

CONTROL DE VACUNAS ANTIAFTOSAS.
RELACION ENTRE EL INDICE K (MODIFICADO) Y LOS INDICES
DE SEROPROTECCION Y SERONEUTRALIZACION

Alonso Fernández, A., Gomes, I., Vieira, A.*

INTRODUCCION

Los países empeñados en controlar la fiebre aftosa, utilizando entre otras medidas, la vacunación sistemática de la población sensible, han de disponer, para alcanzar tal objetivo, de suficiente cantidad de vacunas con un potencial inmunológico aceptable. Para asegurar la calidad de las vacunas, es necesario controlar cada una de las partidas producidas. Debemos tener presente que las vacunas de calidad mediocre, además de presentar dificultades en la determinación de su potencial inmunogénico, independientemente de los métodos que se utilicen, predeterminan las campañas antiaftosas al fracaso.

Los métodos directos de control de inmunogenicidad de las vacunas son de tal modo onerosos que no es factible controlar, por ellos solamente, el total de las partidas necesarias para los programas de lucha contra la fiebre aftosa en los países de Sudamérica. Para cumplir ese objetivo es necesario recurrir a aquellos métodos indirectos que tengan una adecuada relación con los métodos directos. Por otro lado, la necesidad de utilizar bovinos altamente susceptibles en los métodos directos más en uso (6, 7, 11), limita aún más su aplicación, una vez que en muchos países no existen áreas libres de fiebre aftosa.

Para decidir la aplicación de los métodos indirectos (8, 9) ya relacionados a los directos (7, 10) se requiere una investigación y adaptación a las disponibilidades de cada país.

El presente trabajo está encaminado al estudio de la utilización de bovinos de zonas enzooticas en el control inmunogénico de las vacunas antiaftosas, siguiendo las descripciones de Lucam *et al.* (7, 10) con la finalidad de obtener un método directo para su aplicación de rutina, y de base para la obtención de las relaciones con los métodos indirectos.

MATERIAL Y METODOS

Virus

Las suspensiones virales en medio de Earle a base de epitelio lingual bovino y de células BHK se conservaron en nitrógeno líquido a -170° C en ampollas en volúmenes de 1 ml. Previamente se determinaron sus títulos infecciosos en ratón lactante (dosis letales 50% - DL50RL). Se utilizaron las cepas: O1 Campos (Brasil/58), O1 Caseros (Argentina/67), O1 Cura (Venezuela/66), O1 Guyana/69, A24 Cruzeiro (Brasil/55), C3 Resende (Brasil/55) y C3 Paraguay/69 (4).

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

Bovinos

Se utilizaron 182 bovinos procedentes de zonas enzoóticas de fiebre aftosa, entre 18 y 24 meses de edad, homogéneos y en buen estado sanitario, sin antecedentes de haber padecido fiebre aftosa o haber sido vacunados, y con un índice de seroprotección (ISP) inferior a 1.

Vacunas

Se comprobaron vacunas inactivadas monovalentes y trivalentes preparadas según Abreu (1) y que habían pasado satisfactoriamente los controles de esterilidad e inocuidad.

Vacunación

Se vacunaron por vía subcutánea 98 bovinos (de 4 a 8 por valencia), a la dosis indicada por la sección de producción de vacunas del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa, o sea, 2 ml para las monovalentes y 5 ml para las trivalentes.

Sangría de los bovinos

Los bovinos vacunados y testigos se sangraron en el momento de la comprobación. El suero se conservó a -25° C hasta la realización de las pruebas de seroprotección y seroneutralización.

Titulación en ratones lactantes

Las suspensiones virulentas, en diluciones de base 10, se inocularon por vía intraperitoneal en ratones suizos Webster, cepa Rockefeller, 6 a 8 días de edad, en volúmenes de 0,05 ml para cada ratón, utilizando 6 ratones por dilución. Las observaciones se prolongaron durante 7 días, expresando la infecciosidad en dosis letales 50% en ratón lactante por ml (DL₅₀ RL/ml) que se estableció mediante la aplicación del cálculo de Reed/Muench (13).

Titulación en cultivos de tejido

Con las suspensiones virulentas en diluciones de base 10 se sembraron 6 tubos por dilución, en cantidad de 0,1 ml de inóculo por tubo. Las lecturas postinoculación se efectuaron de acuerdo al tipo de células utilizadas, considerándose positivos los tubos que presentaron efecto citopático. En caso de duda se confirmó el resultado por fijación de complemento. La infecciosidad se expresa en dosis infectantes 50% en cultivo de tejido por ml (DI₅₀ CT/ml), aplicando las normas descriptas para el ratón lactante (13).

Comprobación de los bovinos

Tres a cuatro semanas postvacunación, los bovinos vacunados y los testigos (previamente anestesiados con hidrato de cloral al 40%, inyectado por vía intravenosa a razón de 1 ml por cada 5 kg de peso vivo) se comprobaron con suspensiones virulentas de epitelio lingual bovino correspondiente a la cepa de la valencia que se deseaba controlar. A todos los bovinos, vacunados y testigos, se les inocularon cuatro diluciones virulentas, de base 10, inyectándose cada una en cuatro puntos de una línea, a razón de 0,1 ml por punto, iniciándose con

la más concentrada en la zona próxima a la base de la lengua. En los bovinos vacunados se utilizaron las diluciones que contenían 10^4 , 10^3 , 10^2 y 10^1 DI50 Bov/ml y en los testigos las que contenían 10^3 , 10^2 , 10^1 y 10^0 . Por tanto, si la suspensión virulenta de una cepa de control posee $10^{6,5}$ DI50Bov/ml, en los bovinos vacunados se inocularon las diluciones $10^{-2,5}$, $10^{-3,5}$, $10^{-4,5}$ y $10^{-5,5}$ y en los testigos las $10^{-3,5}$, $10^{-4,5}$, $10^{-5,5}$ y $10^{-6,5}$.

Indice K modificado - observación de las lesiones

a) Las lesiones en el punto de inoculación en los bovinos testigos se observaron a las 24 y 44 horas, y en los vacunados solo a las 44 horas postinoculación, por considerar este lapso más apropiado (2). Esta inmunidad en el punto de inoculación se expresó según Lucam *et al.* (7, 10) en log DI50Bov/ml detectadas en bovinos testigos (T) y vacunados (V) ($\log IK = \log T - \log V$, o sea $IK = \frac{T}{V}$).

b) La protección a la generalización podal se examinó cada 2 días durante los 7 días subsiguientes a la inoculación. Esta protección se expresó en el número de bovinos que no presentaron lesiones en patas, en relación al número de vacunados, o en porcentaje de protección a la generalización podal (% PGP).

Indice de Seroprotección (ISP)

[Se utilizó el método establecido por Cunha (3) con ligeras modificaciones. Las suspensiones virulentas correspondientes a las cepas de control se prepararon a partir de epitelio lingual bovino. El suero proveniente de cada bovino vacunado o testigo, sin diluir y con previa inactivación a 60°C durante 20 minutos, fue inoculado a 24 RL de 6 a 8 días de edad, en volúmenes de 0,1 ml por vía subcutánea. Transcurrida una hora, los 24 RL inoculados con el mismo suero se dividieron en 4 grupos y a cada grupo se le inoculó por vía intraperitoneal una de las cuatro diluciones de virus preparadas a partir de suspensión virulenta de la cepa de control, en cantidad de 0,05 ml a cada ratón. En cada prueba se realizó una titulación del virus utilizado. Además se efectuó un control de seroprotección utilizando un suero normal de bovino. Los ratones se observaron durante los 7 días subsiguientes a la inoculación. El logaritmo del ISP de los sueros se expresa por la diferencia entre los log de las titulaciones del virus en los ratones controles (T) y en ratones previamente inoculados con cada uno de los sueros bovinos (S) ($\log ISP = \log DL50RL/ml (T) - \log DL50RL/ml (S)$, o sea $ISP = \frac{T}{S}$). Los títulos se establecen mediante la aplicación del cálculo de Reed-Muench (13). El ISP de una valencia representa la media de los índices individuales de los sueros bovinos correspondientes a dicha valencia.

Las diluciones de virus para la inoculación se prepararon en base a las DL50RL/ml. Para la titulación del virus se utilizaron las diluciones que contenían 10^3 , 10^2 , 10^1 y 10^0 DL50RL/ml para los sueros de bovinos testigos, para el suero normal las 10^4 , 10^3 , 10^2 y 10^1 , y para los sueros bovinos vacunados las 10^5 , 10^4 , 10^3 y 10^2 .

Si por ejemplo, la suspensión virulenta de la cepa de control contenía $10^{7,8}$ DL50RL/ml se utilizaron para la titulación del virus las diluciones $10^{-7,8}$, $10^{-6,8}$, $10^{-5,8}$ y $10^{-4,8}$, para los sueros bovinos testigos y suero normal las diluciones $10^{-6,8}$, $10^{-5,8}$, $10^{-4,8}$ y $10^{-3,8}$, y para los sueros de bovinos vacunados las $10^{-5,8}$, $10^{-4,8}$, $10^{-3,8}$ y $10^{-2,8}$.

Indice de Seroneutralización (IS)

[El método utilizado es básicamente el IS de Lucam, Fedida y Dannacher (8) con ligeras modificaciones. En tubos de Pyrex (16 x 150 mm) se cultivaron $1,8 \times 10^5$ células BHK-21, Clon 13,

en monocamadas, en 1 ml de medio Eagle modificado (12) con 10% de suero bovino por tubo durante 48 horas. El virus de control utilizado fue previamente pasado de 3 a 6 veces en estas células. Con los sueros correspondientes a los bovinos vacunados y testigos se realizaron diluciones de base 2, utilizándose para los de bovinos testigos diluciones de 1:2 a 1:32 y para los vacunados de 1:16 a 1:512. A 1 ml de las diferentes diluciones se añadió 1 ml del virus de control que contenía 10^3 DI₅₀CT/ml. La mezcla suero + virus se mantuvo en incubación durante 1 hora a 37° C y 30 minutos a 4° C; en seguida se inocularon 0,2 ml (conteniendo 10^2 DI₅₀CT) de cada mezcla, por tubo, en 6 tubos. Previamente a la inoculación de los tubos, se eliminó el medio Eagle modificado con suero y después de la inoculación se añadieron 0,8 ml de medio Eagle modificado sin suero. En cada prueba, además de una seroneutralización con un suero bovino normal, se realizó una titulación control del virus utilizado, así como control de células, y de cada uno de los sueros bovinos en estudio. Las lecturas se efectuaron a las 72 horas postinoculación de los tubos. El IS de cada suero se estableció mediante la aplicación del cálculo según Reed-Muench (13) en los tubos que presentaron efecto citopático. El IS de cada valencia se expresó mediante la media de los índices individuales de los sueros bovinos correspondientes a cada valencia.

RESULTADOS

Indice K Modificado (IKM)

Bovinos testigos: Las lesiones observadas, 24 y 44 horas postinoculación, en la lengua de 46 bovinos, así como la desviación típica (SD) en dichos tiempos de lectura están indicados en la tabla 1. Todos los bovinos reaccionaron en la lengua y 44 presentaron generalización podal.

Las SD a las 44 horas postinoculación obtenidas a partir de 8 y 5 titulaciones sucesivas en lotes de 4 bovinos testigos con las cepas O1 Caseros y C3 Resende respectivamente, se presentan en la tabla 2. Juntamente se indican las SD obtenidas a partir de titulaciones en RL realizadas paralelamente, utilizando 8 ratones por dilución. Entre las primeras titulaciones y las últimas transcurrieron 18 meses. Hubo variación de sensibilidad entre los bovinos testigos y los RL para distintas cepas y pasajes del virus aftoso bovino (tabla 3).

Bovinos vacunados: Los IK obtenidos a las 44 horas postinoculación, así como la protección a la generalización podal en los bovinos vacunados están presentados en forma individual (tabla 4), agrupados por valencias de vacunas en lotes de 4 bovinos (Fig. 1 y tabla 5), y en lotes de 8 (Fig. 2).

Indice de Seroprotección (ISP)

Las medias de los ISP obtenidas a partir de los sueros de bovinos vacunados, sangrados en el momento de la comprobación, están presentados en correlación con la generalización podal (PGP) en lotes de 4 y 8 bovinos, en las figuras 3 y 4 respectivamente, y en correlación con el IK a las 44 horas postinoculación en lotes de 4 bovinos, en la figura 5. Tanto para el método directo como para el ISP se utilizaron las mismas cepas de control.

Indice de Seroneutralización (IS)

La figura 6 muestra la relación existente, en lotes de 4 bovinos, entre el IK obtenido a las 44 horas postinoculación y las medias de los índices de seroneutralización, a partir de los sueros de los bovinos vacunados, sangrados en el momento de la comprobación, utilizando las mismas cepas de control para ambos índices.

DISCUSION

Teniendo en cuenta que las vacunas deben proteger a la población sensible frente a los virus presentes en el campo, las cepas que han de ser utilizadas en el control de inmunidad de las vacunas, deben tener un comportamiento serológico semejante al de las cepas de campo. Conservando en nitrógeno líquido las cepas de control en suspensión, es posible utilizar con seguridad la misma suspensión durante un mínimo de 18 meses, por no presentar caída significativa en sus títulos infecciosos (tabla 2). Se comprobó también que no existe relación entre la infecciosidad de las cepas para el bovino y para el ratón lactante (tabla 3), por lo que las DI50 a ser inoculadas en bovinos destinados al control de inmunidad de vacunas antiaftosas no deben basarse en el ratón lactante.

Los bovinos testigos, tanto de zonas libres (5) como de zonas enzoóticas (2), presentan un incremento progresivo en los títulos infecciosos hasta aproximadamente las 44 horas postinoculación. Cabe mencionar que los títulos obtenidos a las 24 horas presentan valores de desviación típica más elevados que los de los títulos obtenidos a las 44 horas, siendo éste el momento óptimo para efectuar las lecturas (tabla 1). Los valores de SD obtenidos a las 24 horas en animales de zonas libres (5) son muy próximos a los obtenidos a las 44 horas en animales de zonas enzoóticas (tabla 1).

La comparación entre los valores individuales de IK y la protección a la generalización podal en bovinos vacunados (tabla 4) establece que: valores $K \geq 1,5$ proporcionan un 97% de protección podal y valores $K < 0,7$ proporcionan el 26%. Por otro lado, agrupando los bovinos por valencia y en lotes de 4, se observó que a valores $IK \geq 1,5$ corresponde una PGP $\geq 75\%$ en todos y cada uno de los lotes comprobados, confirmándose a la vez la protección a la generalización obtenida en las observaciones individuales. Sin embargo, si el valor $K < 0,7$ todos los lotes proporcionan una protección $< 75\%$ (tabla 5, Figura 1).

Utilizando lotes de 4 u 8 animales se observó un comportamiento semejante en todos los ensayos. Por tanto, el $IK \geq 1,5$ obtenido mediante la construcción de la línea de regresión es indicador para lotes de 4 u 8 bovinos vacunados, de una protección tanto en el punto de inoculación como frente a la generalización. En cambio, las vacunas con $IK < 0,7$ proporcionaron una deficiente protección en ambos aspectos.

Los valores $IK \geq 1,5$ o $< 0,7$ definen con claridad la inmunidad global (IKM) proporcionada por las vacunas, puesto que en la inmunidad global se consideró la protección en el punto de inoculación y la protección a la generalización podal.

Las vacunas que proporcionan valores IK de $\geq 0,7$ a $< 1,5$ son de capacidad inmunogénica dudosa. Ante estos resultados es aconsejable complementar el IK con las observaciones de la generalización podal, exigiendo en esta última una protección $\geq 75\%$.

La SD obtenida en estas experiencias para 11 vacunas comprobadas, cada una en dos distintos lotes de 4 bovinos, ha sido $\pm 0,43$. Esto, unido al comportamiento de los bovinos testigos es una indicación de que los bovinos de zonas enzoóticas pueden ser utilizados en el control de las vacunas antiaftosas.

Correlacionando las medias de los ISP con la PGP en lotes de 4 u 8 bovinos vacunados, la línea de regresión indica que es necesario un $ISP \geq 3$ para que cada lote alcance una $PGP \geq 75\%$ (Figs. 3 y 4). Lo mismo fue confirmado cuando se comparó el valor del ISP con el del IK, o sea, que es necesario un valor $ISP \geq 3$ para obtener un $IK \geq 1,5$ (Fig. 5).

Por lo tanto, las vacunas que proporcionan un $ISP \geq 3$ son consideradas de calidad inmunogénica aceptable, mientras que las que presentan valores $ISP < 3$ han de ser comprobadas mediante la inoculación en bovinos.

La SD obtenida en estas experiencias para 11 vacunas comprobadas, cada una en dos distintos lotes de 4 bovinos, ha sido de $\pm 0,48$, lo que indica que esta técnica de control es de confianza y reproducible.

Comparando las medias de IS con el IK en lotes de 4 bovinos vacunados, se observó que para obtener un $IK \geq 1,5$ es preciso alcanzar un $IS \geq 1,6$ (Fig. 6). Por tanto, las vacunas que proporcionan valores de $IS \geq 1,6$ poseen un potencial inmunogénico aceptable, mientras que las vacunas que proporcionan valores inferiores a este, deben ser sometidas a pruebas de control mediante inoculación en bovinos. Consideramos que el IS, como método de control de la calidad inmunogénica de las vacunas antiaftosas, es el menos preciso, a la vez que el más irregular y limitado de los analizados.

El índice K modificado (IKM) está basado en el índice K (IK) descrito por Lucam *et al.* (7, 10) al que se le introdujeron algunas variantes y se le acrecentó la observación de la generalización podal. Las principales modificaciones introducidas son: a) en la inoculación se toman como base dosis fijas para todos los virus (DI50Bov) independientemente de las diluciones que se utilizan; b) la lectura de las lesiones, tanto en los bovinos testigos como en los vacunados, se realiza a las 44 horas postinoculación (este es el momento en que en todas las cepas se observaron los valores más bajos de desviación típica), y c) la protección frente a la generalización podal, que amplía el conocimiento de la inmunidad que confiere la vacuna que se está controlando.

Todos estos aspectos concurren para hacer de este método un recurso útil, práctico y seguro para el control de rutina de las vacunas antiaftosas. Por consiguiente puede ser utilizado también como método directo de referencia para establecer la posibilidad de usar otros métodos indirectos además del ISP e IS.

RESUMEN

El control de la eficacia de las vacunas antiaftosas inactivadas utilizando bovinos de zonas enzoóticas, es fácil de ser realizado mediante el método del índice K, pero modificado para esas condiciones. Este método directo se correlaciona además, con los métodos serológicos indirectos - seroprotección y seroneutralización.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se aceptan como vacunas de calidad aceptable aquellas que presentan un índice K modificado igual o superior a 1,5 que deberá corresponder a una protección frente a la generalización podal igual o superior al 75%.

La correlación encontrada entre los índices K iguales o superiores a 1,5 y los métodos indirectos de seroprotección y seroneutralización indica que las medias de estos dos índices deben ser no inferiores a 3,0 y 1,6 respectivamente.

SUMMARY

CONTROL OF FOOT-AND-MOUTH DISEASE VACCINES.
RELATIONSHIP BETWEEN INDEX K (MODIFIED) AND SEROPROTECTION
AND SERONEUTRALIZATION INDEXES

The efficacy control of inactivated FMD vaccines, employing cattle from enzootic areas can be performed using the Index K method with modifications for these conditions. Additionally, this method can be correlated with the indirect serological methods - seroprotection and seroneutralization.

According to the data obtained in this study, vaccines are considered of acceptable quality if their Index K values are equal or higher than 1.5, which should correspond to a protection against generalization equal or higher than 75%.

The correlation found between the Indexes K equal or superior to 1.5 and the seroprotection and seroneutralization tests shows that their average should not be below 3.0 and 1.6 respectively.

TABLA 1 - TABLE 1

*Influencia del tiempo de observación en los títulos infecciosos
(log DI₅₀/ml) del virus aftoso en 46 bovinos testigos
The difference in FMD virus infectivity titers (log ID₅₀/ml)
of 46 control cattle as influenced by observation time*

Horas postinoculación Hours post-inoculation	Promedio Average	Desviación típica Standard deviation
24	4.56	1.46
44	5.60	0.80

TABLA 2 - TABLE 2

Títulos infecciosos de dos cepas de virus aftoso (log DI50/ml) en bovinos testigos a las 44 horas postinoculación y (log DL50/ml) en ratones lactantes
Infectivity titers of two FMD virus strains (log ID50/ml) in control cattle at 44 hours post-inoculation and (log LD50/ml) in suckling mice

Cepa - Strain	Nº de titulaciones No. of titrations	Bovino - Cattle		Ratón lactante Suckling mouse	
		Promedio Average	Desviación típica Standard deviation	Promedio Average	Desviación típica Standard deviation
O1 Caseros	8	5.52	0.28	7.10	0.25
C3 Resende	5	5.46	0.32	7.55	0.26

TABLA 3 - TABLE 3

Variación de los títulos infecciosos de cepas de virus aftoso y de diferentes pasajes en bovinos expresados en log DL50/ml en ratón lactante y log DI50/ml en bovinos testigos
Variation in the infectivity titers of FMDV strains at varying passage level in cattle, expressed in log LD50/ml in suckling mice and log ID50/ml in control cattle

Cepa y número de pasajes Strain and passage number	Ratón lactante* Suckling mice	Bovino** Cattle	△ RL/bovino SM/cattle
O1 Campos 5	6.18	3.94	2.24
O1 Campos 6	6.96	5.73	1.23
O1 Caseros 1	7.10	5.52	1.58
O1 Cura 1	7.60	6.66	0.94
O1 Guyana 2	8.80	5.06	3.74
A24 Cruzeiro 13	6.63	3.50	3.13
A24 Cruzeiro 14	5.96	3.92	2.04
C3 Paraguay 1	6.80	4.27	2.53
C3 Resende 10	6.62	5.57	1.05
C3 Resende 11	7.55	5.46	2.09

* Ocho ratones lactantes por dilución - Eight suckling mice per dilution

** Cuatro bovinos por titulación, lesiones en la lengua observadas a las 44 horas postinoculación
 Four cattle per titration, tongue lesions observed at 44 hours post-inoculation

TABLA 4 - TABLE 4

Indice K a las 44 horas postinoculación en bovinos vacunados y el porcentaje de protección a la generalización podal. Análisis individual

Index K at 44 hours post-inoculation in vaccinated cattle, and the percentage of protection against generalization. Individual analysis

IK	Bovinos - Cattle		% Protección % Protection
	T o t a l	Protegidos Protected	
≥ 1.5	68	66	97
< 0.7	23	6	26

TABLA 5 - TABLE 5

Indice K a las 44 horas postinoculación en lotes de 4 bovinos vacunados y el porcentaje de protección a la generalización podal

Index K at 44 hours post-inoculation in groups of 4 vaccinated cattle and the percentage protection against generalization

IK	Lotes de 4 bovinos - Groups of 4 cattle		% Protección % Protection
	T o t a l	Protegidos* Protected	
≥ 1.5	13	13	100
< 0.7	4	0	0

* Si 3 ó más bovinos en cada lote de 4 estaban protegidos, el lote fue considerado como protegido.

If 3 or more cattle in each group of 4 were protected then the entire group was considered protected.

FIGURA 1 - FIGURE 1

Diagrama de dispersión entre el Índice K a las 44 horas postinoculación y el número de bovinos protegidos a la generalización, en 21 lotes de 4 bovinos vacunados

Scatter diagram between Index K at 44 hours post-inoculation and the number of cattle protected against generalization, in 21 groups of 4 vaccinated cattle

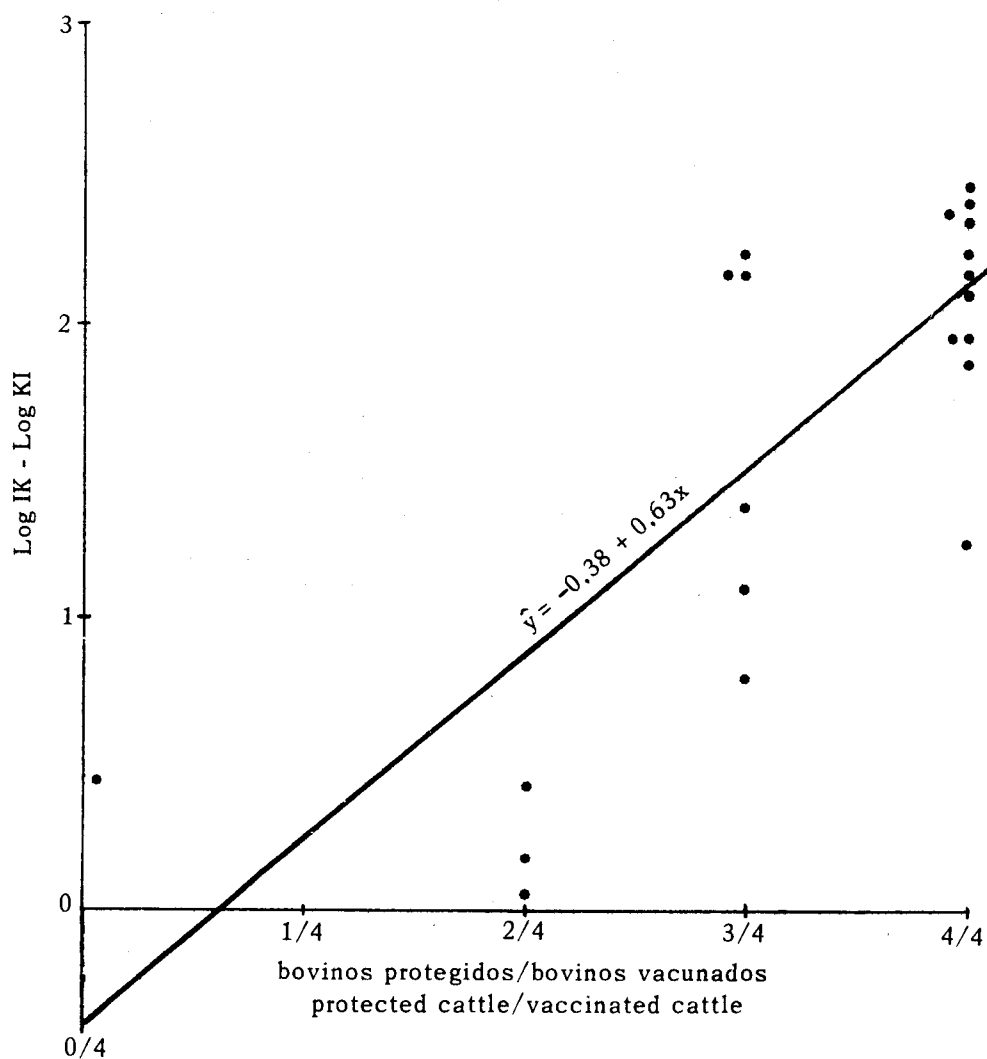


FIGURA 2 - FIGURE 2

Diagrama de dispersión entre el Índice K a las 44 horas postinoculación y el número de bovinos protegidos a la generalización, en 11 lotes de 8 bovinos vacunados

Scatter diagram between Index K at 44 hours post-inoculation and the number of cattle protected against generalization, in 11 groups of 8 vaccinated cattle

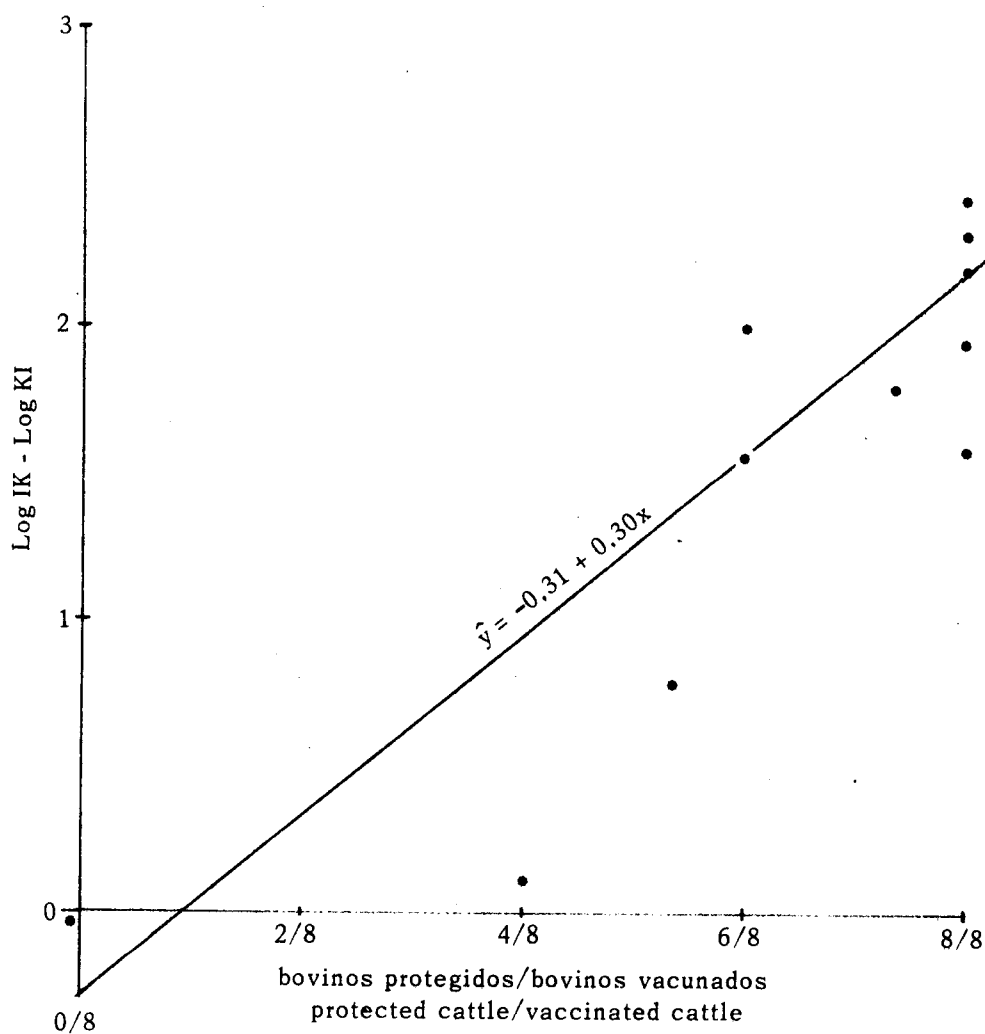


FIGURA 3 - FIGURE 3

Diagrama de dispersión entre las medias de los Índices de SP en el momento de la comprobación y el número de bovinos protegidos a la generalización, en 21 lotes de 4 bovinos vacunados

Scatter diagram between averages of SP Indexes at the time of challenge and the number of cattle protected against generalization, in 21 groups of 4 vaccinated cattle

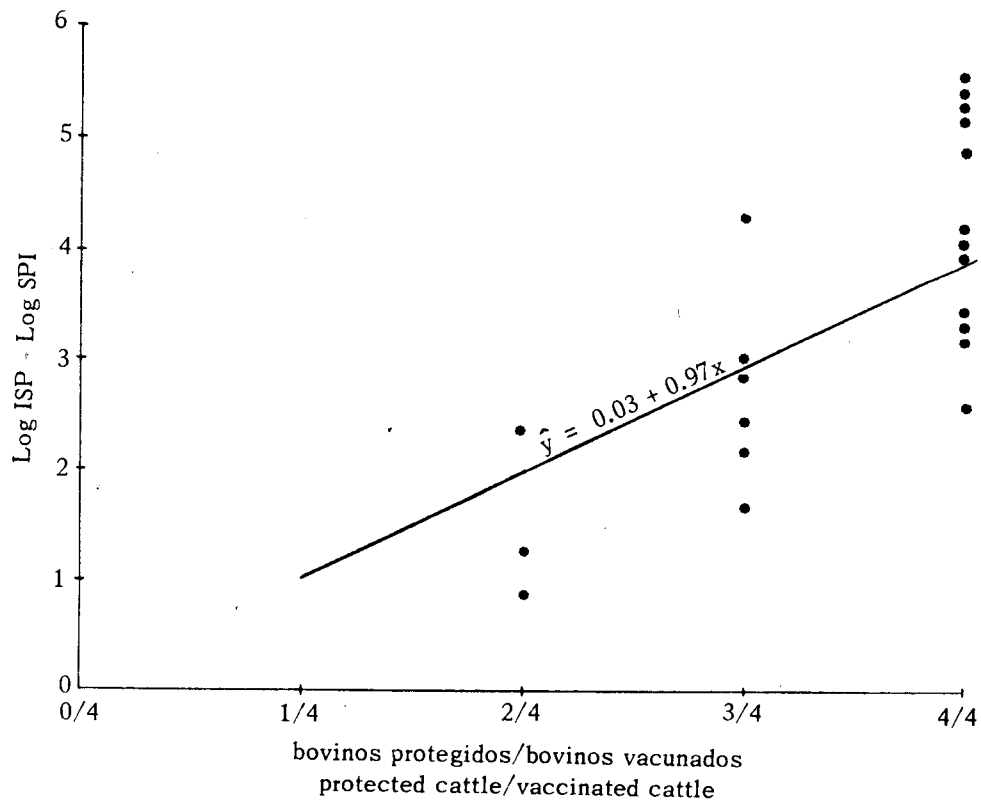


FIGURA 4 - FIGURE 4

Diagrama de dispersión entre las medias de los Indices de SP en el momento de la comprobación y el número de bovinos protegidos a la generalización, en 11 lotes de 8 bovinos vacunados

Scatter diagram between averages of SP Indexes at the time of challenge and the number of cattle protected against generalization, in 11 groups of 8 vaccinated cattle

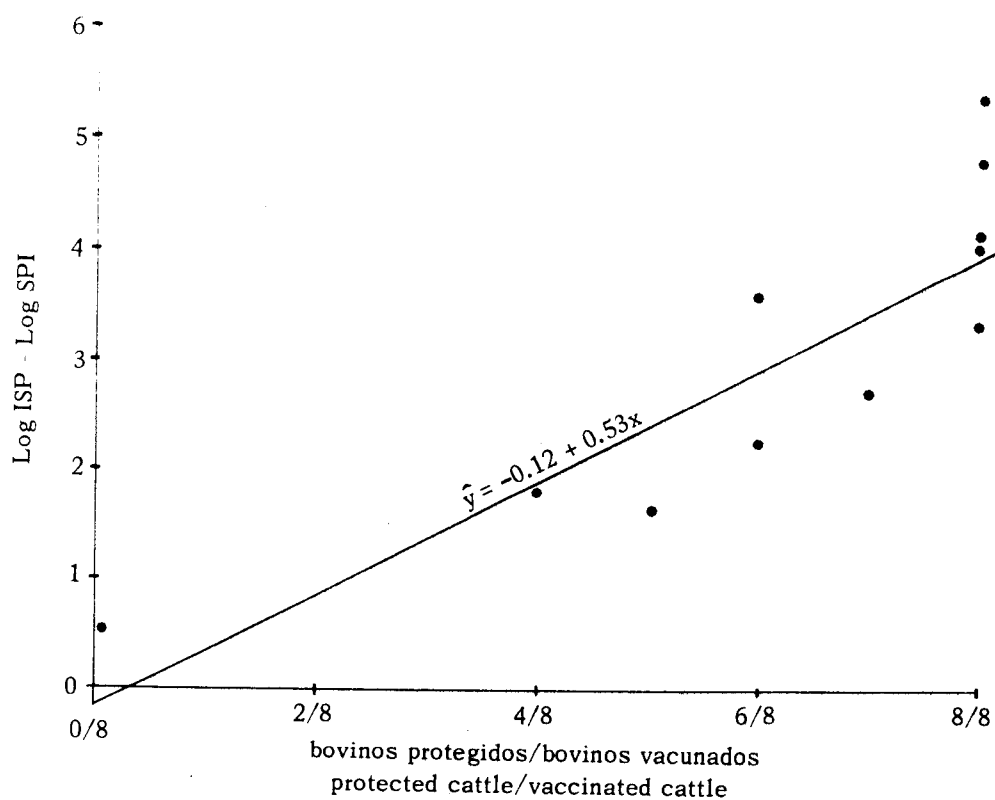


FIGURA 5 - FIGURE 5

Diagrama de dispersión entre las medias de los Indices de SP en el momento de la comprobación y el Índice K a las 44 horas postinoculación, en 23 lotes de 4 bovinos vacunados

Scatter diagram between averages of SP Indexes at the time of challenge and the Index K at 44 hours post-inoculation, in 23 groups of 4 vaccinated cattle

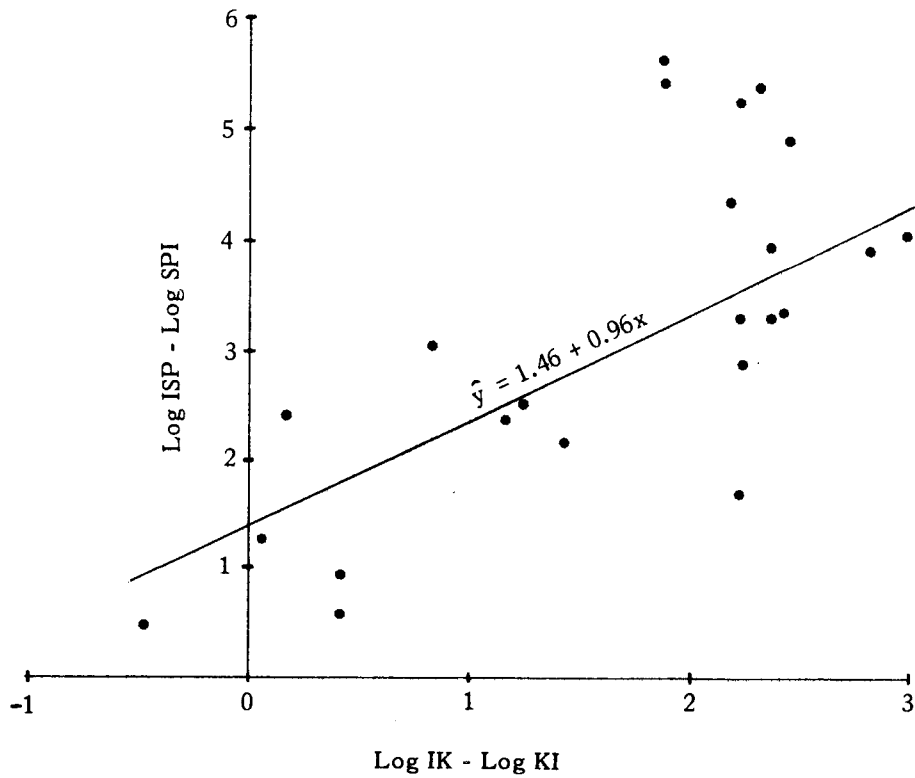
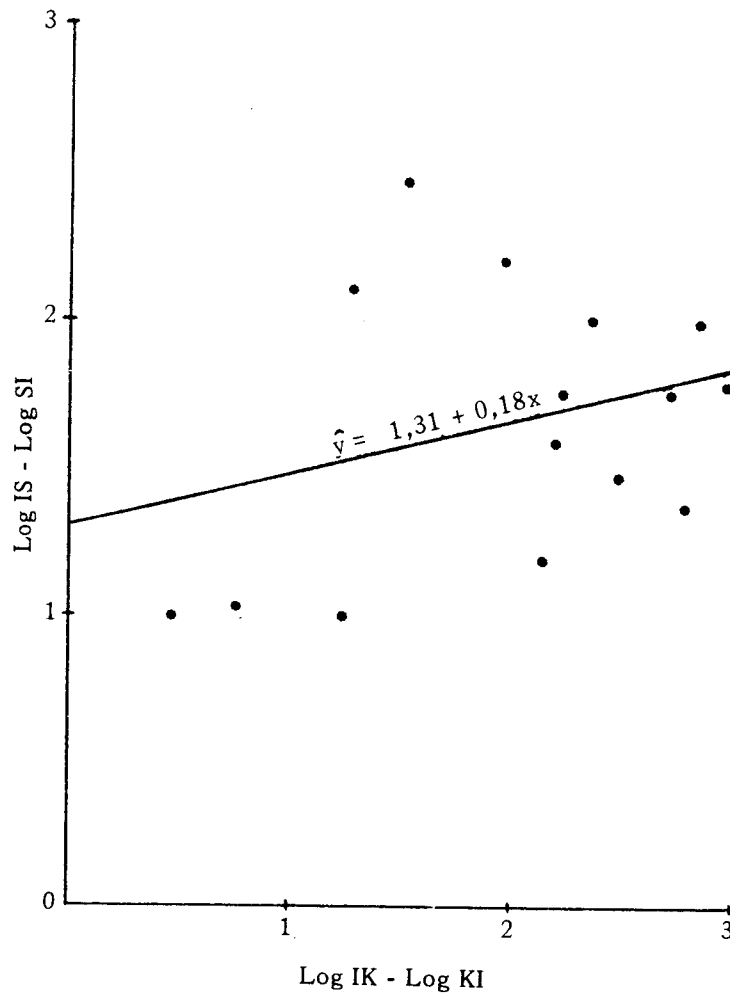


FIGURA 6 - FIGURE 6

Diagrama de dispersión entre las medias de los Índices de SN (IS) en el momento de la comprobación y el Índice K a las 44 horas postinoculación, en 15 lotes de 4 bovinos vacunados

Scatter diagram between averages of SN (SI) Indexes at the time of challenge and the Index K at 44 hours post-inoculation, in 15 groups of 4 vaccinated cattle



BIBLIOGRAFIA

1. ABREU MARTINS, I. Vacunas antiaftosas hidróxido-saponinadas inactivadas por el formol. *Bltm Centro Panamericano Fiebre Aftosa 1*: 1-19, 1971.
2. ALONSO FERNANDEZ, A., FEDERER, K.E., GOMES, I., VIEIRA, A. Comparación inmunológica y serológica de dos subtipos del virus aftoso tipo C Waldmann. *Bltm Centro Panamericano Fiebre Aftosa 4*: 9-20, 1971.
3. CUNHA, F.G., BAPTISTA Jr., J.A., SERRAO, U.M., TORTURELLA, I. El uso de los ratones lactantes en la evaluación de los anticuerpos contra el virus de la fiebre aftosa y su significación inmunológica. *Gac. vet., B. Aires 19* (110): 243-267, 1957.
4. FEDERER, K.E., ALONSO FERNANDEZ, A. Subtipos del virus de la fiebre aftosa en Sudamérica. (en preparación).
5. FEDIDA, M. Etude quantitative de l'état immunitaire post-vaccinal et des interrelations entre ses divers aspects dans une virose animale, la fièvre aphteuse. Thèse présentée à l'Université Claude Bernard, Lyon, p. 307, 1971.
6. HENDERSON, W.M., GALLOWAY, I.A. The use of culture virus in the preparation of foot-and-mouth disease vaccine. *J. Hyg. Camb. 51* (4): 546-558, 1953.
7. LUCAM, F., FEDIDA, M. Une nouvelle méthode quantitative pour l'appréciation de l'immunité anti-aphteuse. *Bull. Off. int. Epiz. 49* (9-10): 596-621, 1958.
8. LUCAM, F., FEDIDA, M., DANNACHER, G. Mesure de l'immunité anti-aphteuse post-vaccinale du boeuf au moyen d'une épreuve de séro-neutralization en culture de tissus. *Bull. Acad. Vét. 37* (4): 175-180, 1964.
9. LUCAM, F., FEDIDA, M., DANNACHER, G. Mesure de l'immunité anti-aphteuse post-vaccinale du boeuf, par épreuve sur le cobaye. *Rev. Méd. vet. 115* (4): 225-245, 1964.
10. LUCAM, F., FEDIDA, M., DANNACHER, G. Le contrôle officiel français des vaccins anti-aphteux. *Bull. Off. int. Epiz. 65* (3-4): 385-418, 1966.
11. MACKOWIAK, C., FONTAINE, J., TERRE, J., STELLMANN, C., ROUMIANTEEFF, M., PETERMANN, H.G. Contrôle quantitatif du vaccin anti-aphteux. Etude de la loi dose-effet et corrélation entre les doses vaccinales 50 p. 100 chez les cobayes et les bovidés. *Bull. Off. int. Epiz. 65* (1-2): 131-171, 1966.
12. MACPHERSON, I., STOKER, M. Polyoma transformation of hamster cell clones - an investigation of genetic factors affecting cell competence. *Virology 16*: 147-151, 1962.
13. REED, L.J., MUENCH, H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Amer. J. Hyg. 27* (3): 493-497, 1938.