas autóctonas tipo "porker". En ese caso la explotación está constituida por pocos animales, con bajo nivel sanitario, y su alimentación está constituida por restos de comida, residuos y sobrantes de la producción agrícola; b) explotación empresarial de baja tecnología. Pueden ser medianas o grandes, teniendo como principales características la compra de animales nuevos y el uso de residuos de la alimentación humana y de las industrias de la carne, de la leche y de vegetales para la alimentación; y c) la explotación en términos empresariales con excelentes índices de productividad, rebaños de razas mejoradas o cruzamientos industriales de alta calidad, especializados en la producción de cerdos "tipo carne".

Se trata de la explotación moderna, intensiva, con elevada densidad del rebaño, alto nivel sanitario y alta rotatividad, con razas precoces, aptas para el sacrificio a una edad inferior a los 6 meses.

Movilización de los animales

Cualquiera sea el tipo de explotación, la movilización de los cerdos es muy escasa comparada con la especie bovina y cuando se hace generalmente lo es por camiones o ferrocarril al lugar de recría y de allí al matadero.

Portadores

Aún no ha sido demostrada experimentalmente la existencia de portadores del virus de la fiebre aftosa en la especie porcina, al contrario de lo que ocurre con las especies bovina y ovina.

Para que haya la ocurrencia de un episodio de fiebre aftosa en un rebaño porcino, se debe admitir que el agente es generalmente **introducido** en el establecimiento a través de la alimentación. Por lo tanto, la fiebre aftosa en cerdos puede ser considerada como consecuencia de la existencia de la enfermedad en bovinos y ovinos.

En la cadena epidemiológica de la fiebre aftosa, la especie porcina parece ejercer solamente el papel de multiplicador del agente, dada su gran susceptibilidad al virus y la alta tasa de eliminación al medio ambiente.

El éxito obtenido en Chile, así como en algunos países europeos que controlaron la fiebre aftosa sólo con medidas aplicadas en la especie bovina, parece indicar que el cerdo es sólo un receptor del agente y que no mantiene el virus en el rebaño, sea por la ausencia de portadores de virus o por el poco tiempo de vida útil de los animales, por cuanto la explotación porcina se realiza en ciclos muy breves, hecho ese que no permite establecer épocas fijas de vacunación.

Basados en el comportamiento de la fiebre aftosa en la especie porcina y la modalidad particular de la cría del cerdo se concluye que no se justifica incluir la vacunación sistemática de esa especie en los programas oficiales de control de la enfermedad.

En la profilaxis de la fiebre aftosa en la especie porcina, la educación sanitaria adquiere particular relevancia. A través de ella los criadores mantendrán sus explotaciones apartadas de los bovinos, con un buen nivel de sanidad y vacunarán espontáneamente a los animales cuando estén expuestos a mayor riesgo.

Cabe a las instituciones oficiales desarrollar y orientar esa educación sanitaria, mantener rigurosa vigilancia epidemiológica, adoptar las medidas sanitarias pertinentes en los brotes (aislamiento, interdicción, etc.) y disponer de vacunas en circunstancias especiales y en determinadas áreas.

RESUMEN

Los últimos adelantos en el campo de la inmunoprofilaxis tornaron factible la protección de los cerdos contra la fiebre aftosa. Con base en los conocimientos actuales sobre el comportamiento de

la fiebre aftosa en la especie porcina y la modalidad particular de la cría del cerdo, se concluye que no se justifica incluir la vacunación sistemática de esa especie en los programas oficiales de control de la enfermedad, por cuanto la explotación porcina se realiza en ciclos muy breves lo que no permite establecer épocas fijas de vacunación. Esto no excluye que la estrategia oficial establezca la vacunación de cerdos en determinadas áreas y en circunstancias especiales.

Se considera que en la profilaxis de la fiebre aftosa en los cerdos es muy importante la educación sanitaria de los criadores, la disponibilidad de un sistema de vigilancia epidemiológica ágil y efectivo que facilitará la aplicación de medidas sanitarias preventivas y cuarentenarias y la vacunación estratégica en los establecimientos expuestos a mayor riesgo.

REFERENCIAS

1. ANDERSON, E.C.; MASTERS, R.C.; MOWAT, G.N. Immune response of pigs to inactivated foot-and-mouth disease vaccines. Response to emulsion vaccines. *Res. vet. Sci.* 12 (4): 342-350, 1971.
2. AUGÉ DE MELLO, P.; GOMES, I. Vacuna anti-aftosa 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). *Bltm Centro Panamericano Fiebre Aftosa* 31-32: 1-6, 7-12, 1978.
3. AUGÉ DE MELLO, P.; GOMES, I.; ALONSO FERNANDEZ, A.; MASCARENHAS, J.C. Vacuna anti-aftosa con adyuvante oleoso para cerdos. II. Vacunación intraperitoneal de cerdos jóvenes con emulsión doble. (Foot-and-mouth disease oil adjuvanted vaccines for pigs. II. Intraperitoneal vaccination of young pigs with double emulsion vaccine). *Bltm Centro Panamericano Fiebre Aftosa* 31-32: 13-19, 21-27, 1978.
4. BACHRACH, H.L.; McKERCHER, P.D. Immunology of foot-and-mouth disease in swine: Experimental inactivated virus vaccine. *J. Am. vet. Med. Ass.* 160 (4): 521-526, 1972.
5. CAPORALE, G.; ROSSI, G.A.; PELLICIONI, A. Vaccination of swine against foot-and-mouth disease (FMD) with hydroxylamine and acetyleneimine inactivated virus. *Vet. ital.* 20: 137-147, 1969.
6. GIRAUD, M.; GUILLOTEAU, B.; PERROT, A.; DEBROCK, C.; PRUNET, P. Recherches sur l'activité d'un nouveau vaccin anti-aftueux chez le porc. *Bull. Off. int. Épiz.* 71 (3-4): 285-306, 1969.
7. GOMES, I.; AUGÉ DE MELLO, P.; ALONSO FERNANDEZ, A.; COSTA, K. de F. Vacuna anti-aftosa 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). *Bltm Centro Panamericano Fiebre Aftosa* 35-36: 19-25, 27-33, 1979.
8. GRAVES, J.H.; McKERCHER, P.D.; FARRIS, Jr., H.E.; COWAN, K.M. Early response of cattle and swine to inactivated foot-and-mouth disease virus. *Res. vet. Sci.* 9 (1): 35-40, 1968.
9. LUCAM, F.; FEDIDA, M.; DANNACHER, G.; PERRAUD, J. What may be expected concerning foot-and-mouth disease vaccination in pigs? Annual Meeting of the Research Group held at the Animal Virus Research Institute, Pirbright, 14-16 Sept., 1966.
10. McKERCHER, P.D. Response to swine to oil adjuvant vaccine. In International Symposium on Foot-and-Mouth Disease 8: 151-160, 1967.
11. McKERCHER, P.D.; FARRIS, Jr., H.E. Foot-and-mouth disease in swine: Response to inactivated vaccines. *Arch. ges. Virusforsch.* 22 (3-4): 451-461, 1967.
12. McKERCHER, P.D.; GAILIUNAS, P. Response of swine to inactivated foot-and-mouth disease vaccine. Duration of immunity and local tissue reaction. *Arch. ges. Virusforsch.* 28 (2): 165-176, 1969.
13. McKERCHER, P.D.; GIORDANO, A.R. Foot-and-mouth disease in swine. I. The immune response of swine to chemically-treated and non-treated foot-and-mouth disease virus. *Arch. ges. Virusforsch.* 20 (1): 39-53, 1967.
14. MORGAN, D.O.; McKERCHER, P.D.; BACHRACH, H.L. Quantitation of the antigenicity and immunogenicity of purified foot-and-mouth disease virus vaccine for swine and steers. *Appl. Microbiol.* 20 (5): 770-774, 1970.
15. MOWAT, G.N. Quantities of purified antigen required to immunize swine against foot-and-mouth disease. *Bull. Off. int. Épiz.* 77 (5-6): 887-897, 1972.
16. ROSENBERG, F.J. Conocimiento de la epidemiología de la fiebre aftosa con particular referencia a Sudamérica. *Ser. Monog. Cient. Técn.* 5, Centro Panamericano de Fiebre Aftosa, 1975.
17. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE and PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. Vacunas contra la fiebre aftosa. II. Estudios sobre la duración de la inmunidad en bovinos y porcinos. (Foot-and-mouth disease vaccines. II.

- Studies on duration of immunity in cattle and pigs). *Bltn Centro Panamericano Fiebre Aftosa* 19-20: 17-23, 24-30, 1975.
18. WITTMANN, G.; BAUER, K.; MUSSGAY, M. Experiments on vaccination of pigs with ethyl-ethyleneimine (EEI) diethylaminoethyl dextran (DEAE-D) foot-and-mouth disease vaccines. Influence of route of inoculation and dose of antigen on the duration of immunity. *Arch. ges. Virusforsch.* 36 (3-4): 251-264, 1972.
19. WITTMANN, G.; BAUER, K.; MUSSGAY, M. Studies on vaccination of pigs with inactivated foot-and-mouth disease vaccines. II. Studies with ethyl-ethyleneimine inactivated virus and DEAE-dextran as adjuvant. *Arch. ges. Virusforsch.* 29 (2-3): 139-158, 1970.

REFLECTIONS ON THE PREVENTION OF FOOT-AND-MOUTH DISEASE IN SWINE¹

P. Augé de Mello²

Considerable progress in the immunoprophylaxis of foot-and-mouth disease (FMD) in swine has been made since the time of Prof. Lucam and collaborators' presentation (9) "What may be expected concerning foot-and-mouth disease vaccination in swine?" given at the Annual Meeting of the Research Group, in September 1966 in Pirbright, England.

In his presentation Prof. Lucam made it clear that FMD vaccines produced in France, whose efficacy was proven in cattle, did not have adequate immunogenicity for pigs. Thirty bovine PD₅₀ were needed to protect 50% of vaccinated cattle. The authors concluded, in answer to the title question:

"With the best foot-and-mouth disease vaccines presently at our disposal and with the limitations of their use in field conditions, it appears quite illusory to expect an adequate protection of swine."

Presently, this situation is no longer the same and if a similar paper were to be presented today, the conclusions would certainly be much more optimistic. Perhaps the conclusion would be:

"Latest advances in the field of immunoprophylaxis have made it possible to protect swine for their useful life until slaughter, with one application of vaccine at weaning and for breeders with vaccination at 6-month intervals."

FMD vaccines with oil adjuvant (1, 4, 5, 6, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17) and DEAE-dextran (18,

19) have been shown to immunize swine against FMD.

Over the past several years the Pan American Foot-and-Mouth Disease Center has given priority to studies on preparation and control FMD vaccines for swine. Results have been quite satisfactory with the development of an oil-adjuvanted vaccine in the form of double emulsion and applied by the intraperitoneal route (2, 3, 7).

More recent results are quite different from those obtained by Prof. Lucam and his colleagues in 1966 (2, 3, 7). A double emulsion trivalent oil-adjuvanted vaccine applied intraperitoneally in a 3-ml dose in 2-month old pigs contained 11 PD₅₀ when tested 30 days post-vaccination (7).

Some European countries like France, Spain and Germany have already produced at the industrial level FMD vaccines with oil adjuvant or with DEAE-dextran, and they now include vaccination of swine in the control of FMD in that species.

It can be expected that in the near future South-American countries, particularly those whose swine industry is of socio-economic importance, may revise their programs, giving more attention to FMD problem in swine and including this species in their official control programs.

It appears opportune to ask at this point: "Epidemiologically, can we justify including swine in official FMD control programs?"

To respond this question we must analyze the epidemiological behavior of the disease in swine.

Reviewing the literature (16) we find that little has been published about the pathogenesis of the disease in swine or about its epidemiological behavior in this species, in contrast to the relatively large number of papers published on the development of vaccines.

Faced with this lack of information and in the hope of bringing to the attention of this meeting elements for discussion, we will attempt to highlight briefly some of more relevant points.

¹ Presented at the VI International Meetings of the Veterinary Sciences University, La Plata, Argentina, November 5-11, 1978.

² Pan American Foot-and-Mouth Disease Center, PAHO/WHO, Caixa Postal 589, 20000 Rio de Janeiro-RJ, Brazil.

Types of management

Basically, we can distinguish the following types of swine management: (a) as a domestic activity, predominantly of "criollo" animals, cross-breeds of local breeds of the short fat type. The herds mostly consist of few animals with low health level, and feed is usually food scraps and left overs from agricultural production; (b) holdings of low technology management. These can be small or large operations, but having the predominant characteristic that new animals are constantly brought in and that human food scraps and residues of dairy and agriculture are used for feeding; and (c) finally, the very well managed herds with excellent productivity indices, herds of improved breeds or industrial crossbreeds of high quality, specialized in the production of meat-pigs.

The last type, represents the modern intensive swine breeding operation with high sanitary level and fast turnover with the production of feeders ready for slaughter at 6 months or less.

Animal movement

In any of these management types there is little movement of swine compared to cattle. When swine are moving it is usually by truck or train from the operation to the slaughterhouse.

Carriers

The carrier state has not been experimentally shown to exist in pigs, contrary to the situation with cattle and sheep, which frequently become carriers after exposure to FMD virus.

Therefore for an FMD outbreak to occur in swine the agent it is generally **introduced** onto the premises by other species or by feed. We therefore can consider FMD in swine to be a consequence of the existence of the disease in cattle and sheep.

In the epidemiological chain of FMD the pig appears to play the role of virus multiplier, given its great susceptibility to the virus and the high level of infectivity in the environment caused by diseased pigs.

The success obtained in Chile as well as in some European countries, which control FMD only by control measures applied to cattle, appears to indicate that swine do not maintain the virus in the herd, either because of the absence of carriers of the virus or because of the fast turnover of the animals.

Based on the behavior of FMD in swine and the fast turnover of the population which may preclude the establishment of fixed vaccination periods added to particularities of swine management, it does not appear justifiable to include systematic vaccination of this species in official FMD control programs.

In the prophylaxis of FMD in swine, health education becomes particularly relevant. Through education, producers must learn to separate their swine from cattle, to maintain a high level of health control measures and to vaccinate voluntarily those animals which are exposed to high risk.

Official control programs should develop and orient this health education, maintain regular strict epidemiological surveillance, adopt in outbreaks sanitary measures (isolation, stoppage of animal movement, etc.), and use vaccine in special condition in certain areas of high risk.

SUMMARY

Recent advances in the field of immunoprophylaxis have made it feasible to protect swine from foot-and-mouth disease (FMD). On the basis of present knowledge about FMD behavior in swine and the particularities of swine management, including systematic vaccination of this species in official FMD control programs is probably justified. The fast turnover of the swine population does not permit the establishment of fixed vaccination periods. However, this does not exclude the vaccination of swine in certain high risk areas as part of the official strategy.

Health education of farmers, disposal of a fast and effective epidemiological surveillance system which will allow the application of preventive and quarantine measures, and strategic vaccination in establishments under high risk are considered of great importance in the prophylaxis of FMD in swine.

REFERENCES

1. ANDERSON, E.C.; MASTERS, R.C.; MOWAT, G.N. Immune response of pigs to inactivated foot-and-mouth disease vaccines. Response to emulsion vaccines. *Res. vet. Sci.* 12 (4): 342-350, 1971.
2. 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). *Bltn Centro Panamericano Fiebre Aftosa* 31-32: 1-6, 7-12, 1978.
3. AUGÉ DE MELLO, P.; GOMES, I.; ALONSO FERNANDEZ, 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 vaccines for pigs. II. Intraperitoneal vaccination of young pigs with double emulsion vaccine). *Bltn Centro Panamericano Fiebre Aftosa* 31-32: 13-19, 21-27, 1978.
4. BACHRACH, H.L.; McKERCHER, P.D. Immunology of foot-and-mouth disease in swine: Experimental inactivated virus vaccine. *J. Am. vet. Med. Ass.* 160 (4): 521-526, 1972.
5. CAPORALE, G.; ROSSI, G.A.; PELLICIONI, A. Vaccination of swine against foot-and-mouth disease (FMD) with hydroxylamine and acetyleneimine inactivated virus. *Vet. ital.* 20: 137-147, 1969.
6. GIRAUD, M.; GUILLOTEAU, B.; PERROT, A.; DEBROCK, C.; PRUNET, P. Recherches sur l'activité d'un nouveau vaccin anti-aphteux chez le porc. *Bull. Off. int. Épiz.* 71 (3-4): 285-306, 1969.
7. GOMES, I.; AUGÉ DE MELLO, P.; ALONSO FERNANDEZ, A.; COSTA, K. de 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). *Bltn Centro Panamericano Fiebre Aftosa* 35-36: 19-25, 27-33, 1979.
8. GRAVES, J.H.; McKERCHER, P.D.; FARRIS, Jr., H.E.; COWAN, K.M. Early response of cattle and swine to inactivated foot-and-mouth disease virus. *Res. vet. Sci.* 9 (1): 35-40, 1968.
9. LUCAM, F.; FEDIDA, M.; DANNACHER, G.; PERRAUD, J. What may be expected concerning foot-and-mouth disease vaccination in pigs? Annual Meeting of the Research Group held at the Animal Virus Research Institute, Pirbright, 14-16 Sept., 1966.
10. McKERCHER, P.D. Response to swine to oil adjuvant vaccine. In International Symposium on Foot-and-Mouth Disease 8: 151-160, 1967.
11. McKERCHER, P.D.; FARRIS, Jr., H.E. Foot-and-mouth disease in swine: Response to inactivated vaccines. *Arch. ges. Virusforsch.* 22 (3-4): 451-461, 1967.
12. McKERCHER, P.D.; GAILIUNAS, P. Response of swine to inactivated foot-and-mouth disease vaccine. Duration of immunity and local tissue reaction. *Arch. ges. Virusforsch.* 28 (2): 165-176, 1969.
13. McKERCHER, P.D.; GIORDANO, A.R. Foot-and-mouth disease in swine. I. The immune response of swine to chemically-treated and non-treated foot-and-mouth disease virus. *Arch. ges. Virusforsch.* 20 (1): 39-53, 1967.
14. MORGAN, D.O.; McKERCHER, P.D.; BACHRACH H.L. Quantitation of the antigenicity and immunogenicity of purified foot-and-mouth disease virus vaccine for swine and steers. *Appl. Microbiol.* 20 (5): 770-774, 1970.
15. MOWAT, G.N. Quantities of purified antigen required to immunize swine against foot-and-mouth disease. *Bull. Off. int. Épiz.* 77 (5-6): 887-897, 1972.
16. ROSENBERG, F.J. Conocimiento de la epidemiología de la fiebre aftosa con particular referencia a Sudamérica. *Ser. Monog. Ciunt. Técn.* 5, Centro Panamericano de Fiebre Aftosa, 1975.
17. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE and PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. Vacunas contra la fiebre aftosa. II. Estudios sobre la duración de la inmunidad en bovinos y porcinos. (Foot-and-mouth disease vaccines. II. Studies on duration of immunity in cattle and pigs). *Bltn Centro Panamericano Fiebre Aftosa* 19-20: 17-23, 24-30, 1975.
18. WITTMANN, G.; BAUER, K.; MUSSGAY, M. Experiments on vaccination of pigs with ethyl-ethyleneimine (EEI) diethylaminoethyl dextran (DEAE-D) foot-and-mouth disease vaccines. Influence of route of inoculation and dose of antigen on the duration of immunity. *Arch. ges. Virusforsch.* 36 (3-4): 251-264, 1972.
19. WITTMANN, G.; BAUER, K.; MUSSGAY, M. Studies on vaccination of pigs with inactivated foot-and-mouth disease vaccines. II. Studies with ethyl-ethyleneimine inactivated virus and DEAE-dextran as adjuvant. *Arch. ges. Virusforsch.* 29 (2-3): 139-158, 1970.

noticias

SUERO BOVINO TRATADO POR PEG PARA USO EN CULTIVOS DE CELULAS

Barteling¹ señaló que el suero originario de bovinos vacunados varias veces, al cual se le había retirado los anticuerpos por precipitación con polietilenglicol (PEG)², podía ser usado satisfactoriamente para cultivos de células y producción de virus de la fiebre aftosa.

Basados en ese trabajo, hemos usado rutinariamente suero tratado por PEG para la mayoría de los trabajos con cultivos celulares, BHK₂₁ o IB-RS-2 en monocamadas, tales como titulaciones de infectividad, seroneutralización y pruebas de inocuidad de vacunas inactivadas.

El suero bovino se obtiene de un matadero cercano al laboratorio. La sangre extraída de los vasos principales del cuello se recoge en recipientes conteniendo una solución de antibióticos suficiente para 10 litros de sangre (concentración final de 100 u.i. de penicilina/ml y 0,15 mg de neomicina/ml). La sangre se elimina si ocurre contaminación con material esofágico. Para formar una partida de suero se recoge un mínimo de 150 litros de sangre de por lo menos 15 animales de una vez.

Después de producida la coagulación se cortan los coágulos en trozos de alrededor de 50 cm³ y se dejan encima de un tamiz durante una noche a +4°C para permitir la separación del suero. Pequeños coágulos y glóbulos rojos se separan del suero por centrifugación continua³. Luego el suero se trata con PEG de la siguiente manera:

Para cada litro de suero se adiciona, bajo agitación continua, 80 g de PEG previamente disuelto

en 100 ml de solución salina 0,15M esterilizada en autoclave por 30 minutos a 15 libras. Se continúa la agitación por una hora, seguida por una hora de sedimentación. El sobrenadante se retira del sedimento denso y se filtra a través de filtros Seitz EKS y membranas Millipore de 0,3 µm. En seguida se realizan las pruebas de esterilidad y crecimiento de células.

En un experimento preliminar (no publicado) se encontró que la eficacia, en lo que se refiere a crecimiento celular en monocamada de las células BHK₂₁ C13 o IB-RS-2, fue reducida en 50% cuando se usaba suero tratado por PEG. Barteling¹ también observó reducción en el crecimiento de células BHK₂₁ C13 cultivadas en monocada. Nosotros hemos corregido esa deficiencia sembrando doble cantidad de células.

Los resultados de las titulaciones de virus usando cultivos de células multiplicadas en medio con suero tratado por PEG fueron similares a los obtenidos usando suero de animales donadores libres de anticuerpos. El suero tratado por PEG también ha sido usado satisfactoriamente para el crecimiento de células para producir vacunas experimentales^{4,5}.

De esta manera, el método puede eliminar la necesidad de mantener bovinos donadores libres de anticuerpos, lo que constituye una considerable economía para un laboratorio.

¹BARTELING, J.S. Use of polyethyleneglycol-treated serum for production of foot-and-mouth disease virus in growing BHK-suspended cell cultures. *Bull. Of. int. Épiz. 81* (11-12): 1243-1254, 1974.

²Polyethylene Glycol 6000, J.T. Baker, New Jersey 08865.

³Centrifuga Alfa Laval BPB 204 A-11.

⁴ABARACON, D.; GIACOMETTI, H. Vacunas contra la fiebre aftosa con virus producido en cultivos celulares con suero bovino tratado por polietilenglicol (PEG). *Bltm Centro Panamericano Fiebre Aftosa* 21-22: 44-48, 1976.

⁵MESQUITA, J.A.; CARNEIRO, A.S. Vacuna antiaftosa con antígenos producidos en cultivos celulares con suero tratado por PEG. *Bltm Centro Panamericano Fiebre Aftosa* 33-34: 61, 1979.

Julio A. Mesquita
Antonio Vieira
Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
Rio de Janeiro, Brasil

news

PEG-TREATED BOVINE SERUM FOR USE IN CELL CULTURES

Barteling¹ indicated that serum originating from repeatedly vaccinated cattle from which antibodies had been removed by polyethyleneglycol (PEG)² precipitation could be used successfully for cell cultures and foot-and-mouth disease (FMD) virus production.

Based on this work, we have been using PEG-treated serum routinely for most cell culture work, with BHK₂₁ and IB-RS-2 cells in monolayers as infectivity titration, neutralization tests and innocuity tests of inactivated vaccines.

The bovine serum is obtained from a neighboring slaughterhouse. Blood from the severed neck vessels is collected in a container with sufficient antibiotic solution for 10 liters of blood (final concentration 100 UI of penicillin/ml and 0.15 mg of neomycin/ml). The blood is discarded if contamination with oesophagic material occurs. A minimum of 150 liters of blood from at least 15 cattle is collected for one batch of serum.

After coagulation the blood is cut into pieces of about 50 cm³ and left in a separating sieve overnight at 4°C. Small fibrous clots and red cells are separated from the serum by continuous centrifugation³ which is then treated with PEG in the following manner:

Under continuous shaking 80 g PEG, previously dissolved in 100 ml of 0.15M saline solution

and autoclaved 30 minutes at 15 PSI, was added to each liter of serum. The mixing was continued for one hour followed by one hour of sedimentation. The supernatant was decanted from the thick sediment and filtered through Seitz EKS and Millipore 0.3 µm filters. The serum was then tested for sterility and cell growth promotion.

In a preliminary experiment (unpublished data) it was found that the growth efficiency of BHK₂₁ C 13 or IB-RS-2 cell monolayer cultures was reduced to 50% when PEG-treated serum was used. Reduction in growth of monolayer BHK₂₁ cell cultures was also reported by Barteling¹. We corrected this deficiency by seeding the cultures with twice the number of cells.

Results of virus titration using cell cultures grown with PEG-treated serum were similar to those grown with serum from FMD antibody free donor steers. The PEG-treated serum also has been used successfully for the growth of cells to produce experimental vaccines^{4,5}.

Thus, the method could eliminate the need to maintain FMD antibody free donor steers, which constitutes considerable savings for a laboratory.

¹BARTELING, J.S. Use of polyethyleneglycol-treated serum for production of foot-and-mouth disease virus in growing BHK-suspended cell cultures. *Bull. Of. int. Epiz. 81* (11-12): 1243-1254, 1974.

²Polyethylene Glycol 6000, J.T. Baker, New Jersey 08865.

³Alfa Laval BPB 204 A-11.

⁴ABARACON, D.; GIACOMETTI, H. Vaccines against foot-and-mouth disease with virus produced in cell cultures with bovine serum treated with polyethyleneglycol (PEG). *Bln Centro Panamericano Fiebre Aftosa* 21-22: 49-53, 1976.

⁵MESQUITA, J.A.; CARNEIRO, A.S. Foot-and-mouth disease vaccine with antigens produced in cell cultures grown with PEG-treated bovine serum. *Bln Centro Panamericano Fiebre Aftosa* 33-34: 62, 1979.

Julio A. Mesquita
Antonio Vieira
Pan American Foot-and-Mouth Disease Center
Rio de Janeiro, Brazil

resúmenes

abstracts

BASARAB, O.; URIBE, L.F.

Texto en inglés. *Proc. 5th Wld. Int. Pig vet. Soc. Congr.*, Zagreb, KB.47, 1978. (*FMD Bull. Wellcome* 18 (1): 3, 1979). [Wellcome FMD Vaccine Laboratory, Pirbright, Woking, Surrey, England]

Protección de cerdos de engorde contra la fiebre aftosa con una vacuna oleosa. 2. Estudio sobre cepas sudamericanas del virus aftoso

Los experimentos realizados en vacunas con emulsión de agua en aceite que contenían cepas europeas han sido descritos en un trabajo anterior. Esta comunicación describe los resultados obtenidos en cerdos de engorde inoculados con una vacuna trivalente, elaborada con cepas de América del Sur. Se evidenció que una dosis de 2 ml induce un pronto establecimiento de la inmunidad, que persiste al menos hasta el fin del período de engorde. En general, los resultados obtenidos fueron muy similares a los descritos en el trabajo anterior.

The protection of fattening pigs against foot-and-mouth disease with an oil adjuvanted vaccine. 2. Studies on South American foot-and-mouth disease virus strains

Experiments on water-in-oil emulsion vaccines containing European virus strains have been described in a previous paper. This paper describes results obtained in fattening pigs inoculated with trivalent vaccine containing South American virus strains. It was shown that a 2 ml vaccine dose induces rapid onset of immunity which persists at least until the end of the fattening period. Results were, in general, similar to those described in previous paper.

BAUER, K.; LORENZ, R.J.

Texto en inglés. *In 15th Conf. O.I.E. Perm. Comm.*, Paris, Rep. No. 501, 1978. (*FMD Bull. Wellcome* 18 (1): 5, 1979).

Ensayos para mejorar las pruebas de potencia de las vacunas antiaftosas mediante dos pruebas de laboratorio combinadas

Se combinó el método empleado para evaluar la cantidad de antígeno en las vacunas antiaftosas por fijación de complemento después de eluido del hidróxido de aluminio, con una prueba de potencia en ratones, empleando virus miotrópico para la descarga. Los resultados indicaron que existía una correlación entre el contenido de antígeno fijador de complemento en el eluido de la vacuna y la protección de los cerdos contra la descarga. Se estableció que tres clases diferentes de vacunas correspondían a distintos porcentajes de inmunidad en bovinos. Las vacunas que contenían un elevado porcentaje de antígeno fijador de complemento protegieron al 96% de los animales probados, y se sugiere que la prueba en bovinos no es esencial para estas vacunas. Las vacunas sin antígeno detectable

Trials for improving potency testing of foot-and-mouth disease vaccines by combination of two laboratory tests

A method for evaluation of the amount of antigen in foot-and-mouth disease vaccines by complement fixation after elution from aluminum hydroxide has been combined with a potency test in mice using myotropic virus for challenge. Results indicated a correlation between the content of complement fixing antigen in the eluate of vaccine and protection of cattle against challenge. Three classes of vaccine could be established corresponding to different percentages of immunity in cattle. Vaccines with high amounts of complement fixing antigen protected 96% of cattle tested and it is suggested that a cattle test would not be essential for these vaccines. Vaccines with no detectable antigen corresponded to 77% protection in cattle and cattle tests would be

confirieron una protección del 77% en bovinos, y las pruebas en bovinos serían esenciales para las vacunas comprendidas en este grupo. Las vacunas con un bajo nivel de antígeno fijador de complemento produjeron un porcentaje de protección del 81%, y algunas no proporcionaron una protección adecuada al bovino. Fue para esta última categoría de vacunas que se combinó la prueba de fijación de complemento con una prueba de protección en ratón, empleando el método BAYES (ver "Grundriss der Biologischen Statistik", editado por E. Weber, Fisher Verlag, Stuttgart, 1972).

essential for vaccines in this group. Vaccines with low amounts of complement fixing antigen had a percentage protection of 81% and some of these did not adequately immune cattle. It is for vaccines in this latter class that the results of the complement fixation test were combined with those of a mouse potency test using BAYES rule (see "Grundriss der Biologischen Statistik, edited by E. Weber, Fisher Verlag, Stuttgart, 1972).

BEKKUM, J.G. van; LEEUW, P.W. de

Texto en inglés. In Sexta Conferencia Internacional de la Ciencia Veterinaria, Universidad Nacional de La Plata, Argentina, noviembre 1978. (*FMD Bull. Wellcome* 18 (3): 18, 1979). [Central Veterinary Institute, Virology Department, 39 Houtribweg, Lelystad, Netherlands]

Algunos aspectos del virus aftoso en la leche

Desde principios de siglo es un hecho conocido que la leche contaminada puede desempeñar un importante papel en la diseminación del virus aftoso. Desde la epizootia registrada en 1967-68 en el Reino Unido, durante la cual se evidenció que el ganado puede excretar grandes cantidades de virus en ausencia de lesiones clínicas, la presencia y supervivencia del virus aftoso en la leche ha recibido una atención considerable. Sin embargo, todas las observaciones realizadas en el campo sobre la diseminación del virus aftoso a través de la leche concernían a los animales no vacunados. En estudios posteriores con vacas vacunadas descargadas por instilación nasal fue imposible detectar virus en la leche, tanto en la prueba de histocultivo como en la prueba de inocuidad. Por consiguiente, en los países con un programa de control bien establecido, los efectos combinados del tratamiento por calor y la vacunación, que producen inmunidad individual y un alto nivel de anticuerpos en la leche a granel, el riesgo de diseminación del virus a través de la leche y los productos lácteos es muy bajo.

Some aspects of foot-and-mouth disease virus in milk

Since the beginning of the century it has been known that contaminated milk can play a role in the dissemination of foot-and-mouth disease (FMD) virus. Since the 1967-68 epizootic in the United Kingdom when clearcut evidence was obtained that cattle can excrete large quantities of virus in the absence of clinical signs, the presence and survival of FMD virus in milk has received considerable attention. However, all field observations on the spread of FMD virus by milk concerned non-vaccinated animals. In further studies with vaccinated cows challenged by nasal instillation it proved impossible to detect virus in their milk in either tissue culture or cattle inocuity tests. Therefore, in countries with a well established control program, the combined effects of heat treatment and vaccination resulting in immunity in individual cows and a high level of antibody in bulk milk the risk of virus dissemination by milk and milk products is very low.

BEKKUM, J.G. van; LEEUW, P.W. de; TERPSTRA, C.

Texto en inglés. In Sexta Conferencia Internacional de la Ciencia Veterinaria, Universidad Nacional de La Plata, Argentina, noviembre 1978. (*FMD Bull. Wellcome* 18 (4): 20, 1979). [Central Veterinary Institute, Virology Department, 39 Houtribweg, Lelystad, Netherlands]

Evaluación de la potencia de las vacunas antiaftosas, en especial las destinadas al porcino

Existe un gran número de pruebas para determinar la potencia de vacunas contra la fiebre aftosa en bovinos. Las pruebas de potencia para las vacunas destinadas al porcino se han desarrollado en términos muy similares a los usados para las vacunas bovinas, aunque no siempre ha sido posible calcular una DP_{50} para cerdos, ni establecer una relación consistente entre los niveles de anticuerpo seroneutralizante y el grado de protección en cerdos. Además, se ha comprobado que las vacunas tienden a dar un resultado más satisfactorio en el campo que en las pruebas de laboratorio. Una comparación de diferentes métodos de descarga en cerdos ha indicado que el resultado de la prueba puede estar influenciado no sólo por la vía de infección, sino también por el tamaño y composición del grupo de animales expuestos.

Evaluation of the potency of foot-and-mouth disease vaccines, particularly those destined for pigs

A number of methods are in use for the potency testing of vaccines against foot-and-mouth disease in cattle. Potency tests for vaccines intended for use in pigs developed along similar lines to those for cattle vaccines but it was not always possible to calculate a pig PD_{50} nor was it possible to establish a consistent relationship between the levels and serum neutralizing antibody and the degree of protection in the pig. In addition, it was noted that vaccine tended to perform better in the field than in laboratory trials. A comparison of different challenge methods for pigs has indicated that not only the route of infection but also the size and composition of the group of animals exposed may affect the outcome of the test.

CROWTHER, J.R.

Texto en inglés. In 15th Conf. O.I.E. Perm. Comm., Paris, Rep. No. 103, 1978. (*FMD Bull. Wellcome* 18 (2): 9, 1979). [Animal Virus Research Institute, Pirbright, Woking, Surrey, England]

Subtipificación del virus aftoso. Nuevos enfoques

Las pruebas de neutralización y de fijación de complemento son dos métodos convencionales para determinar las relaciones entre las diferentes cepas del virus aftoso. La prueba de fijación de complemento es más apropiada para medir los cambios más importantes en la composición antigénica de las cepas para los extensos estudios epizootiológicos, mientras que la prueba de neutralización es más indicada para la comparación de los virus, a nivel de los problemas relacionados con la inmunidad en el campo. Las pruebas RIA y ELISA son nuevos métodos para comparar las cepas, tanto a mayor como a menor escala. Ambas pruebas son adaptables para la comparación de cepas contenidas en materiales de histocultivo infectados. ELISA representa una técnica sensible, no requiere rotulación radioactiva o recuento, ni plantea

Subtyping of foot-and-mouth disease virus. New approaches

The complement fixation and neutralization tests are two conventional methods for determining relationships between foot-and-mouth disease virus strains. The complement fixation test is most appropriate for measuring major changes in antigenic make up of strains for broad epizootiological studies while the neutralization test is more suited for comparison of viruses at the level which is important to the problems of field immunity. Radioimmunoassay (RIA) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) are new methods for the comparison of strains on both broad and narrow fronts. Both tests are adaptable for the comparison of strains contained in infected tissue culture materials. ELISA offers a sensitive technique which does not require radioactive labelling and counting and does not pose any

problemas de manejo. Las técnicas biofísicas tales como el enfoque isoelectrico ofrecen un método no serológico para la investigación directa de los polipéptidos víricos.

handling problems. Biophysical techniques such as isoelectric focussing offer a non-serological method for the direct investigation of virus polypeptides.

CROWTHER, J.R.; ABU-el ZEIN, E.M.E.

Texto en inglés. *J. gen. Virol.* 42 (3): 597-602, 1979. (*FMD Bull. Wellcome* 18 (5): 26, 1979). [Animal Virus Research Institute, Pirbright, Woking, Surrey, England]

Detección y cuantificación del virus aftoso mediante pruebas inmunoabsorbentes marcadas por enzima

Se han aplicado con éxito las técnicas del ensayo de enzimas fijadas en inmunoabsorbentes (ELISA) para la cuantificación del virus aftoso purificado. Se describen tres métodos, en los que los límites de detección de virus fueron muy similares. Los datos acumulativos indican que el rango de 5 a 30ng/ml de virus puede medirse con precisión de los antecedentes de los controles. Los métodos utilizados fueron específicos para el tipo O; el virus de la enfermedad vesicular del cerdo ni el virus aftoso del tipo A interfirieron en la prueba. La especificidad y reproducibilidad de las pruebas indicaron que, para determinar concentraciones no conocidas de virus, pueden construirse curvas estándar relacionando concentraciones víricas conocidas con el desarrollo del color, usando reagentes definidos.

Detection and quantification of foot-and-mouth disease virus by enzyme labelled immunosorbent assay techniques

The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) technique has been successfully applied to the quantification of purified foot-and-mouth disease virus. Three methods are described and the limits for the detection of virus were similar. Cumulative data indicate that a range of 5 to 30ng/ml of virus may be measured distinct from background controls. The methods used were specific for type O foot-and-mouth disease; swine vesicular disease and type A foot-and-mouth disease virus did not interfere. The specificity and reproducibility of the assays indicated that standard curves relating known virus concentrations to color development, using defined reagents, can be constructed in order to assay unknown virus concentrations.

CZELLENG, F.; FARKAS, L.; PERENYI, T.; FAZEKAS, A.; SZALAI, F.; ZSITVAI, K.; ERDELYI, K.

Texto en inglés. *In 15th Conf. O.I.E. Perm. Comm., Paris, Rep. No. 505, 1978. (FMD Bull. Wellcome* 18 (1): 3, 1979). [Phylaxia Veterinary Biologicals and Feedstuffs, Zaszpus U. 3133, H-1143, Hungary]

Efecto de la inactivación con etileneimina y formaldehído sobre la inmunogenicidad del virus aftoso

Se comparan los efectos de dos agentes inactivantes (etileneimina y formalina) sobre cepas del virus aftoso tipo O desarrolladas en cultivo Frenkel. En las condiciones requeridas para la completa inactivación del virus con formalina, sólo se mantuvo del 29 al 53% de la actividad fijadora de complemento original. A las cinco semanas de almacenamiento a 4°C, sólo permaneció del 3 al 30% de la actividad registrada al finalizar el proceso de inactivación. Cuando se utilizó etileneimina para la inactivación, un 80 al 95% de la actividad

Effect of ethyleneimine and formaldehyde inactivation on the immunogenicity of foot-and-mouth disease virus

The effects of two inactivating agents (formalin and ethyleneimine) on foot-and-mouth disease virus strains of type O grown in Frenkel culture were compared. Under the conditions required for complete inactivation of virus with formalin, only 29 to 53% of the original complement fixing activity of the virus was retained. Of the activity present at the end of the inactivation process, only 3 to 30% was still present after storage for five weeks at 4°C. When ethyleneimine was used for inactivation, 80 to 95% of the original

fijadora de complemento inicial se mantuvo hasta el final del proceso, de la que el 70 al 95% todavía podía ser detectada a las cinco semanas de almacenamiento.

complement fixing activity was preserved at the end of the process and 70 to 95% of this could still be detected after storage for five weeks.

DUCHESNE, M.; LEGRAND, B.; COLSON, X.; DURAND, M.

Texto en inglés. In 15th Conf. O.I.E. Perm. Comm., Paris, Rep. No. 302, 1978. (*FMD Bull. Wellcome* 18 (1): 4, 1979). [Laboratoire Roger Bellon, P.O. Box 31, 37190, Azay-Le-Rideau, France]

Concentración y purificación del virus aftoso A Maroc 1977 producido en células BHK

El virus A Maroc aislado de brotes de fiebre aftosa acaecidos en Marruecos a principios de 1977, difería serológica e inmunogénicamente del virus A₅ Allier, así como de otras cepas del tipo A conocidas. El virus fue adaptado a células BHK en suspensión mediante tres pasajes en monocapa y uno en suspensión. El crecimiento observado en suspensión fue muy similar al conseguido con el virus A₅ Allier. El virus fue concentrado y purificado por un proceso de adsorción-elución con complejos de óxido de etileno y calcio. Este procedimiento dio como resultado una concentración de 1.150 veces, y una purificación del 45%. Las propiedades físico-químicas de A Maroc fueron comparadas con las de otros virus del tipo A.

Concentration and purification of the A Maroc 1977 foot-and-mouth disease virus produced on BHK cells

The A Maroc virus isolated from outbreaks of foot-and-mouth disease in Morocco in early 1977 differed serologically and immunologically from the A₅ Allier virus and from other known type A virus strains. The virus was adapted to BHK suspension culture by three passages in monolayer and one in suspension. Growth in suspension was similar to that achieved with A₅ Allier virus. The virus was concentrated and purified by a process of adsorption-elution involving ethylene oxide and calcium complexes. This procedure resulted in a concentration of 1,150-fold and a purification of 45%. The physical-chemical properties of A Maroc were then compared with those of other type A viruses.

FEDIDA, M.; COUDERT, M.; LOMBARD, M.; BRUN, A.; FAVRE, H.; DURAND, G.; GIRAUD, M.; DHENNIN, L.

Texto en francés. *Rev. Med. vet.* 129 (10): 1305-1328, 1978. (*FMD Bull. Wellcome* 18 (2): 8, 1979). [Laboratoire National de Pathologie Bovine, B.P. 33, 69342 Lyon Cedex 2, France]

Estudio serológico e inmunológico del virus aftoso aparecido en Marruecos en 1977

El virus aftoso causante de la epizootia registrada en Marruecos a principios de 1977, demostró tener propiedades serológicas e inmunológicas diferentes de las de la cepa A₅ Allier. Las investigaciones realizadas en Francia han puesto de manifiesto que el virus difería también notablemente de los otros virus del tipo A; el valor *r* era muy bajo (0,20 aproximadamente) y el valor *R* era de tan sólo 13. Los bovinos vacunados una vez con la vacuna francesa habitual no resistieron la descarga con el virus

Serological and immunological study of the foot-and-mouth disease virus which appeared in Morocco in 1977

The foot-and-mouth disease virus responsible for the foot-and-mouth disease epizootic in Morocco in early 1977 proved to have serological and immunological properties different from those of the A₅ Allier strain. Investigations carried out in France have shown that the virus was also very different from other type A viruses; the '*r*' value was low (about 0.20) and the '*R*' value only about 13. Cattle vaccinated once with the usual French vaccine did not withstand challenge

A Morocco. Sin embargo, aquellos que fueron inoculados dos o más veces con la misma vacuna, resultaron inmunizados durante un período mínimo de tres meses.

with the A Morocco virus. However, cattle given two or more injections of the same vaccine were immune for at least three months.

KRUSCHKE, P.; OLECHNOWITZ, A.F.

Texto en alemán. *Arch. exp. VetMed.* 32 (8): 435-440, 1978. (*FMD Bull. Wellcome* 18 (2): 12, 1979)

Diferencias específicas al tipo en las proteínas estructurales del virus aftoso

La comparación de las bandas de tres cepas del virus aftoso (O₂, A₅ y C) por electroforesis en gel de poliacrilamida indicó que las tres cepas tenían en común dos proteínas pesadas, con un peso molecular de 56.000 (VP₅₆) y 42.000 (VP₄₂) respectivamente. Dos bandas siguientes contenían el principal volumen del cápside de la proteína. Los pesos moleculares relativos eran de 29.000 (VP₂₉) y 25.000 (VP₂₅) para el virus A₅ y 29.000 y 25.500 (VP_{25.5}) para el virus C. La segunda zona de proteínas del tipo O podía dividirse en dos componentes; los tres polipéptidos resultantes presentaban un peso molecular de 31.000 (VP₃₁), 29.000 (VP₂₉) y 25.000 (VP₂₅). Otras dos bandas cuyo peso molecular era de 20.000 (VP₂₀) y 13.000 (VP₁₃) normalmente se hallaban presentes sólo en el caso de los subtipos O₂ y A₅. Las posiciones y funciones de los polipéptidos individuales no son todavía conocidas con exactitud. VP₅₆ muestra una cierta semejanza con el antígeno VIA. VP₄₂ puede ser un precursor común para VP₂₉ y VP₁₃.

Type-specific differences in the structural proteins of foot-and-mouth disease virus

Comparison of the banding patterns in polyacrylamide gel electrophoresis of three strains of foot-and-mouth disease virus (O₂, A₅ and C) indicated that all three had two heavy proteins, of molecular weight 56,000 (VP₅₆) and 42,000 (VP₄₂) respectively, in common. Two following bands represented the main bulk of capsid protein. The relative molecular weights were 29,000 (VP₂₉) and 25,000 (VP₂₅) for A₅ virus and 29,000 and 25,500 (VP_{25.5}) for C virus. The second protein zone of type O could be split into two components; the three resulting polypeptides having molecular weights of 31,000 (VP₃₁), 29,000 (VP₂₉) and 25,000 (VP₂₅). Two further bands with molecular weights of 20,000 (VP₂₀) and 13,000 (VP₁₃) were usually present only in subtypes O₂ and A₅. The positions and functions of the individual polypeptides are not yet certain; VP₅₆ shows some similarity to the VIA antigen. VP₄₂ may be the common precursor for VP₂₉ and VP₁₃.

LAI, S.S.; McKERCHER, P.D.; MOORE, D.M.; GILLESPIE, J.H.

Texto en inglés. *Amer. J. vet. Res.* 40 (5): 463-468, 1979. (*FMD Bull. Wellcome* 18 (6): 35, 1979). [Plum Island Animal Disease Center, Greenport, Long Island, New York 11944, USA]

La patogénesis de la enfermedad vesicular del cerdo en porcinos

Cerdos expuestos a la cepa UGK 27/72 de la enfermedad vesicular del cerdo desarrollaron lesiones vesiculares a los 2 días después de la inoculación (DPI). Las lesiones aparecieron primeramente sobre la banda coronaria y a seguir sobre el "dew-claw", la lengua, el hocico, los labios y los bulbos de los talones. El comienzo de la viremia coincidió con la respuesta febril y la presentación de vesículas. Se aisló el virus de descargas nasales,

Pathogenesis of swine vesicular disease in pigs

Pigs exposed to the UGK 27/72 strain of swine vesicular disease developed vesicular lesions by 2 days post-inoculation (DPI). Lesions first appeared on the coronary band and then on the dewclaw, tongue, snout, lips and bulbs of the heels. The onset of viremia coincided with the febrile response and the appearance of vesicles. Virus was isolated from nasal discharges, oesophageal-pharyngeal fluid and faeces as early as the first

líquido esófago-faríngeo y excrementos al primer día después de la inoculación. El aspecto y la distribución de fluorescencia específica en varios tejidos indicaron que, durante el desarrollo de la infección con la enfermedad vesicular del cerdo, los tejidos epiteliales fueron implicados inicialmente, seguidos por una infección generalizada de los tejidos linfáticos y, subsiguientemente, una viremia primaria. Se halló una meningoencefalomielitis benigna y no supurativa por todo el sistema nervioso central en cerdos inoculados como también en cerdos expuestos por contacto. Los bulbos olfatorios fueron afectados más severamente y con más frecuencia. Se hallaron las lesiones del cerebro más severas entre 3 y 4 días después del comienzo de la viremia. Cerdos expuestos por contacto mostraron lesiones del cerebro más severas que los cerdos inoculados. También se observaron cambios microscópicos en la corona del casco, el hocico, la lengua y el corazón.

day after inoculation. The appearance and distribution of specific fluorescence in various tissues indicated that during the development of swine vesicular disease infection, the epithelial tissues were initially involved, followed by a generalized infection of lymph tissues and, subsequently, a primary viraemia. A mild non-suppurative meningoencephalomyelitis throughout the central nervous system in both inoculated and contact-exposed pigs was found. The olfactory bulbs were most severely and most frequently affected. The most severe brain lesions were found at 3 to 4 days after the onset of viraemia. Pigs exposed by contact showed more severe brain lesions than inoculated pigs. Microscopic changes were also observed in the coronary band, snout, tongue and heart.

LEEUW, P.W. de; BEKKUM, J.G. van; TIESSINK, J.W.A.

Texto en inglés. *J. Hyg. (Camb.)* 81: 415-425, 1978. (*FMD Bull. Wellcome* 18 (1): 6, 1979). [Central Veterinary Institute, Virology Department, 39 Houtribweg, Lelystad, Netherlands]

Excreción de virus aftoso en líquido esofágico-faríngeo y leche de bovinos después de una infección intranasal

Se investigó el crecimiento de virus en el área faríngea y la excreción de virus en leche de ganado lechero susceptible y vacunado. Se infectaron diez vacas vacunadas entre 2 y 9 meses después de la última vacunación y todas resistieron a la descarga. El virus se multiplicó en el área faríngea, aunque en menor medida que en los animales de control susceptibles. No se evidenció una clara relación entre el crecimiento vírico y el título de anticuerpo seroneutralizante en el momento de la descarga. Las primeras secreciones de virus se registraron en muestras de leche al cuarto día postinfección, en que las lesiones generalizadas eran ya aparentes. La excreción continuó de 3 a 4 días. Durante los 19 primeros días subsiguientes a la descarga no se detectó virus aftoso en la leche sin tratar de las vacas vacunadas.

Excretion of foot-and-mouth disease virus in oesophageal-pharyngeal fluid and milk of cattle after intranasal infection

The growth of virus in the pharyngeal area and the excretion of virus in milk of susceptible and vaccinated dairy cattle were investigated. Ten vaccinated cows were infected at 2 to 9 months after the last vaccination and all resisted the challenge. Virus multiplied in the pharyngeal area but to a less extent than in susceptible control animals. There was no clear relationship between virus growth and the titer of serum neutralizing antibody at the time of challenge. Susceptible cows first secreted virus in milk samples on the fourth day following infection when generalized lesions were apparent. Excretion continued for 3 to 4 days. No foot-and-mouth disease virus could be detected in untreated milk of vaccinated cows for the first 19 days following challenge.

MOORE, D.M.; COWAN, K.M.

Texto en inglés. *J. gen. Virol.* 41 (3): 549-562, 1978. (*FMD Bull. Wellcome* 18 (1): 4, 1979). [Plum Island Animal Disease Center, Greenport, Long Island, New York 11944, USA]

Efecto de la tripsina y ciotripsina en los polipéptidos de las variantes de placa pequeña y grande de la cepa del virus aftoso: Relación con la infectividad y antigenicidad específica

Se ha comprobado que las variantes de placa pequeña y placa grande de la cepa de virus aftoso A₁₂ 119 tienen determinantes antigénicos específicos. La especificidad antigénica del virus de placa grande fue destruida por el tratamiento con tripsina, mientras que el antígeno de placa pequeña mostró ser resistente, a pesar de la segmentación del polipéptido sensible a la tripsina. La segmentación del polipéptido VP₃ causada por la tripsina dio como resultado la formación de un nuevo antígeno, que no se hallaba presente en el virus sin tratar. Se han examinado los efectos producidos por la ciotripsina y la tripsina sobre los polipéptidos de las variantes de placa, los cuales han sido relacionados con ciertos cambios en la antigenicidad, infectividad y exposición de los polipéptidos en la superficie del cápside. Se discuten los resultados concernientes a la orientación del polipéptido sensible a la tripsina en el cápside vírico. Se señaló la significación de las diferentes propiedades de las variantes de placa, que facilitan la comprensión de las características del virus y del sistema celular para la producción de vacunas con un comportamiento satisfactorio en el campo.

Effect of trypsin and chymotrypsin on the polypeptides of large and small plaque variants of foot-and-mouth disease virus: Relationship to specific antigenicity and infectivity

Large and small plaque variants of foot-and-mouth disease virus strain A₁₂ 119 were shown to have specific antigenic determinants. Large plaque virus antigenic specificity was destroyed by trypsin treatment but the small plaque antigen was resistant despite cleavage of the trypsin-sensitive polypeptide. The cleavage of polypeptide VP₃ by trypsin resulted in the formation of a new antigen not present on untreated virus. The effects of chymotrypsin and trypsin on the polypeptides of the plaque variants have been examined and related to changes in antigenicity, infectivity and exposure of the polypeptides at the surface of the capsid. The results are discussed in relation to the orientation of the trypsin-sensitive polypeptide in the virus capsid. The significance of the differing properties of plaque variants in understanding both the virus characteristics and cell system to be used in preparing effective vaccines for use in the field was noted.

MORGAN, D.O.; MOORE, D.M.; McKERCHER, P.D.

Texto en inglés. *Proc. Ann. Mtg. U.S. Anim. Hlth. Ass.* 82: 277-283, 1978. (*FMD Bull. Wellcome* 18 (5): 27, 1979). [Plum Island Animal Disease Center, Greenport, Long Island, New York 11944, USA]

Purificación del antígeno asociado a la infección del virus aftoso

Se extrajo el antígeno asociado a la infección vírica (VIA) de células BHK infectadas mediante resinas para intercambio iónico, y se concentró por ultracentrifugación. Se prepararon columnas de cromatografía afines con IgG del suero de cerdos que había sido tomado 8 semanas después de la infección con la misma cepa (O₁ Brugge). El VIA purificado eluido de estas columnas era inmunológicamente activo, como se comprobó tanto por la

Purification of foot-and-mouth disease virus infection-associated antigen

The virus infection-associated (VIA) antigen of foot-and-mouth disease was extracted from infected BHK cells by means of ion exchange resins and concentrated by ultrafiltration. Affinity chromatography columns were prepared with IgG from the serum of pigs taken eight weeks after infection with the same strain (O₁ Brugge) of virus. Purified VIA eluted from these columns was immunologically active as shown by both

prueba de fijación de complemento como de inmunoprecipitación. La inyección en conejos y cobayos de 1,5 mg de antígeno purificado VIA en adyuvante de Freund, no indujo cantidades demostrables de anticuerpos. Sin embargo, al inyectar complejos de antígeno VIA/IgG porcino, se produjeron anticuerpos específicos para el antígeno VIA en ambas especies. El análisis electroforético en gel de poliacrilamida del antígeno VIA purificado por medio de columnas de cromatografía afines, reveló sólo un componente proteico.

complement fixation and immunoprecipitation procedures. Injection of 1.5 mg of purified VIA antigen in Freund's adjuvant into rabbits and guinea pigs failed to induce demonstrable quantities of antibodies. However, injection of VIA antigen/swine IgG immune complexes elicited antibodies specific for the VIA antigen in both rabbits and guinea pigs. Polyacrylamide gel electrophoretic analysis of the VIA antigen purified by affinity column chromatography showed only one protein component.

ODEND'HAL, S.

Texto en inglés. *Vet. Rec.* 104 (12): 262, 1979. (*FMD Bull. Wellcome* 18 (5): 31, 1979). [Department of Anatomy and Radiology, College of Veterinary Medicine, University of Georgia, Athens, Georgia 30602, USA]

Pruebas en roedores con antígeno asociado a la infección vírica luego de una epizootia de fiebre aftosa en India

A principios de 1978 se produjo un brote de fiebre aftosa en un pueblo de Bengal Occidental, India. Dos meses más tarde se introdujeron roedores en recintos que albergaban bovinos cuyo suero había revelado evidentes signos de infección, por la prueba VIA. Esta misma prueba fue utilizada para examinar sueros procedentes de los roedores, así como del personal veterinario y empleados de la explotación. Ninguna de las 47 ratas utilizadas en el estudio dio resultado positivo. Tampoco se hallaron muestras positivas de las 10 extraídas de ardillas y 6 tomadas de las personas que intervinieron en la prueba. Los resultados indican que, en un brote natural, tanto las ratas como las ardillas tienen una gran resistencia frente a la contaminación de virus aftoso por vía oral.

Testing rodents with virus infection associated antigen following a foot-and-mouth disease epizootic in India

An outbreak of foot-and-mouth disease occurred in a village in West Bengal, India, in early 1978. Two months later, rodents were trapped on premises where cattle sera demonstrated positive evidence of infection by the VIA test. Sera from the rodents and also from veterinary and other personnel in attendance were tested using the VIA test. Of 47 rats trapped, none were positive. There were no positive samples from 10 taken from squirrels or 6 taken from human beings. The results indicated that rats and squirrels have a strong resistance to infection with foot-and-mouth disease virus via the oral route under the condition of a natural outbreak.

PINTO, A.A.; GARLAND, A.J.M.

Texto en inglés. *J. Hyg. (Camb.)* 82: 41-50, 1979. (*FMD Bull. Wellcome* 18 (3): 14, 1979).

Respuesta de inmunidad al antígeno asociado a la infección vírica (VIA) en bovinos vacunados repetidamente con virus aftoso inactivado por formalina o acetiletileneimina

Se vacunaron grupos de bovinos hasta 4 veces con una vacuna antiaftosa inactivada con formalina y hasta 6 veces con vacuna inactivada con acetiletileneimina (AEI). En cada caso la vacuna fue

Immune response to virus-infection-associated (VIA) antigen in cattle repeatedly vaccinated with foot-and-mouth disease virus inactivated by formalin or acetyleneimine

Groups of cattle were vaccinated up to four times with formalin-inactivated FMD vaccine and up to six times with acetyleneimine (AEI)-inactivated vaccine. In each case the vaccine was

bivalente del tipo O-A. La respuesta de anticuerpo al antígeno VIA fue evaluada mediante una prueba de inmunodifusión doble. En ningún grupo se detectó anticuerpo antes ni después de la primera vacunación. La segunda inoculación con una vacuna inactivada con formalina provocó el desarrollo de anticuerpos en todos los animales. Con la vacuna inactivada con AEI, 4 de 12 animales dieron una respuesta transitoria de anticuerpos VIA. Otro grupo fue subdividido y vacunado una, dos o tres veces con vacuna del tipo C inactivada con AEI a varios intervalos antes de exponer los animales a la infección. Después de expuestos se detectó virus en el líquido esofágico-faríngeo en 22 de 24 bovinos. Ocasionalmente se observó una respuesta transitoria de anticuerpos a VIA en animales inmunes vacunados, aunque algunos que habían sido revacunados en varias ocasiones no desarrollaron anticuerpo VIA detectable luego de la descarga. Se concluyó que la respuesta de anticuerpo VIA es el resultado del antígeno en la vacuna, y no guarda relación con virus infeccioso residual. Existe una gran variación entre las respuestas individuales, pero la frecuencia y duración de la respuesta producida por la vacuna inactivada con formalina parece ser mayor que cuando se utiliza AEI para la inactivación. Los resultados subrayan la necesidad de interpretar con cautela las pruebas para el anticuerpo VIA en las encuestas efectuadas en el campo.

a bivalent type O-A vaccine. The antibody response to VIA antigen was measured in a double immunodiffusion test. In neither group was VIA antibody detected before and after the first vaccination. Following the second vaccination with formalin-inactivated vaccine all animals developed VIA antibody. With AEI inactivated vaccine four out of twelve cattle gave a transient response after the second vaccination and after successive vaccinations more animals tended to show a transient VIA antibody response. A further group was subdivided and vaccinated once, twice or three times with AEI inactivated type C vaccine at various intervals before exposure to infection. After exposure, virus was detected in oesophageal-pharyngeal fluid from 22 out of 24 cattle. A transient VIA antibody response was occasionally observed in immune vaccinated animals but some repeatedly vaccinated animals failed to develop detectable VIA antibody after challenge. It is concluded that the VIA antibody response results from antigen in the vaccine and is not due to residual infective virus. There was a wide variation in the VIA response of individual animals, but the frequency and duration of the response appears to be greater after use of formalin-inactivated vaccine than after use of AEI-inactivated vaccine. The results emphasize the need for caution in the interpretation of tests for VIA antibody in field surveys.

RWEYEMAMU, M.M.; TERRY, G.; PAY, T.W.F.

Texto en inglés. *Arch. virol.* 59 (1): 69-79, 1979. (*FMD Bull. Wellcome* 18 (2): 11, 1979). [Wellcome FMD Vaccine Laboratory, Pirbright, Woking, Surrey, England]

Estabilidad e inmunogenicidad de las partículas vacías del virus aftoso

Se ha comprobado que tres cepas del virus aftoso contenían cantidades significativas de partículas 75S vacías, producidas espontáneamente, así como partículas 140S infecciosas. Se estudió en detalle una de estas cepas (A Pando 1970). Sus partículas vacías presentaron un coeficiente de sedimentación de 67S en 0,04M de fosfato tamponado. Estas partículas son inestables en SDS, no infecciosas y probablemente, libres de ARN. Al calentarse se

Stability and immunogenicity of empty particles of foot-and-mouth disease virus

Three strains of foot-and-mouth disease virus were shown to contain significant amounts of naturally occurring 75S empty particles as well as infectious 140S particles. One of these strains, A Pando (1970), was studied in detail. Empty particles from this strain were shown to have a sedimentation coefficient of 67S in 0.04M phosphate buffer. They were labile in SDS, non-infectious and, probably, RNA-free and, on heating,

descompusieron en subunidades 12S, como ocurrió con las partículas 140S. Las partículas vacías difieren de las partículas completas en su composición polipéptida, puesto que contienen VP₀, pero no hubo evidencia de una disminución de VP₄. Las partículas 75S se hallaban presentes en cantidades considerables y permanecieron estables frente a la inactivación con AEI. Igualmente, permanecieron estables a 4°C durante un mínimo de dos años. En cobayos fueron tan inmunogénicas como las partículas 140S. Los antisueros desarrollados contra las partículas 75S presentaron la misma especificidad serológica en las pruebas de seroneutralización que los sueros preparados contra las partículas 140S. Se concluyó que las partículas 75S de la cepa A Pando pueden proporcionar una importante contribución como partículas 140S a la inmunogenicidad de las vacunas inactivadas preparadas a partir de esta cepa.

they broke down to 12S subunits as did the 140S particles. Empty particles differed from full particles in their polypeptide composition since they contained VP₀ but there was no evidence for a diminished content of VP₄. The 75S particles were shown to be present in significant amounts and to be stable to AEI inactivation. At 4°C, they were stable for at least two years. In guinea pigs, they were as immunogenic as the 140S particles. Antisera raised against the 75S particles had the same serological specificity in neutralization tests as sera prepared against the 140S particle. It was concluded that the 75S particles from this A Pando strain may provide as important a contribution as 140S particles to the immunogenicity of inactivated vaccines prepared from this strain.

bibliografía sobre enfermedades vesiculares**vesicular diseases bibliography**

ADAM, K.H.; KAADEN, O.R.; STROHMAIER, K.

Aislamiento de péptidos inmunizantes del virus aftoso tratados con bromuro de cianógeno. *Texto en inglés.* (Isolation of immunizing cyanogen bromide peptides of foot-and-mouth disease virus). *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 84 (3): 677-683, 1978. (*FMD Bull. Wellcome* 18 (2): 12, 1979). [Federal Research for Animal Virus Diseases, Tübingen, Federal Republic of Germany]

BATTY, E.; FARMER, Y.L.; BREAME, A.J.; BRUCE, W.

El efecto de la humedad relativa en el virus de la enfermedad vesicular del cerdo en películas secas antes y durante la fumigación con formaldehído. *Texto en inglés.* (The effect of relative humidity on swine vesicular disease virus in dried films before and during formaldehyde fumigation). *J. Hyg. (Camb.)* 82: 255-261, 1979. (*FMD Bull. Wellcome* 18 (5): 30, 1979). [Animal Virus Research Institute, Pirbright, Woking, Surrey, England]

BERNATH, S.; KUCSERA, G.; SOOS, T.

Evaluación de la prueba de neutralización del virus (índice S) para probar la potencia de vacunas anti-aftosas. *Texto en húngaro.* (Evaluation of the virus neutralization test (S-Index) for potency testing of foot-and-mouth disease vaccines). *Mag. Allatorv. Lap.* 34 (1): 29-32, 1979. (*FMD Bull. Wellcome* 18 (6): 32, 1979). [Allatgyogyaszati Oitoanyagellenorzo Intezet, Szallas u.8, 1107 Budapest, Hungary]

BODON, L.

Estudios sobre las propiedades del virus de la enfermedad vesicular del cerdo. *Texto en húngaro.* (Studies on the properties of swine vesicular disease virus). *Mag. Allatorv. Lap.* 33 (3): 183-185, 1978. (*FMD Bull. Wellcome* 18 (5): 30, 1979).

CONDY, J.B.; HEDGER, R.S.

Experiencias en el establecimiento de un rebaño de búfalo africano (*Synceros caffer*) libre de fiebre aftosa. *Texto en inglés.* (Experiences in the establishment of a herd of foot-and-mouth disease-free African buffalo (*Synceros caffer*). *S. Afr. J. Wildlife Res.* 8: 87-89, 1978. (*FMD Bull. Wellcome* 18 (1): 2, 1979). [Veterinary Research Laboratory, P.O. Box 8101, Causeway, Salisbury, Rhodesia]

CUNLIFFE, H.R.; WALKER, J.S.

La estabilidad de tres virus animales en el tejido tiroideo de porcinos infectados. *Texto en inglés.* (Stability of three animal viruses in thyroid tissue from infected swine). *Vet. Rec.* 104 (20): 461, 1979. (*FMD Bull. Wellcome* 18 (6): 34, 1979). [Plum Island Animal Disease Center, Greenport, New York 11944, USA]

CHU, R.M.; MOORE, D.M.; CONROY, J.D.

Enfermedad vesicular del cerdo experimental, patología y estudios de inmunofluorescencia. *Texto en inglés.* (Experimental swine vesicular disease, pathology and immunofluorescence studies). *Can. J. Comp. Med.* 43 (1): 29-38, 1979. (*FMD Bull. Wellcome* 18 (3): 15, 1979). [Department of Veterinary Pathology and Hygiene, University of Illinois, Illinois, USA]

DUTTA, P.K.; MAHANTA, P.N.; CHAKRABARTY, A.K.

Fiebre aftosa en mithun (*Bos gaurus*). (Foot-and-mouth disease in mithun (*Bos gaurus*). *Vet. Rec.* 104: 146, 1979. (*FMD Bull. Wellcome* 18 (3): 16, 1979). [Regional FMD Virus Typing Center, Assam Agricultural University, Khanapara, Gauhati-781022, Assam, India]

ESPINET, R.G.

Uso de una vacuna antiaftosa a sílice de diatomeas. *Texto en español*. (Use of diatomite silica in foot-and-mouth disease vaccines). *Gac. Vet.* (B.Aires) 39 (321): 304-317, 1977. (*FMD Bull. Wellcome* 18 (6): 32, 1979).

GAGGINO, O.P.; IBARRA, O.L.; LAPORTE, O.; RIVENSON, S.

Resultados de índices seroneutralizantes y comportamiento a la descarga de virus por vía intranasal en ovinos vacunados contra la fiebre aftosa. *Texto en español*. (Results of serum neutralization indices and the resistance to intranasal challenge of sheep vaccinated against foot-and-mouth disease). *Rev. Med. vet.* (B.Aires) 58 (4): 290-298, 1977. (*FMD Bull. Wellcome* 18 (1): 5, 1979). [Departamento de Virología, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Villa Udaondo, Castelar, Buenos Aires, Argentina]

GONÇALVES, E.I.

Contribución al estudio de la titulación del virus de la fiebre aftosa en ratones lactantes. *Texto en portugués*. (Contribution to the study of titration of foot-and-mouth disease virus in unweaned mice). *Científica* (Brasil) 5 (2): 223-225, 1977. (*FMD Bull. Wellcome* 18 (4): 22, 1979). [Laboratório de Febre Aftosa, Ministério de Agricultura, Barretos, São Paulo, Brasil]

GONÇALVES, E.I.; ARITA, G.M.; SOUZA, J.V.L.; SIQUEIRA, S.B.; BARBOSA, E.D.

Infección de ratones por el virus de la fiebre aftosa por vía oral. *Texto en portugués*. (Infection of unweaned mice with foot-and-mouth disease virus by the oral route). *Científica* (Brasil) 5 (2): 220-222, 1977. (*FMD Bull. Wellcome* 18 (2): 10, 1979). [Laboratório de Febre Aftosa, Ministério de Agricultura, Barretos, São Paulo, Brasil]

LAL, S.M.; NAIR, S.P.; MISRA, L.D.; KUMAR, S.

Una nota sobre una planta piloto de producción de vacuna antiaftosa monovalente del tipo O usando una línea de células BHK-21. *Texto en inglés*. (A note on pilot plant production of foot-and-mouth disease monovalent type O vaccine using BHK-21 cell line). *Indian J. anim. Sci.* 48 (8): 625-627, 1978. (*FMD Bull. Wellcome* 18 (4): 19, 1979). [Regional Station of the Indian Veterinary Research Institute, Hebbal, Bangalore 560024, India]

McKERCHER, P.D.; MORGAN, D.O.

Adyuvantes en las vacunas antiaftosas. *Texto en inglés*. (Adjuvants in foot-and-mouth disease vaccines). In Sexta Conferencia Internacional de Ciencia Veterinaria, Universidad Nacional de La Plata, Argentina, noviembre 1978 (Resumen-Summary). (*FMD Bull. Wellcome* 18 (4): 19, 1979). [Plum Island Animal Disease Center, Greenport, Long Island, New York 11944, USA]

NAVARRETE, M.G.; LOBO, C.A.

Prueba de Lucam simplificada en cobayos para el control de vacuna antiaftosa y análisis inmunológico de diferentes cepas del virus de la fiebre aftosa. *Texto en español*. (Simplified Lucam test in guinea pigs for the control of foot-and-mouth disease vaccine and immunological analysis of different strains of foot-and-mouth disease virus). *Revista ICA* (Bogotá) 12 (1): 41-54, 1977. (*FMD Bull. Wellcome* 18 (3): 15, 1979). [Laboratorio de Investigaciones Veterinarias de Enfermedades Tropicales, ICA, Bogotá, Colombia]

PILET, C.; MONTEIL, J.C.; MISHRA, U.; PERSON, J.M.

La actividad antivírica de diferentes extractos de Brucella. *Texto en francés*. (On the antiviral activity of different extracts of Brucella). *Bull. Acad. vet. Fr.* 51: 258-268, 1978. (*FMD Bull. Wellcome* 18 (6): 35, 1979). [Service de Microbiologie et d'Immunologie, École National Veterinaire d'Alfort, France]

SADIR, A.M.; MONESIGLIOM, J.C.; GAGGINO, O.P.; COLAUTI, N.; RIVENSON, S.

Anticuerpos fijadores de complemento en bovinos vacunados experimentalmente contra la fiebre aftosa. *Texto en español*. (Complement fixing antibodies in cattle vaccinated experimentally against foot-and-mouth disease). In Sexta Conferencia Internacional de la Ciencia Veterinaria, Universidad Nacional de La Plata, Argentina, noviembre 1978. (*FMD Bull. Wellcome* 18 (4): 21, 1979). [Departamento de Virología, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Villa Udaondo, Castelar, Buenos Aires, Argentina]

SASAKI, K.; SUPHAVILA, P.; CHANDARKEO, T.

Antígeno inactivado de virus concentrado para la prueba indirecta de fijación de complemento de la fiebre aftosa. *Texto en inglés*. (Inactivated, concentrated virus antigen for indirect complement fixation test of foot-and-mouth disease). *Nat. Inst. anim. Hlth Quart.* 18: 128-134, 1978. (*FMD Bull. Wellcome* 18 (6): 34, 1979). [National Institute of Animal Health, Josuihoncho, Kodaira, Tokyo 187, Japan]

SHAZHKO, Zh.A.; ONUFREIV, V.P.; SHAZHKO, L.F.; OKOVYITAYA, M.A.

Inhibidores vironeutralizantes no específicos de suero bovino e inmunidad postvacunal contra la fiebre aftosa. *Texto en ruso*. (Non-specific virus-neutralizing inhibitors of cattle serum and post-vaccinal immunity against foot-and-mouth disease). *Sel'skhokh. Biol.* 13 (2): 227-280, 1978. (*FMD Bull. Wellcome* 18 (4): 22, 1979).

SOLYOM, F.; ROITHM, J.; MAKER, A.; FAZEKAS, A.; CZELLENG, F.

Respuestas inmunitarias primarias y secundarias de terneros de varias edades a vacunas antiaftosas del tipo Frenkel. *Texto en húngaro*. (Primary and secondary immune response of calves of different ages to Frenkel-type foot-and-mouth disease vaccines). *Mag. Allatorv. Lap.* 34 (1): 23-27, 1979. (*FMD Bull. Wellcome* 18 (6): 33, 1979). [Phylaxia Oltoanyag es Tapszertermelo Vallalat, Szallas u. 5/7, 1107 Budapest, Hungary]

SPIER, R.E.; CLARKE, J.B.; PRESTON, K.J.; MOWAT, G.N.

Selección de un nuevo clon (AC9) de células BHK₂₁ C 13 en suspensión y su acrecentada susceptibilidad a una cepa de virus aftoso discriminante. *Texto en inglés*. (The selection of a new clone (AC9) of BHK₂₁ C 13 suspension cells and its enhanced susceptibility to a discriminating strain of foot-and-mouth disease virus). In 15th Conf. O.I.E. Perm. Comm., Paris, Rep. No. 305, 1978. (*FMD Bull. Wellcome* 18 (1): 6, 1979). [Animal Virus Research Institute, Pirbright, Woking, Surrey, England]

STROBBE, R.; LEUNEN, J.; DEBECQ, J.; WELLEMANS, G.

Vacunación antiaftosa de bovinos por inyección de la vacuna en el pliegue caudal. *Texto en francés*. (Vaccination of cattle against foot-and-mouth disease in the caudal fold). In 15th Conf. O.I.E. Perm. Comm., Paris, Rep. No. 505, 1978. (*FMD Bull. Wellcome* 18 (2): 10, 1979). [Institut National de Recherches Veterinaires, Gréselenberg 99, 1180 Bruxelles, Belgium]

STROHMAIER, K.; WITTMANN-LIEBOLD, B.; GEISSLER, A-W.

Secuencia del terminal N de tres proteínas de la capa del virus aftoso. *Texto en inglés*. (The N-terminal sequence of three coat proteins of foot-and-mouth disease virus). *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 85

(4): 1640-1645, 1978. (*FMD Bull. Wellcome* 18 (3): 14, 1979). [Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere, Tübingen, Germany]

SYUSYUKIN, A.A.; KOUDRIAVTSEVA, G.A.; OKOVITI, A.S.; TSVETKOVA, N.

Características citológicas y virológicas de diferentes sublíneas de células BHK₂₁. *Texto en francés*. (Cytological and virological characteristics of different sublines of BHK₂₁ cells). In 15th Conf. O.I.E. Perm. Comm., Paris, Rep. No. 304, 1978. (*FMD Bull. Wellcome* 18 (1): 7, 1979).

TRAUTMAN, R.; BENNETT, C.E.

Relación entre las biopruebas de neutralización vírica y de seroprotección para anticuerpos IgG e IgM a la fiebre aftosa. *Texto en inglés*. (Relationship between virus neutralization and serum protection bioassays for IgG and IgM antibodies to foot-and-mouth disease). *J. gen. Virol.* 42: 457-466, 1979. (*FMD Bull. Wellcome* 18 (5): 27, 1979). [Plum Island Animal Disease Center, Greenport, Long Island, New York 11944, USA]

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. Paul Suttmöller, Jefe de los Laboratorios
 Dr. Roberto Goić, Jefe de Asesoría de Campo
 Dr. Jaime Estupiñán, Jefe de Adestramiento e Información
 Srta. Patricia Chain, Oficial de Comunicaciones

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. Paul Suttmöller, Chief of Laboratories
Dr. Roberto Goić, Chief of Field Services
Dr. Jaime Estupiñán, Chief of Training and Information
Ms. Patricia Chain, Communications Officer