
BOLETIN

del centro panamericano
de fiebre aftosa

N° 29-30, enero-junio, 1978.

No. 29-30, January-June, 1978.

contenido

contents

Necesidad de guías y padronización de la notificación y el diagnóstico de las enfermedades	p. 1
Needs for guidelines and standardization of disease diagnosis and reporting.	7
<i>Pedro N. Acha</i>	
La epidemiología de la estomatitis vesicular. Una revisión de la literatura y propuestas para estudios de campo.	13
The epidemiology of vesicular disease. A review of some of the literature and proposal for further field studies	35
<i>John Mason</i>	
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.	55
<i>Centro Panamericano de Fiebre Aftosa</i>	
<i>Dirección de Lucha Contra la Fiebre Aftosa</i>	

p.

Potency testing of oil adjuvanted foot-and-mouth disease vaccine: PD ₅₀ assays of a semi-industrial water-in-oil type emulsion in guinea pigs and cattle	61
<i>Pan American Foot-and-Mouth Disease Center</i> <i>Dirección de Lucha Contra la Fiebre Aftosa</i>	
Resúmenes — Abstracts.	67
Bibliografías sobre enfermedades vesiculares Vesicular diseases bibliography.	77

NECESIDAD DE GUIAS Y PADRONIZACION DE LA NOTIFICACION Y EL DIAGNOSTICO DE LAS ENFERMEDADES¹

Pedro N. Acha²

Si bien en muchos países ha habido, durante los últimos treinta años, un aumento significativo de la producción de carne y de la productividad por unidad animal, los objetivos que deberemos alcanzar en las dos o tres décadas siguientes, para llenar las necesidades de la población, requerirán esfuerzos aún mayores, en términos de cantidad de animales y producción de carne, leche y huevos por animal. Con el sistema actual no es posible ningún aumento de la población ganadera y de la productividad animal. Esta, en los países latinoamericanos, por ejemplo, es menor de lo que se puede alcanzar en relación con la capacidad de la tierra.

En América Latina la natalidad de terneros va de 45 a 55 por ciento, muy por debajo del 80 por ciento que se considera técnicamente posible. Representa una pérdida potencial de 20 millones de terneros por año, o el equivalente a cerca de 4 millones de toneladas de carne y 15 millones de toneladas de leche.

En términos de disponibilidad adicional de alimentos para el hombre significa un déficit de 4 millones de toneladas de carne para 60 millones de personas al año. Entre las causas figuran la baja fertilidad, deficiencias genéticas, problemas nutricionales y administrativos, prácticas pecuarias rudimentarias y un inadecuado control de las enfermedades, en general, y de las enfermedades infecciosas y parasitarias, en particular.

Si bien los grandes progresos de los últimos años nos han dado métodos y procedimientos para el control efectivo de las enfermedades infecciosas y parasitarias, el ritmo de su aplicación para mejo-

rar la salud animal y la producción ganadera ha sido muy lento. El empleo de estos avances tecnológicos requiere los debidos recursos humanos y materiales. Muy poco progreso se verifica en la formación de nuevos recursos humanos, esenciales para el control de las enfermedades que atrasan la producción pecuaria, y que impide el desarrollo de la capacidad de diagnóstico de los países.

Enfermedades que requieren control internacional

Las diversas enfermedades infecciosas o contagiosas que ocurren en ciertas partes del mundo constituyen una amenaza para las áreas en donde no existen. No hay duda alguna que las enfermedades de los animales se diseminan con mayor rapidez por intermedio del traslado de los mismos. Por este hecho, la mayoría de los países desarrollados han establecido medidas de seguridad razonablemente adecuadas contra la introducción de enfermedades exóticas, a través de la restricción de las importaciones de animales. Esto se consigue por un embargo o por medidas de cuarentena. Los microorganismos patógenos, sin embargo, pueden sobrevivir, en distinto grado, en productos de origen animal o en otros artículos de comercio que pueden estar contaminados, y de ese modo transportar mecánicamente una infección.

La mayoría de las enfermedades de importancia internacional son causadas por virus, debido a su característica de ser mucho más infecciosas que las producidas por bacterias o protozoos y por la habilidad que tienen muchos virus de sobrevivir durante períodos relativamente largos, fuera del huésped vivo, sobre todo en las condiciones normalmente utilizadas para el transporte y almacenamiento de productos animales. De hecho, podría usarse la fiebre aftosa como un ejemplo adecuado para ilustrar este punto.

¹ Trabajo presentado en el XX Congreso Mundial de Medicina Veterinaria. Salónica, Grecia. Julio, 1975.

² Jefe de la División de Control de Enfermedades, OPS/OMS. 525 23rd Street N.W., Washington, D.C. 20037, E.U.A.

Los riesgos de diseminación de una enfermedad

Con respecto a la introducción de una enfermedad hay dos tipos de riesgos a los cuales está expuesto un país: controlables e incontrolables. Los primeros están relacionados con los movimientos de los animales domésticos, con el comercio de sus productos contaminados. Los otros se asocian con la diseminación de los agentes patógenos a través del movimiento de animales salvajes, aerosoles, aves migratorias y el tránsito de pasajeros. El factor mecánico en esta difusión puede ser muy importante. La historia de la fiebre aftosa contiene numerosos casos de diseminación de la enfermedad por intermedio del movimiento de animales, de sus productos y de materiales tales como la paja empleada para embalaje. Ejemplos de infección por medios incontrolables son la transmisión de la rabia por varias especies de animales salvajes en las cuales es endémica, la evidente introducción aérea de la fiebre aftosa en Inglaterra durante la epidemia de 1967/1968, y la introducción de la misma enfermedad en el Oriente de Anglia por aves migratorias (estorninos), cuando había una alta prevalencia de fiebre aftosa en Holanda y Bélgica. El riesgo controlable puede evitarse con restricciones de importación, pero el incontrolable es una amenaza constante para las áreas del mundo libres de esta enfermedad. Por lo tanto, la lucha contra las enfermedades en las áreas endémicas es un aspecto muy importante del control internacional de las enfermedades. Esta es la política que se requiere para las soluciones de largo plazo de problemas tales como los que se derivan de una prevalencia permanentemente alta de varias enfermedades en Sudamérica, Africa y Asia. Los siguientes ejemplos de enfermedades que se han "escapado" de las áreas endémicas originales son indicativos de la constante amenaza a nuestras poblaciones de ganado susceptibles, y no son incidentes históricos como lo ha sido la introducción de la pleuroneumonía contagiosa bovina en Australia en 1858, ni la aparición de la fiebre aftosa en Canadá en 1951. Todos ellos son ejemplos recientes que ponen de relieve la existencia permanente de este peligro para nuestras majadas, rebaños y manadas.

En 1960 la peste porcina africana llegó a Portugal procedente del Africa Occidental. En 1962 el

virus de la fiebre aftosa del tipo SAT₁, hasta entonces confinado al Africa, alcanzó el Golfo Pérsico y desde allí en seis meses se diseminó por Israel, Iraq, Jordania, Siria, Turquía e Irán. En 1971, la peste porcina africana apareció en Cuba, y en ese mismo año los Estados Unidos se alarmaron seriamente por la diseminación de un tipo venezolano de encefalomiелitis equina que había progresado rápidamente hacia el norte desde la América Central y México.

Enfermedades de emergencia

Las enfermedades arriba mencionadas de peste porcina africana, los tipos exóticos del virus aftoso, la encefalomiелitis equina, junto con la "lumpy skin", la lengua azul, la fiebre equina africana y la anemia infecciosa equina, han sido denominadas "enfermedades de emergencia" o "enfermedades emergentes" por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). Estas infecciones no son una lista completa de los peligros contra los cuales debemos estar en permanente vigilancia. Más aún, nunca podremos tener la certeza de si hemos identificado o podemos identificar todos los peligros. La enfermedad vesicular del cerdo es un buen ejemplo de una enfermedad inesperada. ¿Quién sospechaba su aparición en Italia y en otros países de Europa en 1966 y después de esa fecha?

Vigilancia epidemiológica

Una defensa efectiva contra la introducción de enfermedades exóticas debe ser mantenida por un servicio de inteligencia que provea información acerca del estado sanitario del país exportador.

Un servicio útil de información de las enfermedades debe ser confiable y rápido. Es extremadamente difícil alcanzar estos dos criterios esenciales: confiabilidad y rapidez, por cuanto muchas de las acciones consecutivas a la notificación de brotes de enfermedad resultan ser perjudiciales para la economía y el comercio del país afectado.

Un sistema de vigilancia epidemiológica sostenido por agencias internacionales o multinacionales es muy útil en la formulación y padronización de las reglamentaciones sobre el movimiento internacional de animales, pero debe destacarse que sufrirá

de todos los defectos inherentes a las condiciones en que los servicios veterinarios de cada país se están desarrollando. La información internacional de un sistema de vigilancia epidemiológica depende enteramente de los datos que cada país provee a través de sus servicios de diagnóstico clínico o de diagnóstico de laboratorio. Esta información puede ser tan precisa cuanto el país sea capaz de proveerla a través de sus propios servicios de vigilancia epidemiológica y de laboratorios de diagnóstico.

Laboratorio de diagnóstico

El laboratorio de diagnóstico es sumamente importante en la obtención de datos válidos confiables. La Organización Panamericana de la Salud, Oficina Regional en las Américas de la Organización Mundial de la Salud, en sus programas de asesoramiento a los gobiernos sobre el movimiento internacional de animales, y principalmente en aquellas enfermedades que pueden afectar la salud del hombre o de los animales, considera que los servicios de sanidad animal de un país deben cumplir las siguientes responsabilidades: 1) prevenir la exportación de animales o productos de origen animal que puedan constituir una amenaza para la ganadería o la salud pública en el país de destino; y 2) prevenir la introducción de animales enfermos o portadores de infección así como de productos de origen animal contaminados.

Es precisamente el papel del laboratorio nacional de diagnóstico veterinario que determina, desde el principio, si el problema sanitario que están estudiando es un problema prevalente o existente ya en el país o es una enfermedad considerada exótica. Indudablemente la legislación, las inspecciones de aduana, y las cuarentenas son valiosos elementos para controlar la introducción de enfermedades y productos perjudiciales para la salud del hombre o de los animales. Pero estas barreras son vulnerables aun en los países que poseen los más avanzados servicios veterinarios.

Tomando en consideración el origen de los animales o de los productos de origen animal el laboratorio designado por el gobierno debe llevar a cabo pruebas de diagnóstico sea en la estación cuarentenaria o en algún otro lugar, a veces en el mismo país de origen, para descubrir la posible presen-

cia de enfermedades exóticas. Una función muy importante de este laboratorio es el diagnóstico precoz de la enfermedad exótica que ha atravesado las barreras cuarentenarias.

Padronización de las pruebas de diagnóstico y terminología

Las restricciones sobre las importaciones impuestas por los países pueden ser absolutas o relativas, dependiendo de la decisión del país de proteger la salud de su población animal. Un factor relevante que debe ser considerado es la severidad de los riesgos a que está expuesto.

En el comercio mundial de animales y de productos de origen animal es desagradable para el servicio veterinario de una nación rechazar animales importados de otra nación, debido a diferencias en los standards de reactivos o en la interpretación de pruebas diagnósticas, debido a las repercusiones políticas y económicas. Estos hechos injustificables ocurren verdaderamente y ocasionan obstáculos en el movimiento internacional de animales. Es lógico y esencial padronizar los reactivos biológicos y las pruebas de diagnóstico, tanto a nivel nacional como internacional. La responsabilidad más importante de los laboratorios de diagnóstico veterinario de cada país es adaptar los reactivos biológicos para el diagnóstico a los standards internacionales y controlar y supervisar la padronización, por cuanto sin ella ningún programa de control puede ser significativo. Las principales agencias internacionales que asesoran a los gobiernos en el control de las enfermedades del hombre y de los animales han hecho contribuciones substanciales para la padronización internacional de productos biológicos incluyendo los reactivos de diagnóstico, que han facilitado tanto la ejecución de programas nacionales de control como el movimiento internacional de animales. Las enfermedades de los animales constituyen un obstáculo importante para el comercio internacional, principalmente entre países desarrollados e industrializados. Solamente cuando los programas nacionales de control están establecidos se puede esperar que haya un suficiente número de laboratorios bien equipados.

La acción internacional y el control y coordinación de proyectos multinacionales tienen enorme

valor para los países que sufren de enfermedades y son la mejor garantía para los países libres de ellas. En las Américas, la Organización Panamericana de la Salud, a través del Centro Panamericano de Zoonosis y del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa, llevan a cabo una actividad de rutina en la padronización de productos biológicos. El Centro de Zoonosis distribuye muestras para la preparación de antígenos y vacunas, así como de antígenos de referencia. También recibe productos biológicos para someterlos a pruebas de calidad y recientemente inició las pruebas de proficiencia en América Latina. Gran adelanto se ha hecho en los países de América Latina en lo referente a padronización de las pruebas de diagnóstico para brucelosis, rabia, tuberculosis e hidatidosis, pero aún queda mucho por hacer en la padronización de otros preparados biológicos.

Al mismo tiempo, también la terminología debe ser padronizada o aceptada por todos los países si se quiere determinar que cierto diagnóstico ha sido realizado por un método o procedimiento que es entendido y aceptado por todos. Por tanto, podemos proponer que, para una determinada enfermedad, sea seleccionado un determinado nombre, que sea utilizado un síntoma reconocido y que sea preparada una breve descripción.

El laboratorio veterinario de diagnóstico no sólo debe cumplir con las responsabilidades del diagnóstico de una enfermedad y de notificarlo de una manera que sea bien entendida por los funcionarios de todos los países, sino que debe comunicar estos hallazgos por un sistema de notificación de enfermedades que todas las personas lo entiendan. Se puede hacer un gran adelanto a través de agencias internacionales en colaboración con los países y a través de la asistencia de la Asociación Mundial de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico en la preparación de un manual para la padronización de diagnóstico y notificación de enfermedades.

Los países de las Américas que han establecido programas nacionales de control de la fiebre aftosa, brucelosis, tuberculosis bovina, e hidatidosis, con la asistencia financiera de importantes agencias internacionales, han llegado a un punto en que comprueban que los objetivos de estos programas nunca serán alcanzados si no se tiene un conjunto de normas con las cuales planificar, formular, eje-

cutar y evaluar esos programas. La Organización Panamericana de la Salud ha sido requerida por varios países miembros para reunir algunos grupos asesores con el propósito de desarrollar guías para el control de algunas de estas enfermedades.

De esos grupos de estudio han surgido las guías para la preparación de planes para programas de brucelosis, fiebre aftosa y erradicación de la tuberculosis bovina que incluyen los principios y los criterios técnicos para conducir y evaluar estos programas además de los requerimientos para padronizar productos biológicos (vacunas, antígenos, tuberculinas, etc.). Algunos de los países han usado posteriormente estas guías en la preparación de sus solicitudes de crédito a agencias internacionales para ayuda financiera, así como para revisión y expansión de sus servicios médico veterinarios, incluyendo el establecimiento de un laboratorio de diagnóstico veterinario bien montado y bien equipado. El Banco Interamericano de Desarrollo proveyó 78 millones de dólares con este fin.

A medida que estos países van reforzando los servicios veterinarios con el establecimiento de laboratorios de diagnóstico, van desarrollando nuevas técnicas o perfeccionando la aplicación de las existentes. Por tanto, es necesario padronizar reactivos, no solamente por tipo sino por sensibilidad, y establecer criterios standards para la interpretación de los resultados a nivel internacional. La realización de este objetivo depende de la disponibilidad de personal entrenado para llevar a cabo estas técnicas. El tipo de entrenamiento que reciben estos veterinarios que realizan diagnósticos de laboratorio debe ser el mismo, de tal manera que el resultado de una prueba obtenido en un laboratorio sea comparable con el que se obtiene en otro laboratorio de un país diferente. Esto destaca más aún el papel de los centros internacionales para el entrenamiento de personal en la padronización de reactivos.

Por las razones señaladas, las tareas de diagnóstico y de control relacionadas con el movimiento internacional de animales y de productos animales debe ser standardizada a un nivel internacional. Complementando la padronización de los reactivos de diagnóstico y la terminología a nivel internacional, se procederá a la preparación de guías para que los países puedan utilizar en sus actividades

de diagnóstico.

La asistencia técnica provista por las agencias internacionales en lo que se refiere a la padronización de productos biológicos debe consistir de: a) preparaciones standard y de referencia de sustancias biológicas; b) determinación de los requerimientos para las sustancias biológicas para establecerlos en las guías destinadas a los que están dedicados a su producción y control, y c) información técnica, entrenamiento de personal y consultores.

Guías para la padronización de reactivos de diagnósticos

El principal objetivo de la padronización internacional de reactivos de diagnóstico es disponer de preparaciones bien probadas y estables, de reconocida actividad, que puedan ser utilizadas en la evaluación de las preparaciones locales.

Una preparación "standard internacional" es aquella a la que se le ha asignado una unidad internacional. La "unidad internacional" se describe como la actividad biológica específica contenida en un determinado peso de una sustancia standard internacional. Una preparación "internacional de referencia" puede desempeñar la función de un standard internacional. Los "reactivos biológicos internacionales" son usados en pruebas de laboratorio específicos para la identificación de microorganismos. Los standards internacionales como las preparaciones de referencia y los agentes de referencia son establecidos después de estudios muy completos.³

Existen requerimientos y recomendaciones formuladas para la padronización de cada producto biológico, lo que proporciona guías a los laboratorios dedicados a la protección y pruebas de estas sustancias y facilita la aceptación en un país de biológicos producidos en otro. Las guías preparadas por la Organización Panamericana de la Salud para la preparación y conducción de programas de

control de la brucelosis, la tuberculosis y la fiebre aftosa, contienen los requerimientos o recomendaciones para los diferentes reactivos biológicos. Estos requerimientos y recomendaciones se encontrarán como un anexo de las guías y frecuentemente se refieren a la Serie de Informes Técnicos de la Organización Mundial de la Salud.

CONCLUSIONES

A medida que aumenta el volumen del tráfico de animales y de productos de origen animal entre países y de un continente al otro, existe una mayor preocupación sobre la diseminación de enfermedades entre los países exportadores e importadores. Se destaca el papel de los laboratorios de diagnóstico veterinario en el control de estas enfermedades, lo que facilitará un mayor mercado para los animales y los productos de origen animal.

Estos laboratorios de diagnóstico no sólo pueden colaborar con los servicios médico veterinarios del país, sino que deben mantener un esfuerzo cooperativo con los servicios de salud animal de otros países a través de un sistema de notificación de enfermedades. Estos servicios de vigilancia y notificación de las enfermedades de los animales deben basarse en un sistema padronizado de diagnóstico, clasificación y notificación de enfermedad.

En las Américas, donde la América del Norte, la América Central y el Area del Caribe están libres de fiebre aftosa y donde existe una campaña multinacional para erradicar la fiebre aftosa del continente sudamericano, cualquier mejoramiento en el movimiento intercontinental de animales y productos animales está dirigido principalmente a prevenir la diseminación de esta enfermedad. Entre estas dos áreas de las Américas, el control del movimiento internacional de animales es estrictamente obligatorio. Este movimiento puede ser controlado por medidas internacionales de sanidad animal, tanto en los países importadores como exportadores.

El control obligatorio de las exportaciones ha sido tradicional en las Américas y ha ayudado enormemente el efecto de las medidas tomadas por los países importadores para prevenir la introducción de muchas enfermedades. Existe un acuerdo

³ Abdussalam, M. y S. Vrancheva, 1972. Servicios internacionales de referencia disponibles para los laboratorios de diagnóstico de las enfermedades de los animales. Publicación Científica 235, Organización Panamericana de la Salud, E.U.A.

mutuo entre los países, por el cual un país ayuda al otro en el control de ciertas enfermedades, las que si fueran introducidas a través de un país importador podrían crear un desastre en la producción ganadera de la región.

La Organización Panamericana de la Salud ha asistido a los gobiernos de las Américas en el establecimiento de guías para el control de algunas de estas enfermedades de significación en la salud hu-

mana y animal, incluyendo recomendaciones y requerimientos para sustancias biológicas, como lo son los reactivos para el diagnóstico. Se admite en la Organización que estas guías para la padronización de reactivos biológicos deben ser ampliadas para asistir a los países en una base internacional, de tal modo que el diagnóstico de una enfermedad, su terminología y su notificación puedan ser aceptadas por todas las autoridades de la salud animal.

NEEDS FOR GUIDELINES AND STANDARDIZATION OF DISEASE DIAGNOSIS AND REPORTING¹

*Pedro N. Acha*²

While significant increases have occurred over the past thirty years in the production of meat-producing animals and in the output per animal unit in many of the countries, the objectives to be achieved in the next two to three decades in order to meet the needs of the people will require even greater strides in terms of animal numbers and per animal production of meat, milk, and eggs. Any increase in livestock numbers and in per animal production is not feasible under the present system. Livestock productivity in the Latin American countries, for example, is lower than what may be considered achievable relative to the capability of the land.

The calf birth rate in Latin America is between 45 and 55 per cent, as compared with the figure of 80 per cent that is considered technically achievable. This means an annual potential loss of 20 million calves, or the equivalent of about 4 million tons of meat and 15 million tons of milk.

In terms of available additional human food, it represents a deficit of 4 million tons of meat for 60 million people a year. The causes include low fertility, genetic deficiencies, nutritional and administrative problems; poor livestock practices; and inadequate control of diseases in general and of infectious and parasitic diseases in particular.

Although major advances in recent years have given us the methods and procedures for effectively controlling infectious and parasitic diseases, their actual application to the improvement of animal health and livestock production has been very slow in coming. The application of these technological advances requires human resources and the necessary materials. Very limited progress has been

made in the development of new human resources essential to the control of the diseases that hinder livestock production and impede the development of the diagnostic capability of the countries.

Diseases that Demand International Control

The various infectious or contagious diseases which occur in certain parts of the world are, by their presence in those regions, a threat to areas in which they do not exist. There is no doubt whatsoever that animal diseases are most readily spread by the movement of animals. Because of this fact, most of the developed countries have established reasonably adequate safeguards against the introduction of exotic diseases by restricting the importation of animals. This is accomplished either by an embargo or by quarantine regulations. Pathogenic micro-organisms can survive, however, to a varying degree, in products of animal origin or in other articles of commerce which may have become contaminated and can thus act as mechanical carriers of infection.

Most of the diseases of international importance are virus diseases, because of their characteristic of being more highly infectious than bacterial or protozoal diseases and of the ability of most viruses to survive for relatively long periods away from the living host, especially under the conditions normally used for the transport and storage of animal products. Foot-and-mouth disease could, in fact, be used as an appropriate example to illustrate this point.

The Risks of Spread of Disease

The risks to which a country is exposed in connection with the introduction of disease are of two types: controllable and uncontrollable. Controllable risks are those associated with movements of domesticated animals, trade in their products and

¹Paper presented at the XX World Congress on Veterinary Medicine. Salonica, Greece. July, 1975.

²Chief, Division of Disease Control. PAHO/WHO. 525 23rd Street N.W., Washington, D.C. 20037, U.S.A.

trade in possible contaminated products. Uncontrollable risks are those associated with dissemination of the pathogen by movements of wild animals, air-borne droplets, migratory birds, passenger traffic, vehicular and aircraft traffic. The mechanical element in such dissemination may be quite important. Numerous examples can be provided from the history of foot-and-mouth disease of the spread of infection by movement of animals, their products and such things as straw used as packing material. Examples of the dissemination of infection by uncontrollable means are the transmission of rabies from the various species of wildlife in which it is endemic, the clear demonstration in the 1967-68 epidemic of foot-and-mouth disease in England of air-borne infection, and the introduction of foot-and-mouth disease into East Anglia by migratory starlings when there was a high prevalence of the disease in Holland and Belgium. Controllable risks can be avoided by importation restrictions, but the uncontrollable risks are a continuous threat to areas of the world free of this disease. A very important aspect of the international control of disease is, therefore, the attack on the disease in the endemic areas. This is the policy required for the long-term solution to problems such as those posed by the continued high prevalence of various diseases in South America, Africa and Asia. The following examples of diseases that have "escaped" from their original endemic areas are indicative of the constant threat to our susceptible livestock population. The examples which I have chosen are not the historic incidents such as the introduction of contagious bovine pleuropneumonia into Australia in 1858, nor even that of foot-and-mouth disease into Canada in 1951. They are all recent examples which emphasize the persistence of this type of hazard to our national flocks, herds and studs.

In 1960 African swine fever arrived in Portugal from West Africa. In 1962 the SAT₁ type of foot-and-mouth disease virus, hitherto confined to Africa, reached the Persian Gulf and thence, within six months, spread to Israel, Iraq, Jordan, Syria, Turkey and Iran. In 1971 African swine fever appeared in Cuba and, in the same year, considerable alarm was felt in the United States of America by the spread of the Venezuelan type of

equine encephalomyelitis which had rapidly progressed northwards from Central America and Mexico.

Emerging Diseases

The diseases cited above of African swine fever, exotic types of foot-and-mouth disease and equine encephalomyelitis, together with lumpy skin disease, blue tongue, African horse sickness and equine infectious anemia, have been labelled as "emerging diseases" by the Food and Agriculture Organization. These infections do not constitute a complete list of the hazards against which we must remain continuously vigilant. Moreover, we can never be certain whether we have identified or can identify all the hazards. Swine vesicular disease is a good example of an unexpected disease; what accounted for its appearance in Italy and in other countries of Europe in 1966 and later on?

Epidemiological Surveillance

An effective defense against the introduction of exotic disease must be supported by an intelligence service providing information about the health status of the exporting country.

A useful disease-reporting service must be reliable and swift. It is extremely difficult to achieve these two essential criteria: reliability and speed, as most actions consequential to announcements of outbreaks of disease are detrimental to the affected country's trade and economy.

A system of epidemiological surveillance supported by international or multinational agencies is very useful in the formulation and standardization of regulations on the international movement of animals, but it should be pointed out that it is subject to inadequacies inherent in the conditions under which the veterinary services of each nation are developing. International epidemiological surveillance information is dependent entirely upon the data that each country provides through its clinical and veterinary diagnostic laboratory services. This information can be only as accurate as each country is capable of providing through its epidemiological services and diagnostic laboratories.

Diagnostic Laboratory

The diagnostic laboratory is highly important in obtaining valid and reliable data. The Pan American Health Organization, Regional Office in the Americas of the World Health Organization, in its programs of advising the Governments on the international movement of animals, and principally on those diseases of human and animal health significance, considers that the animal health services of a country should have the following responsibilities: 1) to prevent the exportation of animals or animal products which may constitute a threat to the livestock or public health in the country of destination; and 2) to prevent the introduction of diseased animals or carriers of infection as well as any contaminated animal products.

It is precisely the role of the national veterinary diagnostic laboratory to determine, at the very outset, if the disease problem they are dealing with is one prevalent in the country or a disease considered to be exotic to that country. Undoubtedly legislation, customs inspection, and quarantine are valuable elements in controlling the introduction of diseases and products harmful to human and animal health. But those barriers are vulnerable even in countries that have more advanced veterinary services.

Taking into consideration the origin of the animals or animal products, the laboratory designated by the Government should perform diagnostic tests in the quarantine station or elsewhere, sometimes in the country of origin, to disclose the possible presence of exotic diseases. A very important duty of such laboratories is the early diagnosis of an exotic disease that has crossed the quarantine barriers.

Standardization of Diagnostic Tests and Terminology

The restrictions on imports imposed by countries can be absolute or of lesser degree depending upon the country's determination to protect the health of its animals. A relevant factor to be considered is the severity of the hazards to which it is exposed.

In the world trade of animals and animal prod-

ucts, it is damaging for the veterinary services of one nation to reject animals imported from another nation because of differences in the standards of reagents or in the interpretation of diagnostic tests because of the economic and political repercussions. These unjustifiable actions do occur and are obstacles in the intercountry movement of animals. It is logical and essential to standardize biological reagents and diagnostic tests at both the national and international levels. It is the primary responsibility of the veterinary diagnostic laboratory in each country to adapt diagnostic reagents to international standards and to control and supervise the standardization because, without this, no control program can be meaningful. The leading international agencies that advise Governments on the control of diseases of human and animal health significance have made substantial contributions to the international standardization of biologicals, including the diagnostic reagents that have facilitated the execution of national control programs and the international movement of animals. Animal diseases are a great obstacle to international trade, principally between developing and industrialized countries. Only when national disease control programs are established can we expect to have a sufficient number of well-equipped laboratories.

International action and coordination and multinational control projects have enormous value for countries suffering from disease and are the best guarantee for the countries free of it. In the Americas, the Pan American Health Organization, through the Pan American Zoonoses and Foot-and-Mouth Disease Centers, carries out routine activity in the standardization of biological products. The Zoonoses Center distributes strains for the preparation of antigens and vaccines as well as antigens for reference purposes. It receives biologicals for quality testing and recently began proficiency testing in Latin America. Great strides have been made in the Latin American countries in standardizing the diagnostic tests for brucellosis, rabies, tuberculosis and hydatidosis, but much remains to be done in standardizing biological preparations.

Similarly, terminology must be standardized or acceptable by all countries if we are to determine

that a certain diagnosis has been arrived at by a method or procedure that is understood and accepted by all countries. Therefore, we must propose that a term for a particular disease be selected, that a recognized symptom be used, and that a very brief description be prepared.

The veterinary diagnostic laboratory must not only perform its responsibilities in diagnosing the disease and reporting it in a manner that can be understood by officials in all countries, but must also communicate these findings by some disease-reporting system that everyone understands. Great advances could be made through international agencies in collaboration with the countries and through the assistance of The World Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians in the preparation of a guideline for the standardization of disease diagnosis and reporting.

The countries of the Americas which have established national programs for the control of foot-and-mouth disease, brucellosis, bovine tuberculosis, and hydatidosis with the financial assistance of international lending agencies have arrived at the point where they realize that the objectives of these programs could never be achieved without a set of guidelines with which to plan, formulate, execute, and evaluate them. The Pan American Health Organization was requested by several Member Countries to convene some advisory study groups for the purpose of developing guidelines to control some of these diseases.

Emanating from such study groups are the Guidelines for the Preparation of Plans for Programs of Brucellosis, Foot-and-Mouth Disease, and Bovine Tuberculosis Eradication which includes the principles and technical criteria for the conduct and evaluation of these programs plus the requirements for standards of biologic substances (vaccines, antigens, tuberculins, etc.). Several of the countries have subsequently used these guidelines in the preparation of the loan requests to international agencies for financial assistance, as well as the revision and expansion of their veterinary medical services, including the establishment of an adequately manned, well-equipped veterinary diagnostic laboratory (IDB provided 78 million dollars for this purpose).

As these countries reinforce the veterinary ser-

vices with the establishment of diagnostic laboratories, they develop new diagnostic techniques or improve the applications of the existing ones. Therefore, it is necessary to standardize reagents, not only for type but for sensitivity, and to establish standard criteria for the interpretation of results at the international level. Realization of this objective is dependent upon availability of trained personnel to conduct the procedures. The type of training received by such veterinary laboratory diagnosticians must be the same so that a test result in one laboratory be comparable to that obtained in another laboratory in a different country. This further emphasizes the role of international centers in the training of personnel in standardizing reagents.

For the reasons stated, diagnostic and control work connected with the international movement of animals and animal products must be standardized at the international level. Complementing the standardization of diagnostic reagents and terminology at the international level will have to be the development of guidelines for the countries to follow in their diagnostic activities.

Technical assistance provided by the international agencies regarding standardization of biologics should consist of: a) standard and reference preparations of biologics substances; b) preparation of requirements for biological substances to provide guidelines to those concerned with their production and control; and c) technical information, training of personnel and consultants.

Guidelines for Standardization of Diagnostic Reagents

The principal objective of the international standardization of diagnostic reagents is to make available well-tested and stable preparations of known reactivity which can be used in evaluation of local preparations.

The "international standard" is a preparation to which an international unit has been assigned. The "international unit" is described as a specific biological activity contained in a defined weight of the international standards. An "international reference preparation" may serve the same function as an international standard. "International

biological reagents" are used in specific laboratory tests for the identification of micro-organisms. International standards, reference preparations and reference agents are established following completed studies.³

There are requirements and recommendations formulated for the standardization of each biological which provides guidelines to laboratories engaged in the protection and testing of these substances and facilitates their acceptance in countries other than those in which they are produced. The guidelines developed at the Pan American Health Organization for the preparation and conduct of programs to control brucellosis, tuberculosis and foot-and-mouth disease contain the requirements or recommendations for the different biological reagents. These requirements and recommendations are found as an annex to the guidelines and frequently refer to the Technical Report Series of WHO.

CONCLUSIONS

As the volume of the movement of animals and animal products among countries and from one continent to another increases, there is a major concern about the spread of diseases between the exporting and the importing countries. The role of the veterinary diagnostic laboratory in the control of these diseases, which will facilitate a greater market for animals and animal products, has been emphasized.

These diagnostic laboratories must not only cooperate with the veterinary medical services within

the country, but should also maintain a cooperative effort with the animal health services of other countries through a system of disease-reporting. Such surveillance and notification of animal disease will have to be based upon a standardized system of disease diagnosis classification and notification.

In the Americas, where North and Central America and the Caribbean are free of foot-and-mouth disease and there exists a multinational campaign to eradicate foot-and-mouth disease from the South American continent, any improvement in the intercontinental movement of animals and animal products is directed primarily at preventing the spread of this disease. Between these two areas in the Americas, control of the international movement of animals and their products is strictly enforced. This movement is controlled by international animal health measures in both the importing and exporting countries.

Compulsory control of exports has been traditional in the Americas and greatly aids the effect of measures taken by importing countries to prevent the introduction of many diseases. There exists mutual agreement between countries, whereby one country assists another in the control of certain diseases which, if introduced into the importing country, could create a disaster to the livestock production in that locality.

The Pan American Health Organization has assisted the Governments of the Americas in the establishment of guidelines for the control of some of these diseases of human and animal health significance, including recommendations and requirements for biological substances such as diagnostic reagents. It is felt in the Organization that guidelines for the standardization of diagnostic reagents should be amplified to assist the countries on a worldwide basis so that disease diagnosis, terminology, and reporting would be acceptable by all animal health authorities.

³Abdussalam, M. and S. Vrancheva, 1972. International Reference Services Available to Animal Disease Diagnostic Laboratories, Scientific Publication 235, Pan American Health Organization, U.S.A.

LA EPIDEMIOLOGIA DE LA ESTOMATITIS VESICULAR

Una revisión de la literatura
y propuestas para estudios de campo

*John Mason*¹

INTRODUCCION

En una revisión de estomatitis vesicular (EV) publicada en 1968, Saulmon (90) afirmó que "el mecanismo de infección, el medio de transmisión y el reservorio del virus" para esta enfermedad son desconocidos. La situación aún se mantiene igual. A pesar del gran volumen de experiencias realizadas a nivel de laboratorio con los virus de la EV, las características básicas del ciclo de transmisión y sobrevivencia del virus en la naturaleza aún permanecen oscuras.

[Este trabajo revisa parte de la literatura existente sobre EV, particularmente la relacionada con su patogenia y su conducta a nivel de campo, con el fin de detectar cuáles son los estudios requeridos para resolver las incógnitas referentes a las vías de transmisión y reservorios del virus.]

La EV ha sido reconocida como entidad clínica desde 1884 (110). El virus fue descrito por primera vez por Olitsky en 1926 (81). En 1926 y 1927 Cotton (16,17,18) identificó los dos serotipos principales del virus, New Jersey (NJ) e Indiana (Ind.), como causantes de la enfermedad. Desde entonces fueron identificados y descritos numerosos brotes de EV, particularmente en Estados Unidos de América y en menor grado en México y en América Central y del Sur (1, 2, 8, 40, 43, 48, 51, 52, 71, 74, 92, 93, 104).

CARACTERISTICAS CLINICAS

La EV es una enfermedad viral que produce lesiones vesiculares en la boca, patas y ubres de bovi-

nos, equinos y porcinos. Con menor frecuencia causa una enfermedad gripal en el hombre. Está agrupada entre las "enfermedades vesiculares" del ganado que incluyen fiebre aftosa, exantema vesicular del cerdo y enfermedad vesicular del cerdo. Además de causar pérdidas económicas en rebaños, tanto de carne como de leche, la enfermedad posee una importancia capital para los programas de salud animal por ser similar clínicamente a la fiebre aftosa. La apariencia clínica de la EV está bien descrita en textos generales (22, 23, 28).

En los bovinos la EV prácticamente no produce mortandad y las secuelas son escasas. Las lesiones vesiculares de la boca curan rápidamente, pero en la mayoría de los animales afectados se observa pérdida de peso y una baja temporal en la producción de leche. A veces ocurre mastitis como complicación (40). En los porcinos son frecuentes las lesiones podales y la cojera es a menudo el primer signo observado. En América Central se han observado brotes de EV producidos por el virus NJ que se caracterizaron por una alta mortalidad en los cerdos afectados (W.J. Turner, Comunicación personal, 1975). Es rara la ocurrencia de casos clínicos en ovinos y caprinos y posiblemente estas especies no sean susceptibles a la infección natural por EV (40). Sin embargo, en Colombia fueron registrados casos en ovejas (12). Los cambios patológicos producidos por la EV en bovinos y porcinos fueron descritos por Seibold y Sharp (94) y Chow y McNutt (21), respectivamente.

AGENTES VIRALES

La etiología viral de la EV fue establecida por Cotton en 1926. En el año siguiente demostró que existían dos tipos de virus antigénicamente diferentes (denominados según el estado donde fueron aislados por primera vez, como NJ e Ind.).

¹ Comisión México-Americana para la Prevención de la Fiebre Aftosa. P.O. Box M-10078, México, D.F. México.

Además del aislamiento original del virus Ind. actualmente conocido como Indiana 1, recientemente fueron aislados dos nuevos subtipos: Cocal o Indiana 2 y Alagoas o Indiana 3 (29). Actualmente se clasifica el virus de la EV dentro del grupo de los Rhabdovirus (50). Se trata de un virus con forma cilíndrica de bala que contiene ARN. Sus dimensiones son de aproximadamente 173 m μ de largo por 72 m μ de ancho (70). Se cree que el virus no es capaz de sobrevivir mucho tiempo fuera de un huésped vertebrado o invertebrado (42).

DIFERENCIAS ENTRE LOS SEROTIPOS NEW JERSEY E INDIANA DE ESTOMATITIS VESICULAR

A pesar de ser morfológicamente similares, los tipos NJ e Ind. del virus de la EV son serológica e inmunológicamente diferentes y parecen tener distintos requerimientos ecológicos. El tipo NJ produce en general cuadros clínicos más severos pudiendo tener un período de incubación menor. Algunos autores sólo observaron lesiones podales en bovinos afectados con el tipo NJ (40, 71). La mayoría de los brotes en bovinos con lesiones exclusivas de mamas parecen ser causados por el virus Ind. (71).

La mayoría de los brotes de EV son causados por el tipo NJ (71). En los Estados Unidos de América, el virus Ind. sólo fue aislado en cuatro epidemias, las de 1925, 1942, 1956 y 1964 (90, 96). El tipo NJ posee un único serotipo y su distribución es más amplia en las áreas templadas de Norte América y parece estar restringido a huéspedes vertebrados (43), mientras que el virus Ind. fue aislado también de artrópodos y vertebrados y tiene por lo menos tres serotipos, dos de los cuales parecen estar limitados a Sudamérica (Indiana 2 y 3).

La cepa Indiana 2, denominada virus "Cocal" por Jonkers y col. (59) fue aislada de pulgas recogidas de ratas de arrozales atrapadas en la floresta Bush Bush en Trinidad y también cerca de Belém do Pará, en Brasil. En ningún caso se asoció este virus con estomatitis clínica, si bien se encontraron anticuerpos específicos para esta cepa en caballos

en Trinidad (29).

En julio de 1964 se detectó un brote de enfermedad vesicular en mulas de una plantación de azúcar en el estado de Alagoas, Brasil. En esa oportunidad se encontró que durante los dos meses previos habían ocurrido brotes similares en otras partes del mismo estado y en el estado vecino de Pernambuco. Los équidos fueron afectados con mayor frecuencia, aunque también hubo casos en bovinos y se hallaron anticuerpos específicos en el suero de los peones de la plantación, quienes acusaron haber tenido fiebre, dolores de cabeza y malestar en la época en que era investigado el primer brote en las mulas. La cepa en cuestión era serológicamente diferente de los virus de la EV conocidos hasta entonces, tipos Indiana 1 y 2 encontrados en Trinidad y Argentina, y fue denominada Indiana 3 (Alagoas) (29, 83).

Es poco común encontrar las cepas NJ e Indiana 1 actuando concomitantemente en el mismo rebaño o aún en la misma área. Sin embargo, en brotes recientes en México se aislaron ambos virus en la misma propiedad, en el mismo animal y aún en la misma muestra (71).

CARACTERISTICAS EPIDEMIOLOGICAS DE LA ESTOMATITIS VESICULAR

Son bien conocidas las características epidemiológicas más importantes de la enfermedad (8, 40, 41, 42, 44, 45, 58, 74, 90). En los Estados Unidos de América los brotes de EV comienzan súbitamente durante temporadas cálidas particularmente en la estación de lluvias. Los brotes pueden aparecer casi simultáneamente en vastas áreas en predios ampliamente separados entre sí. Las propiedades afectadas tienen una distribución irregular, pareciendo que la enfermedad diera grandes saltos a lo largo de la campiña. Frecuentemente no se observan casos en predios adyacentes a los afectados.

La incidencia de la EV puede tener amplias variaciones entre los rebaños afectados. Usualmente entre 10 y 15% de los animales poseen signos clínicos (71, 74), si bien se han visto rebaños con tasas de ataque del 100%. En algunos brotes se producen casi exclusivamente lesiones bucales,

mientras que en otros predominan las mamarías (27, 104). Los signos clínicos son observados mayormente en animales adultos siendo raramente afectados los bovinos y equinos menores de un año (8, 71, 85). Sin embargo se ha registrado EV en cerdos lactantes (85).

En los Estados Unidos de América el número de brotes disminuye en el otoño o después de un período de tiempo seco y frío y la enfermedad desaparece abruptamente después de la primera helada. Durante muchos años se observaron casos en bovinos, equinos y porcinos en los llanos de la costa sudeste de los Estados Unidos de América, siendo la EV considerada endémica en esta área. En otras áreas, particularmente los Apalaches, en el valle del alto Mississipi y las Montañas Rocosas, se observan brotes periódicos en bovinos y equinos, posiblemente con ciclos que oscilan entre 2 y 10 o más años. En estos casos, la ocurrencia de la enfermedad es considerada epidémica.

El área endémica de México se encuentra en los llanos costeros alrededor de Veracruz y a lo largo del bajo del Istmo de Tehuantepec. En cambio, en las zonas más altas en el interior del país ocurren con mayor frecuencia brotes esporádicos aislados (71). Existen, sin embargo, numerosas áreas en Estados Unidos de América y México donde la enfermedad aún no ha sido registrada. En América del Sur la EV no fue registrada en Bolivia, Chile, Guyana, Paraguay y Uruguay (3).

En algunos predios se afectan solamente los bovinos, mientras que en otros sólo se observan equinos enfermos aun cuando en ambos casos los bovinos y los equinos se encuentren en contacto. Porcinos en contacto con bovinos y equinos pueden permanecer sanos. En otros casos pueden afectarse solamente los cerdos, mientras que caballos y bovinos en contacto no demuestran signo clínico alguno.

Las áreas endémicas para la EV en los Estados Unidos de América parecen caracterizarse por terrenos planos con bañados y ciénagas cruzados por numerosos arroyos de agua estancada. La estación fértil es larga, la vegetación es frondosa y la humedad alta. Las áreas de ocurrencia epidémica se asocian con corrientes naturales de agua, con matorrales y árboles y con pasturas que fueron mojadas algunas semanas antes. Brotes de la enferme-

dad que ocurren en las zonas montañosas de pinos y matorrales hacia el fin del verano suelen ser precedidos por focos en las planicies altamente irrigadas o inundadas (90).

En México, el área endémica se caracteriza primariamente por un clima tropical lluvioso, con ausencia de estaciones frescas y secas o con breves períodos secos con una precipitación pluvial total elevada. El área posee una temperatura anual media de 25° C, es húmeda o aún prehúmeda con un exceso de agua entre junio y noviembre, meses de mayor incidencia de la EV. En las regiones áridas y semiáridas de México o en las áreas montañosas del interior del país con temperatura media de 15 a 20° C, la EV sólo es observada en forma esporádica (6, 71).

La EV puede ser considerada endémica en climas cálidos en ciertas áreas donde reaparece anualmente y donde una gran parte de la población animal susceptible posee anticuerpos. La enfermedad es epidémica en climas más fríos donde aparece irregularmente y donde los animales susceptibles se encuentran en general libres de anticuerpos. Las infecciones de especies silvestres, del hombre y de los cerdos son características de las áreas endémicas.

En las áreas en que la enfermedad es epidémica, la infección es reconocida primariamente como una entidad clínica de bovinos y equinos.

Numerosos estudios indican que las tasas de infección por EV son mayores en las áreas endémicas que en las de ocurrencia epidémica. En los llanos de la costa sudeste de Estados Unidos de América 50% de los bovinos examinados poseían anticuerpos neutralizantes contra la EV, mientras que inmediatamente por fuera del área solamente el 10% fue positivo (45, 68). Similarmente en áreas de ocurrencia epidémica sólo se hallaron anticuerpos en animales del grupo etario que sufrió el brote epidémico. En Panamá, Shelokov no halló ninguna evidencia de anticuerpos contra el virus Ind. en humanos de áreas urbanas, pero 35% de los sueros fueron positivos en las áreas forestales (96, 97). Por otro lado, en los brotes epidémicos de EV la razón de casos clínicos sobre infecciones inaparentes es más alta que en las áreas endémicas, debido presumiblemente a que un menor número de animales poseen una inmunidad preexistente.

PATOGENIA Y TRANSMISION DE LA
ESTOMATITIS VESICULAR

En estudios de patogenia realizados se encontró que los virus de la EV no eran capaces de penetrar la piel intacta (8). Sin embargo, la inoculación o frotado del virus en abrasiones de las encías o lengua y en la piel del rodete coronario o de las tetas de bovinos producía rápidamente lesiones típicas. La inyección en otros sitios resultaba usualmente en infecciones inaparentes inmunizantes. El frotado del virus sobre la mucosa intacta, así como su introducción en los alimentos o en el agua de bebida no produjeron infección (43).

El período de incubación por inoculación experimental del virus de la EV suele ser de 2 a 5 días. Las lesiones en el bovino aparecen en el lugar de la inoculación, pero raramente ocurre generalización con desarrollo de vesículas secundarias.

La inoculación de la EV en los cerdos provoca reacciones diferentes a las observadas en bovinos creyéndose que la patogenia de la enfermedad en esa especie sea de otro tipo. La EV puede difundirse en los cerdos por contacto. De hecho se cree que ésta fue la vía de transmisión del virus en un gran brote ocurrido en 1943 en una planta de producción de suero contra el cólera porcino (92). Cuando se inoculan cerdos por vía endovenosa, el virus de la EV produce lesiones en las patas y en el hocico. En las áreas endémicas de Estados Unidos de América los cerdos se infectan al comienzo de la temporada de brotes, mientras que en las áreas de ocurrencia epidémica es poco común observar cerdos enfermos (46). Este hecho es de difícil explicación si se considera la elevada susceptibilidad de esta especie a la infección por diversas rutas (92). Por otro lado, la cantidad de virus necesaria para infectar cerdos no es mayor que la requerida para bovinos (40).

Si bien fragmentos de carne altamente contaminados con virus pueden producir lesiones de EV en cerdos con el hocico escarificado, la enfermedad no parece estar relacionada con la ingestión de residuos y la infección por vía digestiva no es considerada como un medio probable de transmisión (84).

La dificultad en reproducir la enfermedad clínica en bovinos por cualquier vía que no sea la

inoculación local ha llevado a la impresión de que la infección natural primaria también debe ocurrir por este medio. La mayoría de los animales susceptibles puede ser infectada por la vía nasofaríngea. En un estudio no se consiguió inducir lesiones bucales en un bovino expuesto a un aerosol de virus de la EV, pero el animal desarrolló anticuerpos neutralizantes y fue resistente a la infección local. Sólo se obtuvieron lesiones típicas en la boca con salivación y pirexia mediante la inoculación intracutánea en la lengua y encías o por frotación del virus sobre una superficie mucosa con abrasiones (40).

Si bien la mayoría de las revisiones bibliográficas sostienen que es difícil de obtener la infección por contacto, existe evidencia considerable indicando que ella ocurre. Cotton (16, 17, 18) observó este tipo de difusión pero sólo durante el comienzo de la enfermedad. Patterson y col. (84) hallaron virus activo en la saliva colectada de cerdos infectados antes del desarrollo de vesículas. Sin embargo, son escasos los informes sobre aislamiento del virus de la nasofaringe aun cuando el virus es fácilmente transmitido por esta vía por medio de aerosoles (86). Tesh y col. aislaron virus del tipo Ind. de muestras de garganta de 7 de 8 monos infectados experimentalmente, pero no tuvieron éxito con otras especies de animales silvestres (109). El virus NJ fue aislado de lauchas madres después de la inoculación de camadas de ratones lactantes (30) y se cree posible la transmisión de EV entre monos y otros vertebrados arbóreos por contacto directo (103).

Los operadores de laboratorio se infectan por diseminación del virus por la excesiva salivación de animales afectados o por contacto directo con tejidos altamente infectados cuando los animales son examinados o tratados (86). Si bien es difícil aislar virus de humanos con EV (86), Fellowes y col. (31) aislaron virus de la sangre de un auxiliar infectado en el laboratorio de Plum Island. Lavados nasofaríngeos colectados simultáneamente fueron negativos. Aunque se supone la existencia de transmisión de hombre a hombre, no existe ninguna evidencia a favor de este proceso (86). En varias ocasiones se examinaron sueros de familiares de laboratoristas infectados para la detección de anticuerpos neutralizantes o fijadores

de complemento obteniéndose siempre resultados negativos (86).

Se ha sugerido que la infección en humanos y aún en animales puede ocurrir por vía conjuntival ya que en un número de casos humanos de EV los síntomas generales fueron precedidos por irritación ocular (86).

Una amplia gama de mamíferos puede infectarse experimentalmente por el virus de la EV. Cobayos adultos inoculados en el epitelio de la almohadilla plantar con virus de la EV desarrollan vesículas locales en 48 horas. Ratonos adultos inoculados por vía intracerebral desarrollan parálisis del tren posterior en 3 días y mueren hacia el 5° día (19, 20). Los ratones lactantes desarrollan una infección fatal cualquiera que sea la ruta de introducción del virus (80, 99).

En infecciones experimentales de animales silvestres de Panamá, Tesh y col. (109) hallaron que los mamíferos eran altamente susceptibles a la infección por EV (con excepción de dos, todas las 38 especies estudiadas poseían anticuerpos neutralizantes 12 días después de la inoculación del virus). La susceptibilidad de las diferentes especies al virus de la EV dependía principalmente de la edad. Con una excepción, los mamíferos adultos inoculados por vía subcutánea permanecían asintomáticos. Sin embargo, tanto el virus Ind. como el NJ causaban mortandad en una variedad de mamíferos lactantes entre 2 y 4 días después de la inoculación subcutánea. En varios de los animales moribundos se observaron signos en el sistema nervioso central, pero en ningún caso aparecieron lesiones vesiculares.

Sabin y Olitsky (80, 89) desarrollaron experiencias en ratones con el fin de determinar porque los animales adultos eran más resistentes que los jóvenes al virus de la EV. Si bien la inyección intracerebral del virus era fatal tanto para los jóvenes como para los adultos, encontraron que cuando el virus era inoculado por vía intranasal sólo sucumbían los ratones jóvenes (3 semanas), mientras que los mayores (1 año) eran resistentes.

Después de la instilación nasal de virus de la EV, tanto en ratones jóvenes como adultos, no se pudo hallar evidencia de infección sanguínea o sistémica. En la mucosa nasal no se pudo demostrar la presencia de virus una hora después de la instila-

ción, pero fue abundante dos días después, así como también en el rinoencéfalo anterior. En el cuarto día se hallaron altos títulos tanto en la mucosa nasal como en el cerebro y los ratones jóvenes mostraron signos clínicos definidos de afección del sistema nervioso central. Los ratones adultos no desarrollaron signos clínicos con posterioridad a la instilación nasal, aun cuando el virus estuvo presente entre el 2° y 5° día en el rinoencéfalo anterior. Las experiencias demostraron que en los ratones jóvenes el resto del cerebro es invadido desarrollándose una encefalomiélitis con muerte subsecuente en 5 días, mientras que en los adultos la progresión del virus es detenida en algún lugar del rinoencéfalo anterior. En cuanto el virus de la EV alcanza el cerebro de los animales jóvenes por vía del primer nervio cranial, una barrera localizada preexistente en el rinoencéfalo anterior y desarrollada con la edad impide al virus alcanzar el cerebro en los ratones adultos.

Un fenómeno semejante fue observado cuando los ratones jóvenes y adultos fueron expuestos por vía intramuscular e intraocular.

¿Por qué son los ratones adultos generalmente resistentes a todas las formas de inoculación periférica del virus de la EV cuando su inyección cerebral es igualmente fatal para ratones de cualquier edad? El virus de la EV inyectado intracerebralmente se difunde primariamente en un sistema "abierto" en contigüidad con los ventrículos. En cambio, cuando en los ratones jóvenes la inoculación es periférica el virus progresa en un sistema cerrado de neuronas, pero esto no ocurre en los adultos debido a la presencia de barreras localizadas en el sitio de inoculación.

¿Por qué son los ratones jóvenes más susceptibles al virus de la EV y por qué lo opuesto parece ser cierto en bovinos? Mientras la enfermedad clínica ocurre normalmente en bovinos adultos es muy raro observar lesiones vesiculares en los terneros menores de un año. De acuerdo con los resultados de encuestas serológicas, en cuanto desaparece la protección conferida por los anticuerpos maternos, los bovinos jóvenes serían tan susceptibles como los adultos a la infección por EV. ¿Por qué se observan entonces menos casos con lesiones en los animales más jóvenes? ¿Será que los daños a los tejidos (abrasiones, inoculaciones) en presencia

del virus de la EV producen algún efecto en animales viejos que no es observado en los animales jóvenes? ¿ Explicará ésto la difusión aparente del virus de la EV a lo largo de las líneas de ordeño en rebaños lecheros? (18).

PRODUCCION DE ANTICUERPOS E INMUNIDAD A LA ESTOMATITIS VESICULAR

En equinos y bovinos infectados experimentalmente con los virus de EV tipos NJ e Ind., los títulos de anticuerpos fijadores de complemento aparecen entre 6 y 8 días después de la inoculación alcanzando el pico en 9-16 días (37). Luego declinan gradualmente y desaparecen a los 50-110 días. Se pueden demostrar títulos seroneutralizantes en 6-8 días postinoculación, los que aumentan hasta alcanzar niveles relativamente elevados dentro de las 4-5 semanas. El título de anticuerpos neutralizantes se mantiene alto pero fluctuante durante un largo período de tiempo. En algunos casos los anticuerpos séricos neutralizantes contra la EV persistieron en bovinos hasta 8 años (102).

Sorensen y col. (102) sugirieron que la fluctuación de los títulos de anticuerpos neutralizantes podría ser explicada por persistencia del virus en el huésped y que los aumentos y caídas del título podrían deberse a periódicos "escapes contenidos" y subsecuentes retiradas del virus a sus focos crónicos. Sin embargo es interesante notar que entre 30 y 60 días después de la recuperación de EV numerosos animales pueden ser reinfectados con la misma cepa viral con desarrollo de enfermedad clínica. Estos animales pueden poseer títulos significativos de anticuerpos en el momento de la reinfección. Los títulos existentes suben rápidamente después de la descarga de virus.

En estudios realizados en Georgia, Hanson y col. hallaron que 70% de los bovinos en edad de lactación, 35% de los novillos y 70% de los terneros de menos de 3 meses de edad, así como 71% de lechones lactantes examinados, poseían anticuerpos neutralizantes contra el virus de EV (42, 44). Los anticuerpos séricos de los terneros y lechones eran, sin duda alguna, reflejo de su transferencia con el calostro. En hamsters, los anticuerpos maternos persisten en su cría durante 2-3 meses (109).

En las áreas endémicas la severidad de la enfermedad en bovinos varía, siendo la mayoría de las infecciones subclínicas o inaparentes. Experimentalmente se pueden inducir infecciones moderadas mediante la exposición de bovinos al virus por nebulización. El virus multiplica con inducción de anticuerpos pero sin aparición de signos de la enfermedad. Estudios serológicos demuestran que esto mismo puede ocurrir en condiciones naturales. En un rebaño del estado de Wisconsin todos los bovinos poseían anticuerpos un mes después de la aparición de la enfermedad, pero sólo el 50% fue afectado clínicamente (8, 40).

VACUNACION CONTRA LA ESTOMATITIS VESICULAR

La inoculación del virus vivo de la EV por vía intramuscular en bovinos no produce lesiones pero, en la mayoría de los casos, estimula la producción de anticuerpos neutralizantes. Esta observación llevó al uso experimental del virus vivo de la EV por vía intramuscular como procedimiento para la vacunación de bovinos en Panamá (69), Georgia (69), Guatemala (15) y Perú (104). Sin embargo, el uso de la vacuna no está difundido en el presente.

La vacuna del virus vivo tipo NJ, administrada intramuscularmente durante una epidemia, redujo marcadamente el número de casos clínicos de EV en bovinos lecheros en lactación. El período de permanencia de la EV en rebaños afectados fue bastante disminuido con posterioridad a la vacunación. Si bien mediante la vacunación no se alcanzó una protección absoluta de bovinos contra la descarga intradermolingual de virus, se logró un grado significativo de protección. Noventa por ciento de los animales vacunados desarrollaron anticuerpos. Aunque la enfermedad estaba activa en el área, ninguno de los bovinos vacunados desarrolló EV clínica, mientras que el 26% de los bovinos de rebaños no vacunados desarrollaron lesiones vesiculares.

Durante una prueba de campo de la vacuna contra la EV se observó que la enfermedad clínica era poco frecuente en rebaños que tuvieron 50% o más de los bovinos vacunados. En rebaños vacunados durante los períodos tempranos de una

epidemia no se observaron casos clínicos de EV 7 días después de la vacunación. El virus vacunal no se difundió de animal a animal por lactación o por saliva. Cincuenta por ciento de los bovinos poseían aún anticuerpos neutralizantes un año después de una inyección única de vacuna. Sólo el 5% no mostró aumento de los anticuerpos luego de una segunda vacunación. Se halló que el 60% de los animales ya poseía anticuerpos contra la EV antes de la vacunación. De ellos, el 76% tuvo aumento del título después de la primera vacunación. En rebaños con historia clínica de la enfermedad, el porcentaje de animales con anticuerpos preexistentes se elevó a 82. Aun en rebaños sin antecedentes de casos clínicos de EV, el 24% de los bovinos tenían anticuerpos específicos.

ESTOMATITIS VESICULAR EN POBLACIONES DE ANIMALES SILVESTRES

Numerosas encuestas serológicas en poblaciones de animales silvestres fueron realizadas con el fin de encontrar posibles reservorios del virus de la EV (45, 46, 53, 54, 57, 59, 60, 62, 63, 103, 108, 109).

En estudios realizados en el sudeste de los Estados Unidos de América se hallaron anticuerpos en ciervos de cola blanca (63), mapaches (44), linces (62) y cerdos salvajes (46). Cuarenta y ocho por ciento de los mapaches, 60% de los ciervos, 83% de los cerdos salvajes y 33% de los linces sangrados poseían anticuerpos neutralizantes contra el virus de la EV. Encuestas realizadas por Karstad en la misma área demostraron que ciertas especies de aves costeras y marinas también poseían anticuerpos contra la EV. Sin embargo, numerosos estudios laboratoriales no han conseguido demostrar que los pájaros desempeñen algún papel en la historia natural del virus de la EV.

Jenney y col. también hallaron evidencia de infección por virus EV en ciervos, mapaches, marsupiales y ardillas (53, 54). Trainer y Hanson (111) encontraron 8% de los sueros de ciervos de Texas positivos. Asimismo, 43% de 122 pavos silvestres de Río Grande atrapados en un refugio del sur de Texas durante 1964-65 poseían anticuerpos contra el virus NJ de la EV, aun cuando no se había registrado enfermedad clínica en el ganado (38).

Se cree que es poco probable que los ciervos sean reservorios del virus de la EV puesto que la enfermedad experimental es de corta duración e induce la formación rápida de altos títulos de anticuerpos neutralizantes (63). El mapache es altamente susceptible pero las infecciones son inaparentes no habiéndose detectado excreción del virus ni infecciones latentes.

Jonkers halló evidencia de infección por el virus Cocal en roedores de la floresta de Bush Bush en Trinidad durante las estaciones lluviosas de 1961 y 1962. La epidemia de 1961 fue de carácter explosivo y afectó alrededor del 65% de la población de roedores no arbóreos de la floresta (57, 59, 60).

Tesh y col. (107, 108, 109) estudiaron la prevalencia de anticuerpos neutralizantes contra la EV en varias poblaciones humanas y animales de Panamá. Entre los animales silvestres se encontraron anticuerpos contra el tipo Ind. principalmente de las especies arbóreas y semiarbóreas. Las tasas de infección más altas contra el tipo NJ fueron observadas en murciélagos, carnívoros y algunos roedores.

En Panamá también se realizó una encuesta serológica en gran escala para la detección de anticuerpos contra el virus Ind. en monos y otros vertebrados silvestres. Aproximadamente 75% de 267 monos capturados en la provincia del Darién tenían anticuerpos neutralizantes, mientras que solamente 19% de 383 monos cercanos a la ciudad de Panamá fueron positivos (103).

Excluyendo los monos, los vertebrados arbóreos poseían tasas de anticuerpos más altas que los animales que viven sobre la superficie del suelo. Los perezosos de dos dedos y los puerco espines tropicales se encontraban entre los animales arbóreos con altas tasas contra el virus Ind. Monos centinelas expuestos en el área mostraron aumentos en sus tasas de anticuerpos (103).

La lista completa de vertebrados silvestres de Panamá que poseían anticuerpos contra la EV incluye una amplia variedad de *especies terrestres*, entre las cuales se mencionan diversos tipos de ratas y ratones, agouti, conejos, armadillos y marsupiales; *especies principalmente arbóreas* incluyendo cinco clases de murciélagos; *especies estrictamente arbóreas* como son los perezosos, puerco espín, ardillas, ratas, marmoset, varios tipos de

monos, hormigueros pigmeos y kinkajou (*Potos candivolvulus*) y vertebrados semiarbóreos que incluyen mamíferos hormigueros, marsupiales y coatís (108). Todos estos animales son encontrados en una amplia gama de habitats y situaciones ecológicas y en general sin contacto regular con animales domésticos o el hombre. Obviamente, el virus de la EV se mantiene en áreas selváticas en forma independiente del ciclo de infección de los animales domésticos.

ESTOMATITIS VESICULAR EN HUMANOS

La EV posee aparentemente una patogenicidad apreciable para el hombre. La infección ocurre comúnmente en los que trabajan en los laboratorios y entre las poblaciones rurales de áreas donde la enfermedad existe en el ganado y en huéspedes animales silvestres (9, 31, 34, 56, 97, 108).

Han ocurrido casos humanos en laboratoristas y en tratadores de animales de estaciones experimentales que desarrollaban investigaciones sobre la EV. Con anterioridad al uso de medidas adicionales de seguridad, el 95% de los laboratoristas, el 100% de los tratadores de animales y el 70% de los becarios relacionados a proyectos de EV desarrollados en el laboratorio ARS de Beltsville, Estados Unidos de América, durante un período de 7 años, poseían anticuerpos contra los virus de la EV (15% frente al serotipo Ind. solamente, 40% sólo frente al NJ y 40% frente a ambos tipos (86). De los 54 casos humanos diagnosticados serológicamente en Beltsville, 31 (57%) declararon haber padecido síntomas clínicos. Desde que se comenzaron a utilizar escudos faciales de plástico para proteger los ojos y filtros de aire descartables sobre la nariz durante la inoculación y observación de animales infectados, los casos ocurridos han sido escasos.

La enfermedad en humanos es generalmente de tipo gripal, ocasionalmente severa y a veces asociada con vesículas orales y faríngeas. Muchos de los casos que ocurrían resultaron de la introducción de suspensión vírica en los ojos durante la pulverización de materiales en morteros, el examen de animales infectados y la colecta de materiales vesiculares. Presumiblemente los otros casos se debieron a la inhalación, ingestión o inoculación de virus virulento durante manipulaciones en el laboratorio o

en el campo sin que hubiera razones especiales para implicar a vectores artrópodos mordedores.

En 1956 se detectaron anticuerpos contra la EV en sueros de 18 personas que vivían en haciendas al sudeste de Georgia, Estados Unidos de América, donde se había diagnosticado la enfermedad en el ganado (72). Aproximadamente la mitad de las personas investigadas serológicamente poseían anticuerpos contra la EV (42). Posteriormente, Hanson y Karstad (44) demostraron anticuerpos neutralizantes en 25% de los sueros de 200 pacientes febriles del área rural endémica de Georgia. Algunas de las personas expuestas a bovinos enfermos durante una epidemia de EV en Nuevo México y Colorado desarrollaron una enfermedad febril seguida por elevación de los títulos de anticuerpos contra el virus Ind. (34). Al estudiarse los casos clínicos se demostró que las infecciones naturales de EV eran similares a las adquiridas accidentalmente en el laboratorio.

Estudios realizados en Panamá demostraron que tanto las personas como los animales domésticos poseían altos títulos de anticuerpos contra los tipos NJ e Ind. de la EV (108). La prevalencia de anticuerpos en humanos aumentaba con la edad sugiriendo una asociación directa entre las tasas de infección por EV y el período de residencia en áreas endémicas. Las diferencias geográficas y de especie observadas entre las tasas de anticuerpos para los virus Ind. y NJ implican que los dos serotipos de virus pueden tener ciclos diferentes en la naturaleza. La evidencia disponible sugiere que el tipo Ind. puede ser transmitido por artrópodos, mientras que el modo de transmisión del virus NJ no pudo ser determinado.

En 1960-61 se estudió un brote del tipo NJ en un rebaño lechero en el oeste de Panamá (9). Al encuestarse la población humana del área se observó que la presencia de anticuerpos neutralizantes contra este virus era considerablemente mayor (34-71%) entre las personas que tenían un historial de haber trabajado con bovinos que entre aquellos que no lo habían hecho (7-15%). Se consideró que el modo posible de transmisión a los humanos fue por contacto con animales infectados o por artrópodos. Si bien ambos tipos de difusión pueden haber ocurrido, el contacto directo fue aparentemente más importante.

Utilizando muestras de sueros humanos colectados al azar en toda América Central para una encuesta global de enfermedades transmisibles, Johnson y col. informaron que alrededor de la mitad de los adultos poseía anticuerpos contra los virus Ind. o NJ de la EV. En encuestas realizadas en unas 200 aldeas en toda América Central, el 48% de las personas examinadas tenía anticuerpos contra el virus NJ y 18% contra el Ind. Se halló evidencia de infección con el tipo NJ en prácticamente todas las localidades encuestadas. El tipo Ind. si bien no fue tan prevalente, tuvo una distribución geográfica similar (55).

EL PAPEL DE LOS ARTRÓPODOS EN LA TRANSMISION DE LA ESTOMATITIS VESICULAR

La mayor ocurrencia de brotes de EV en los meses cálidos y lluviosos, la rápida difusión de la enfermedad en grandes áreas y su asociación con áreas boscosas y con corrientes de agua natural, sugieren que la EV es una enfermedad transmitida por artrópodos. Efectivamente, se ha logrado aislar el virus Ind. de moscas *Phlebotomus* en áreas endémicas de Panamá (96, 107) y de mosquitos *Aedes* en predios de Nuevo México donde habían ocurrido casos clínicos en bovinos (105). El virus Cocal fue aislado de ácaros de ratas de arrozales en Trinidad y de mosquitos *Culex* en Trinidad y Brasil (57, 59, 60). El virus tipo NJ fue aislado en una oportunidad de jejenes oculares no hematófagos (*Hippelates pusio*) atrapados en un predio de Colorado donde habían ocurrido casos clínicos de EV en bovinos (51, 113).

Se observó, asimismo, multiplicación del virus Ind. en mosquitos *Aedes aegypti* con transmisión subsecuente a ratones (7, 77). Un hecho similar fue observado con el virus Cocal también en mosquitos (*Culex pipiens quinquefasciatus* y *Trichoprosopon digitatum*) (59). Por otro lado, el virus de la EV fue propagado *in vitro* en células de la polilla *Antheraea eucalypti* (116), en líneas celulares continuas de tejidos del *Aedes aegypti* y del *Aedes albopictus* (4, 5) y en células de la mosca de los frutales, *Drosophila melanogaster* (76, 88).

Donaldson (24) describió la infección de murciélagos en condiciones de laboratorio con el virus Cocal y su transmisión a ratones lactantes a través

de mosquitos del género *Aedes aegypti* (L), a partir de murciélagos virémicos. En murciélagos mantenidos a temperatura de 22° C se detectó viremia durante diez días, mientras que el período de viremia alcanzó a 16 días en murciélagos en estado de hibernación. Se concluyó que, en regiones endémicas de estomatitis vesicular, se debe considerar la posibilidad de un ciclo artrópodos hematófagos-murciélagos-artrópodos (25).

En Panamá, el tipo NJ, aún siendo más endémico que el Ind., nunca ha sido aislado de artrópodos. En cambio el virus Ind. ha sido aislado repetidamente de moscas *Phlebotomus*. Puesto que la leishmaniasis también es transmitida por *Phlebotomus* y se encuentra en gran parte de la misma área, se ha sugerido que esta enfermedad y la EV tipo Ind. pueden tener requerimientos ecológicos similares (108).

La significación de un único aislamiento del virus NJ del *Hippelates pusio* es incierta ya que estos jejenes oculares se alimentan de mucus y no son insectos hematófagos. Existe la posibilidad de que este insecto juegue un papel en la transmisión mecánica sin desarrollo de un ciclo infeccioso en sus tejidos (51, 54). Esto mismo puede aplicarse a las moscas *Phlebotomus*, un grupo de insectos que a veces se alimenta en heridas y secreciones corporales. ¿Es posible que virus provenientes de lesiones en la boca y tetas de bovinos infectados sea introducido por estas moscas en heridas o abrasiones causadas por espinas de plantas o rastros en bovinos susceptibles?

Experimentalmente se demostró que es posible la transmisión mecánica del virus tipo NJ por varias especies de dípteros picadores (33). Ferris y col. encontraron que numerosas especies de mosquitos y tabánidos eran capaces de recoger el virus y transmitirlo durante breves períodos a huéspedes de laboratorio. La transmisión fue aparentemente mecánica y no biológica, puesto que los insectos sólo permanecieron infectantes durante 3 días, no hubo incubación intrínseca y la especificidad de huésped fue escasa. Se observó que insectos que se alimentan sobre áreas del cuerpo de un animal pueden transmitirle el virus de la EV sin causar signos aparentes de la enfermedad pero estimulando una respuesta serológica contra el virus.

A pesar de la evidencia acumulada a favor de la

transmisión del virus de la EV por artrópodos algunos investigadores han cuestionado considerablemente su papel como vectores. Fracasos repetidos en el aislamiento de virus de la EV de una gran variedad de moscas mordedoras y mosquitos en áreas endémicas y epidémicas han causado dudas acerca de la hipótesis de insectos picadores como los principales vectores de la EV (90). Si la aparición simultánea de la enfermedad en un rebaño entero o en varios rebaños es atribuida al trabajo de un vector debería requerir el acceso a un reservorio infectante de un tamaño muy grande. Este tipo de reservorio aún no ha sido encontrado.

En un área de Panamá se detectó actividad del virus Ind. sin que durante el mismo período se consiguiera detectar virus en las moscas *Phlebotomus*. Si estas moscas son en realidad el único vector del virus Ind. de la EV se habría esperado una tasa de aislamiento de esos insectos mucho más elevada de la que realmente se observó (107). El fracaso en aislar el virus Cocal en Trinidad con mayor frecuencia de mosquitos y ratones centineas sugirió que los mosquitos probablemente no son los agentes principales responsables por la transferencia de virus durante períodos epidémicos. El único aislamiento en ácaros *Gigantolaelaps* en Trinidad tampoco es adecuado para confirmar a estos artrópodos como un vector principal (57). En su conjunto, estas observaciones implican que podrá haber otras fuentes no reconocidas de virus en la naturaleza. Si bien Tesh y col. (106) demostraron la transmisión transovárica del virus tipo Ind. en las moscas *Phlebotomus*, lo cual podría explicar como se mantiene el virus en la naturaleza con exclusión de huéspedes vertebrados, las tasas de transmisión transovárica halladas (20-30%) no son consideradas como suficientemente elevadas para mantener el virus durante mucho tiempo en la población de insectos a menos que ocurra uno o más de los siguientes hechos: 1) sobrevivencia selectiva de las moscas infectadas; 2) transmisión del virus a muchas hembras durante la inseminación por machos infectados, o 3) la existencia de otra fuente de virus que ocasionalmente realimente el ciclo transovárico.

Jonkers informó que la epidemia de virus Cocal de 1961 en pequeños roedores de Trinidad

tuvo un parecido considerable con las epidemias de EV en bovinos. La aparición súbita de la infección en una gran proporción de la población susceptible poco tiempo después de copiosas lluvias en un ambiente boscoso, el fracaso en incriminar artrópodos picadores, la ausencia de viremia en los animales infectados y finalmente la afinidad de los agentes por la piel sugirieron que la epidemiología de este grupo de agentes era básicamente similar (60).

En un trabajo publicado en 1967, Jonkers (58) levantó una serie de objeciones a la hipótesis del origen por artrópodos de la EV:

- 1 - si las lesiones típicas en bovinos y equinos son producidas exclusivamente en los sitios de abrasiones y cortes sobre la piel y mucosa de la boca, por ejemplo, es difícil imaginar los hábitos picadores de un vector responsable por esta ocurrencia;
- 2 - si un vector artrópodo es responsable por la transmisión del virus, ¿por qué se afectan los animales de algunos potreros ampliamente separados, mientras que los de potreros adyacentes no se infectan?;
- 3 - la aparición súbita de casos clínicos en una gran proporción del rebaño, a veces en el mismo día (48), requeriría un gran número de vectores infectados y presumiblemente una extensa epidemia en las especies silvestres. Si la enfermedad fuera difundida por vectores sería más probable que la epidemia en los animales silvestres se volcara en forma más gradual hacia el ganado;
- 4 - los porcinos a menudo no son afectados durante epidemias aun cuando estén en contacto con bovinos y equinos (40, 74). Esto es difícil de conciliar con una enfermedad de origen por vector a menos que se postule que el vector pica a los bovinos y equinos, pero no pica a los porcinos;
- 5 - similarmente, la escasez de casos en ganado estabulado es difícil de explicar si la enfermedad es transmitida por vectores ya que es común hallar vectores hematófagos en los establos;
- 6 - la densidad de la población del ganado en un área no parece ser un factor importante para la difusión de la EV (8, 41). Este hecho tampoco es consistente con una enfermedad originada por vectores;
- 7 - si las lesiones son causadas por la introducción del virus por la picadura de un vector en

el sitio de las lesiones, ¿por qué se encuentran solamente lesiones bucales en algunos rebaños y en otros sólo lesiones en las tetas?;

8 - salvo una excepción (105), los intentos de aislar virus de artrópodos atrapados durante brotes en los Estados Unidos de América no han tenido éxito hasta el presente (62). Aun cuando se aisló virus Cocal de ácaros y mosquitos durante una epidemia en roedores campestres en Trinidad, ninguno de estos vectores fue considerado como el probable responsable de la diseminación extensiva del virus (60). En Panamá se sugirió que la tasa de aislamiento de virus de las moscas *Phlebotomus* era demasiado baja como para explicar el elevado nivel de infección por el virus Ind. de las poblaciones humana y animal (107);

9 - una de las mayores dificultades en apoyar el planteo que ubica a la EV como una enfermedad originada por artrópodos reside en el hecho que en estudios experimentales de viremia producida en bovinos, equinos y roedores es de corta duración y títulos bajos (42, 67). En Trinidad la epidemia de virus Cocal en roedores no estuvo acompañada de una viremia suficiente como para infectar insectos hematófagos con regularidad (57). Hasta el presente no se encontró para la EV ningún huésped animal que demuestre una viremia de duración y título suficiente para infectar regularmente un vector hematófago.

Existen algunos resultados experimentales que pueden explicar esta anomalía. Estudios de depuración del virus (10) han demostrado que las partículas virales de EV son removidas eficazmente de la sangre por las células fagocíticas del sistema retículoendotelial. En el hombre el virus del tipo Ind. es absorbido y multiplica diferencialmente en los monocitos, presumiblemente la forma circulante de los macrófagos fijos tisulares. Desde que estas células parecen ser importantes como procesadoras de la información antigénica necesaria para iniciar una respuesta inmunológica, la formación de anticuerpos luego de la infección es acelerada y no se acompaña de un período de significativa viremia. Este cuadro fue observado en infecciones experimentales de bovinos y equinos y

de una variedad de pequeños mamíferos (26, 55).

EL VIRUS DE LA ESTOMATITIS VESICULAR COMO VIRUS DE PLANTAS

Son numerosos los brotes de EV en los cuales las lesiones han ocurrido predominantemente en un solo lugar del organismo, tal como la boca o las tetas. Esta observación combinada con el hecho que el virus de la EV no atraviesa la piel intacta ha sugerido la posibilidad de que sean necesarias lesiones inespecíficas que permitan la entrada del virus como rasguños por breñas y zarzas en la boca o tetas. De acuerdo con esto, Jonkers (58) formuló una hipótesis que sugiere que el virus de la EV ya se encuentra en el propio pasto antes que aparezcan los primeros casos siendo puesto en contacto con el ganado, ya sea por la ingestión de material infectado con virus (resultando en la aparición de lesiones específicas en la boca siempre que el virus sea inoculado en la mucosa) o por acostarse en o caminar a través de un área en la cual el virus se halle presente (con la producción de lesiones en las tetas o las patas).

Jonkers postuló que la consideración del pasto como la unidad epidemiológica explicaría la distribución de los brotes en forma de manchones, la ausencia de difusión de predio a predio y la escasez de casos en animales estabulados (en los casos que ocurren en lotes de ganado alimentados con forraje verde el virus sería introducido supuestamente con el forraje). Esta hipótesis explicaría también la ausencia de difusión por el solo contacto, la ocurrencia simultánea en grandes áreas, la mayor incidencia en la estación lluviosa (relacionada de alguna forma al crecimiento o disponibilidad de algún agente en los pastos) y la menor incidencia en porcinos.

Similarmente, McDermid sugirió en 1951 que el virus de la EV crece en ciertos campos como un saprófito y que la infección podría ser transmitida al ganado por medio de rastros (73). Johnson y col. (55) han propuesto que el virus de la EV es básicamente un virus de plantas, lo cual es sugerido por su similitud morfológica con ciertos rhabdovirus vegetales y que es transmitido a los vertebrados

por las moscas *Phlebotomus*, básicamente chupadoras de jugos vegetales o por algunos insectos no picadores, como los aphideos (pulgas de los vegetales que transmiten ciertos virus de plantas) que podrían pasar el virus a los animales domésticos al ser ingerido con los alimentos vegetales. Propusieron, además, que en su forma vegetal el virus posee una doble cubierta sobre la partícula viral que lo hace no infeccioso para vertebrados. El virus podría ser convertido en una nueva forma, de cubierta simple, por pasaje en insectos y de esta forma sería infeccioso para vertebrados.

A pesar de la especulación acerca del virus de la EV como virus de plantas, aún no se han realizado aislamientos del mismo en plantas o insectos de plantas como los aphideos.

UN MECANISMO ALTERNO DE TRANSMISION

Si bien la hipótesis que postula que el virus de la EV sería típicamente vegetal es de cierta forma más consistente que la sugerencia de una enfermedad originada por artrópodos, aún persiste una serie de preguntas sin la debida respuesta. Además de afectar bovinos, equinos y cerdos, la EV está ampliamente distribuida en la población animal silvestre de ciertas áreas y sería difícil de explicar la infección de estas especies, sobre todo las arbóreas y semiarbóreas, por medio del contacto con el virus en pasturas. Esta misma pregunta surgiría para explicar la fuente de brotes en rebaños de cerdos estabulados no alimentados con forrajes verdes. Sería más difícil aún explicar la ampliamente difundida infección del hombre si fuera necesario el contacto con pastos infectados.

Las epidemias de EV en bovinos y equinos hacen su aparición dramática con el súbito, prácticamente simultáneo, apareamiento de numerosos casos clínicos de enfermedad vesicular, dispersos en una gran área. Desde que las lesiones en la boca, patas o tetas son difíciles de producir experimentalmente a no ser por inoculación del epitelio o contacto de la mucosa escarificada con el virus de la EV, se asume que este mismo proceso ocurre en la naturaleza, y el sitio más lógico para que la infección tenga lugar es el pasto.

En realidad, los casos de EV con lesiones constituyen una pequeña minoría del total de infec-

ciones. Sobre la base de encuestas serológicas en animales domésticos y silvestres y en humanos, la gran mayoría de las infecciones parecen ser inaparentes y asintomáticas. Si, por las razones arriba señaladas, estas infecciones no pueden ser explicadas simplemente por el contacto con el virus en los pastos o por difusión por medio de insectos vectores, ¿qué otros mecanismos de transmisión pueden ser considerados? Otra explicación es que la transmisión tiene lugar por contacto directo, muy posiblemente por la vía nasofaríngea.

De acuerdo con esta hipótesis, el principal mecanismo de transmisión del virus de la EV sería por vía respiratoria, siendo la gran mayoría de las infecciones inaparentes, con la persistencia del virus en el huésped animal durante largos períodos de tiempo, posiblemente en una forma oculta. La aparición de las lesiones vesiculares típicas en el animal infectado podría ocurrir entonces de alguna manera análoga a lo que ocurre en humanos con las infecciones crónicas por herpes simplex, en las cuales las erupciones aparecen cuando la resistencia local se ve reducida por diversos factores inespecíficos.

Si bien esto podría explicar lo que ocurre en algunos casos individuales, se requiere una hipótesis adicional que considere la ocurrencia simultánea en una amplia región de un gran número de casos clínicos. La base más razonable para este fenómeno es que uno o más factores ambientales, presumiblemente climáticos, provocan de alguna forma la producción de lesiones vesiculares por el virus de animales previamente infectados. La distribución en forma de manchones de los rebaños afectados por EV, el diferente grado de severidad de la enfermedad para diferentes rebaños y la diversidad de localización exclusiva de lesiones (boca; patas o tetas) pueden depender de algún tipo de respuesta diferencial y graduada a las influencias o factores ambientales por parte de los bovinos crónicamente infectados con EV.

Existe alguna evidencia experimental (39) sobre el papel de factores ambientales tales como la temperatura en la aparición de casos clínicos de EV. La mortalidad de ratones inoculados intracerebralmente con virus de la EV fue significativamente reducida en grupos aclimatados a 8° C en relación a

grupos mantenidos a 27° C o 35° C. El período de incubación de la infección también fue más largo entre los ratones adaptados a temperaturas bajas y las tasas metabólicas fueron más altas en los ratones mantenidos a 8° C que en aquellos que estaban a 25-35° C, tal como quedó evidenciado por el mayor consumo de comida y aumento de peso.

La aclimatación a una temperatura baja antes de la inoculación fue esencial para influenciar favorablemente la tasa de sobrevivencia de los ratones. La exposición al frío en el momento de la inoculación o brevemente después no alteró el curso de la infección. Puesto que ha sido demostrado experimentalmente que los animales susceptibles pueden ser infectados con el virus de la EV tan fácilmente en invierno como en verano, resta la posibilidad que mientras la temperatura ambiente quizás no influya la habilidad del virus para iniciar una infección, puede alterar apreciablemente la respuesta del huésped a esa infección.

En años recientes se han descrito mutantes sensibles a la temperatura (ts) para numerosos virus incluyendo el de la EV. Aun cuando la mayoría de las mutantes ts fueron producidas en laboratorio, se sabe que las mismas también ocurren con una baja frecuencia espontáneamente en varias poblaciones virales. Una evidencia cada vez mayor sugiere que mutantes ts seleccionadas naturalmente pueden ser responsables por estados latentes *in vitro* y que estas mutantes juegan un papel ya sea en el establecimiento o en el mantenimiento de infecciones virales persistentes (87).

Se ha encontrado que los virus recuperados de diferentes tipos de infecciones persistentes poseen una menor habilidad para replicar a altas temperaturas. Esto ha llevado a sugerir que para aislar virus de explantes de tejidos provenientes de animales con enfermedades en las que se sospecha una infección viral latente o persistente, se deberían incubar los cultivos celulares a 31-33° C, además de la incubación convencional a 37° C (87).

¿Tienen estos hechos alguna aplicación en la historia natural del virus de la EV? ¿Son, por ejemplo, las mutantes ts del virus de la EV responsables por las infecciones persistentes en bovinos? ¿Podrían mutaciones posteriores de estas cepas virales, posiblemente provocadas por cambios ambientales de alguna naturaleza, resultar en tipos

de virus que causen las lesiones vesiculares típicas de animales afectados?

Observaciones de campo durante epidemias también sugieren alguna influencia posible de factores ambientales. Sólo se han registrado unos pocos casos clínicos sospechosos de EV en los Estados Unidos de América en el invierno o en los primeros meses de la primavera y el virus nunca ha sido aislado durante esos meses del año (40). Lauerman (68) informó que parecía haber un marcado aumento del número de casos de EV después del pasaje de un anticiclón. Observó también que la difusión de la epidemia seguía la dirección del pasaje del anticiclón. En forma similar, Hanson y col. (43) observaron que la EV no siempre aparece simultáneamente en un área epidémica. El estudio de casos en Georgia y Alabama sugirió que la enfermedad se movía centrífugamente a partir de uno o dos centros y que más bien se difundía a lo largo de corredores de rebaño en rebaño, en lugar de permanecer en algunos campos en particular. Asimismo, la dirección y el momento de la difusión parecían coincidir con el pasaje de frentes de tormenta (41).

Una dificultad con la teoría de la transmisión por contacto de la EV en el ganado reside en que la enfermedad es desconocida en algunas áreas a pesar de ser densamente pobladas por animales susceptibles. Si el único requerimiento fuera el contacto se esperaría una infección ampliamente difundida. Sin embargo, es posible que la difusión sea por contacto pero que el proceso de infección requiera condiciones ambientales especiales o estados metabólicos alterados.

SOBREVIVENCIA INTEREPIDÉMICA DEL VIRUS DE LA ESTOMATITIS VESICULAR

Independientemente de cuales sean los mecanismos básicos para la transmisión de la EV de animal a animal es difícil explicar la sobrevivencia de este virus durante períodos interepidémicos. En algunas áreas de los Estados Unidos de América las epidemias ocurrieron con intervalos de más de 10 años. La persistencia del virus como una infección oculta durante períodos tan prolongados parece bastante improbable si se compara con la probabilidad de introducción desde áreas donde

se observan infecciones anualmente. Hanson sugirió la introducción de un animal susceptible infectado o la migración de un huésped o vector no identificado hacia el área del brote epidémico (41).

En vista de que la EV puede ser observada en ciertas áreas de México durante todo el año, Hanson sugirió también que el origen de la mayoría de los brotes de esta enfermedad estaría en América semitropical, siendo que el virus podría ser introducido a los Estados Unidos de América por movimientos de ganado infectado a lo largo de las rutas de comercialización y por migraciones de reservorios animales, si bien ningún animal doméstico o silvestre ha sido aún incriminado como huésped reservorio. Las aves migratorias también han sido incriminadas como posibles vectores o reservorios (40, 41).

Se ha sugerido que ciertos insectos pueden transmitir el virus a través de grandes distancias. Los afídeos, saltadores y lepidópteros que atacan pastizales y forrajeras migran cada primavera con los vientos cálidos del sur desde la costa del Golfo hacia Canadá. El viaje dura entre 2 y 6 semanas y una sucesión de ondas migratorias puede seguir a la primera (41).

La introducción del virus de la EV a áreas epidémicas por vertebrados o insectos migratorios aún no explicaría el brote súbito de casos clínicos en un área grande. Esto requeriría la migración de un enorme número de portadores de virus, si la ocurrencia de los casos clínicos estuviera ligada a la aparición de infecciones primarias en el área. Por otro lado, el virus podría ser introducido en un área "limpia" por medio de portadores migratorios, con un cúmulo gradual de infecciones asintomáticas hasta que las condiciones sean apropiadas para la aparición repentina o "brote" de casos clínicos en un área extensa.

Una otra posibilidad es que la EV persista de hecho en los animales en una forma inaparente durante largos períodos de tiempo en áreas epidémicas sin que aparezcan casos clínicos debido a la ausencia de condiciones ambientales favorables para su ocurrencia. Cuando estas condiciones sobrevienen, aunque se trate de intervalos largos, se observarían los brotes de casos clínicos. Esto sugeriría que aun cuando las condiciones ambientales necesarias para la aparición de brotes de EV no

existan regularmente en las áreas epidémicas, éstas podrían aparecer en raras ocasiones como eventos excepcionales.

Paracería que ninguna teoría de transmisión por sí misma sirve para explicar todas las observaciones de campo y laboratorio con respecto al virus de la EV. Es probable que en la naturaleza opere más de un sistema. Si bien la diseminación respiratoria por contacto directo con animales infectados parecería posible y consistente con varias observaciones de campo, los vectores artrópodos pueden jugar un papel significativo bajo ciertas condiciones como por ejemplo, en las áreas de bosques tropicales en Panamá. Puede existir una serie de reservorios diferentes para el virus y la transmisión puede ocurrir de diversas maneras bajo condiciones distintas pudiendo ser diferente para el tipo NJ y para el virus tipo Ind., a pesar de que ambos pueden ser encontrados en la misma área, son morfológicamente similares y producen básicamente el mismo cuadro clínico.

PREGUNTAS A SER RESUELTAS EN RELACION A LA EPIDEMIOLOGIA DE LA ESTOMATITIS VESICULAR

Las numerosas incógnitas que existen sobre la EV podrían ser resumidas en algunas de las preguntas que surgen con respecto a la epidemiología de la enfermedad:

1 - ¿Cuál es el reservorio (o reservorios) del virus de la EV?

2 - ¿Cómo se transmite el virus de la EV de uno a otro huésped?

3 - ¿Cómo adquirirían el virus los vectores artrópodos si no ha sido observada una viremia con títulos altos de larga duración en ningún huésped vertebrado?

4 - ¿Es suficiente el pasaje trasovárico del virus tipo Ind. en el *Phlebotomus* para explicar la sobrevivencia del virus en la naturaleza?

5 - ¿Son diferentes los mecanismos de transmisión para los virus NJ e Ind.?

6 - ¿Por qué no se ha aislado el virus tipo NJ de artrópodos siendo un hecho bastante común para el virus Ind.?

7 - ¿Cómo producirían ordinariamente los

vectores hematófagos las lesiones en los bovinos si éstas son producidas solamente por la inoculación del virus de la EV en el sitio de las lesiones bucales, podales o mamarias o por contacto del virus con superficies escarificadas del epitelio en esos sitios?

8 - ¿Cómo adquieren la infección huéspedes tales como los murciélagos, monos y el hombre, si el virus de la EV o el agente que produce las lesiones de EV se encuentra en los pastos?

9 - ¿Cómo sobrevive el virus de la EV entre períodos epidémicos cuando pueden haber intervalos entre brotes de hasta 10-15 años?

10 - ¿Por qué se caracterizan algunos brotes de EV en bovinos por lesiones exclusivamente mamarias? ¿Se debe ésto a una diferencia de cepas de virus? ¿Qué tipo de vector produciría sólo lesiones mamarias? Si las lesiones son causadas por contacto con el virus en los pastos, ¿por qué no se observan también lesiones bucales y podales al mismo tiempo que ocurren las mamarias?

11 - ¿Es el virus de la EV transmitido mecánicamente durante el ordeño de una vaca a la próxima por las manos del ordeñador o por las copas del ordeñadero automático o el virus se encuentra ya presente en los tejidos, siendo las lesiones vesiculares provocadas por daños a las tetas?

12 - ¿Son los anticuerpos seroneutralizantes persistentes debidos a la persistencia del virus en el huésped durante largos períodos?

13 - ¿Cómo se infectan los bovinos en rebaños en los que no se observan casos clínicos, pero donde una gran proporción del rebaño puede tener anticuerpos contra la EV?

14 - A pesar de que el virus de la EV no produce lesiones cuando es inoculado por vía subcutánea o intramuscular, produce un aumento de los títulos de anticuerpos y una cierta inmunidad protectora. Sin embargo, la inmunidad producida puede no proteger contra la descarga intralingual. Según estas observaciones, ¿cómo se obtiene, de acuerdo con lo informado, una protección aceptable durante brotes de EV cuando se vacuna con el virus por vía intramuscular?

15 - ¿Produce la inoculación intramuscular del virus vivo de la EV usado como vacuna en bovinos infecciones inaparentes de larga duración? ¿Ten-

drían estos bovinos una mayor tendencia a desarrollar lesiones vesiculares posteriormente, durante una epidemia natural? ¿Si sometidos experimentalmente a un "stress"?

16 - ¿Cómo podemos explicar la ocurrencia de algunos brotes o casos durante la estación seca o durante un período de escasa precipitación, si los brotes de EV son vistos mayormente durante la estación de lluvias?

17 - Si la EV se encuentra presente en los pastos, ¿por qué los potreros adyacentes no se afectan con mayor frecuencia? ¿Por qué es usualmente tan salpicada la distribución de los rebaños afectados?

18 - ¿Por qué se observan brotes regionales y qué factores limitan la aparición de la enfermedad a esas áreas circunscritas?

19 - ¿Por qué existe a veces una diferencia considerable de las tasas de morbilidad entre rebaños afectados en el mismo brote regional?

20 - ¿Por qué se afectan más frecuentemente con EV clínica los bovinos y equinos adultos que los animales menores de un año?

21 - ¿Por qué es máxima la incidencia de la EV durante la estación de lluvias?

22 - ¿Cómo podría infectarse un número suficiente de vectores del virus de la EV con un nivel suficientemente alto que produzca un brote simultáneo y ampliamente difundido en bovinos y equinos en un área epidémica?

23 - ¿Puede ser relacionada la EV en áreas endémicas y epidémicas en el hemisferio occidental con la distribución de alguna especie de artrópodos o conjunto de condiciones climáticas en particular? ¿Por qué no se encuentra la EV en el hemisferio oriental?

24 - ¿Por qué no son más numerosos los casos clínicos y por qué no es mayor la prevalencia de la enfermedad en las áreas de producción suina, si la EV en los suinos puede difundirse por contacto?

25 - ¿Cómo podrían infectarse con el virus Ind. monos centinelas enjaulados en áreas de bosque tropical en Panamá no siendo por artrópodos voladores y picadores?

26 - ¿Los bovinos que desarrollan lesiones de EV durante un brote poseen anticuerpos contra el virus antes de la aparición de lesiones?

PROPUESTA PARA ESTUDIOS
ULTERIORES DE CAMPO

Debido a los complejos patrones de transmisión y requerimientos ecológicos que pueden existir para el virus de la EV, se hace difícil el estudio de la enfermedad a nivel de campo. Los estudios retrospectivos de epidemias o las encuestas ocasionales de animales de áreas endémicas son valiosos, pero pueden dar poca información adicional a la ya disponible.

Un enfoque, que parecería ser prometedor para revelar algunos de los datos epidemiológicos desconocidos sobre la EV sería un estudio prospectivo, longitudinal en un área en que ambos virus, NJ e Ind., sean endémicos. Este tipo de área puede ser hallada en ciertas partes de México, América Central y América del Sur.

El estudio básico de campo debería incluir una investigación ecológica continua de la EV en un área endémica circunscrita seleccionada sobre la base de encuestas serológicas. Se podrían seleccionar 2 ó 3 predios que posean un número suficiente de bovinos, equinos y suínos. Se puede anotar la historia clínica de los rebaños y seguir clínicamente individuos durante el transcurso del estudio. Se acompañaría con la colecta de muestras de sangre para el análisis de anticuerpos por fijación del complemento y seroneutralización en el comienzo del estudio y cada 2 ó 3 meses después. Se podrían mantener registros sobre los movimientos de animales, ingresos al rebaño, tipos de pasturas y forrajes disponibles y tipo de alimentación provista. Igualmente se puede guardar un registro cuidadoso sobre una variedad de fenómenos climáticos (precipitación pluvial, temperatura, humedad, tormentas, inundaciones, etc.). Paralelamente los estudios serológicos pueden incluir muestras representativas de especies silvestres y residentes humanos seleccionados en el área. Por último se incluirían estudios entomológicos con el fin de determinar los posibles vectores artrópodos presentes, colectándolos para aislamiento de virus siempre que fuera indicado.

Básicamente, la investigación intentaría estudiar durante un cierto número de años cada uno y todos los factores que en una pequeña área endémica para la EV pudieran estar relacionados con

los reservorios y transmisión del virus en la naturaleza. Los patrones de infección inaparente por EV podrían ser seguidos desde el nacimiento de algunos bovinos en observación y quizás, si ocurrieran casos clínicos de esta enfermedad durante el transcurso del estudio, su aparición podría ser relacionada a algunos eventos ambientales concomitantes en el área. La ocurrencia de nuevas infecciones, ya sean o no acompañadas por lesiones clínicas, podrían ser correlacionadas posiblemente con el aislamiento de virus de la EV en vectores o plantas, o en otros agentes que son aún insospechados, o podría demostrarse la relación con difusión respiratoria por medio del contacto estrecho entre los animales afectados.

Puesto que en el presente no se están desarrollando estudios de campo en lugar alguno, es esencial que se inicie a la brevedad posible algún tipo de estudio ecológico prospectivo de larga duración sobre la EV con el fin de proveer alguna comprensión sobre la historia natural de esta enfermedad intrigante. Al mismo tiempo debe realizarse un esfuerzo mayor para utilizar la numerosa información resultante del uso en gran escala del virus de la EV en el laboratorio, en el estudio de la biología molecular de los virus, con la esperanza de que puedan ofrecernos una mejor comprensión de los hallazgos epidemiológicos en el campo.

BIBLIOGRAFIA

1. ACREE, J.A. Colorado epizootic of vesicular stomatitis: Observations on its effects, transmission and response to therapy. *Proc. Am. A. Equine Pract.* pp. 289-299, 1964.
2. ACREE, J.A.; HODGSON, D.F.; PAGE, R.W. Epizootic Indiana vesicular stomatitis in Southwestern U.S. *USLSA Proc.* 68: 375-379, 1964.
3. ANIMAL HEALTH YEARBOOK, 1975. UNITED NATIONS, pp. 162-165, 1976.
4. ARTSOB, H.; SPENCE, L. Growth of vesicular stomatitis virus in mosquito cell lines. *Can. J. Microbiol.* 20: 329-336, 1974.
5. ARTSOB, H.; SPENCE, L. Persistent infection of mosquito cell lines with vesicular stomatitis virus. *Acta Virol.* 18: 331-340, 1974.
6. ATLAS OF MEXICO. University of Texas, Austin, 1975.

7. BERGOLD, G.H.; SUAREZ, O.M.; MUNZ, K. Multiplication in and transmission by *Aedes aegypti* of vesicular stomatitis virus. *J. Invest. Path.* 11: 406-428, 1968.
8. BRANDLEY, C.A.; HANSON, R.P.; CHOW, T.L. Vesicular stomatitis with particular reference to the 1949 Wisconsin epizootic. *Proc. Am. Vet. Med. Assoc. 88th Ann. Meeting 20-23*: 61-67, Aug. 1951.
9. BRODY, J.A.; FISCHER, G.F.; PERALTA, P.H. Vesicular stomatitis virus in Panama. Human serologic patterns in a cattle raising area. *Am. J. Epidem.* 86: 158-161, 1967.
10. BRUNNER, K.T.; HUREZ, D.; McCLUSKEY, R.T.; BENACERRA, B. Blood clearance of P32-labeled vesicular stomatitis and Newcastle disease viruses by the reticuloendothelial system in mice. *J. Immunol.* 85 (1): 99-105, 1960.
11. CAMARGO, F.; EICHHORN, E.A.; LEVINE, J.M.; TELLEZ GIRON, A. A complement fixation technique for foot-and-mouth disease and vesicular stomatitis. *USLSA Proc.*: 207-211, 1950.
12. CARDONA, V.; BENITO, E.; ROCHA, J.; GUTIERREZ, A. La estomatitis vesicular en Colombia. La fiebre aftosa y otras enfermedades vesiculares en Colombia. 1975.
13. CASTAÑEDA, J.; HANSON, R.P. Complement-fixing antibodies as a measure of immunity of cattle to the virus of vesicular stomatitis New Jersey. *Am. J. vet. Res.* 27 (119): 963-969, 1966.
14. CASTAÑEDA, J.; LAUERMAN, L.H.; HANSON, R.P. Evaluation of virus neutralization tests and association of indices to cattle resistance. *Proc. 68th Ann. Meet. USLSA*: 455-467, 1964.
15. CORREA, W.M. Prophylaxis of vesicular stomatitis: A field trial in Guatemalan dairy cattle. *Am. J. vet. Res.* 25: 1300-1302, 1964.
16. COTTON, W.E. The causal agent of vesicular stomatitis proved to be a filter-passing virus. *JAVMA* 23 (1): 168-184, 1926.
17. COTTON, W.E. Vesicular stomatitis in its relation to the diagnosis of foot-and-mouth disease. *JAVMA* 22 (3): 313-332, 1926.
18. COTTON, W.E. Vesicular stomatitis. *Vet. Med.* 22: 169-175, 1927.
19. COX, H.R.; OLITSKY, P.K. Neurotropism of vesicular stomatitis virus. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 30: 653, 1933.
20. CUNHA, R.G.; EICHHORN, E.A.; MATA, F.O. Differentiation between foot-and-mouth disease and vesicular stomatitis viruses by means of mouse inoculation. *Am. J. vet. Res.* 16: 472, 1955.
21. CHOW, T.L.; McNUTT, S.H. Pathological changes of experimental vesicular stomatitis in swine. *Am. J. vet. Res.*: 420-424, July, 1953.
22. DISEASES OF CATTLE. Edited by W.J. Gibbons, American Veterinary Publication, 509-516, 1963.
23. DISEASES OF SWINE. Edited by H.W. Dunne. Iowa State Univ. Press, 191-201, 1958.
24. DONALDSON, A.I. Studies on the epizootiology and characterization of vesicular stomatitis and morphologically related viruses. PhD. Thesis, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada, 1969.
25. DONALDSON, A.I. Bats as possible maintenance hosts for vesicular stomatitis virus. *Am. J. Epidem.* 92 (3): 132-136, 1970.
26. EDELMAN, R.; WHEELOCH, E.F. Specific role of each human leukocyte type in viral infections. 1. Monocyte as host cell for vesicular stomatitis virus replication *in vitro*. *J. Virol.* 1 (6): 1139-1149, 1967.
27. ELLIS, E.M.; KENDALL, H.E. The public health and economic effects of vesicular stomatitis in a herd of dairy cattle. *JAVMA* 144 (4): 377-380, 1964.
28. EQUINE MEDICINE AND SURGERY. Edited by Bone, J.F.; Cattcott, E.J.; Gabel, A.A.; Johnson, L.E.; Riley, W.F. *Am. Veterinary Public*, pp. 124-130.
29. FEDERER, K.E.; BURROWS, R.; BROOKSBY, J.B. Vesicular stomatitis virus. The relationship between some strains of the Indiana serotype. *Res. vet. Sci.* 8: 103-117, 1967.
30. FELLOWES, O.N.; DIMOPOULLOS, G.T. Isolation of vesicular stomatitis virus from mouse mothers after inoculation of suckling mouse litters. *J. Bact.* 73 (3): 444-445, 1957.
31. FELLOWES, O.N.; DIMOPOULLOS, G.T.; CALLIS, J.J. Isolation of vesicular stomatitis virus from an infected laboratory worker. *Am. J. vet. Res.* 16 (61): 623-626, 1955.
32. FELLOWES, O.N.; DIMOPOULLOS, G.T.; TESSLER, J.; HESS, W.R.; VARDAMAN, T.H.; CALLIS, J.J. Comparative titrations of vesicular stomatitis virus in various animal species and in tissue culture. *Am. J. vet. Res.* 17 (65): 799-802, 1956.
33. FERRIS, D.F.; HANSON, R.P.; DICKE, R.J.; ROBERTS, R.H. Experimental transmission of vesicular stomatitis virus by diptera. *J. Infect. Dis.* 96 (2): 184-192, 1955.
34. FIELDS, B.N.; HAWKINS, K. Human infection with the virus of vesicular stomatitis during an epizootic. *N.E.J. Med.* 277: 989-994, 1967.
35. FRANK, A.H.; APPLEBY, A.; SEIBOLD, H.R. Experimental intracerebral infection of horses,

- cattle and sheep with the virus of vesicular stomatitis. *Am. J. vet. Res.* 6 (18): 28-38, 1945.
36. GALINDO, P.; SRIHONGSE, S.; RODANICHE, E.; GRAYSON, M.A. An ecological survey for arboviruses in Almirante, Panama, 1959-1962. *Am. J. trop. Med.* 15: 385-400, 1962.
 37. GALETA, J.N.; HOLBROOK, A.A. Vesicular stomatitis patterns of complement-fixing and serum-neutralization antibodies in serum of convalescent cattle and horses. *Am. J. vet. Res.* 22 (89): 713-719, 1961.
 38. GLAZENER, W.C.; COOK, R.S.; TRAMER, D.O. A serological study of diseases in the Rio Grande Turkey. *J. Wildl. Manag.* 31 (1): 34-39, 1967.
 39. GRIFFITH, T.P.; HANSON, R.P.; BRANDLY, C.A. The effect of environmental temperature on susceptibility of the mouse to vesicular stomatitis virus. *Proc. 91st Ann. Meet. AVMA* 23-26: 192-198, Aug. 1954.
 40. HANSON, R.P. The natural history of vesicular stomatitis. *Bact. Rev.* 16 (3): 179-204, 1952.
 41. HANSON, R.P. Discussion of the natural history of vesicular stomatitis. *Am. J. Epidem.* 87: 264-266, 1968.
 42. HANSON, R.P.; BRANDLY, C.A. Epizootiology of vesicular stomatitis. *Am. J. Public Health* 47: 205-209, 1957.
 43. HANSON, R.P.; ESTUPIÑAN, J.; CASTAÑEDA, J. Vesicular stomatitis in the Americas. *Bull. Off. int. Epizoot.* 70: 37-47, 1968.
 44. HANSON, R.P.; KARSTAD, L. Enzootic vesicular stomatitis. *Proc. 60th Ann. Meet. U.S. Livestock San. Assoc.*: 288-292, 1956.
 45. HANSON, R.P.; KARSTAD, L. Further studies on enzootic vesicular stomatitis. *Proc. 61st Ann. Meet. USLSA*: 13-15, Nov. 1957.
 46. HANSON, R.P.; KARSTAD, L.H. Feral swine as a reservoir of vesicular stomatitis virus in Southwestern United States. *Proc. U.S. Livestock Sanit. Assn. 62nd Ann. Meet.* 309-315, 1958.
 47. HANSON, R.P.; RASMUSSEN, A.F.; BRANDLEY, C.A.; BROWN, J.W. Human infection with the virus of vesicular stomatitis. *J. Lab. & Clin. Med.* 36: 754-758, 1950.
 48. HEINY, E. Vesicular stomatitis in cattle and horses in Colorado. *No. Am. Vet.* 26: 726-730, 1945.
 49. HOLBROOK, A.A.; GELETA, J.N. Vesicular stomatitis immunization with inactivated vaccines of chicken embryo origin. *Proc. 61st Ann. Meet. USLSA*: 308-315, 1957.
 50. HOWATSON, A.F. Vesicular stomatitis and related viruses. *Advances in virus research.* Acad. Press. pp. 195-256, 1970.
 51. JENNEY, E.W. Vesicular stomatitis in the United States during the last 5 years (1963-1967). *Proc. U.S. Livestock San. Assoc. 71st Ann. Meet.*: 371-385, 1967.
 52. JENNEY, E.W.; BROWN, C.L. Surveillance for vesicular stomatitis in the United States - January, 1968 through July, 1972. *Proc. 76th Ann. Meet. U.S. Animal Health Assoc.* 1972.
 53. JENNEY, E.W.; HAYES, F.A.; BROWN, C.L. Survey for vesicular stomatitis virus neutralizing antibodies in serums of white-tailed deer *Odocoileus virginianus* of the Southeastern United States. *J. Wildl. Dis.* 6: 488-493, 1970.
 54. JENNEY, E.W.; HAYES, F.A.; BROWN, C.L. Survey for vesicular stomatitis infection in Georgia wild mammals. Dev. studies and lab. inv. conducted by VS diag. lab. FY 73. APHIS-USDA. APHIS 91-27 March 1975.
 55. JOHNSON, K.M.; TESH, R.B.; PERALTA, P.H. Epidemiology of vesicular stomatitis virus: Some new data and a hypothesis for transmission of the Indiana serotype. *JAVMA* 155 (12): 2133-2140, 1969.
 56. JOHNSON, K.M.; VOGEL, J.E.; PERALTA, P.H. Clinical and serological response to laboratory-acquired human infection by Indiana type vesicular stomatitis virus (VSV). *Am. J. trop. Med. Hyg.* 15 (2): 244-246, 1966.
 57. JONKERS, A.H. Laboratory studies with rodent viruses in Trinidad. I: Cocal virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 13 (4): 613, 1964.
 58. JONKERS, A.H. The epizootiology of the vesicular stomatitis viruses: a reappraisal. *Am. J. Epidem.* 86 (2): 286-291, 1967.
 59. JONKERS, A.H.; SHOPE, R.E.; AITKEN, T.H.G.; SPENCE, L. Cocal virus, a new agent in Trinidad related to vesicular stomatitis virus, type Indiana. *Am. J. vet. Res.* 25 (104): 236-242, 1964.
 60. JONKERS, A.H.; SPENCE, L.; AITKEN, T.H.G. Cocal virus epizootiology in the bush forest and Nariva swamp, Trinidad, W.I. Further studies. *Am. J. vet. Res.* 26 (112): 758-763, 1965.
 61. KARSTAD, L. Epizootiology of vesicular stomatitis: a discussion of the use of basic concepts in selection of methods for investigation. *Proc. 1st Int. Conf. Wildlife O.S., N.Y.* 298-309, 1962, *Vet. Bull. Weybridge* 34 (3): 905, 1964.
 62. KARSTAD, L.H.; ADAMS, E.V.; HANSON, R.P.; FERRIS, D.H. Evidence for the role of wildlife in epizootics of vesicular stomatitis. *JAVMA* 129 (3): 95-96, 1956.

63. KARSTAD, L.H.; HANSON, R.P. Vesicular stomatitis in deer. *Am. J. vet. Res.* 68 (66): 162-166, 1957.
64. KARSTAD, L.H.; HANSON, R.P. Primary isolation and comparative titrations of five field strains of vesicular stomatitis virus in chicken embryos, hogs and mice. *Am. J. vet. Res.* 19 (70): 233-236, 1958.
65. KARSTAD, L.H.; SPALATIN, J.; HANSON, R.P. Experimental infections of wild birds with the viruses of Eastern equine encephalitis, Newcastle disease and vesicular stomatitis. *J. infect. Dis.* 105: 188-195, 1959.
66. KOWALCZYK, T.; BRANDLY, C.A. Susceptibility and serological response of various species of animals to infection with the virus of vesicular stomatitis. *Am. J. vet. Res.* 15: 477-480, 1945.
67. KOWALCZYK, T.; HANSON, R.P.; BRANDLY, C.A. Infectivity and pathogenicity of vesicular stomatitis virus in ferrets. *Am. J. vet. Res.* 16: 180, 1955.
68. LAUERMAN, L.H. Vesicular stomatitis in temperate and tropical America. Thesis, Univ. Wisc. 1968.
69. LAUERMAN, L.H.; KUNS, M.L.; HANSON, R.P. Field trial of live virus vaccination procedure for prevention of vesicular stomatitis in dairy cattle. 1. Preliminary immune response. *Proc. 66th Ann. Meet. USLSA*, 1962. *Proc. 67th Ann. Meet. USLSA*: 483-490, Oct. 15-18, 1963 III. Evaluation of emergency vaccination in Georgia, 473-482, 1963.
70. LIU, I.K.M.; ZEE, Y.C. The pathogenesis of vesicular stomatitis virus, serotype Indiana, in *Aedes aegypti* mosquitoes. I. Intrathoracic injection. *Am. J. trop. Med. Hyg.* 25 (1): 177-185, 1976.
71. MASON, J.; HERRERA SALDAÑA, A.; TURNER, W.J. Vesicular stomatitis in Mexico. *Proc. 80th Ann. Meet. U.S. Animal Health Assoc.*: 234-253, 1976.
72. McCRCAN, J.E. Vesicular stomatitis infection in man. Morbidity and mortality. Rep. 5. U.S. Dept. HEW, Wash. D.C.: Cited in PATTERSON *et al.* (reference No. 3), 1956.
73. McDERMID, J.E. Vesicular stomatitis in Wisconsin. *Proc. 88th AVMA*: 67-69, 1951.
74. MEYER, N.L.; MOULTON, W.M.; JENNEY, E.W.; ROGERS, R.J. Outbreaks of vesicular stomatitis in Oklahoma and Texas. *USLSA Proc.* 64: 324-332, 1960.
75. MOHLER, J.R. Vesicular stomatitis of horses and cattle. (Revision of the USDA Bulletin No. 662 originally issued May 1918), 1940.
76. MUDD, J.A.; LEAVITT, R.W.; KINGSBURY, D.T.; HOLLAND, J.J. Natural selection of mutants of vesicular stomatitis virus by cultured cells of *Drosophila melanogaster*. *J. gen. Virol.* 20: 341-351, 1973.
77. MYERS, W.A.; HANSON, R.P. Studies on the response of rabbits and guinea pigs to inoculation with vesicular stomatitis virus. *Am. J. vet. Res.* 23 (96): 1078-1080, 1962.
78. OLITSKY, P. Physical, chemical, and biological studies on the virus of vesicular stomatitis of horses. *J. Exp. Med.* 45 (6): 969-981, 1927.
79. OLITSKY, P.; COX, H.R.; SYVERTON, J.T. Comparative studies on the viruses of vesicular stomatitis and equine encephalomyelitis. *J. Exp. Med.* 59 (2): 159-171, 1934.
80. OLITSKY, P.K.; SABIN, A.B.; COX, H.R. Acquired resistance of growing animals to certain neurotropic viruses in the absence of humoral antibodies or previous exposure to infection. *J. Exp. Med.* 64: 723-737, 1936.
81. OLITSKY, P.K.; SCHOENING, H.W.; TRAUM, J. Summary of the observations of the Commission to study foot-and-mouth disease. *North Am. Vet.* 8: 42-47, 1927.
82. OLITSKY, P.; TRAUM, J.; SCHOENING, H.W. Comparative studies on vesicular stomatitis and foot-and-mouth diseases. *J. Am. vet. Med. Assoc.* 23 (1): 147-167, 1926.
83. PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. Diagnosis of vesicular diseases in livestock. Research in Progress. Red: RD 15/1, 1976.
84. PATTERSON, W.C.; JENNEY, E.W.; HOLBROOK, A.A. Experimental infections with vesicular stomatitis in swine. I. Transmission by direct contact and feeding infected meat scraps. *Proc. USLSA*: 368-378, 1955.
85. PATTERSON, W.C.; MOTT, L.O. Vesicular stomatitis. Yearbook of Agriculture, 182-186, 1956. 1956 Yearbook Separate No. 2683.
86. PATTERSON, W.C.; MOTT, L.O.; JENNEY, E.W. A study of vesicular stomatitis in man. *J. Am. vet. Med. Assoc.* 133: 57-66, 1958.
87. PREBLE, O.T.; YOUNGER, J.S. Temperature sensitive viruses and the etiology of chronic and inapparent infections. *J. infect. Dis.* 131 (4): 467-473, 1975.
88. PRINTZ, P. Adaptation du virus de la stomatite vesiculaire a *Drosophila melanogaster*. *Ann. Inst. Pasteur* 119: 520-537, 1970.
89. SABIN, A.B.; OLITSKY, P.K. Influence of host factors on neuroinvasiveness of vesicular stomatitis virus. I. Effect of age on the invasion of the brain by virus instilled in the nose. *J. Exp. Med.* 66:

- 15-34. II. Effect of age on the invasion of the peripheral and central nervous system by virus injected into the leg muscles or the eye. *66*: 35-57. III. Effect of age and pathway of infection on the character and localization of lesions in the central nervous system. *67*: 201-227, 1937.
90. SAULMON, E.E. The epidemiology of vesicular stomatitis in the United States. *Bull. Off. int. Epizoot.* *70*: 49, 1968.
91. SCHOENING, H.W. Vesicular stomatitis in swine. *Proc. 47th Ann. Meet. USLSA*, Dec. 2-4: 85-86, 1943.
92. SCHOENING, H.W. Outbreak of vesicular stomatitis in swine and its differential diagnosis from vesicular exanthema and foot-and-mouth disease. Circular No. 734 USDA, Wash. D.C., 1945.
93. SEAY, L.E. 1960 outbreak of stomatitis and lameness of cattle in Texas, Oklahoma and Arkansas. *Proc. 65th Ann. Meet. USLSA*. Oct. 30 - Nov. 3, 1961.
94. SEIBOLD, H.R.; SHARP, J.B. A revised concept of the pathological changes of the tongue in cattle with vesicular stomatitis. *Am. J. vet. Res.* *21* (80): 35-51, 1960.
95. SHAHAN, M.S.; FRANK, A.H.; MOTT, L.O. Studies of vesicular stomatitis with special reference to a virus of swine origin. *JAVMA* *63* (826): 5-19, 1946.
96. SHELOKOV, A.; PERALTA, P.H. Vesicular stomatitis virus, Indiana type: and arbovirus infection of tropical sandflies and humans? *Am. J. Epidem.* *86* (1): 149-157, 1967.
97. SHELOKOV, A.I.; PERALTA, P.H.; GALINDO, P. Prevalence of human infection with vesicular stomatitis virus. *J. Clin. Invest.* *40*: 1081, 1961.
98. SKINNER, H.H. Infection of chickens and chick embryos with the virus of foot-and-mouth disease and vesicular stomatitis. *Nature* *174*: 1052-1053, 1954.
99. SKINNER, H.H. The virus of vesicular stomatitis in small experimental hosts. *J. Comp. Path.* *67*: 87-105, 1957.
100. SKINNER, H.H. Infection of domestic poultry with the viruses of foot-and-mouth disease and vesicular stomatitis. *Arch. ges. Virusforsch.* *9*: 92-126, 1959.
101. SLAVIN, H.B.; HALE, H.W.; BERRY, G.P. Passive protection of the central nervous system of mice against viruses that pursue the pathway of the olfactory nerves after intranasal instillation. Vesicular stomatitis and St. Louis encephalitis. *J. Immunol.* *54*: 179-188, 1946.
102. SORENSEN, D.K.; CHOW, T.L.; KWALCZYK, T.; HANSON, R.P.; BRANDLY, C.A. Persistence in cattle of serum-neutralizing antibodies of vesicular stomatitis virus. *Am. J. vet. Res.* *19* (70): 74-77, 1958.
103. SRIHONGSE, S. Vesicular stomatitis virus infections in Panamanian primates and other vertebrates. *Am. J. Epidem.* *90* (1): 69-76, 1969.
104. STROZZI, P.; RAMOS-SOCO, T. Teat vesicles as primary and almost exclusive lesions in an extensive outbreak of vesicular stomatitis (New Jersey strain) in milking cows. *JAVMA* *123* (920): 415-418, 1953.
105. SUDIA, W.D.; FIELDS, B.N.; CALISHER, C.H. The isolation of vesicular stomatitis virus (Indiana strain) and other viruses from mosquitoes in New Mexico, 1965. *Am. J. Epidem.* *86* (3): 598-602, 1967.
106. TESH, R.B.; CHANIOTIS, B.N.; JOHNSON, K.M. Vesicular stomatitis virus (Indiana serotype): trans-ovarial transmission by phlebotomine sandflies. *Science* *175* (4029): 1477-1479, 1971.
107. TESH, R.B.; CHANIOTIS, B.N.; PERALTA, P.H.; JOHNSON, K.M. Ecology of viruses isolated from Panamanian Phlebotomine sandflies. *Am. J. trop. Med. Hyg.* *23* (2): 258-269, 1974.
108. TESH, R.B.; PERALTA, P.H.; JOHNSON, K.M. Ecological studies of vesicular stomatitis virus. I. Prevalence of infection among animals and humans living in an area of endemic VSV activity. *Am. J. Epidem.* *90* (3): 255-261, 1969.
109. TESH, R.B.; PERALTA, P.H.; JOHNSON, K.M. Ecologic studies of vesicular stomatitis virus. II. Results of experimental infection in Panamanian wild animals. *Am. J. Epidem.* *91* (2): 216-224, 1970.
110. THEILER, S. Eine contagiose stomatitis des pfedes in Sud-Afrika 1901 *Deut-tierarztl. Wochschr.* *9*: 31. Cited by CALLIS *et al.* Diagnosis of vesicular disease in swine. *18th Ann. Proc. Am. Assoc. Vet. Lab. Diagnost.*, 1975.
111. TRAINER, D.O.; HANSON, R.P. Serologic evidence of arbovirus infections in wild animals. *Am. J. Epidem.* *90* (4): 354-358, 1969.
112. VADLAMUKI, S.; HANSON, R.P. The neutralization test for vesicular stomatitis virus in chicken embryos and tissue cultures. *Cornell Vet.* *53* (1): 16-23, 1963.
113. VESICULAR STOMATITIS ISOLATED FROM EYE GNATS. *Diagnostic Services Newsletter*, NALD. June, 1968.
114. WAGENER, K. Infection and immunity of vesicular stomatitis in guinea pigs. *Vet. Med.* *26* (10): 388-396, 1931.

-
115. WAGENER, K. Investigations on the pathogenicity of vesicular stomatitis virus. *Cornell Vet.* 21: 344-359, 1931.
116. YANG, Y.J.; STOLTZ, D.B.; PREVEC, L. Growth of vesicular stomatitis virus in a continuous culture line of *Antheraea euclaypti* moth cells. *J. gen. Virol.* 5: 473-483, 1969.
117. YEDLOUTSCHNIG, R.J. Complement fixation test for diagnosis of foot-and-mouth disease and vesicular stomatitis using polyvalent guinea pig antiserums. *U. S. Animal Health Assoc. Proc. 76th Ann. Meet.*: 172-182, 1972.

THE EPIDEMIOLOGY OF VESICULAR STOMATITIS

A review of some of the literature
and a proposal for further field studies

*John Mason*¹

INTRODUCTION

In a review of vesicular stomatitis (VS) published in 1968, Saulmon (90) stated that "the mechanism of infection, the method of transmission and the reservoir of the virus" for this disease are unknown. The situation is still the same today. In spite of a tremendous amount of work with the vesicular stomatitis viruses (VSV) in the laboratory, the basic features of the transmission cycle and survival of the virus in nature are still unclear.

The following is a review of some of the literature on vesicular stomatitis, particularly that dealing with pathogenesis, field studies and epidemiological analyses, which might serve as a basis for consideration of what further studies are needed, to solve the mystery of the means of transmission and the reservoir of the VSV.

Vesicular stomatitis has been recognized as a clinical entity since 1884 (110). Olitsky first described the virus of VS in 1926 (81) and Cotton (16, 17, 18) identified the two main virus serotypes, the New Jersey (NJ) and the Indiana (Ind.), as causes of the disease in 1926 and 1927. Since that time many outbreaks of vesicular stomatitis have been identified and described, particularly in the United States, and to a lesser degree in Mexico, and in Central and South America (1, 2, 8, 40, 43, 48, 51, 52, 71, 74, 92, 93, 104).

CLINICAL CHARACTERISTICS

Vesicular stomatitis (VS) is a viral disease which causes vesicular mouth, foot, and teat lesions in cattle, horses and swine, and less frequently, an influenza-like illness in man. Vesicular stomatitis

¹Mexican-United States Commission for the Prevention of Foot-and-Mouth Disease. P.O. Box M-10078, Mexico, D.F. Mexico.

is grouped with the "vesicular diseases" of livestock, which include foot-and-mouth disease, vesicular exanthema of swine and swine vesicular disease. In addition to being a cause of economic loss in beef and dairy herds, the disease is of paramount importance to animal health authorities because of the clinical similarity of the lesions with those produced by foot-and-mouth disease. The clinical appearance of the disease is well described in standard texts (22, 23, 28).

In cattle with VS the mortality is practically nil and sequela are few. The vesicular mouth lesions heal quickly but a loss of weight and a temporary drop in milk production is seen in most animals affected. Mastitis is sometimes seen as a complication (40). In swine, foot lesions are frequent and lameness is often the first sign observed. U.S. outbreaks caused by the NJ virus with high mortality rates in affected pigs have been observed to occur in Central America (W.J. Turner, personal communication, 1975). Clinical cases in sheep and goats are rare and possibly these animals are not susceptible to natural VS infection (40), although cases in sheep have been reported in Colombia (12). The pathological changes produced by VS in cattle and swine also have been described by Seibold and Sharp (94) and Chow and McNutt (21) respectively.

VIRAL AGENTS

The virus etiology of VS was established by Cotton in 1926 and in the following year he demonstrated that there were two antigenically distinct types of the virus (named after the states where they were first isolated, as NJ and Ind.). In addition to the original Ind. isolate now known as Indiana 1, two additional subtypes have been isolated in recent years, Cocal or Indiana 2, and

Alagoas or Indiana 3 (29). The vesicular stomatitis virus is now classified as a member of the Rhabdovirus group (50). It is an RNA - containing virus, shaped like a bullet, cylindrical, with one end rounded and the other end flat. The dimensions of this virus are approximately 173 $m\mu$ long and 72 $m\mu$ wide (70). The virus is not thought to be able to survive for very long outside a vertebrate or invertebrate host (42).

DIFFERENCES BETWEEN THE NEW JERSEY AND INDIANA VS SEROTYPES

Although the NJ and Ind. types of VSV are morphologically similar, they are serologically and immunologically distinct, and appear to have different ecological requirements. There are also some clinical differences between the two major types of VS. The NJ type generally produces more severe clinical changes and may have a shorter incubation period. Foot lesions have been seen only among cattle affected with NJ type virus (40, 71). Ind. VSV seems to cause more outbreaks in cattle in which only teat lesions are seen (71).

Most outbreaks have been caused by the NJ virus serotype (71). The Ind. type virus has been isolated from only four epizootics in the United States namely 1925, 1942, 1956 and 1964 (90, 96). NJ VSV has a single serotype, ranges farthest into the temperate areas of North America and appears to be restricted to vertebrate hosts (43). Ind. VSV has been found in arthropods as well as vertebrates and has at least three serotypes, two of which appear to be limited to South America (Indiana 2 and 3).

The Indiana 2 strain, named "Cocal" virus by Jonkers and co-workers (59) was recovered from mites collected from rice rats trapped in Bush Bush Forest, Trinidad, and also near Belém, Pará, Brazil. In neither case was this virus associated with clinical stomatitis, although strain specific antibodies were found in horses in Trinidad (29).

In July 1964 an outbreak of vesicular disease in mules was discovered on a sugar plantation in the state of Alagoas, Brazil. It was then found that similar outbreaks had occurred during the previous two months elsewhere in that state and in the neighboring state of Pernambuco. Mules and

horses were affected most frequently, but cases occurred also in cattle and strain-specific antibodies were found in the serum of plantation workers who had complained of fever, headaches and malaise at the time the first outbreak in mules was investigated. This strain was found to be different serologically from both Indiana 1 and the Indiana 2 type found in Trinidad and Argentina and has been designated Indiana 3 (Alagoas) (29, 83).

New Jersey and Indiana 1 VSV are rarely found together in the same herd at the same time, or even in the same area. However, in some recent outbreaks in Mexico, both viruses have been found on the same ranch, in the same animal, and even in the same tissue sample (71).

EPIDEMIOLOGICAL FEATURES OF VESICULAR STOMATITIS

The main epidemiological features of the disease are well known (8, 40, 41, 42, 44, 45, 58, 74, 90). In the United States, vesicular stomatitis outbreaks start suddenly during warm weather and particularly during the rainy season. The outbreaks may appear almost simultaneously over a fairly large area, on widely separated premises. The affected farms or ranches are irregularly distributed and the disease seems to skip across the countryside. Often no cases are observed on premises adjacent to those affected.

The incidence of disease can vary widely among affected herds. Usually about 10-15% of the animals show clinical signs of the disease (71, 74), although herds have been seen with a 100% attack rate. Mouth lesions are produced almost exclusively in some outbreaks, while in others teat lesions predominate (27, 104). Clinical cases are mainly seen in adult animals, and cattle and horses under one year of age are rarely affected (8, 71, 85). However, vesicular stomatitis has been reported in suckling pigs (85).

In the United States outbreaks subside in the fall or after a period of cold, dry weather, and stop abruptly after the first killing frost. For many years, cases in cattle, horses, and pigs were seen every year in the coastal plain area of the Southeastern United States and this area is considered enzootic for VS. In other areas, particularly the

Appalachians, in the Upper Mississippi Valley and the Rocky Mountains, outbreaks in cattle and horses are seen periodically, possibly on a cyclical basis, with intervals of two to ten years or more, and in these instances the disease is considered epizootic.

In Mexico the enzootic area is found on the coastal plain around Veracruz and across the low-lying portions of the Isthmus of Tehuantepec, while scattered sporadic outbreaks are more likely to occur at higher altitudes further inland (71). However, there are many areas in the United States and Mexico where the disease has never been reported. In South America VS has not been reported in Bolivia, Chile, Guyana, Paraguay, or Uruguay (3).

On some premises cattle only are affected, on others only horses, although cattle and horses may be in contact in both situations. Swine on the same premises with affected cattle and horses usually remain unaffected. In some cases only the swine may be affected, while cattle and horses in contact show no clinical signs.

In the United States the enzootic areas for VS seem to be characterized by flat, mucky swamp land crisscrossed by sluggish streams. The growing season is long, the vegetation is lush and the moisture is high. Epizootic areas are associated with natural waterways, brush and trees, and pastures that have been wet several weeks previously. Disease outbreaks that occur in the hilly, pine and brush country in late summer frequently may appear first in the irrigated or flooded bottom lands (90).

In Mexico the area enzootic for VS is characterized primarily by a tropical rainy climate with no cool season, and with either no dry season or with a short dry season with high total rainfall. The area has a mean annual temperature of 25° C, is humid or even perhumid, and from June to November, the months of highest VS incidence, usually has a water surplus. Vesicular stomatitis is seen only sporadically in the arid and semiarid regions of Mexico or in the mountainous areas in the interior where the mean annual temperature is between 15-20° C (6, 71).

Vesicular stomatitis can be considered enzootic in warm climates in certain areas where it reap-

pears annually and where a considerable portion of the susceptible animal population possesses antibodies. The disease is epizootic in colder climates where it appears irregularly and where the susceptible animals usually are free of antibodies. Infections of wildlife, man and swine are characteristic of areas in which the disease is enzootic. In the epizootic areas, the infection is recognized primarily as a clinical disease of horses and cattle.

A number of studies have indicated that VSV infection rates are higher in enzootic areas than epizootic areas. In the southeastern U.S. coastal plain 50% of the cattle tested were positive for VS serumneutralizing (SN) antibodies, while just outside this area only 10% were positive (45, 68). Similarly, in epizootic areas, antibodies were found only in animals of the age group that went through the previous epizootic. In Panama, Shelokov found no evidence of Indiana VSV antibodies in humans in urban areas, but up to 35% positivity in forested areas (96, 97). On the other hand, in outbreaks of VS in epizootic areas, the ratio of clinical cases to inapparent infections is higher than in enzootic areas, presumably because fewer animals have a preexisting immunity.

PATHOGENESIS AND TRANSMISSION OF VESICULAR STOMATITIS

In studies on the pathogenesis of vesicular stomatitis, VS viruses were found incapable of penetrating the intact skin (8). However, typical lesions in cattle were readily produced by inoculation or by rubbing of virus into abrasions on the gums or tongue, and on the skin of the coronary band or teats. Injection at other sites usually resulted in an inapparent, immunizing infection. Rubbing virus on the intact mucosa or the introduction of virus in the feed or water did not result in infection (43).

The incubation period after experimental incubation of the VSV is 2-5 days.

In VS in cattle the lesions appear at the site of inoculation but are very rarely followed by secondary vesicles. The disease remains localized and there is no generalization, as evidence by the formation of vesicles at other sites, except in very occasional cases.

Swine react differently to VS than cattle and the pathogenesis in these animals may be of a different type. Vesicular stomatitis can be spread by contact in swine, and in a large outbreak in a hog cholera serum production plant in 1943, the majority of cases were thought to have been infected in this way (92). When inoculated intravenously in swine, VSV will produce lesions on the feet and on the snout. In enzootic areas in the United States swine become infected with VS earlier in the season, while in epizootic areas cases in swine are rarely seen (46). This is difficult to explain in view of the high susceptibility of this species to infection by the various routes (92). Furthermore, the quantity of virus necessary to produce an infection in swine is not greater than that required in cattle (40).

Although virus-laden meat scraps can cause VS lesions in swine with scarified snouts, the disease is not thought to be related to garbage feeding, and infection by ingestion does not seem to be a very likely means of transmission (84).

The difficulty in reproducing the clinical disease in cattle by any other means than local inoculation has led to the impression that the primary infection must also take place in this manner. Actually, most susceptible animals can be infected by the nasopharyngeal route. In one study an aerosol of vesicular stomatitis virus did not induce mouth lesions in a cow which was exposed to it but this animal developed neutralizing antibodies and was refractive to injection. Vesicular stomatitis with typical lesions of the mouth, salivation and pyrexia was induced only by intracutaneous inoculation of the tongue and gums or by rubbing virus over an abraded mucous surface (40).

Although most reviews of VS state that infection through contact is difficult to achieve, there is considerable experimental evidence that it does occur. Cotton (16, 17, 18) observed this type of spread but only early in the disease. Patterson *et al.* (84) found that saliva collected from infected pigs prior to development of vesicles contained active virus. However, isolation of VSV from the nasopharynx is rarely reported even though VS virus can be easily spread by this route using aerosols (86). Tesh *et al.* isolated VSV-Indiana from throat specimens in 7 of 8 experimentally infected

marmosets but they were not successful with other species of wild animals (109). Vesicular stomatitis virus-New Jersey type has been isolated from mouse mothers after inoculation of suckling mouse litters (30) and transmission of VS among monkeys and other arboreal vertebrates by direct contact is thought to be possible (103).

With infections in laboratory workers the virus is spread from affected animals by their excessive salivation, or by actual contact with virus-laden tissues when animals are examined or treated (86). It is difficult to isolate virus from humans with VS (86), although Fellowes *et al.* (31) isolated virus from the blood of an infected lab worker at the Plum Island Laboratory. Nasopharyngeal washings collected at the same time were negative. Surprisingly enough, no evidence of spread from man to man has been seen, although this would be expected (86). In several instances families of infected lab workers have been tested for complement fixing (CF) or SN antibodies with negative results (86).

It has been suggested that infection in humans or even animals may take place via the conjunctiva, since irritation of the eye preceded general symptoms in a number of human cases of VS (86).

A wide variety of mammals can be infected with VSV. Mature guinea pigs inoculated with VSV in the foot-pad epithelium develop vesicles there in 48 hours. Mature mice inoculated intracerebrally become paralytic in 3 days and die by the fifth day (19, 20). Suckling mice develop a fatal infection irrespective of the route by which the virus is introduced (80, 99).

In experimental infections in Panamanian wild animals, Tesh and his coworkers (109) found that mammals were highly susceptible to VSV infection (all but two of 38 species tested had neutralizing antibodies by the twelfth day after inoculation). The susceptibility of the different species to VSV depended mainly on age. With one exception, adult mammals remained asymptomatic following subcutaneous inoculation of VSV, but VSV-Ind. and VSV-NJ caused death in a variety of suckling mammals within 2-4 days after subcutaneous inoculation. Central nervous system signs were seen in many of the dying animals, but vesicular lesions were not seen.

Sabin and Olitsky (80, 89) carried out some classical experiments on the pathogenesis of VS in mice, to determine why older mice were more resistant than young mice to VSV. Although injection of VSV directly into the brain was fatal for both young or old mice, they found that when the virus was given intranasally only young mice (3 weeks) succumbed, while older mice (1 year) were found to be resistant.

No evidence of a generalized systemic or blood infection could be found in either old or young mice after the nasal instillation of VSV. No virus could be demonstrated in the nasal mucosa one hour after instillation, but two days later it was abundant in both the nasal mucosa and the anterior rhinoencephalon. On the fourth day the virus was present in large amounts in the brain and nasal mucosa of the young mice and they showed definite clinical signs of central nervous system (CNS) involvement. The older mice showed no signs of disease after nasal instillation, even though virus was present between the second and fifth day in the anterior rhinoencephalon. The experiments showed that in young mice the rest of the brain is invaded, with subsequent death of these animals in five days with encephalomyelitis, while in the old mice the progression of the virus is arrested somewhere in the anterior rhinoencephalon. While the VSV reached the brain of the young mice by way of the first cranial nerve, a preexisting localized barrier in the anterior rhinoencephalon, which develops with age, prevented the virus from reaching the brain of the old mice.

A similar phenomenon has been observed when young and adult mice were exposed by the intramuscular and intraocular inoculation routes.

Why are old mice generally resistant to all forms of peripheral inoculation of VSV when intracerebral injection is equally fatal for mice of all ages? Evidently, VSV injected intracerebrally spreads primarily in an "open" system in continuity with the ventricles, while after peripheral inoculation the virus progresses in a closed system of neurons in young mice, but is unable to do so in old mice because of localized barriers at the site of inoculation.

Why are young mice more susceptible to VSV than old mice and why does the reverse seem to be

true for cattle? Clinical cases are seen in adult cattle, while calves under one year are rarely seen with lesions. According to antibody surveys, as soon as the protection provided by maternal antibodies wanes, young cattle are as susceptible to infection with VSV as older cattle. Why, then, are fewer lesion cases found in younger animals? Does tissue injury (abrasions, inoculations) in the presence of VSV produce some effect in older animal that is not seen in younger animals? Would this explain the apparent spread of VS in dairy herds along milking lines? (18).

ANTIBODY PRODUCTION AND IMMUNITY TO VESICULAR STOMATITIS

In cattle and horses experimentally infected with NJ and Ind. VSV, complement fixing antibody titers appear 6-8 days after inoculation and reach a peak in 9-16 days (37). Thereafter they gradually decline and disappear in 50-110 days. Serum neutralization titers can be demonstrated in 6-8 days post-inoculation and increase to relatively high levels within 4-5 weeks. The titers of neutralizing antibodies remain high but fluctuate over a long period of time. In some instances, VS SN antibodies persisted up to 8 years in cattle (102).

Sorensen and his co-workers (102) suggested that the fluctuating SN antibody titers could be explained by the persistence of the VSV in the animal host, and that the rise and fall in titer could be due to a periodic "contained escape" and subsequent retreat of the virus to its chronic foci. However, it is interesting to note that within 30-60 days after recovery from VS, many animals can be reinfected experimentally with the same strain of virus, with clinical stomatitis resulting. These animals may even possess significant titers of antibody at the time of reinfection. The existing titers rise rapidly after challenge.

In studies in Georgia, Hanson and his group found that 70% of the cattle of milking age, 35% of the heifers and 70% of the young calves less than three months of age possessed antibodies neutralizing VSV (42, 44). The serum antibodies in calves were undoubtedly a reflection of their transfer with colostrum. In hamsters, maternal antibodies persist in the offspring for 2-3 months

(109). In Georgia, 71% of suckling pigs tested were positive for VS antibodies.

The severity of the disease varies in cattle in the enzootic areas, most infections being silent and unrecognized. Mild infections can be induced experimentally by exposure of cattle to the virus by nebulization. The virus multiplies and antibodies are induced but signs of disease are absent. Serological studies show that this can occur naturally. In one herd in Wisconsin all the cattle had VS antibodies one month after the appearance of the disease but only 50% had been clinically affected (8, 40).

VACCINATION AGAINST VESICULAR STOMATITIS

The inoculation of live VSV intramuscularly in cattle does not cause lesions, but will result in the production of neutralizing antibodies in most cases. This observation has led to the experimental use of live VSV intramuscularly as a vaccination procedure for cattle in Panama (69), Georgia (69), Guatemala (15) and Peru (104). However, the vaccine is not in general use at the present time.

Live VS NJ virus vaccine, administered intramuscularly during an epizootic markedly reduced the number of clinical cases of VS in lactating dairy cattle. The period during which VS was present in affected herds was markedly shortened following vaccination. While absolute protection of the vaccinated animals against intralingual challenge was not achieved, a significant degree of protection was stimulated in cattle by the vaccination. Ninety percent of the vaccinated animals developed VSV NJ antibodies. Although VS was active in the area, none of the vaccinated cattle developed clinical VS, while 26% of the cattle in neighboring non-vaccinated herds did develop vesicular lesions.

During a VS vaccine field trial it was observed that the clinical disease appeared infrequently in herds that had 50% or more of the cattle vaccinated. In herds vaccinated during the early stages of an epizootic no active cases of clinical VS were seen seven days after vaccination. The vaccine virus did not spread from animal to animal by milking or by saliva. Fifty percent of the cattle still had VS SN antibodies one year after a single in-

jection of vaccine. Only 5% showed no demonstrable rise in antibodies after a second vaccination. In cattle which already had VS antibodies, 76% showed an increase in titer after the first vaccination. It was found that 60% of the animals had VS antibodies before vaccination. In herds with actual history of VS, this figure rose to 82%. Even on farms with no history of clinical cases of VS, 24% of the cattle had VS antibodies.

VESICULAR STOMATITIS IN WILD ANIMAL POPULATIONS

Many serological surveys for VS have been carried out in wild animal populations, in a search for possible reservoirs for VSV (45, 46, 53, 54, 57, 59, 60, 62, 63, 103, 108, 109).

Serological surveys in Southeastern U.S. revealed antibodies in white-tailed deer (63), raccoons (44), bobcats (62) and wild pigs (46). Forty-eight percent of the raccoons, 60% of the deer, 83% of the feral swine and 33% of the bobcats surveyed possessed neutralizing antibodies for VSV. In surveys in the same area Karstad found that certain species of shore and wading birds also had antibodies for VSV. However, several laboratory studies have failed to demonstrate that birds may play any role in the natural history of VS.

Jenney *et al.* also found evidence of VSV infection in deer, raccoons, opossums and squirrels (53, 54). Trainer and Hanson (111) found 8% of deer sera from Texas positive for VSV antibodies, and forty-three percent of 122 wild Rio Grande turkeys trapped at a wildlife refuge in South Texas during 1964-65 had antibodies for NJ VSV, although no clinical disease was reported in livestock (38).

It was thought unlikely that deer were reservoir hosts of VS since the experimental disease was short-lived and was quickly followed by high levels of virus neutralizing antibodies (63). Raccoons were highly susceptible but the infections were clinically inapparent, and excretion of the virus and latent infection were not detected.

Jonkers found evidence of Cocal virus infection (Indiana 2-VSV) of rodents in the Bush Bush forest in Trinidad during the rainy seasons of 1961 and 1962. The 1961 epizootic was explosive in

character and involved about 65% of the forest floor rodent population (57, 59, 60).

Tesh and his coworkers (107, 108, 109) studied the prevalence of VSV neutralizing antibodies in various Panamanian human and animal populations. Among wild animals VSV-Indiana antibodies were found mainly in arboreal and semi-arboreal species. Infection rates for VSV-NJ in feral animals were highest in bats, carnivora and certain rodents.

A large scale survey for antibodies to VSV-Ind. in monkeys and other wild vertebrates was performed in different parts of Panama. Approximately 75% of 267 monkeys in Darien Province were positive for neutralization tests whereas only 19% positive results were obtained from 383 monkeys collected near Panama City (103).

Wild vertebrates other than monkeys showed a much higher antibody rate in arboreal mammals than in ground-living animals. Two-toed sloths and tropical porcupines were among the arboreal mammals showing high VSV-Ind. rates, and sentinel monkeys exposed in the area showed increases in VSV-Ind. antibody titers (103).

The complete list of wild vertebrates found with VS antibodies in Panama includes a large variety of *terrestrial species*, like spiny rat, pocket mouse, rice rat, cotton rat, domestic rat, rabbit, 9-banded armadillo and water opossum; *vertebrates mainly arboreal* including five species of chiroptera: leaf-nosed, fruit, long-tongued, round-eared and big-eared bats; various arboreal vertebrates as kinkajou, olingo, 2-toed sloth, 3-toed sloth, pygmy anteater, porcupine, squirrel, climbing rat, night monkey, marmoset, spider monkey, white-faced monkey and howler monkey; and *semiarboreal vertebrates* like anteater, opossum (common, 4-eyed, masked) water opossum and raccoon (108). These animals are found in a wide range of habitats and ecological situations, most with no regular contact with domestic animals or man. Obviously, besides the cycle of infection in domestic livestock, the VS virus somehow was maintaining itself independently in forest areas.

VESICULAR STOMATITIS IN HUMANS

Vesicular stomatitis appears to possess appre-

ciable pathogenicity for man, infection commonly occurring as a laboratory-acquired disease and among rural populations in areas where the disease exists in livestock and wild animals hosts (9, 31, 34, 56, 97, 108).

There have been human cases in laboratory workers and in animal handlers at research stations where VS investigations were being carried out. Before additional safety precautions were included, 95% of the laboratory workers, 100% of the regular animal handlers and 70% of the trainees involved with VS projects at the Beltsville ARS laboratories during a 7-year period showed positive antibody titer for VSV, 15% to the Ind. type alone - 40% to the NJ type alone - and 40% to both serotypes (86). Of 54 cases of VS in man, diagnosed by serological tests at Beltsville, 31 (57%) reported clinical symptoms. Since using plastic face shields to protect the eyes and disposable air filters over the nose during inoculation and observation of infected animals, cases rarely occur among the workers.

The illness in humans is usually influenza-like, occasionally severe and sometimes associated with oral and pharyngeal vesicles. Many of the early cases resulted from getting virus suspension into the eyes while grinding with mortar and pestle, while examining infected animals, and while collecting vesicular material. Presumably the other cases resulted from inhalation, ingestion or inoculation of virulent virus during laboratory or veterinary manipulations, and there was no special reason to implicate biting anthropod vectors.

In 1956, antibodies to VS were found in blood samples collected from 18 persons living on farms in Southeastern Georgia where VS had been diagnosed among livestock (72). Approximately half of the persons tested had significant antibody titers to VS (42). Later, Hanson and Karstad (44) demonstrated neutralizing antibodies in 25% of sera from 200 unselected febrile patients in the enzootic VS area of rural Georgia. Some of the people exposed to sick cattle during an epizootic in New Mexico and Colorado developed febrile illnesses followed by rises in VSV Indiana 1 antibody titers (34). In a study of the clinical cases, it was found that naturally acquired VS infections was similar to those acquired accidentally in the

laboratory.

Studies in Panama showed that domestic animals and humans there had high antibody rates to both Ind. and NJ VSV (108). The antibody prevalence in humans increased with age, suggesting a direct relation between VSV infection rates and length of residence in the endemic area. Geographic and species differences in antibody rates between VSV-Ind. and VSV-NJ implied that the two virus serotypes may have different cycles in nature. Available evidence suggested that VSV-Ind. might be arthropod-transmitted, but the mode of VSV-NJ transmission could not be determined.

An outbreak of VS-NJ type was studied in a dairy herd in Western Panama in 1960-1961 (9). In a survey of humans in the area, the presence of neutralizing antibodies to this virus was considerably higher (34-71%) among people with a history of having worked with cattle than among those who had not (7-15%). The possible mode of spread to humans was considered to be by contact with infected animals or by arthropods. While both types of spread may have occurred, direct contact appeared to be more important.

Utilizing human serum samples randomly collected throughout Central America for a comprehensive survey of various communicable diseases, Johnson and his coworkers reported the astonishing finding that about one-half of the adults in Central America had antibodies to NJ or Ind. VSV. In surveys carried out in some 200 villages throughout Central America, 48% of the persons tested had antibodies for NJ VSV and 18% for Ind. VSV. Evidence of infection with NJ VSV was found in nearly every locality surveyed. Ind. VSV was not quite as prevalent, but had a similar geographic distribution (55).

THE ROLE OF ARTHROPODS IN THE TRANSMISSION OF VESICULAR STOMATITIS

Because cases and outbreaks of VS occur mainly in the warm, rainy months, and in view of the rapid occurrence of cases over a wide area, and the association of the disease with wooded premises and natural waterways, it is commonly believed that VS is an arthropod-borne disease. This is

further supported by the isolation of the Ind. type of VSV from *Phlebotomus* sandflies in Panama (96, 107) in areas where the disease is enzootic, and from *Aedes* mosquitoes in New Mexico on the same premises where clinical cases in cattle were seen (105). Cocal VS virus (Indiana 2) has been isolated from mites on rice rats in Trinidad and from *Culex* mosquitoes in Trinidad and in Brazil (57, 59, 60). New Jersey VSV was isolated on one occasion from non-blood sucking eye gnats (*Hippelates pusio*) trapped on a premise in Colorado where clinical VS in cattle was seen (51, 113).

In addition, Ind. VSV multiplication, with subsequent transmission to mice, was seen in *Aedes aegypti* mosquitoes (7, 77). A similar finding was made with Cocal virus, also in mosquitoes (*Culex pipiens quinquefasciatus* and *Trichoprosopon digitatum*) (59). Furthermore, VSV has been propagated *in vitro* in *Antheraea eucalypti* moth cells (116) and in continuous cell lines of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquito tissues (4, 5), and in cells of the fruit fly, *Drosophila melanogaster* (76, 88).

Donaldson (24) described bat infections in laboratory conditions with the Cocal virus and its transmission to suckling mice through *Aedes aegypti* (L) mosquitoes feeding on viremic bats. In bats maintained at 22° C viremia was detected during 10 days while in hibernating bats the viremic period reached 16 days. It was concluded that in VS endemic regions, the possibility of a blood sucking arthropods-bats-arthropods cycle must be considered (25).

Even though the NJ type of VSV is even more enzootic in Panama than the Indiana type NJ VSV has never been isolated from arthropods there, while Ind. VSV has been isolated repeatedly from *Phlebotomus* sandflies. Since leishmaniasis is also transmitted by *Phlebotomus* and is found in much the same area, it has been suggested that this disease and Ind. VS may have similar ecological requirements (108).

The significance of a single isolation of NJ VSV from *Hippelates pusio* is uncertain since these eye gnats feed on mucus and are not blood sucking insects. There is a possibility that this insect plays a role in mechanical transmission rather than

developing a carrier state in which the virus multiplies in its tissues (51, 54). The same may apply to *Phlebotomus* sandflies, a group of insects that sometimes feed on wounds and body secretions. Could virus obtained from lesions on the muzzle and teats of infected cattle be introduced by these flies into wounds or abrasions on uninfected cattle caused by plant spines or stubble?

Mechanical transmission of NJ VSV by various species of biting diptera was shown to be experimentally possible in 1955 (33). Ferris, *et al.* found that a number of species of mosquitoes and tabanids were capable of picking up the virus and transmitting it for short periods to laboratory hosts. Since the insects did not remain infective for more than three days, and since there was no intrinsic incubation and little host specificity it appears that the transmission was mechanical and not biological. It was observed that insects, feeding on areas of an animal's body that do not show clinical signs of the disease, are able to transmit VSV to the animal without causing overt signs and cause a serological response to the virus.

In spite of the accumulating evidence for the transmission of VSV by arthropods, some investigators have raised considerable question about their role as vectors. Repeated failures to isolate VS virus from a wide variety of biting flies and mosquitoes in enzootic and epizootic areas has caused doubt about the hypothesis of biting insects as the major vectors of VS (90). The simultaneous appearance of the disease in an entire herd or many herds, if attributed to the work of a vector, would require access to an infective reservoir of a very large size. Such a reservoir has not yet been found.

In Panama, VSV-Ind. activity was detected in an area during a period when it was not detected in *Phlebotomus* sandflies. If sandflies are indeed the sole vector of VSV-Ind., one would have expected a much higher virus isolation rate from these insects than was actually observed (107). In Trinidad, failure to isolate Cocal virus more frequently from mosquitoes and sentinel mice suggested that mosquitoes probably were not the principal agents responsible for virus transfer during epizootic periods. Also, the single isolation from *Gigantolaelaps* mites in Trinidad was not

adequate to confirm these arthropods as a principal vector (57). Collectively, these observations imply that there may be other undetected sources of the virus in nature. Although Tesh and his coworkers (106) demonstrated transovarial transmission of VSV-Ind. in *Phlebotomus* sandflies, which could possibly explain how the virus is maintained in nature without vertebrate hosts, the transovarial transmission rates they found (20-30%) were not thought to be high enough to sustain the virus for long in the insect population in the absence of one or more of the following: 1) selective survival of infected sandflies, 2) virus transmission to many females during insemination by infected males, 3) or existence of another virus source that occasionally replenishes the transovarial cycle.

Jonkers reported that the 1961 Cocal virus epizootic in small rodents in Trinidad bore considerable resemblance to epizootics in livestock caused by the VSV. The sudden appearance of infection in a large proportion of the susceptible population some time after heavy rains in a wooded environment, the failure to incriminate flying biting arthropods, the absence of viremia in naturally infected animals, and finally the affinity of the agents involved for the skin, all suggested that the epizootiology of this group of agents was basically similar (60):

Jonkers (58) has raised a number of objections to the hypothesis that VS is arthropod-borne in a paper published in 1967:

1 - if the typical lesions in cattle and horses are produced only at the sites of abrasions and cuts on the skin and mucosa of the mouth, for example, it is difficult to imagine the biting habits of a vector that would account for this;

2 - if an arthropod vector is responsible, why are animals in certain widely separated pastures affected while those in adjacent pastures are not?;

3 - the sudden appearance of clinical cases in a large proportion of the herd, sometimes on the same day (48), would require a large number of infective vectors and presumably an extensive epizootic in wildlife. If the disease were spread by vectors a more gradual spill-over of the epizootic in wildlife into livestock would appear more probable;

4 - swine often are not affected during epizootics even when in contact with cattle and horses (40, 74). This is difficult to reconcile with a vector-borne disease unless a vector were postulated that bites cattle and horses, but does not bite swine;

5 - similarly, the paucity of cases in stabled cattle or horses is difficult to explain if the disease is vector-borne, since blood-sucking vectors are commonly found in stables;

6 - the density of the livestock population in an area does not appear to be an important factor in the spread of VS (8, 41). This is also not consistent with a vector-borne disease;

7 - if the lesions are caused by the actual introduction of the virus by the vector at the site of the lesions, why are only mouth lesions found in some herds and only teat lesions in others?;

8 - virus isolation attempts with arthropods caught during VS outbreaks in the United States have, with one exception (105), so far been unsuccessful (62). In fact, even where virus isolations were made from possible vectors, as in Trinidad when Cocal virus was found in mites and mosquitoes, in relation to an epizootic in field rodents, neither the mosquitoes nor mites were thought very likely to be responsible for the extensive dissemination of the virus (60). In Panama, it was suggested that the rate of virus isolation from sandflies was too low to explain the high level of VSV-Ind. infection in the animal and human populations (107);

9 - one of the main difficulties in supporting the claim that VS is an arthropod-borne disease is that in experimental studies the viremia produced in cattle, horses and rodents was found to be of low titer and short-lasting (42, 67). In Trinidad, Cocal virus epizootics in rodents were not accompanied by sufficient viremia to infect blood-sucking insects with any regularity (57). So far, an animal host which demonstrates a long-lasting viremia of high enough titer to regularly infect a blood sucking vector has not been found for VS.

There are some experimental findings which may explain this anomaly. Virus clearance studies (10) have demonstrated that the VS virus particles are effectively removed from the blood by the

phagocyte cells of the RE system. In man, Ind. VSV is differentially taken up by and multiplies in monocytes, thought to represent the circulating form of the fixed tissue macrophage. Since these cells seem to be important as processors of antigenic information necessary to initiate an immune response, antibody formation following infection is swift and unaccompanied by a period of significant viremia. This pattern has been found following experimental infection of cattle, horses and a variety of small mammals (26, 55).

VESICULAR STOMATITIS VIRUS AS A PLANT VIRUS

In many VS outbreaks lesions are seen predominantly at a single body site, such as in the mouth or on the teats. This observation combined with the fact that the VS virus does not pass through the unbroken skin, has suggested the possibility that nonspecific lesions are necessary for virus entrance, as for example scratches from brambles and briars on the mouth or teats. From this, Jonkers (58) has formulated a hypothesis which suggests that the VS virus already is present in the pasture itself before the appearance of the first cases, and is brought into contact with livestock either by the eating of virus-infected material (the result being specific mouth lesions if virus introduction in the mucosa is effected) or by lying down in or walking through an area in which infective virus is present (with the production of teat or foot lesions).

Jonkers claimed that considering the pasture as the epizootiological unit would explain the spotty distribution of outbreaks (only some pasture are affected), the absence of spread from premise to premise, and the paucity of cases in stabled animals (in cases in dry-lot cattle fed fresh-cut fodder, the virus would supposedly be brought in with the feed). This hypothesis would also explain the absence of spread by contact alone, the simultaneous occurrence over a wide area, the higher incidence during the rainy season (related in some way to growth or availability of some agent in the pasture), and the lower incidence in swine.

Along these lines, McDerimid suggested in 1951 that VS virus grows on certain lands as a saprophyte and that infection may be transmitted to livestock via hard stubble (73). Johnson and his coworkers (55) have gone further to propose that the VS virus is basically a plant virus (this is suggested by the morphological similarity of the VS virus with certain bullet-shaped rhabdoviruses which infect plants) and that it is transmitted to vertebrates by *Phlebotomus* sandflies, which are known to suck plant juices, or by some nonbiting insects, such as aphids (known to transmit certain plant viruses) which might pass the virus to certain domestic animals by being ingested with plant meals. They further proposed that in its plant form the virus has a double coat on the virus particle which renders it noninfectious for vertebrates. The virus would be converted to a new singlecoated form by passage through insects, and this form would be infectious for vertebrates.

In spite of the speculation about VSV being a plant virus, no isolations of this virus has been made yet from plants or plant insects such as aphids.

AN ALTERNATIVE MECHANISM OF TRANSMISSION

Although the hypothesis that VSV is a plant virus is somewhat more consistent with field observations than the suggestion that the disease is arthropod-borne, a number of questions still remain. In addition to affecting cattle, horses and swine, VS is widely distributed in the wild animal population in certain areas, and it would be difficult to account for infections in these animals, especially the arboreal and semi-arboreal species, through contact with the virus in pastures. The same question would arise about the source of outbreaks in stabled swine herds not fed fresh-cut fodder. It would be even more difficult to explain the widespread infection of humans if contact with the virus in pastures were required.

One source of confusion may be that epizootics of VS in cattle and horses make their dramatic appearance with the sudden, practically simultaneous onset of hundreds of clinical cases of vesicular disease, dispersed over a wide area. Since the mouth,

teat or foot lesions are difficult to produce experimentally except by inoculation of the epithelium or contact of the scarified mucosa with the VS virus, it is assumed that the same process takes place in nature, and that the most logical site for the infection to take place is the pasture.

Actually, cases of VS with lesions are a small minority of the total infections. On the basis of serological surveys of domestic and wild animals and humans, the great majority of the infections appear to be inapparent and asymptomatic. If these infections cannot be explained simply by contact with the virus in forage, for example, or by spread from insect vectors, for the reasons discussed above, what other mechanisms of transmission might be considered? One other explanation is that transmission takes place by direct contact, most likely by the nasopharyngeal route.

According to this hypothesis, the main mechanism of transmission for VS would be by respiratory spread through normal contact, with the great majority of the infections being inapparent, and with persistence of the virus in the animal host for long periods of time, possibly in a masked form. The appearance of the typical vesicular lesions in the infected animal might then occur in some manner analogous to what occurs in humans with long-term herpes simplex infections, where herpetic eruptions appear when local resistance is reduced by various nonspecific factors.

Although this could explain what might happen in individual cases, some further hypothesis is required to show how large numbers of clinical cases occur simultaneously over a wide area. The most reasonable basis for this phenomenon is that some environmental factor or factors, presumably climatic, in some way provokes the virus to produce vesicular lesions in already infected animals. That the distribution of VS affected herds is spotty and some herds are more severely affected than others, and some have mouth lesions only while others have teat or foot lesions, may depend on some type of graded, differential response to the environmental influences or factors by the chronically VS infected cattle.

There is some experimental evidence (39) that environmental factors such as temperature may play a role in the appearance of clinical cases of

VS. Mortality of mice inoculated IC with VSV was significantly lower among groups acclimated to 8° C than among those acclimated to 27° C or 35° C. Also, the incubation period of infection was longer among the mice adapted to the low temperatures, and rates of metabolism were higher among mice maintained at 8° C than among those kept at 25-35° C, as evidenced by increased food consumption and weight gain.

The acclimatization to a low temperature prior to inoculation was essential to influence the survival rate of the mice favorably. Exposure to cold at the time of inoculation or shortly thereafter did not alter the course of the infection. Since it has been shown experimentally that susceptible animals can be infected with VSV as readily during the winter as in the summer, there remains the possibility that, while the environmental temperature may not influence the ability of the virus to initiate infection, it may alter appreciably the response of the host to the infection.

In recent years temperature-sensitive (ts) mutants have been described for many different viruses including VSV. Although most of the ts virus mutants were produced in the laboratory, spontaneous ts mutants are known to occur at a low frequency in many virus populations. Increasing evidence suggests that naturally selected ts mutants may be involved in disease states *in vitro*, and that these mutants may play a role in either establishment or maintenance of persistent virus infections (87).

Virus recovered from many different types of persistent infections has been found to have an impaired ability to replicate at higher temperatures. This has led to the suggestion that investigators seeking to isolate virus from tissue explants from animals with diseases in which latent or persistent virus infections are suspected, should incubate such cell cultures at 31° C or 33° C, in addition to the conventional incubation at 37° C (87).

Could these findings have some applications to the natural history of the VSV? Are ts mutants of VSV responsible for persistent VS infections in cattle, for example? Could further mutation of these virus strains, possibly provoked by environmental changes of some kind, result in virus types that cause the typical vesicular lesions in affected

animals?

Field observations during epizootics also suggest some possible influence of environmental factors. Only a few questionable clinical cases of VS have been reported in the U.S. in the winter and early spring months, and the virus has never been isolated during these months of the year (40). Lauerman (68) reported that there appeared to be a marked increase in the number of VS cases occurring after passage of an anticyclone. He also observed spread of the epizootic in the direction of the anticyclone passage. Similarly, Hanson and his coworkers (43) have reported that VS does not always appear simultaneously in an epizootic area. Study of cases in Georgia and Alabama suggested that the disease moved outward from one or two centers, and that it moved along corridors, from herd to herd, rather than being resident in particular pastures. Also, the direction and time of movement appeared to coincide with the passage of storm fronts (41).

One difficulty with the theory that VS is spread by contact among livestock is that the disease is unknown in some areas in spite of heavy populations of susceptible animals. If contact were the only requirement, widespread infection would be expected. However, it is possible that the spread is by contact, but actual infection requires special environmental conditions or altered metabolic states.

INTEREPIZOOTIC SURVIVAL OF THE VESICULAR STOMATITIS VIRUS

No matter what the basic mechanism are for the transmission of VS from animal to animal, it is difficult to explain the interepizootic survival of the VSV. In certain areas of the United States epizootics have occurred at intervals of greater than 10 years. Persistence of virus as an occult infection for such prolonged periods would appear very improbable, compared with introduction from areas where infections are observed every year. Hanson suggested that there could be introduction of an infected animal such as a cow or a pig or the migration of an unidentified host or vector into the area where the epizootic eventually occurs (41).

Since VS can be found in certain areas in Mexico throughout the year, Hanson further suggested that semitropical America might be the origin of most outbreaks of VS, and that the virus might be introduced into the United States by movement of infected cattle along sales routes and the migration of reservoir animals, although no domestic or wild animal has yet been incriminated as a reservoir host. Migratory birds have also been suggested as a possibility (40, 41).

It also has been suggested that certain insects might transmit the virus over long distance. Aphids, leaf hoppers and lepidoptera that attack field and pastures plants migrate on warm southern winds from the Gulf Coast into Canada each spring. The journey may take 2-6 weeks and a succession of migratory waves may follow the initial one (41).

The introduction of VSV into epizootic areas by migrating vertebrates or insects still would not explain the sudden outbreak of clinical cases over a wide area. This would require the migration of enormous numbers of virus carriers, if the occurrence of the clinical cases is to be linked to the onset of primary infections in an area. On the other hand, the virus could be introduced into a "clean" area by migrating carriers, with a gradual build-up of asymptomatic infections, until conditions are appropriate for a sudden appearance or "outbreak" of clinical cases over a wide area.

Another possibility is that VS does persist in animals in inapparent form for long periods of time in epizootic areas, without the appearance of clinical cases, because the environmental conditions for their occurrence do not exist. When these conditions supervene, even though at long intervals, clinical cases and outbreaks are seen. This would suggest that even though the environmental conditions necessary for VS outbreaks do not regularly exist in the epizootic areas, they may occur on rare occasions, as exceptional events.

It would appear that no single theory of transmission serves to explain all the field and laboratory observations with VSV. It is likely that more than one system operates in nature. Although respiratory spread by direct contact of infected animals would appear to be possible and consistent with many field observations, arthropod vectors

may also play a significant role under certain conditions, as in the tropical forests areas in Panama, for example. A series of different reservoirs for the virus may exist, and transmission may take place in different ways under different conditions, and may be different for the NJ type of VSV than for the Indiana type, even though both may be found in the same area, are morphologically similar, and produce basically the same clinical picture.

QUESTIONS TO BE RESOLVED REGARDING THE EPIDEMIOLOGY OF VESICULAR STOMATITIS

The many unknowns that exist about VS might be summarized by listing some of the questions that arise about the epidemiology of this disease:

1 - What is the reservoir (or reservoirs) for the VSV?

2 - How is VSV transmitted from one host to another?

3 - If a viremia of high titer and long duration has not been observed in any vertebrate hosts, how would arthropod vectors of VSV pick up the virus?

4 - Is transovarial passage of Indiana VSV in *Phlebotomus* enough to explain the survival of the virus in nature?

5 - Do NJ and Indiana VSV have different transmission mechanisms?

6 - Why have NJ VSV isolations not been made in arthropods, while they are fairly common with Indiana VSV?

7 - If lesions in cattle are produced only by inoculation of VSV at the site of mouth, foot or teat lesions, or contact of the virus with scarifications of the epithelium at these sites, how would blood-sucking vectors ordinarily produce these lesions?

8 - If the VSV or the agent producing the VS lesions is found in pastures, how do hosts such as bats, monkeys and man pick up the VS infection?

9 - How does the VSV survive between epizootics when there may be an interval of up to 10-15 years between outbreaks?

10 - Why are some VSV outbreaks in cattle characterized by teat lesions only? Is this due to a strain difference of the virus? What type of

vector would produce only teat lesions? If the lesions are caused by contact with the virus in pastures, why are mouth and foot lesions not seen also, at the same time that teat lesions occur?

11 - Is VSV transmitted mechanically during milking from one cow to the next on the hands of the milker, or on the cups of milking machines, or is the virus already present in the tissues, with the vesicular lesions being provoked by injury to the teats?

12 - Are persisting VS SN antibodies in cattle due to VS virus which persists in the host for long periods?

13 - How are cattle infected with VSV in herds where no clinical cases are seen, but where a large proportion of the herd may have antibodies for VSV?

14 - Even though vesicular stomatitis virus given subcutaneously or IM will not cause lesions, it will produce a rise in antibody titer and some protective immunity. However, the immunity produced may not protect against intralingual challenge. In view of these observations, how does VSV given IM as a vaccine provide suitable protection during VS outbreaks, as reported?

15 - Does inoculation of cattle IM with live VSV used as a vaccine produce long-lasting inapparent VS infections? Would these cattle be more prone to vesicular lesions later, during a natural epizootic? If subjected to stress, experimentally?

16 - If VS outbreaks are seen mainly during the rainy season, how can we explain some outbreaks or cases which occur during the dry season, or during a period of low rainfall?

17 - If VSV is present in pastures, why are adjacent pastures not affected more frequently? Why is the distribution of affected herds usually so spotty?

18 - Why are regional outbreaks seen, and what factors limit the appearance of the disease to these circumscribed areas?

19 - Why is there sometimes a considerable difference in the morbidity rates in affected herds in the same regional outbreak?

20 - Why are adult cattle and horses more frequently affected with clinical VS than animals under one year of age?

21 - Why is the incidence of VS highest during the rainy season?

22 - How could enough arthropod vectors of VSV be infected at a high enough level to produce a simultaneous, widespread outbreak in cattle and horses in an epizootic area?

23 - Can the distribution of VS in the Western Hemisphere, in enzootic and epizootic areas, be related with the distribution of any particular species of arthropods, or any particular set of special climatic conditions? Why is VS not found currently in the Eastern Hemisphere?

24 - If VS in swine can be spread by contact, why are clinical cases not more numerous, and why is the disease not more prevalent in swine production area?

25 - How could sentinel monkeys in cages in the tropical forest areas in Panama be infected with Indiana VSV except by flying, biting arthropods?

26 - Do cattle that develop VS lesions during a VS outbreak have antibodies for VSV before the appearance of the lesions?

PROPOSAL FOR FURTHER FIELD STUDIES

Because of the complex transmission patterns and ecological requirements that may exist for VSV, the disease is difficult to study in the field. Retrospective studies of epizootics, or sporadic surveys of animals in enzootic areas are valuable but may provide little more information than is already available.

An approach which would seem to offer considerable promise of revealing some of the missing epidemiological data about VS is a prospective, longitudinal study in an area where both NJ and Ind. VS are known to be enzootic. Such an area can be found in certain parts of Mexico, Central and South America.

The basic field study should entail a continuing ecological investigation of VS in a circumscribed enzootic area selected on the basis of serological surveys. Two or three premises could be selected where a sufficient number of cattle, horses and swine are being kept. The past clinical history of the herds could be collected, and individual

animals could be followed clinically for the duration of the study. Blood specimens could be collected at the outset of the study for CF and SN antibody tests and these could be repeated on the same animals every 2-3 months. Records could be kept of the movement of the animals, additions to the herds, type of pastures and forage available, and types of feed provided. A careful record could be maintained of a variety of local climatic phenomena (rainfall, temperature, humidity, storms, flooding, etc). Parallel serological studies could also be made on representative wild animals and on selected human residents in the area. Entomological studies could be carried out to determine the possible arthropod vectors present and arthropods collected, whenever indicated, for the isolation of virus.

Basically, the investigation would attempt to study over a number of years in a small area enzootic for VS any and all factors which might have some relation to the reservoirs and transmission of VSV in nature. The patterns of inapparent infection with VS could be followed from birth of some of the cattle under observation and hopefully, if clinical VS cases were to occur during the study period, their appearance could be related to some concomitant environmental events in the area. The occurrence of new infections, whether accompanied by clinical lesions or not, possibly could be correlated with the isolation of VSV in vectors or plants, or in other agents that are still unsuspected, or could be shown to be related to respiratory spread through close contact of the affected animals.

Since practically no field studies of VS are being carried out anywhere at the present time, it is essential that some type of prospective long-term ecological studies of this disease be started as soon as possible, to provide some understanding of the natural history of this puzzling disease. At the same time a greater effort should be made to use the many findings resulting from the wide-scale use of VSV in the laboratory, in the study of molecular biology of viruses, in the hope that they may provide a better understanding of the epidemiological findings in the field.

REFERENCES

1. ACREE, J.A. Colorado epizootic of vesicular stomatitis: Observations on its effects, transmission and response to therapy. *Proc. Am. A. Equine Pract.* pp. 289-299, 1964.
2. ACREE, J.A.; HODGSON, D.F.; PAGE, R.W. Epizootic Indiana vesicular stomatitis in Southwestern U.S. *USLSA Proc.* 68: 375-379, 1964.
3. ANIMAL HEALTH YEARBOOK, 1975. UNITED NATIONS, pp. 162-165, 1976.
4. ARTSOB, H.; SPENCE, L. Growth of vesicular stomatitis virus in mosquito cell lines. *Can. J. Microbiol.* 20: 329-336, 1974.
5. ARTSOB, H.; SPENCE, L. Persistent infection of mosquito cell lines with vesicular stomatitis virus. *Acta Virol.* 18: 331-340, 1974.
6. ATLAS OF MEXICO. University of Texas, Austin, 1975.
7. BERGOLD, G.H.; SUAREZ, O.M.; MUNZ, K. Multiplication in and transmission by *Aedes aegypti* of vesicular stomatitis virus. *J. Invest. Path.* 11: 406-428, 1968.
8. BRANDLEY, C.A.; HANSON, R.P.; CHOW, T.L. Vesicular stomatitis with particular reference to the 1949 Wisconsin epizootic. *Proc. Am. Vet. Med. Assoc. 88th Ann. Meeting 20-23:* 61-67, Aug. 1951.
9. BRODY, J.A.; FISCHER, G.F.; PERALTA, P.H. Vesicular stomatitis virus in Panama. Human serologic patterns in a cattle raising area. *Am. J. Epidem.* 86: 158-161, 1967.
10. BRUNNER, K.T.; HUREZ, D.; McCLUSKEY, R.T.; BENACERRA, B. Blood clearance of P32-labeled vesicular stomatitis and Newcastle disease viruses by the reticuloendothelial system in mice. *J. Immunol.* 85 (1): 99-105, 1960.
11. CAMARGO, F.; EICHHORN, E.A.; LEVINE, J.M.; TELLEZ GIRON, A. A complement fixation technique for foot-and-mouth disease and vesicular stomatitis. *USLSA Proc.:* 207-211, 1950.
12. CARDONA, V.; BENITO, E.; ROCHA, J.; GUTIERREZ, A. La estomatitis vesicular en Colombia. La fiebre aftosa y otras enfermedades vesiculares en Colombia. 1975.
13. CASTAÑEDA, J.; HANSON, R.P. Complement-fixing antibodies as a measure of immunity of cattle to the virus of vesicular stomatitis New Jersey. *Am. J. vet. Res.* 27 (119): 963-969, 1966.
14. CASTAÑEDA, J.; LAUERMAN, L.H.; HANSON, R.P. Evaluation of virus neutralization tests and association of indices to cattle resistance. *Proc. 68th Ann. Meet. USLSA:* 455-467, 1964.

15. CORREA, W.M. Prophylaxis of vesicular stomatitis: A field trial in Guatemalan dairy cattle. *Am. J. vet. Res.* 25: 1300-1302, 1964.
16. COTTON, W.E. The causal agent of vesicular stomatitis proved to be a filter-passing virus. *JAVMA* 23 (1): 168-184, 1926.
17. COTTON, W.E. Vesicular stomatitis in its relation to the diagnosis of foot-and-mouth disease. *JAVMA* 22 (3): 313-332, 1926.
18. COTTON, W.E. Vesicular stomatitis. *Vet. Med.* 22: 169-175, 1927.
19. COX, H.R.; OLITSKY, P.K. Neurotropism of vesicular stomatitis virus. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 30: 653, 1933.
20. CUNHA, R.G.; EICHHORN, E.A.; MATA, F.O. Differentiation between foot-and-mouth disease and vesicular stomatitis viruses by means of mouse inoculation. *Am. J. vet. Res.* 16: 472, 1955.
21. CHOW, T.L.; McNUTT, S.H. Pathological changes of experimental vesicular stomatitis in swine. *Am. J. vet. Res.* 420-424, July, 1953.
22. DISEASES OF CATTLE. Edited by W.J. Gibbons, American Veterinary Publication, 509-516, 1963.
23. DISEASES OF SWINE. Edited by H.W. Dunne. Iowa State Univ. Press, 191-201, 1958.
24. DONALDSON, A.I. Studies on the epizootiology and characterization of vesicular stomatitis and morphologically related viruses. PhD. Thesis, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada, 1969.
25. DONALDSON, A.I. Bats as possible maintenance hosts for vesicular stomatitis virus. *Am. J. Epidem.* 92 (3): 132-136, 1970.
26. EDELMAN, R.; WHEELOCH, E.F. Specific role of each human leukocyte type in viral infections. 1. Monocyte as host cell for vesicular stomatitis virus replication *in vitro*. *J. Virol.* 1 (6): 1139-1149, 1967.
27. ELLIS, E.M.; KENDALL, H.E. The public health and economic effects of vesicular stomatitis in a herd of dairy cattle. *JAVMA* 144 (4): 377-380, 1964.
28. EQUINE MEDICINE AND SURGERY. Edited by Bone, J.F.; Cattcott, E.J.; Gabel, A.A.; Johnson, L.E.; Riley, W.F. *Am. Veterinary Public*, pp. 124-130.
29. FEDERER, K.E.; BURROWS, R.; BROOKSBY, J.B. Vesicular stomatitis virus. The relationship between some strains of the Indiana serotype. *Res. vet. Sci.* 8: 103-117, 1967.
30. FELLOWES, O.N.; DIMOPOULLOS, G.T. Isolation of vesicular stomatitis virus from mouse mothers after inoculation of suckling mouse litters. *J. Bact.* 73 (3): 444-445, 1957.
31. FELLOWES, O.N.; DIMOPOULLOS, G.T.; CALLIS, J.J. Isolation of vesicular stomatitis virus from an infected laboratory worker. *Am. J. vet. Res.* 16 (61): 623-626, 1955.
32. FELLOWES, O.N.; DIMOPOULLOS, G.T.; TESSLER, J.; HESS, W.R.; VARDAMAN, T.H.; CALLIS, J.J. Comparative titrations of vesicular stomatitis virus in various animal species and in tissue culture. *Am. J. vet. Res.* 17 (65): 799-802, 1956.
33. FERRIS, D.F.; HANSON, R.P.; DICKE, R.J.; ROBERTS, R.H. Experimental transmission of vesicular stomatitis virus by diptera. *J. Infect. Dis.* 96 (2): 184-192, 1955.
34. FIELDS, B.N.; HAWKINS, K. Human infection with the virus of vesicular stomatitis during an epizootic. *N.E.J. Med.* 277: 989-994, 1967.
35. FRANK, A.H.; APPLEBY, A.; SEIBOLD, H.R. Experimental intracerebral infection of horses, cattle and sheep with the virus of vesicular stomatitis. *Am. J. vet. Res.* 6 (18): 28-38, 1945.
36. GALINDO, P.; SRIHONGSE, S.; RODANICHE, E.; GRAYSON, M.A. An ecological survey for arboviruses in Almirante, Panama, 1959-1962. *Am. J. trop. Med.* 15: 385-400, 1962.
37. GALETA, J.N.; HOLBROOK, A.A. Vesicular stomatitis patterns of complement-fixing and serum-neutralization antibodies in serum of convalescent cattle and horses. *Am. J. vet. Res.* 22 (89): 713-719, 1961.
38. GLAZENER, W.C.; COOK, R.S.; TRAMER, D.O. A serological study of diseases in the Rio Grande Turkey. *J. Wildl. Manag.* 31 (1): 34-39, 1967.
39. GRIFFITH, T.P.; HANSON, R.P.; BRANDLY, C.A. The effect of environmental temperature on susceptibility of the mouse to vesicular stomatitis virus. *Proc. 91st Ann. Meet. AVMA 23-26*: 192-198, Aug. 1954.
40. HANSON, R.P. The natural history of vesicular stomatitis. *Bact. Rev.* 16 (3): 179-204, 1952.
41. HANSON, R.P. Discussion of the natural history of vesicular stomatitis. *Am. J. Epidem.* 87: 264-266, 1968.
42. HANSON, R.P.; BRANDLY, C.A. Epizootiology of vesicular stomatitis. *Am. J. Public Health* 47: 205-209, 1957.
43. HANSON, R.P.; ESTUPIÑAN, J.; CASTAÑEDA, J. Vesicular stomatitis in the Americas. *Bull. Off. int. Epizoot.* 70: 37-47, 1968.
44. HANSON, R.P.; KARSTAD, L. Enzootic vesicular stomatitis. *Proc. 60th Ann. Meet. U.S. Livestock San. Assoc.*: 288-292, 1956.

45. HANSON, R.P.; KARSTAD, L. Further studies on enzootic vesicular stomatitis. *Proc. 61st Ann. Meet. USLSA*: 13-15, Nov. 1957.
46. HANSON, R.P.; KARSTAD, L.H. Feral swine as a reservoir of vesicular stomatitis virus in Southwestern United States. *Proc. U.S. Livestock Sanit. Assn. 62nd Ann. Meet.*: 309-315, 1958.
47. HANSON, R.P.; RASMUSSEN, A.F.; BRANDLEY, C.A.; BROWN, J.W. Human infection with the virus of vesicular stomatitis. *J. Lab. & Clin. Med.* 36: 754-758, 1950.
48. HEINY, E. Vesicular stomatitis in cattle and horses in Colorado. *No. Am. Vet.* 26: 726-730, 1945.
49. HOLBROOK, A.A.; GELETA, J.N. Vesicular stomatitis immunization with inactivated vaccines of chicken embryo origin. *Proc. 61st Ann. Meet. USLSA*: 308-315, 1957.
50. HOWATSON, A.F. Vesicular stomatitis and related viruses. *Advances in virus research*. Acad. Press. pp. 195-256, 1970.
51. JENNEY, E.W. Vesicular stomatitis in the United States during the last 5 years (1963-1967). *Proc. U.S. Livestock San. Assoc. 71st Ann. Meet.*: 371-385, 1967.
52. JENNEY, E.W.; BROWN, C.L. Surveillance for vesicular stomatitis in the United States - January, 1968 through July, 1972. *Proc. 76th Ann. Meet. U.S. Animal Health Assoc.* 1972.
53. JENNEY, E.W.; HAYES, F.A.; BROWN, C.L. Survey for vesicular stomatitis virus neutralizing antibodies in serums of white-tailed deer *Odocoileus virginianus* of the Southeastern United States. *J. Wildl. Dis.* 6: 488-493, 1970.
54. JENNEY, E.W.; HAYES, F.A.; BROWN, C.L. Survey for vesicular stomatitis infection in Georgia wild mammals. Dev. studies and lab. inv. conducted by VS diag. lab. FY 73. APHIS-USDA. APHIS 91-27 March 1975.
55. JOHNSON, K.M.; TESH, R.B.; PERALTA, P.H. Epidemiology of vesicular stomatitis virus: Some new data and a hypothesis for transmission of the Indiana serotype. *JAVMA* 155 (12): 2133-2140, 1969.
56. JOHNSON, K.M.; VOGEL, J.E.; PERALTA, P.H. Clinical and serological response to laboratory-acquired human infection by Indiana type vesicular stomatitis virus (VSV). *Am. J. trop. Med. Hyg.* 15 (2): 244-246, 1966.
57. JONKERS, A.H. Laboratory studies with rodent viruses in Trinidad. I: Cocal virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 13 (4): 613, 1964.
58. JONKERS, A.H. The epizootiology of the vesicular stomatitis viruses: a reappraisal. *Am. J. Epidem.* 86 (2): 286-291, 1967.
59. JONKERS, A.H.; SHOPE, R.E.; AITKEN, T.H.G.; SPENCE, L. Cocal virus, a new agent in Trinidad related to vesicular stomatitis virus, type Indiana. *Am. J. vet. Res.* 25 (104): 236-242, 1964.
60. JONKERS, A.H.; SPENCE, L.; AITKEN, T.H.G. Cocal virus epizootiology in the bush forest and Nariva swamp, Trinidad, W.I. Further studies. *Am. J. vet. Res.* 26 (112): 758-763, 1965.
61. KARSTAD, L. Epizootiology of vesicular stomatitis: a discussion of the use of basic concepts in selection of methods for investigation. *Proc. 1st Int. Conf. Wildlife O.S., N.Y.* 298-309, 1962, *Vet. Bull. Weybridge* 34 (3): 905, 1964.
62. KARSTAD, L.H.; ADAMS, E.V.; HANSON, R.P.; FERRIS, D.H. Evidence for the role of wildlife in epizootics of vesicular stomatitis. *JAVMA* 129 (3): 95-96, 1956.
63. KARSTAD, L.H.; HANSON, R.P. Vesicular stomatitis in deer. *Am. J. vet. Res.* 68 (66): 162-166, 1957.
64. KARSTAD, L.H.; HANSON, R.P. Primary isolation and comparative titrations of five field strains of vesicular stomatitis virus in chicken embryos, hogs and mice. *Am. J. vet. Res.* 19 (70): 233-236, 1958.
65. KARSTAD, L.H.; SPALATIN, J.; HANSON, R.P. Experimental infections of wild birds with the viruses of Eastern equine encephalitis, Newcastle disease and vesicular stomatitis. *J. infect. Dis.* 105: 188-195, 1959.
66. KOWALCZYK, T.; BRANDLY, C.A. Susceptibility and serological response of various species of animals to infection with the virus of vesicular stomatitis. *Am. J. vet. Res.* 15: 477-480, 1945.
67. KOWALCZYK, T.; HANSON, R.P.; BRANDLY, C.A. Infectivity and pathogenicity of vesicular stomatitis virus in ferrets. *Am. J. vet. Res.* 16: 180, 1955.
68. LAUERMAN, L.H. Vesicular stomatitis in temperate and tropical America. Thesis, Univ. Wisc. 1968.
69. LAUERMAN, L.H.; KUNS, M.L.; HANSON, R.P. Field trial of live virus vaccination procedure for prevention of vesicular stomatitis in dairy cattle. 1. Preliminary immune response. *Proc. 66th Ann. Meet. USLSA*, 1962. *Proc. 67th Ann. Meet. USLSA*: 483-490, Oct. 15-18, 1963. III. Evaluation of emergency vaccination in Georgia, 473-482, 1963.
70. LIU, I.K.M.; ZEE, Y.C. The pathogenesis of vesicular stomatitis virus, serotype Indian., in *Aedes aegypti* mosquitoes. I. Intrathoracic injection. *Am. J. trop. Med. Hyg.* 25 (1): 177-185, 1976.

71. MASON, J.; HERRERA SALDAÑA, A.; TURNER, W.J. Vesicular stomatitis in Mexico. *Proc. 80th Ann. Meet. U.S. Animal Health Assoc.*: 234-253, 1976.
72. McCROAN, J.E. Vesicular stomatitis infection in man. Morbidity and mortality. Rep. 5. U.S. Dept. HEW, Wash. D.C.: Cited in PATTERSON *et al.* (reference No. 3), 1956.
73. McDERMID, J.E. Vesicular stomatitis in Wisconsin. *Proc. 88th AVMA*: 67-69, 1951.
74. MEYER, N.L.; MOULTON, W.M.; JENNEY, E.W.; ROGERS, R.J. Outbreaks of vesicular stomatitis in Oklahoma and Texas. *USLSA Proc.* 64: 324-332, 1960.
75. MOHLER, J.R. Vesicular stomatitis of horses and cattle. (Revision of the USDA Bulletin No. 662 originally issued May 1918), 1940.
76. MUDD, J.A.; LEAVITT, R.W.; KINGSBURY, D.T.; HOLLAND, J.J. Natural selection of mutants of vesicular stomatitis virus by cultured cells of *Drosophila melanogaster*. *J. gen. Virol.* 20: 341-351, 1973.
77. MYERS, W.A.; HANSON, R.P. Studies on the response of rabbits and guinea pigs to inoculation with vesicular stomatitis virus. *Am. J. vet. Res.* 23 (96): 1078-1080, 1962.
78. OLITSKY, P. Physical, chemical, and biological studies on the virus of vesicular stomatitis of horses. *J. Exp. Med.* 45 (6): 969-981, 1927.
79. OLITSKY, P.; COX, H.R.; SYVERTON, J.T. Comparative studies on the viruses of vesicular stomatitis and equine encephalomyelitis. *J. Exp. Med.* 59 (2): 159-171, 1934.
80. OLITSKY, P.K.; SABIN, A.B.; COX, H.R. An acquired resistance of growing animals to certain neurotropic viruses in the absence of humoral antibodies or previous exposure to infection. *J. Exp. Med.* 64: 723-737, 1936.
81. OLITSKY, P.K.; SCHOENING, H.W.; TRAUM, J. Summary of the observations of the Commission to study foot-and-mouth disease. *North Am. Vet.* 8: 42-47, 1927.
82. OLITSKY, P.; TRAUM, J.; SCHOENING, H.W. Comparative studies on vesicular stomatitis and foot-and-mouth diseases. *J. Am. vet. Med. Assoc.* 23 (1): 147-167, 1926.
83. PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. Diagnosis of vesicular diseases in livestock. Research in Progress. Red: RD 15/1, 1976.
84. PATTERSON, W.C.; JENNEY, E.W.; HOLBROOK, A.A. Experimental infections with vesicular stomatitis in swine. I. Transmission by direct contact and feeding infected meat scraps. *Proc. USLSA.*: 368-378, 1955.
85. PATTERSON, W.C.; MOTT, L.O. Vesicular stomatitis. Yearbook of Agriculture, 182-186, 1956. 1956 Yearbook Separate No. 2683.
86. PATTERSON, W.C.; MOTT, L.O.; JENNEY, E.W. A study of vesicular stomatitis in man. *J. Am. vet. Med. Assoc.* 133: 57-66, 1958.
87. PREBLE, O.T.; YOUNGER, J.S. Temperature sensitive viruses and the etiology of chronic and inapparent infections. *J. infect. Dis.* 131 (4): 467-473, 1975.
88. PRINTZ, P. Adaptation du virus de la stomatite vesiculaire a *Drosophila melanogaster*. *Ann. inst. Pasteur* 119: 520-537, 1970.
89. SABIN, A.B.; OLITSKY, P.K. Influence of host factors on neuroinvasiveness of vesicular stomatitis virus. I. Effect of age on the invasion of the brain by virus instilled in the nose. *J. Exp. Med.* 66: 15-34. II. Effect of age on the invasion of the peripheral and central nervous system by virus injected into the leg muscles or the eye. 66: 35-57. III. Effect of age and pathway of infection on the character and localization of lesions in the central nervous system. 67: 201-227, 1937.
90. SAULMON, E.E. The epidemiology of vesicular stomatitis in the United States. *Bull. Off. int. Epizoot.* 70: 49, 1968.
91. SCHOENING, H.W. Vesicular stomatitis in swine. *Proc. 47th Ann. Meet. USLSA*, Dec. 2-4: 85-86, 1943.
92. SCHOENING, H.W. Outbreak of vesicular stomatitis in swine and its differential diagnosis from vesicular exanthema and foot-and-mouth disease. Circular No. 734 USDA, Wash. D.C., 1945.
93. SEAY, L.E. 1960 outbreak of stomatitis and lameness of cattle in Texas, Oklahoma and Arkansas. *Proc. 65th Ann. Meet. USLSA*. Oct. 30 - Nov. 3, 1961.
94. SEIBOLD, H.R.; SHARP, J.B. A revised concept of the pathological changes of the tongue in cattle with vesicular stomatitis. *Am. J. vet. Res.* 21 (80): 35-51, 1960.
95. SHAHAN, M.S.; FRANK, A.H.; MOTT, L.O. Studies of vesicular stomatitis with special reference to a virus of swine origin. *JAVMA* 63 (826): 5-19, 1946.
96. SHELOKOV, A.; PERALTA, P.H. Vesicular stomatitis virus, Indiana type: and arbovirus infection of tropical sandflies and humans? *Am. J. Epidem.* 86 (1): 149-157, 1967.
97. SHELOKOV, A.I.; PERALTA, P.H.; GALINDO, P. Prevalence of human infection with vesicular

- stomatitis virus. *J. Clin. Invest.* 40: 1081, 1961.
98. SKINNER, H.H. Infection of chickens and chick embryos with the virus of foot-and-mouth disease and vesicular stomatitis. *Nature* 174: 1052-1053, 1954.
 99. SKINNER, H.H. The virus of vesicular stomatitis in small experimental hosts. *J. Comp. Path.* 67: 87-105, 1957.
 100. SKINNER, H.H. Infection of domestic poultry with the viruses of foot-and-mouth disease and vesicular stomatitis. *Arch. ges. Virusforsch.* 9: 92-126, 1959.
 101. SLAVIN, H.B.; HALE, H.W.; BERRY, G.P. Passive protection of the central nervous system of mice against viruses that pursue the pathway of the olfactory nerves after intranasal instillation. Vesicular stomatitis and St. Louis encephalitis. *J. Immunol.* 54: 179-188, 1946.
 102. SORENSEN, D.K.; CHOW, T.L.; KWALCZYK, T.; HANSON, R.P.; BRANDLY, C.A. Persistence in cattle of serum-neutralizing antibodies of vesicular stomatitis virus. *Am. J. vet. Res.* 19 (70): 74-77, 1958.
 103. SRIHONGSE, S. Vesicular stomatitis virus infections in Panamanian primates and other vertebrates. *Am. J. Epidem.* 90 (1): 69-76, 1969.
 104. STROZZI, P.; RAMOS-SOCO, T. Teat vesicles as primary and almost exclusive lesions in an extensive outbreak of vesicular stomatitis (New Jersey strain) in milking cows. *JAVMA* ;23 (920): 415-418, 1953.
 105. SUDIA, W.D.; FIELDS, B.N.; CALISHER, C.H. The isolation of vesicular stomatitis virus (Indiana strain) and other viruses from mosquitoes in New Mexico, 1965. *Am. J. Epidem.* 86 (3): 598-602, 1967.
 106. TESH, R.B.; CHANIOTIS, B.N.; JOHNSON, K.M. Vesicular stomatitis virus (Indiana serotype): trans-ovarial transmission by phlebotomine sandflies. *Science* 175 (4029): 1477-1479, 1971.
 107. TESH, R.B.; CHANIOTIS, B.N.; PERALTA, P.H.; JOHNSON, K.M. Ecology of viruses isolated from Panamanian Phlebotomine sandflies. *Am. J. trop. Med. Hyg.* 23 (2): 258-269, 1974.
 108. TESH, R.B.; PERALTA, P.H.; JOHNSON, K.M. Ecological studies of vesicular stomatitis virus. I. Prevalence of infection among animals and humans living in an area of endemic VSV activity. *Am. J. Epidem.* 90 (3): 255-261, 1969.
 109. TESH, R.B.; PERALTA, P.H.; JOHNSON, K.M. Ecologic studies of vesicular stomatitis virus. II. Results of experimental infection in Panamanian wild animals. *Am. J. Epidem.* 91 (2): 216-224, 1970.
 110. THEILER, S. Eine contagiose stomatitis des pferdes in Sud-Afrika 1901 Deut-tierarztl. Wochscher. 9: 31. Cited by CALLIS *et al.* Diagnosis of vesicular disease in swine. *18th Ann. Proc. Am. Assoc. Vet. Lab. Diagnost.*, 1975.
 111. TRAINER, D.O.; HANSON, R.P. Serologic evidence of arbovirus infections in wild animals. *Am. J. Epidem.* 90 (4): 354-358, 1969.
 112. VADLAMUKI, S.; HANSON, R.P. The neutralization test for vesicular stomatitis virus in chicken embryos and tissue cultures. *Cornell Vet.* 53 (1): 16-23, 1963.
 113. VESICULAR STOMATITIS ISOLATED FROM EYE GNATS. Diagnostic Services Newsletter, NALD. June, 1968.
 114. WAGENER, K. Infection and immunity of vesicular stomatitis in guinea pigs. *Vet. Med.* 26 (10): 388-396, 1931.
 115. WAGENER, K. Investigations on the pathogenicity of vesicular stomatitis virus. *Cornell Vet.* 21: 344-359, 1931.
 116. YANG, Y.J.; STOLTZ, D.B.; PREVEC, L. Growth of vesicular stomatitis virus in a continuous culture line of *Antheraea euclaypti* moth cells. *J. gen. Virol.* 5: 473-483, 1969.
 117. YEDLOUTSCHNIG, R.J. Complement fixation test for diagnosis of foot-and-mouth disease and vesicular stomatitis using polyvalent guinea pig antiserums. *U. S. Animal Health Assoc. Proc. 76th Ann. Meet.*: 172-182, 1972.

**PRUEBA DE POTENCIA PARA VACUNAS CONTRA LA FIEBRE AFTOSA
DE ADYUVANTE OLEOSO:
ENSAYOS DE DP₅₀ EN COBAYOS Y EN BOVINOS DE UNA VACUNA
PREPARADA EN FORMA SEMI-INDUSTRIAL CON UNA
EMULSION DEL TIPO AGUA EN ACEITE**

*Centro Panamericano de Fiebre Aftosa¹
Dirección de Lucha Contra la Fiebre Aftosa²*

RESUMEN

Una vacuna contra la fiebre aftosa preparada en forma semi-industrial fue ensayada mediante pruebas de potencia en cobayos y bovinos a los 1, 2 y 3 meses postvacunación. En los cobayos, los valores de DP₅₀ a los 30 días fueron ligeramente más bajos que a los 60 ó 90 días. No hubo diferencia significativa entre los valores de DP₅₀ en bovinos a los 30, 60 ó 90 días. Los números de DP₅₀ en bovinos después de la exposición por contacto fueron significativamente más bajos que después de la descarga en la lengua.

INTRODUCCION

En un trabajo anterior la calidad de las vacunas antiaftosas de adyuvante oleoso se estimó mediante pruebas de potencia basadas en el estudio de anticuerpos en bovinos y cobayos vacunados (2). Se determinó que para una prueba de dosis protectora 50% (DP₅₀), la vacuna debía ser diluida en una emulsión sin antígeno del tipo agua en aceite. También se demostró que el cobayo podía ser un animal de laboratorio útil para las pruebas de potencia de las vacunas de adyuvante oleoso (2).

En el presente trabajo una vacuna preparada en escala semi-industrial fue probada en bovinos y en cobayos. La inmunidad de los bovinos vacunados fue determinada por inoculación de virus en la

lengua o por contacto con animales afectados. Tanto las pruebas con los cobayos como con los bovinos se hicieron a los 1, 2 y 3 meses después de la vacunación para determinar la variación de los resultados de las pruebas y para establecer el número de DP₅₀ cobayo y DP₅₀ bovino.

MATERIALES Y METODOS

Vacuna

Producción de los antígenos

Los antígenos para la vacuna se prepararon con cepas del virus de la fiebre aftosa (FA) O₁ Campos, A₂₄ Cruzeiro y C₃ Resende cultivados en células BHK en suspensión en un tanque de 200 litros en el Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (1). Sus características se pueden observar en la Tabla 1. Los antígenos fueron conservados a 4° C por uno o dos meses después de la inoculación. La vacuna terminada fue conservada en las mismas condiciones por otros 3-4 meses antes de ser usada en las pruebas de cobayos y 7-9 meses antes de la vacunación de los bovinos.

Formulación de la vacuna

La vacuna era una emulsión de agua en aceite de una suspensión trivalente de antígenos y de una parte igual de la fase oleosa que consistía en aceite mineral³ con 10% de monooleato de mannide⁴. La emulsión se preparó en un tanque emulsificador de 50 litros (4). La vacuna fue diluida en una

¹P. Augé de Mello; A. Alonso Fernández; I. Gomes; M.S. Söndahl. Caixa Postal 589 - ZC-00 - Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

²A.R. Pollak; H. Tórtora; A. Millán; D. Pintos; W. Moreno. Ruta 8 "Brig. Gral. Juan Antonio Lavalleja" - KIm 29, Pando, Uruguay.

³Marcol 52, Exxon Corporation USA.

⁴Arlacel A, ICI America Inc. Atlas Chemicals Division.

TABLA 1. Características de los antígenos

Virus	Cepa	Títulos		Almacenamiento a 4°C en meses		
		Infectividad ^a	FC ^b	Antígeno inactivado	Vacuna	
					Cobayos	Bovinos
O ₁	Campos	8.0	1/20	2	3	7-9
A ₂₄	Cruzeiro	7.3	1/18	1	3	7-9
C ₃	Resende	7.8	1/18	2	4	7-9

^a Log₁₀ DICC₅₀/ml.

^b FC, prueba de fijación del complemento (4 unidades hemolíticas de complemento₅₀ a 90 min).

emulsión similar sin antígeno (2) para las pruebas de potencia en cobayos y en bovinos.

Cobayos

Se utilizaron cobayos albinos, machos, de 5 meses de edad y con un peso aproximado de 550 g.

Fueron inoculados por vía intramuscular grupos de 16 cobayos con 0,25 ml en 4 series de dilución de la vacuna por cada tipo de virus y por cada período de descarga. Las pruebas de potencia para los virus de los subtipos O₁ Campos, A₂₄ Cruzeiro y C₃ Resende fueron hechas a los 30, 60 y 90 días postvacunación.

La inmunidad de los cobayos fue comprobada inoculando en la almohadilla plantar de cada uno de ellos, no menos de 500 dosis generalizantes para el cobayo.

Bovinos

En este experimento se utilizaron novillos de 2 años de edad, de raza Hereford, de 200 kg de peso aproximadamente, criados en una isla del Río Negro, Uruguay.

Nueve grupos de 8 bovinos cada uno, no vacunados previamente, fueron inoculados por vía intramuscular con 5 ml de vacuna diluida 1:10, 1:40 y 1:160, respectivamente, 3 grupos el primer día, 3 a los 30 días y 3 a los 60 días. Treinta días después que los últimos grupos habían sido vacunados, todos los bovinos fueron expuestos simultáneamente a la FA. Por tanto, el estudio de su inmuni-

dad se hizo a los 90, 60 y 30 días postvacunación.

Exposición al virus

La exposición al virus de la FA se hizo con la cepa subtipo O₁ Campos. Cuatro bovinos de cada grupo fueron inoculados en el epitelio de la lengua en 4 puntos con un total de aproximadamente de 10.000 DI₅₀. Cuatro bovinos no vacunados sirvieron como control y recibieron una inoculación similar de virus.

Los 4 animales restantes de cada grupo, así como los 4 no vacunados como control, permanecieron en contacto con los animales inoculados. Todos los animales estuvieron juntos en las mismas instalaciones y en íntimo contacto. Los animales fueron examinados individualmente a los 5 y a los 10 días después de la exposición para determinar la presencia de lesiones en la boca y en el espacio interdental.

Pruebas de anticuerpos

Antes de la vacunación de los bovinos y antes de la exposición al virus fueron tomadas muestras de sangre para pruebas de anticuerpos. Los sueros fueron examinados por las pruebas de seroprotección (6) y sus resultados expresados como la media de la expectativa porcentual de protección (EPP) de acuerdo con Gomes y Astudillo (9).

Los sueros también fueron sometidos a pruebas de microneutralización como está descrito por Ferreira (7).

RESULTADOS

Los valores de DP_{50} cobayos para cada uno de los antígenos se muestran en la Tabla 2. Los valores aumentaron ligeramente entre los 30 y los 60 días postvacunación y permanecieron prácticamente constantes hasta los 90 días.

TABLA 2. DP_{50} cobayo en 0,25 ml de vacuna antiaftosa de adyuvante oleoso

Cepas de virus	Días postvacunación		
	30	60	90
O ₁	48 ^a	108	74
A ₂₄	58	110	102
C ₃	56	77	69

^a Recíproca de la dilución de la vacuna (0,25 ml) que protege 50% cobayo contra no menos de 500 dosis generalizantes.

La Tabla 3 resume los resultados de las pruebas de microneutralización de los sueros con los antígenos O y A a diferentes períodos después de la vacunación. Se puede apreciar que de los 30 a los 90 días postvacunación el nivel se matuvo estable.

La dilución de la vacuna en una emulsión libre de antígenos dio apenas una relativa y pequeña reducción en el promedio de los títulos de anticuerpos. Resultados similares se obtuvieron con las pruebas de seroprotección (Tabla 4).

Recién a los 3 meses después de la vacunación, el nivel de protección decayó en forma apreciable para la vacuna diluida 1:160.

Los resultados de la exposición al virus del subtipo O₁ se muestran en la Tabla 5. En esta tabla, protección significa la ausencia de cualquier lesión en la lengua del animal inoculado excepto aquellas de los puntos de inoculación y en los animales de contacto, la ausencia de cualquier lesión. De acuerdo con estos criterios se clasificó "no protegido" un número mayor de animales en el grupo de animales de contacto que en el grupo de los animales inoculados en la lengua. En el grupo inoculado en la lengua, hubo solamente 2 animales con lesiones generalizadas, mientras que los animales de control no vacunados e inoculados en la lengua generalizaron en 48 horas. Sin embargo, la mayoría de las lesiones de los animales vacunados se desarrollaron entre los 5 y los 10 días después de la descarga.

No hubo diferencia significativa en los valores de las DP_{50} en los bovinos a los 30, 60 ó 90 días (Tabla 5). Sin embargo, los valores de la DP_{50} en los grupos de animales de contacto fueron significativamente más bajos que los del grupo inoculado por vía intradermolingual.

TABLA 3. Medias de los títulos de neutralización en bovinos^a vacunados con diluciones^b de vacuna de adyuvante oleoso

Dilución de la vacuna	Tipo de virus							
	O				A			
	Días postvacunación				Días postvacunación			
	0	30	60	90	0	30	60	90
1/10	<1,0	3,1	2,8	3,2	<1,0	3,0	2,8	3,3
1/40	<1,0	2,6	2,8	2,9	<1,0	2,7	2,7	2,8
1/160	<1,0	2,6	2,5	2,4	<1,0	2,7	2,5	2,4

^a 8 bovinos por grupo.

^b Diluciones en emulsión libre de antígeno.

TABLA 4. Expectativa porcentual de protección^a frente al virus tipo O de la fiebre aftosa en bovinos vacunados con antígeno en varias diluciones y en diferentes períodos postvacunación (Prueba de seroprotección)

Dilución de la vacuna ^b	Días postvacunación		
	30	60	90
1/10	92	89	96
1/40	97	91	93
1/160	99	87	73

^a Gomes y Astudillo. *Bltm Centro Panamericano Fiebre Aftosa 17-18*: 9-16, 1975.

^b Diluciones en emulsión libre de antígeno.

TABLA 5. Protección de bovinos^a a la exposición con virus tipo O₁ de la fiebre aftosa

Dilución de la vacuna ^b	Vía de exposición	Días postvacunación			Total
		30	60	90	
1/10	IDL	4/4	4/4	4/4	12/12
	CONT	3/4	3/4	3/4	9/12
1/40	IDL	4/4	3/4	4/4	11/12
	CONT	1/4	2/4	3/4	6/12
1/160	IDL	2/4	3/4	1/4	6/12
	CONT	2/4	1/4	1/4	4/12
Controles	IDL	0/4	0/4	0/4	0/12
	CONT	0/4	0/4	0/4	0/12
DP ₅₀ Bovino	IDL	160	160	115	
	CONT	40	40	56	

^a Protegidos = ausencia de lesiones en las patas de bovinos inoculados por vía intradermolingual y ausencia de lesiones en los bovinos controles.

^b Diluciones en emulsión libre de antígeno.

DISCUSION

Las pruebas de potencia que se realizaban con las vacunas tradicionales con antígenos adsorbidos con hidróxido de aluminio se hacían por descarga

a los 21 días postvacunación, tanto en los cobayos como en los bovinos (5). Sin embargo, los niveles de anticuerpos en bovinos vacunados con vacunas de adyuvante oleoso pueden continuar subiendo hasta 90 días después de la vacunación mientras que los niveles en los bovinos vacunados con vacunas de hidróxido de aluminio alcanzan su pico a 30 días aproximadamente (3). Por lo tanto es importante determinar el momento óptimo de la exposición en las pruebas de potencia de las vacunas de adyuvante oleoso.

En este trabajo, la inmunidad de los cobayos y de los bovinos fue estudiada mediante exposición a los 30, 60 y 90 días postvacunación. Los valores de la DP₅₀ cobayos, que se ven en la Tabla 2, para esos períodos, no indican la necesidad de hacer la descarga más allá de los 30 días postvacunación aun cuando hubo un ligero aumento en los valores DP₅₀ hasta los 60 días postvacunación. Los títulos de anticuerpos de los bovinos (Tabla 3) y los resultados de la exposición al virus (Tabla 5) también muestran que con fines prácticos, las estimaciones obtenidas en los bovinos a los 30 días resultan útiles.

En un trabajo anterior, se exploraron diferentes formas de dilución de antígenos para las pruebas de DP₅₀ (2). En este experimento se muestra una desventaja al diluir la vacuna en una emulsión libre de antígeno. La curva de la respuesta por dosis fue muy baja, tanto para los cobayos como para los bovinos, y la vacuna debe ser diluida en altas diluciones a fin de alcanzar el punto final en la titulación. Esta misma observación fue señalada por Stellmann *et al.* (10) para vacunas de hidróxido de aluminio diluidas en un diluyente con adyuvante. Ellos prefirieron diluir la vacuna en un diluyente inmunológicamente neutro en vez de dosis decrecientes de vacuna o bien, diluir la vacuna con diluyente que contenía adyuvante. También indicaron que una curva más baja de respuesta por dosis significa un más alto error standard y una menor sensibilidad del sistema de prueba. Sin embargo, con una vacuna de emulsión de agua en aceite, la dilución en una sustancia inerte es difícil de realizar (2). En las pruebas de cobayos el uso de dosis decreciente parece ser impracticable, pero sería conveniente hacer experiencias utilizando el método de dosis decreciente en bovinos.

Como se indica en la Tabla 5 la protección de los bovinos parece ser menos favorable que lo que podía esperarse de acuerdo con las pruebas de anticuerpos en el suero. Sin embargo, en los animales inoculados en la lengua, todos aquellos que presentaron alguna lesión en la pata y todos los animales expuestos por contacto con alguna lesión oral o podal fueron clasificados como "no protegidos". Por tanto, esta categoría incluye varios animales con solamente una o dos lesiones en las patas y los del grupo de contacto que solamente tuvieron una pequeña lesión oral al 10° día después de iniciada la exposición. La mayoría de los animales inoculados en la lengua y de contacto tenían altos niveles de anticuerpos.

Es muy probable que el elevado nivel de virus en el medio ambiente y el prolijo examen de los bovinos a los 5 días haya contribuido al desarrollo de varias lesiones primarias. Observaciones similares fueron hechas por Gomes en los cerdos (8).

REFERENCIAS

1. ABARACON, D.; GIACOMETTI, H.; MESQUITA, J. Etileneimina binaria (BEI) como inactivante de virus de la fiebre aftosa producida por diferentes técnicas semi-industriales. (En prep.).
2. AUGÉ DE MELLO, P.; ALONSO FERNANDEZ, A.; GOMES, I. Potency testing of oil adjuvanted foot-and-mouth disease vaccines. (En prep.).
3. AUGÉ DE MELLO, P.; ASTUDILLO, V.; GOMES, I.; CAMPOS GARCIA, J.T. Aplicación en el campo de vacuna antiaftosa oleosa e inactivada: vacunación y revacunación de bovinos jóvenes. (Field application of inactivated oil adjuvanted foot-and-mouth disease virus vaccine: vaccination and revaccination of young cattle). *Bltn Centro Panamericano Fiebre Aftosa 19-20*: 31-38, 39-47, 1975.
4. AUGÉ DE MELLO, P.; MESQUITA, J. Preparation of water-in-oil emulsion foot-and-mouth disease vaccine in a semi-industrial scale at the Pan-American Foot-and-Mouth Disease Center. (En prep.).
5. CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA. Manual de procedimientos para el control de las vacunas antiaftosas. *Ser. Man Téc.* No. 2, 1974.
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, MARIA ELMA V. Prueba de micro-neutralización 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 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.
9. GOMES, I.; ASTUDILLO, V. Foot-and-mouth disease: Evaluation of mouse protection test results in relation to cattle immunity. *Bltn Centro Panamericano Fiebre Aftosa 17-18*: 9-16, 1975.
10. STELLMANN, C.; TERRÉ, J.; FAVRE, H.; BRUN, A.; FONTAINE, J. Comparison of foot-and-mouth disease vaccine potency testing on cattle in terms of the nature of the diluent. *Arch. of Virology 54*: 61-74, 1977.

POTENCY TESTING OF OIL ADJUVANTED FOOT-AND-MOUTH DISEASE VACCINE:
PD₅₀ ASSAYS OF A SEMI-INDUSTRIAL WATER-IN-OIL TYPE
EMULSION VACCINE IN GUINEA PIGS AND CATTLE

Pan American Foot-and-Mouth Disease Center¹
Dirección de Lucha Contra la Fiebre Aftosa²

SUMMARY

Oil adjuvanted foot-and-mouth disease vaccine prepared on a semi-industrial scale was potency tested in guinea pigs and cattle at 1, 2 and 3 months postvaccination. The guinea pig PD₅₀ values at 30 days were slightly lower than those at 60 or 90 days. There was no significant difference between the cattle PD₅₀ values at 30, 60 or 90 days. In cattle PD₅₀ values calculated after contact exposure were significantly lower than after tongue challenge.

INTRODUCTION

A previous study estimated the quality of oil adjuvanted foot-and-mouth disease (FMD) vaccines by antibody assay of vaccinated cattle and by a guinea pig potency test (2). It was determined that for 50% protective dose (PD₅₀) assay the vaccine could be diluted in a water-in-oil type emulsion without antigen (antigen-free emulsion). It was also shown that the guinea pig would be a suitable test animal for potency assay of oil adjuvanted vaccine (2).

In the present experiment vaccine prepared on a semi-industrial scale was tested in guinea pigs and cattle. The immunity of the vaccinated cattle was challenged by exposure to FMD by tongue inoculation or contact with infected animals. Both the guinea pig tests and cattle challenge were done at 1, 2 and 3 months post-vaccination to examine

¹P. Augé de Mello; A. Alonso Fernández; I. Gomes; M.S. Söndahl. Caixa Postal 589 - ZC-00 - Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

²A.R. Pollak; H. Tórtora; A. Millan; D. Pintos; W. Moreno. Ruta 8 "Brig. Gral. Juan Antonio Lavalleja" - Km 29, Pando, Uruguay.

variation of test results and to determine the number of guinea pig PD₅₀ or bovine PD₅₀.

MATERIALS AND METHODS

Vaccine

Antigen production

The antigens for the vaccine were prepared from FMD virus strains O₁ Campos, A₂₄ Cruzeiro and C₃ Resende grown in BHK suspended cells in a 200-liter fermentor at the Pan American Foot-and-Mouth Disease Center (1). Characteristics of each are shown in Table 1. The antigens were stored at 4°C 1-2 months following inactivation. The finished vaccine was stored under the same conditions for 3-4 months before use in the guinea pig test and 7-9 months before vaccination in cattle.

Vaccine formulation

The vaccine was a water-in-oil emulsion of the trivalent antigen suspension and an equal part of the oil phase consisting of mineral oil³ and 10% mannide monooleate⁴. The emulsion was prepared in a 50-liter emulsification vessel (4). The vaccine was diluted in a similar antigen-free emulsion (2) for potency tests in guinea pigs and cattle.

Guinea pigs

Five-month old albino male guinea pigs weighing approximately 550 gm were used in the tests.

³Marcol 52, Exxon Corporation USA.

⁴Arlacel A, ICI America Inc. Atlas Chemicals Division.

TABLE 1. *Characteristics of antigens*

Virus	Strain	Titers		Storage at 4°C in months		
		Infectivity ^a	CF ^b	Inactivated antigen	Vaccine	
					Guinea pigs	Cattle
O ₁	Campos	8.0	1/20	2	3	7-9
A _{2.4}	Cruzeiro	7.3	1/18	1	3	7-9
C ₃	Resende	7.8	1/18	2	4	7-9

^a Log₁₀ CCID₅₀/ml.

^b CF, complement fixation test (4 complement hemolytic units₅₀ at 90 min).

Groups of 16 guinea pigs were inoculated intramuscularly with 0.25 ml of a 4-fold dilution series of the vaccine for each virus type and challenge period. Potency tests for virus subtypes O₁ Campos, A_{2.4} Cruzeiro and C₃ Resende, were made at 30, 60 and 90 days each, post-vaccination.

The immunity of the guinea pigs was challenged by inoculating at least 500 guinea pig generalizing doses into the footpad of each guinea pig.

Cattle

Hereford steers raised on an island in the Rio Negro, Uruguay, 2 years old, weighing approximately 200 kg, were used in this experiment.

Nine groups of 8 previously unvaccinated cattle were inoculated intramuscularly with 5 ml of vaccine diluted 1:10, 1:40 and 1:160, respectively, 3 groups at 0 days, 3 at 30 and 3 at 60. All cattle were simultaneously exposed to FMD 30 days after the last groups had been vaccinated. Thus, challenge of immunity occurred at 90, 60 and 30 days post-vaccination.

Challenge

The challenge virus was FMD virus subtype O₁ strain Campos. Four cattle of each group were inoculated in the tongue epithelium at 4 sites with a total of approximately 10,000 Bovine ID₅₀. Four non-vaccinated control cattle were inoculated with a similar dose of virus.

The 4 remaining cattle of each group, as well as 4 non-vaccinated control cattle were placed in

contact with the inoculated cattle. All cattle were housed together in the same barn and were in intimate contact. The cattle were examined individually for oral and interdigital lesions on Days 5 and 10 after exposure.

Antibody assay

Blood samples for antibody assay were collected before vaccination of the cattle and prior to challenge. Sera were tested by the mouse protection test (6) with the results expressed as the mean expected percentage of protection (EPP) according to Gomes and Astudillo (9).

Sera were also assayed by the microneutralization test as described by Ferreira (7).

RESULTS

The guinea pig PD₅₀ values are listed for each of the antigens in Table 2. The values increased slightly between 30 and 60 days post-vaccination and remained practically constant until 90 days post-vaccination.

Table 3 summarizes the results of the microneutralization test of the cattle sera for the O and A antigens at the different periods after vaccination. It can be seen that from 30-90 days post-vaccination a plateau was maintained. Dilution of the vaccine in antigen-free emulsion resulted only in a relatively small reduction of the mean antibody titers. Similar results were obtained with the mouse protection test (Table 4).

TABLE 2. Guinea pig $PD_{50}/0.25$ ml of oil adjuvanted FMD vaccine

Virus strains	Days post-vaccination		
	30	60	90
O ₁	48 ^a	108	74
A ₂₄	58	110	102
C ₃	56	77	69

^a Reciprocal dilution of vaccine (0.25 ml) protecting 50% of guinea pigs against at least, 500 generalizing doses.

TABLE 3. Mean neutralization titers of cattle^a after vaccination with dilution^b of oil adjuvanted vaccine

Vaccine dilution	Virus type							
	O				A			
	Days post-vaccination				Days post-vaccination			
	0	30	60	90	0	30	60	90
1/10	<1.0	3.1	2.8	3.2	<1.0	3.0	2.8	3.3
1/40	<1.0	2.6	2.8	2.9	<1.0	2.7	2.7	2.8
1/160	<1.0	2.6	2.5	2.4	<1.0	2.7	2.5	2.4

^a 8 cattle per group.

^b Dilutions in emulsion without FMDV antigen.

TABLE 4. Expected percentage of protection^a for FMD virus type O of cattle vaccinated with various antigen dilutions at different times post-vaccination (Mouse protection test)

Vaccine dilution ^b	Days post-vaccination		
	30	60	90
1/10	92	89	96
1/40	97	91	93
1/160	99	87	73

^a Gomes and Astudillo. *Bln Centro Panamericano Fiebre Aftosa 17-18*: 9-16, 1975.

^b Dilutions in emulsion without FMDV antigen.

Only at 3 months after vaccination did the protection level decrease appreciably for the 1:160 vaccine dilution.

Results of the challenge with subtype O₁ virus are listed in Table 5. Protection in this table means the absence of any lesion of the tongue-inoculated cattle except for the inoculation site and the absence of any lesion in the contact cattle. According to these criteria a higher number of animals was scored "not protected" in the contact group than in the tongue-inoculated group. In the group inoculated in the tongue only 2 cattle had generalized lesions while the tongue-inoculated non-vaccinated control cattle generalized in 48 hours. Thus, most lesions of vaccinated cattle developed between 5 and 10 days post-challenge.

There was no significant difference between the cattle PD₅₀ values at 30, 60 or 90 days (Table 5). However the PD₅₀ values calculated from the contact exposure group were significantly lower than those of the IDL group.

TABLE 5. Protection of cattle^a at challenge with FMDV type O₁

Vaccine Dilution ^b	Exposure route	Days post-vaccination			Total
		30	60	90	
1/10	IDL	4/4	4/4	4/4	12/12
	CONT	3/4	3/4	3/4	9/12
1/40	IDL	4/4	3/4	4/4	11/12
	CONT	1/4	2/4	3/4	6/12
1/160	IDL	2/4	3/4	1/4	6/12
	CONT	2/4	1/4	1/4	4/12
Controls	IDL	0/4	0/4	0/4	0/12
	CONT	0/4	0/4	0/4	0/12
Cattle PD ₅₀	IDL	160	160	115	
	CONT	40	40	56	

^a Protected = absence of foot lesions of IDL inoculated cattle and absence of lesions in contact cattle.

^b Dilutions in emulsion without FMDV antigen.

DISCUSSION

The usual time of challenge for potency assay with the traditional FMD vaccines having antigens

adsorbed to aluminum hydroxide is 21 days post-vaccination both for guinea pigs and for cattle (5). However, antibody levels of cattle vaccinated with oil adjuvanted vaccine may continue to rise until 90 days post-vaccination, while those of cattle vaccinated with aluminum hydroxide vaccine peak at approximately 30 days (3). It is therefore important to determine the optimum time for challenge of immunity potency tests of oil adjuvanted vaccines.

In the present study the immunity of both the guinea pigs and the cattle was challenged at 30, 60 and 90 days post-vaccination. The PD₅₀ values for guinea pigs, for those periods, listed in Table 2, do not indicate the need to challenge later than 30 days post-vaccination even though a slight increase in PD₅₀ values may occur until 60 days post-vaccination. The antibody titers (Table 3) for cattle and the results of challenge (Table 5) also show that, for all practical purposes, useful PD₅₀ estimations can be obtained when cattle are challenged 30 days after vaccination.

An earlier paper explored different ways of diluting the antigen for the PD₅₀ assay (2). One disadvantage of diluting the vaccine in an antigen-free emulsion is shown by the present experiment. The dose-response slope was very flat for both guinea pigs and cattle; and the vaccine must be diluted to high dilutions in order to reach the titration endpoint. This same observation has been made by Stellmann *et al.* (10) for aluminum hydroxide vaccine diluted in adjuvant containing diluent. They preferred diluting the vaccine in an immunologically neutral diluent over decreasing vaccine doses or diluting vaccine in diluent containing adjuvant. They also indicated that a flatter dose-response curve means a higher standard error and decreased sensitivity of the test system. However, with a water-in-oil emulsion, vaccine dilution in an inert substance is more difficult to accomplish (2). The use of decreasing doses in a guinea pig test appears to be impractical but experiments using the decreasing dose method for cattle should be explored.

The protection of the cattle as indicated in Table 5 seems to be less favorable than results of the serum antibody assays would predict. However, in the tongue-inoculated cattle all animals with

any foot lesion or all cattle exposed by contact with any oral or foot lesion were scored as "not protected". This category thus included several cattle with 1 or 2 foot lesions only, and those of the contact group with only a small oral lesion at the 10th day after start of the challenge. Most of such tongue-inoculated or contact cattle had high antibody titers.

It is likely that the combination of high virus levels in the environment and careful examination of the cattle at Day 5 contributed to the development of several primary site lesions. Similar observations were made by Gomes (8) for pigs.

REFERENCES

1. ABARACON, D.; GIACOMETTI, H.; MESQUITA, J. Etileneimina binaria (BEI) como inactivante de virus de la fiebre aftosa producida por diferentes técnicas semi-industriales. (In prep.).
2. AUGÉ DE MELLO, P.; ALONSO FERNANDEZ, A.; GOMES, I. Potency testing of oil adjuvanted foot-and-mouth disease vaccines. (In prep.).
3. AUGÉ DE MELLO, P.; ASTUDILLO, V.; GOMES, I.; CAMPOS GARCIA, J.T. Aplicación en el campo de vacuna antiaftosa oleosa e inactivada: vacunación y revacunación de bovinos jóvenes. (Field application of inactivated oil adjuvanted foot-and-mouth disease virus vaccine: vaccination and revaccination of young cattle). *Bltm Centro Panamericano Fiebre Aftosa 19-20*: 31-38, 39-47, 1975.
4. AUGÉ DE MELLO, P.; MESQUITA, J. Preparation of water-in-oil emulsion foot-and-mouth disease vaccine in a semi-industrial scale at the Pan-American Foot-and-Mouth Disease Center. (In prep.).
5. CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA. Manual de procedimientos para el control de las vacunas antiaftosas. *Ser. Man. Téc. No. 2*, 1974.
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, MARIA ELMA V. Prueba de micro-neutralización para estudios de anticuerpos de la fiebre aftosa. (Microtiter neutralization test for the study of foot-and-mouth disease antibodies). *Bltm Centro Panamericano Fiebre Aftosa 21-22*: 17-20, 21-24, 1976.
8. 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.
9. GOMES, I.; ASTUDILLO, V. Foot-and-mouth disease: Evaluation of mouse protection test results in relation to cattle immunity. *Bltm Centro Panamericano Fiebre Aftosa 17-18*: 9-16, 1975.
10. STELLMANN, C.; TERRÉ, J.; FAVRE, H.; BRUN, A.; FONTAINE, J. Comparison of foot-and-mouth disease vaccine potency testing on cattle in terms of the nature of the diluent. *Arch. of Virology 54*: 61-74, 1977.

resúmenes

abstracts

ARROWSMITH, A.E.M.

Texto en inglés. *Dev. Biol. Stand.* 35: 221-230, 1977. (*FMD Bull. Wellcome* 16 (9): 58, 1977). [Animal Virus Research Institute, Pirbright, Woking, Surrey, England]

Estudio sobre cepas del virus aftoso tipo O del Extremo Oriente

Se ha llevado a cabo un estudio sobre cepas del virus aftoso tipo O aislado en países del Extremo Oriente. Las cepas fueron comparadas con cepas convencionales de referencia y entre sí. Aunque los resultados indicaron ciertas diferencias entre las cepas, éstas no pudieron ser claramente clasificadas en grupos. Una variación continua resultó aparente, con relaciones cruzadas entre cepas, producidas más o menos fortuitamente. Los resultados confirmaron la teoría de que los actuales conceptos adoptados para la subtipificación deberían ser revisados, teniendo en cuenta las múltiples relaciones antigénicas.

A survey of foot-and-mouth disease type O strains from the Far East

A survey of type O foot-and-mouth disease virus strains isolated in Far Eastern countries has been carried out. The strains have been compared with standard reference strains and with each other. Although the results indicated differences between the strains, they could not be arranged in clearly distinct groups. A continuous variation was apparent with cross-relations between strains occurring more or less haphazardly. The results confirmed the view that current concepts of subtyping should be revised to take into account multiple antigenic relationships.

BAREI, S.; PEREIRA, H.G.; NARDELLI, L.; PANINA, G.; SIMONE, F. de

Texto en inglés. *Dev. Biol. Stand.* 35: 175-178, 1977. (*FMD Bull. Wellcome* 16 (8): 43, 1977). [Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia, Via Cremona 282, 25-100 Brescia, Italy]

Datos sobre el virus aftoso tipo A aislado en Italia en 1975

En diciembre de 1975 una cepa de virus aftoso tipo A fue aislada durante un brote en la región de Alejandría en Italia. El primer brote se produjo en cerdos alimentados con desperdicios crudos de una cantina cercana donde se usaba carne congelada importada. Otros brotes se produjeron en cerdos y en bovinos jóvenes no vacunados de una zona próxima al primer brote. No hubo mayor diseminación de la enfermedad. La cepa de virus aislada (A Italia/75) se comparó con otra cepa de tipo A en pruebas de fijación del complemento y seroneutralización. Se observó que la cepa A Italia/75 difería de la A Parma/62 (la actual cepa de vacuna

Data on a foot-and-mouth disease virus of type A isolated in Italy in 1975

A strain of foot-and-mouth disease virus type A was isolated during an outbreak in the Alessandria region of Italy in December 1975. The primary outbreak was in pigs fed uncooked garbage from a canteen where imported frozen meat was used. Further outbreaks occurred in pigs and young, non-vaccinated cattle in close proximity to the first outbreak. No further spread of disease took place. The virus strain isolated (A Italy/75) was compared with other type A strains in complement fixation and virus neutralization tests. It was noted that A Italy/75 differed from A Parma/62 (the current Italian vaccine strain) in that low 'r'

italiana) en que valores "r" muy bajos se obtuvieron en ambas direcciones en las pruebas de seroneutralización y de fijación del complemento. Sin embargo, las diferencias antigénicas observadas en pruebas de inmunidad cruzada fueron asimétricas, y la cepa A Parma/62 predominó sobre la A Italia/75. Ello explicaría el hecho de que el brote fue controlado con la vacuna A Parma/62. La cepa A Italia/75 también difiere de las cepas de virus A₅/Francia 1/68, A₂₂/Grecia y A₂₄Cruzeiro.

values were obtained in complement fixation and neutralization tests in both directions. However, the antigenic differences observed in cross-immunity tests were asymmetrical with A Parma/62 being dominant over A Italy/75. This would explain the fact that vaccination with A Parma/62 vaccine controlled the outbreak. The A Italy/75 strain also differed from the A₅/France 1/68, A₂₂/Greece and A₂₄Cruzeiro virus strains.

BERNHARDT, D.; RUNGE, W.; KINDT, H.

Texto en alemán. *Zbl. VetMed. (B)* 24: 293-296, 1977. (*FMD Bull. Wellcome* 16 (8): 51, 1977). [Behringwerken AG, Marburg/Lahn, German Federal Republic]

Ensayo en tres puntos para determinar la potencia de la vacuna antiaftosa en ratones

Se ha investigado un ensayo en tres puntos para determinar la potencia de las vacunas antiaftosas trivalentes en ratones. Se realizó la descarga utilizando cepas miotrópicas adaptadas a ratón de virus previamente pasado entre 26 y 51 veces en ratones. En experimentos preliminares se estableció un claro parentesco entre la edad de los ratones utilizados y su susceptibilidad al virus miotrópico. Ratones de 25 días fueron utilizados en todos los experimentos. La mejor respuesta de inmunidad conferida por la vacuna se obtuvo a los 15 días postvacunación, considerándose este tiempo como el más apropiado para la descarga. Cuatro experimentos con una vacuna comercial indicaron que los resultados del ensayo eran reproducibles.

Three-point assay in mice for the potency testing of foot-and-mouth disease vaccine

A three-point assay for determining the potency of trivalent foot-and-mouth disease vaccines in mice has been investigated. Challenge was with mouse-mytotropic strains of virus previously passaged between 26 and 51 times in mice. Preliminary experiments established a clear relationship between the age of the mice used and their susceptibility to mytropic virus. In all subsequent experiments, mice aged 25 days were used. It was shown that the optimal immune response to vaccination in these mice occurred at 15 days post-vaccination and this was considered the most appropriate time for challenge injection. Four experiments with a commercial vaccine indicated that the results of the assay were reproducible.

CUNLIFFE, H.R.; BLACKWELL, J.H.

Texto en inglés. *J. Food Protection* 40 (6): 389-392, 1977. (*FMD Bull. Wellcome* 16 (8): 54, 1977). [Plum Island Animal Disease Center, Greenport, Long Island, New York 11944, USA]

Supervivencia del virus aftoso en caseína y en caseinato de sodio producidos a partir de leche de vacas infectadas

La transmisión del virus aftoso a través de la leche fue demostrada en la epizootia de 1967-68 en Inglaterra. En una serie de experimentos se ha investigado la supervivencia del virus en la leche y en

Survival of foot-and-mouth disease virus in casein and sodium caseinate produced from the milk of infected cows

Milk-borne transmission of foot-and-mouth disease virus was implied during the 1967-68 epizootic in England. The survival of the virus in milk and dairy products has been investigated in

los productos lácteos. Se prepararon ocho lotes de caseína de leche recogida a intervalos diferentes después de haber infectado las vacas con fiebre aftosa. Se obtuvo caseína cruda por acidulación de la leche desnatada hasta un pH de 4,6 con ácido hidroclicóric. Cada uno de los lotes fue examinado para determinar el grado de infecciosidad de fiebre aftosa, tanto en forma de caseína como caseinato de sodio, en cultivos celulares y por inoculación en los animales. Ninguna de las muestras examinadas en células primarias de riñón bovino mostró evidencia de virus infeccioso. Sin embargo, los animales inoculados con las muestras contrajeron fiebre aftosa en una de las dos pruebas con caseína preparada a partir de leche desnatada, y en tres de las seis pruebas con leche desnatada pasteurizada. Muestras de uno de dos lotes de caseína en polvo infectaron a los animales estudiados. Los animales inoculados con muestras de cuatro de seis lotes de caseína preparada a partir de leche extraída de vacas no infectadas, a la que se había añadido virus aftoso antes de pasteurizarla, también contrajeron la enfermedad.

DALSGAARD, K.

Texto en inglés. *Acta vet. Scand.* 18: 361-366, 1977. (*FMD Bull. Wellcome* 16 (11): 70, 1977). [State Veterinary Institute for Virus Research, Lindholm, Kalvehave, Denmark]

Adyuvante de saponina. V. Precipitación de componentes séricos por adyuvantes de saponina no purificados en difusión en gel de agar

Se observó que dos preparados comerciales de saponina con una actividad adyuvante conocida, produjeron una precipitación no específica en las pruebas de doble difusión en gel con sueros de conejo, cobayo, ovino, bovino, caballo y cerdo. Extractos crudos preparados a partir del árbol sudamericano Quillaja saponaria Molina produjeron una precipitación no específica similar con todos los sueros examinados. El preparado con adyuvante Quil A no dio lugar a anticuerpos precipitantes en conejos, ni reaccionó de manera no específica con ninguno de los sueros estudiados. Se sugiere que la precipitación de suero es una propiedad de algunas de las impurezas en los adyuvantes de saponina, y que esta precipitación podría ser uno de los mecanismos causantes de las reacciones locales.

a series of experiments. Eight batches of casein were prepared from milk collected at various times after infection of cows with foot-and-mouth disease. Raw casein was obtained by acidulation of skim-milk to pH 4.6 with hydrochloric acid. Each batch was tested for foot-and-mouth disease virus infectivity either as casein or sodium caseinate in cell cultures and by inoculation of cattle. None of the samples assayed in primary bovine kidney cells showed evidence of infectious virus. However, cattle inoculated with the sample developed foot-and-mouth disease in one of two trials with casein prepared from raw skim-milk and in three of six trials with skim-milk which had been pasteurized. Samples from one of two batches of dried casein infected test cattle. Samples from four of six batches of casein prepared from non-infected cows milk to which foot-and-mouth disease virus was added prior to pasteurization also induced disease in inoculated cattle.

Saponin adjuvants. V. Precipitation of serum components by non-purified saponin adjuvants in agar gel diffusion

It was found that two commercial preparations of saponin which had known adjuvant activity, produced non-specific precipitation in double gel diffusion tests with rabbit, guinea pigs, horse, sheep, cattle, and pig sera. Crude extracts prepared from the South American tree Quillaja saponaria Molina produced similar non-specific precipitation with all the sera tested. The adjuvant preparation, Quil A, did not induce precipitating antibodies in rabbits, nor did it react non specifically with any of the sera tested. It is suggested that serum precipitation is a property of some of the impurities in saponin adjuvants and that this precipitation might be one of the mechanisms by which local reactions are caused.

DALSGAARD, K.; JENSEN, M.H.

Texto en inglés. *Acta vet. Scand.* 18: 367-373, 1977. (*FMD Bull. Wellcome* 16 (11): 70, 1977). [State Veterinary Institute for Virus Research, Lindholm, Kalvehave, Denmark]

Adyuvante de saponina. VI. La actividad adyuvante de Quil A en vacunación trivalente contra la fiebre aftosa en bovinos y cobayos

El adyuvante de saponina Quil A fue incorporado a una vacuna antiaftosa trivalente concentrada, preparada a partir de virus desarrollados en células BHK. La actividad adyuvante fue evaluada en razón de los anticuerpos neutralizantes. Cinco dosis de 10 ml de vacuna con o sin 1 mg/dosis de Quil A fueron inyectadas a grupos de 6 bovinos. Las vacunas con Quil A dieron lugar a títulos de anticuerpos significativamente más altos que las vacunas sin adyuvante. Una dosis de 5 ml con Quil A indujo niveles de anticuerpos similares a los inducidos por una dosis de 10 ml sin Quil A. Las pruebas en cobayos también indicaron que Quil A aumentó considerablemente la potencia de la vacuna, cualquiera que fuere el tipo de virus tratado. Las reacciones locales fueron consideradas como insignificantes en las pruebas con bovinos.

DALSGAARD, K.; JENSEN, M.H.; SORENSEN, K.J.

Texto en inglés. *Acta vet. Scand.* 18: 349-360, 1977. (*FMD Bull. Wellcome* 16 (11): 69, 1977). [State Veterinary Institute for Virus Research, Lindholm, Kalvehave, Denmark]

Adyuvantes de saponina. IV. Evaluación del adyuvante Quil A en la vacunación de bovinos contra la fiebre aftosa

En trabajos anteriores del mismo autor se puso de manifiesto que una sustancia adyuvante virtualmente pura, denominada Quil A, podía ser aislada a partir de la corteza del Quillaja saponaria Molina. Se investigó el uso de Quil A en vacunas antiaftosas. Experimentos preliminares con una vacuna Frenkel indicaron que 1.000 µg de Quil A por dosis era el nivel que ofrecía el mejor efecto adyuvante, con el mínimo de reacciones adversas. En los experimentos realizados con vacunas BHK se demostró que, agregando 1 mg de Quil A, se obtenía un aumento significativo en la producción de anticuerpos neutralizantes. Se estudió la respuesta de

Saponin adjuvants. VI. The adjuvant activity of Quil A in trivalent vaccination of cattle and guinea pigs against foot-and-mouth disease

The saponin adjuvant Quil A was incorporated in a trivalent, concentrated foot-and-mouth disease vaccine prepared from virus grown on BHK cells. Adjuvant activity was assessed on the basis of neutralizing antibodies. Five of 10 ml doses of vaccine with or without 1 mg/dose of Quil A were each injected into groups of six cattle. Vaccines with Quil A stimulated significantly higher antibody titers than those without adjuvant. A 5 ml dose with Quil A induced antibody levels similar to those induced by a 10 ml dose without Quil A. Tests in guinea pigs also indicated that Quil A significantly increased the potency of vaccine, irrespective of the virus type involved. In cattle experiments, local reactions to Quil A vaccine were considered to be negligible.

Saponin adjuvants. IV. Evaluation of the adjuvant Quil A in the vaccination of cattle against foot-and-mouth disease

Previous work by the author has shown that a virtually pure adjuvant substance, designated Quil A, could be isolated from the cortex of Quillaja saponaria Molina. The use of Quil A in foot-and-mouth disease vaccines has now been investigated. Preliminary experiments with a Frenkel vaccine indicated that a level of 1,000 µg Quil A per dose combined the best adjuvant effect with the minimum of adverse reactions. In experiments with BHK vaccines it was shown that the additions of 1 mg of Quil A produced a highly significant increase in the production of neutralizing antibodies. In one group of animals in which responses were

un grupo de animales durante seis meses, observándose que los títulos de anticuerpos permanecieron seis veces más altos que en los de un grupo testigo. Las reacciones locales producidas por Quil A fueron consideradas como aceptables, y resultaron mucho más inferiores que las registradas anteriormente con saponina cruda.

monitored for six months, the antibody titers remained 6-fold higher than in a control group. The local reactions induced by Quil A were considered to be acceptable and were much lower than those previously reported as induced by crude saponin preparations.

DHENNIN, L.; LABIE, J.

Texto en francés. *Bull. Acad. vet. Fr.* 50 (2): 255-266, 1977. (*FMD Bull. Wellcome* 16 (10): 64, 1977). [Laboratoire Central de Recherches Vétérinaires d'Alfort, 22 rue Pierre Curie, 94700 Maisons-Alfort, France]

Virulencia de la leche y la sangre de vacas lecheras infectadas experimentalmente con fiebre aftosa

La infectividad de muestras de leche y sangre extraídas de vacas lecheras que habían sido inoculadas por vía intravenosa e intramamaria con virus aftoso tipo O, fue investigada hasta 84 horas post-inoculación (HPI). Se observaron títulos elevados en la leche (10^{-6} a 10^{-7}) entre las 24 y las 48 HPI. Los títulos máximos observados en la sangre se dieron entre las 72-96 HPI. La leche dio siempre títulos más elevados que la sangre en todas las muestras examinadas. El virus permaneció en la leche por un período mínimo de 6 días, y de 4 días en la sangre. Se observó que el virus era detectable en la leche antes de la aparición de las primeras lesiones, y antes de que los animales experimentaran un aumento de la temperatura. La producción de leche en vacas infectadas disminuyó drásticamente con la aparición de las primeras aftas, pero volvió a ser normal a los 15 días. Se observó un aumento del pH en la leche de las vacas infectadas. Igualmente y en las primeras etapas, se detectó anticuerpo neutralizante en la leche de las vacas infectadas, aun cuando el virus infeccioso todavía se hallaba presente.

Virulence of milk and blood during experimental foot-and-mouth disease in dairy cows

The infectivity of milk and blood samples from dairy cows inoculated intravenously and diathermally with foot-and-mouth disease virus type O was investigated for up to 84 hours post-inoculation (HPI). High titers of virus (10^{-6} to 10^{-7}) were observed in the milk at 24 to 48 HPI. Maximum titers in the blood were noted at 72 to 96 HPI. In all samples tested, higher titers were found in milk than in blood. Virus persisted in milk for at least six days and in blood, for at least four days. It was noted that virus was detected in the milk before the appearance of primary lesions and before any elevation of body temperature was recorded. Milk yield in infected cows fell drastically at the time of appearance of primary aphthae but returned to normal in about 15 days. Increase in the pH of the milk was also noted in infected cattle. Neutralizing antibody was also detected at an early stage in the milk of infected cattle even though infective virus was still present.

ERCEGAN, M.; PANJEVIC, D.; ERCEGOVAC, D.

Texto en serbio-croata. *Vet. Glasn.* 30 (10): 829-841, 1976. (*FMD Bull. Wellcome* 16 (7): 46, 1977). [Veterinarski Institut, Novi Sad, Yugoslavia]

Investigación sobre la inmunogenicidad de la vacuna antiaftosa con adyuvante oleoso en cerdas de cría

La inmunogenicidad de una vacuna antiaftosa con adyuvante oleoso preparada a partir de virus inactivado con glicidaldeído ha sido investigada en cerdas de cría vacunadas durante diferentes estados de preñez. Se observaron títulos altos de anticuerpos hemaglutinantes en el suero de las cerdas a los 7 días postvacunación. Todas las cerdas vacunadas a los 105, 75, 45 y 15 días de preñez dieron títulos altos de anticuerpos en el suero y calostro el día del parto. Los lechones nacidos de cerdas vacunadas dieron también títulos altos de anticuerpos después de la lactación. Estos títulos disminuyeron progresivamente, aunque a los seis meses todavía tenían un 50% de nivel de protección. Los títulos obtenidos en cerdas después de haberse empleado una vacuna antiaftosa con saponina fueron generalmente más bajos que los observados en los casos de vacunación con adyuvante oleoso. El mayor número de lechones nacidos muertos se registró en los grupos inyectados con vacunas con adyuvante oleoso (1,88 por camada, en comparación con el 1,64 por camada registrado en los cerdos vacunados con saponina — 1,31 en cerdos testigos no vacunados).

Investigation of the immunogenicity of oil adjuvanted foot-and-mouth disease vaccine in breeding sows

The immunogenicity of an oil adjuvanted foot-and-mouth disease vaccine prepared from virus inactivated with glycidaldehyde has been investigated in breeding sows vaccinated at different stages during pregnancy. High titers of haemagglutinating antibodies were observed in the serum of sows as early as seven days post-vaccination. All sows vaccinated at 105, 75, 45, and 15 days of pregnancy had high titers of antibodies in serum and colostrum on the day of farrowing. Piglets born to vaccinated sows also had high antibody titers after suckling. These titers progressively declined although at six weeks of age they were still at a level estimated to provide 50% protection. Titers obtained in sows following the use of a saponin-containing foot-and-mouth disease vaccine were generally lower than those observed after vaccination with oil adjuvanted vaccine. The highest numbers of stillborn piglets were in groups given the oil adjuvanted vaccine (1.88 per litter compared with 1.64 per litter in pigs given saponin vaccine — 1.31 in control, non-vaccinated pigs).

KARPINSKY, S.; TERESZCZUK, S.

Texto en polaco. *Mec. Wet.* 33 (1): 26-29, 1977. (*FMD Bull. Wellcome* 16 (12): 77, 1977).

Estudios sobre la supervivencia del virus de la enfermedad vesicular del cerdo bajo diferentes condiciones experimentales

La infectividad del virus de la enfermedad vesicular del cerdo se perdió totalmente entre las 4 y 6 semanas de su almacenaje en estiércol líquido o agua no tratada a 18–22° C. A 4° C, el título bajó de 10^7 DICT₅₀ inicial a $10^{3.5}$ DICT₅₀ a los 8 meses. No se observó ninguna pérdida en la titulación después de 8 meses de almacenamiento a

Studies on the survival of swine vesicular disease virus under various experimental conditions

When swine vesicular disease virus was stored in liquid manure or untreated water at 18 to 22° C, infectivity was totally lost after 4 to 6 weeks. At 4° C, the titer decreased from an initial 10^7 TCID₅₀ to $10^{3.5}$ TCID₅₀ after 8 months. No loss in titer was observed after storage for 8 months at —18° C. The virus in chlorinated water

a -18° C. El virus en agua clorada resultó completamente inactivado a los 30 minutos. Sin embargo, la presencia de suero de ternero en el agua clorada incrementó el tiempo de supervivencia vírica. El virus conservado a 18° C en estiércol líquido consiguió sobrevivir por un mínimo de 7 días.

was completely inactivated after 30 minutes. However, the presence of calf serum in chlorinated water increased viral survival time. The virus could survive in liquid manure for at least 7 days when kept at 18° C.

KIHM, U.

Texto en francés. *Dev. Biol. Stand.* 35: 149-153, 1977. (*FMD Bull. Wellcome* 16 (7): 47, 1977). [Federal Vaccine Institute, Hagvenaustrasse 74, 4025 Bale, Switzerland]

Comparación de una vacuna antiaftosa bivalente con adyuvante oleoso y una vacuna con adyuvante DEAE-dextran en los cerdos

La eficacia de vacunas antiaftosas bivalentes (O/C) que contenían emulsión oleosa o DEAE-dextran como adyuvantes ha sido comparada en cerdos. Se inyectó la vacuna con adyuvante oleoso en una dosis de 2 ml, mientras que la dosis de la vacuna con DEAE-dextran fue de 5 ml. Las reacciones locales en los puntos de inoculación fueron más severas con la vacuna de adyuvante oleoso, aunque la regresión de las lesiones fue considerable a los tres meses postvacunación. En las descargas experimentales, la vacuna con adyuvante oleoso dio una protección en cerdos de 90% a 100% y 55% a los 5, 21 y 90 días postvacunación respectivamente. En cuanto a la vacuna con DEAE-dextran, la protección fue de 80% a los 5 días y de 20 a 70% a los 21 días postvacunación. No se observó ninguna correlación entre el nivel de anticuerpos neutralizantes en el suero de cerdos vacunados y la resistencia a la descarga.

Comparison of oil adjuvanted and DEAE-dextran adjuvanted bivalent foot-and-mouth disease vaccines in pigs

The efficacy of bivalent (O/C) foot-and-mouth disease vaccines containing either oil emulsion or DEAE-dextran as adjuvant has been compared in pigs. The oil adjuvanted vaccine was injected in a 2 ml dose, the DEAE-dextran vaccine in a 5 ml dose. Local reactions at the inoculation sites were more severe with the oil adjuvanted vaccine than with the DEAE-dextran vaccine but inspection at the three months post-vaccination revealed considerable regression of the lesions. In challenge experiments the oil adjuvanted vaccine protected 90% to 100% and 55% of pigs at 5, 21 and 90 days post-vaccination respectively. For the DEAE-dextran vaccine, protection was 80% after five days and 20 to 70% at 21 days post-vaccination. No correlation between neutralizing antibody levels in the serum of vaccinated pigs and resistance to challenge was observed.

MIZRAHI, A.

Texto en inglés. *Biotech. Bioeng.* 19: 1557-1561, 1977. (*FMD Bull. Wellcome* 16 (12): 76, 1977). [Dept. of Biotechnology, Israel Institute for Biological Research, Ness Ziona 70400, Israel]

Primatone RL en medios de cultivo de células de mamífero

Primatone RL, un hidrolizado péptico hidrosoluble de tejido animal ha sido investigado como

Primatone RL in mammalian cell culture media

Primatone RL, a water soluble peptic digest of animal tissue, was investigated as a serum

sustituto del suero en medios de cultivos de células de mamífero, aunque la sustitución no fue enteramente posible. La adición de 0,1% de Primatone a 6M de medio de cultivo que contenía 1% de suero bovino dio como resultado una producción de células BHK similar a la obtenida en medios testigo que contenían 5% de suero bovino. El Primatone no manifestó efectos nocivos en células BHK cultivadas en él durante un largo período. La producción de virus de encefalomiocarditis desarrollado en cultivos de células BHK en un medio que contenía Primatone fue igual a la obtenida a partir de células desarrolladas en un medio convencional.

substitute in mammalian cell culture media. It was not possible to completely substitute Primatone for serum. The addition of 0.1% Primatone to 6M medium containing 1% bovine serum resulted in yields of BHK cells similar to those obtained with control media containing 5% bovine serum. Primatone appeared to have no adverse effects on BHK cells cultivated in it for a long period. The yield of encephalomyocarditis virus grown in BHK cells culture in Primatone-containing medium was the same as that obtained from cells grown in conventional medium.

PEREIRA, H.G.

Texto en inglés. *Dev. Biol. Stand.* 35: 167-174, 1977. (*FMD Bull. Wellcome* 16 (8): 51, 1977). [Animal Virus Research Institute, Pirbright, Woking, Surrey, England]

Subtipificación del virus aftoso

Los criterios adoptados en la actualidad para distinguir los diferentes subtipos del virus aftoso se basan en la reacción antigénica recíproca, revelada en las pruebas serológicas. La técnica más generalizada para esto es la de fijación de complemento, que normalmente muestra una buena correlación con otras pruebas serológicas y con pruebas de protección cruzada *in vivo*. Se han establecido niveles arbitrarios de reacción cruzada para diferenciar entre subtipo y tipo. Las dificultades prácticas relacionadas con la interpretación de los resultados de subtipificación se deben principalmente a reacciones antigénicas asimétricas, a variaciones en la especificidad de antisueros preparados contra virus dados y a discrepancias entre los resultados de las diferentes pruebas. Sería de gran importancia demostrar que existe evidencia de variaciones antigénicas entre los tipos, en forma de "deriva" gradual, dando lugar a un continuo espectro sin clara delimitación entre las sucesivas variantes. Ello hace imposible demarcar criterios para la diferenciación de los subtipos. Se discuten varios medios para superar las dificultades.

Subtyping of foot-and-mouth disease virus

The criteria presently adopted for the distinction of foot-and-mouth disease virus subtypes are based on reciprocal antigenic relationships revealed by serological tests. The technique most commonly used for this purpose is complement fixation which, in general, shows good correlation with other serological tests and with cross-protection *in vivo*. Arbitrary levels of cross-reactivity have been established for subtype and type differentiation. Practical difficulties in interpreting subtyping results are mainly due to asymmetric antigenic relationships, to variations in specificity of antisera prepared against given viruses and to discrepancies between results of different tests. It may be of greater importance that there is evidence of intratypic antigenic variations occurring as a gradual 'drift' giving rise to a continuous spectrum without clear-cut demarcations between successive variants. This makes it impossible to devise absolutely clear-cut criteria for subtype differentiation. Various ways of overcoming the difficulties mentioned are discussed.

PEREZ, H.A.; ROSSETTI, O.L.; CAMPOS, R.A.

Texto en español. *Rev. Asoc. Arg. Microbiol.* 8 (3): 93-98, 1976. (*FMD Bull. Wellcome* 16 (11): 72, 1977). [Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina]

Etapas tempranas en la replicación del virus de la fiebre aftosa. Localización subcelular del virus penetrante

Se han estudiado las interrelaciones inmediatas a la adsorción de virus aftoso O₁ Caseros en células de riñón bovino, utilizándose como marcador principal la infectividad viral residual. La determinación de la infectividad intracelular a través de un ciclo de replicación viral indica que hasta los 80-90 minutos, la casi totalidad corresponde al virus penetrante. Al analizar fracciones subcelulares infectadas se observa que, en etapas tempranas, la infectividad residual se halla fundamentalmente asociada a la fracción sedimentable a 15.000 g, rica en lisosomas.

Early stages of replication of foot-and-mouth disease virus. Subcellular localization of penetrating virus

The early stages of the infection of primary cultures of foetal bovine kidney cells by foot-and-mouth disease virus strain O₁ Caseros were investigated in single-cycle studies. Following penetration of virus there was a 15 minute period when the level of intracellular infectivity fell. There was then a 90 minute lag phase followed by a period of exponential virus growth. Analysis of subcellular fractions during these early stages of infection indicated that almost all the infectivity present was associated with a lysomal-rich fraction which sedimented at 15,000 g.

SELLERS, R.F.; HERNIMAN, K.A.J.; GUMM, I.D.

Texto en inglés. *Res. vet. Sci.* 23: 70-75, 1977. (*FMD Bull. Wellcome* 16 (8): 50, 1977). [Animal Virus Research Institute, Pirbright, Woking, Surrey, England]

La transmisión aérea del virus aftoso de cerdos vacunados y recuperados, bovinos y ovinos después de expuestos a la infección

En dos períodos diferentes se detectó virus aftoso en el aire de establos que albergaron cerdos susceptibles vacunados o recuperados, bovinos y ovinos expuestos a la infección. El primer período fue entre 30 minutos y 22 horas después de la exposición y afectó a la totalidad de los animales. El segundo período fue entre dos y siete días después de la exposición y se dio en los animales susceptibles y vacunados que desarrollaron lesiones clínicas tras la exposición, y en ovinos y cerdos vacunados y recuperados que no desarrollaron lesiones clínicas. La vacunación de animales antes de la exposición dio como resultado un volumen menor o nulo de virus recuperado. El virus excretado durante el primer período fue atribuido al virus que quedó atrapado en el animal durante la exposición, y el del segundo período, a la multiplicación limitada en el sistema respiratorio. Se sugiere

The airborne dispersal of foot-and-mouth disease virus from vaccinated and recovered pigs, cattle and sheep after exposure to infection

Foot-and-mouth disease virus was detected during two periods in the air of loose-boxes which housed susceptibles, vaccinated or recovered pigs, cattle or sheep exposed to infection. The first period was 30 minutes to 22 hours after exposure and occurred in all animals. The second was two to seven days after exposure and occurred with those susceptible and vaccinated animals which developed clinical lesions after exposure and with vaccinated and recovered sheep and pigs which did not develop clinical lesions. Vaccination of animals before exposure resulted in less or no virus being recovered. Virus excreted during the first period was attributed to virus trapped on the animal during exposure and, virus during the second period to limited multiplication in the respiratory tract. Control of movement for two weeks following contact with infection is

un control del movimiento durante las dos semanas siguientes a la infección por contacto, como medida preventiva para evitar la difusión de la fiebre aftosa en áreas con animales vacunados.

suggested as a means of preventing the spread of foot-and-mouth disease in areas that contain vaccinated animals.

STELLMANN, C.; TERRE, J.; FAVRE, H.; BRUN, A.; FONTAINE, J.

Texto en inglés. *Arch. Virol.* 54: 61-74, 1977. (*FMD Bull. Wellcome* 16 (8): 52, 1977). [IFFA - Merieux, Lyon, France]

Comparación de la potencia de la vacuna antiaftosa en bovinos, en relación con la naturaleza del diluyente

Se ha llevado a cabo un análisis de las pruebas de potencia de las vacunas antiaftosas. En este análisis se utilizaron datos obtenidos de más de 5.000 bovinos. Se estudiaron diferentes sistemas de pruebas con diluciones con buffer sin adyuvante (sistema TA), diluciones con buffer sin adyuvante (sistema TC) y dosis de volumen variable sin diluciones (sistema VV). Los trabajos en Francia demostraron que el sistema TC era 1,38 veces más sensible que el sistema VV y 2,60 veces más sensible que el sistema TA. Esta sensibilidad estaba estrechamente relacionada con la curva de la respuesta a la dosis. Cuando se utilizó el mismo número de animales, el sistema TC resultó 1,69 veces más exacto que el sistema VV y 2,97 veces más exacto que el sistema TA.

Comparison of foot-and-mouth disease vaccine potency testing on cattle in terms of the nature of the diluent

An analysis of potency tests of foot-and-mouth disease vaccines has been carried out. Data obtained from over 5,000 cattle were used in the analysis. Test systems involving dilutions with buffer containing adjuvant (TA system), dilutions with buffer not containing adjuvant (TC system) and variable volume doses with no dilutions (VV system) were studied. Work in France showed that the TC system was 1.38 times more sensitive than the VV system and 2.60 times more sensitive than the TA system. This sensitivity was linked to the dose-response slope. When an equal number of animals were used, the TC system was 1.69 times more precise than the VV system and 2.97 times more precise than the TA system.

bibliografía sobre enfermedades vesiculares

vesicular diseases bibliography

BACHRACH, H.L.; MOORE, D.M.; McKERCHER, P.D.; POLATNICK, J.

Una vacuna experimental preparada con subunidades del virus aftoso. *Texto en inglés.* (An experimental subunit vaccine for foot-and-mouth disease). *Dev. Biol. Stand. 35*: 155-160, 1977. (*FMD Bull. Wellcome 16* (7): 48, 1977). [Plum Island Animal Disease Center, Greenport, Long Island, New York 11944, USA]

CLARKE, J.B.; SPIER, R.E.

Estudio sobre la susceptibilidad al virus aftoso de cultivos de células BHK procedentes de diversas fuentes. *Texto en inglés.* (Studies on the susceptibility to foot-and-mouth disease virus of BHK cell cultures derived from various sources). *Dev. Biol. Stand. 35*: 61-66, 1977. (*FMD Bull. Wellcome 16* (8): 53, 1977). [Animal Virus Research Institute, Pirbright, Woking, Surrey, England]

GROWTHER, J.R.

Examen de las diferencias entre cepas de virus aftoso usando la técnica de radioinmunoensayo. *Texto en inglés.* (Examination of differences between foot-and-mouth disease virus strains using a radioimmunoassay technique). *Dev. Biol. Stand. 35*: 185-193, 1977. (*FMD Bull. Wellcome 16* (9): 59, 1977). [Animal Virus Research Institute, Pirbright, Woking, Surrey, England]

ERCEGOVAC, D.; PANJEVIC, D.; DOBRIC, D.; STUDEN, M.; LOLIN, M.

Vacuna antiaftosa para bovinos inactivada con etileneimina y con un adyuvante oleoso. *Texto en serbio-croata.* (A foot-and-mouth disease vaccine for cattle inactivated with ethyleneimine and containing an oil adjuvant). *Vet. Glasn. 30* (5): 411-414, 1976. (*FMD Bull. Wellcome 16* (7): 45, 1977). [Vet. Fak., Beograd, Yugoslavia]

MIZRAHI, A.; SHAHAR, A.

Sustitución parcial de suero por proteínas vegetales en medio de cultivo BHK. *Texto en inglés.* (Partial replacement of serum by vegetable proteins BHK culture medium). *J. Biol. Stand. 5*: 327-332, 1977. (*FMD Bull. Wellcome 16* (11): 71, 1977). [Israel Institute for Biological Research, Ness Ziona, 70400, Israel]

NARAYANA RAO, C.V.; JANAKIRAMAN, D.; RAMACHANDRAN, S.; QUADER, S.A.

Una nota sobre los efectos citopáticos del virus aftoso en cultivos de células tiroideas de ternero. *Texto en inglés.* (A note on the cytopathic effects of foot-and-mouth disease virus in calf thyroid cell cultures). *Indian J. anim. Sci. 45* (5): 295-298, 1975. (*FMD Bull. Wellcome 16* (10): 65, 1977). [Institute of Veterinary Preventive Medicine, Ranipet, Tamil Nadu, India]

NEUGEBAUER, W.

Fiebre aftosa en el oso negro tibetano (*Ursa thibetanus*). *Texto en alemán.* (Foot-and-mouth disease in the Tibetan black bear (*Ursa thibetanus*). *Zool. Garten 46* (3): 195-197, 1976. (*FMD Bull. Wellcome 16* (9): 57, 1977). [Zoologisch - Botanischen Garten Wilhema, Stuttgart, Germany]

PYE, D.

Evaluación cuantitativa de suero para cultivos celulares. *Texto en inglés.* (Quantitative evaluation of

serum for cell culture). *J. Biol. Stand.* 5: 307-314, 1977. (*FMD Bull. Wellcome* 16 (11): 72, 1977). [R. & D. Division, Commonwealth Serum Laboratories, 45 Poplar Road, Parkville, Victoria 3052, Australia]

SAKAKI, K.; SUPHAVILAI, P.; TOKUDA, G.

Prueba indirecta de fijación de complemento para el cálculo de anticuerpos contra la fiebre aftosa en bovinos. *Texto en inglés.* (Antibody estimation by indirect complement fixation test for foot-and-mouth disease in cattle). *Nat. Inst. anim. Hlth Quart.* 17: 45-53, 1977. (*FMD Bull. Wellcome* 16 (11): 69, 1977). [Second Research Division, National Institute of Animal Health, Kodaïra, Tokyo 187, Japan]

SANTUCCI, J.

Algunas observaciones y comentarios sobre la evolución de la lucha contra la fiebre aftosa en el Oriente Medio durante los quince años comprendidos entre 1962-1977. *Texto en francés.* (Some observations and comments on the development of foot-and-mouth disease control in the Middle East during the fifteen years from 1962-1977). *Bull. Acad. vet. Fr.* 50 (2): 323-333, 1977. (*FMD Bull. Wellcome* 16 (10): 63, 1977).

SCOTT, J.M.; PEGRAM, R.G.; HOLMES, P.H.; PAY, T.W.F.; KNIGHT, P.A.; JENNINGS, F.W.; URQUHART, G.M.

Inmunosupresión en la tripanosomiasis bovina: estudios en el campo utilizando vacunas antiaftosas y anticlostridios. *Texto en inglés.* (Immunosuppression in bovine trypanosomiasis: field studies using foot-and-mouth disease vaccine and clostridial vaccine). *Trop. Anim. Hlth Prod.* 9: 159-165, 1977. (*FMD Bull. Wellcome* 16 (11): 68, 1977). [Dept. Vet. Services, Ethiopian Ministry of Agriculture, Addis Abeba, Ethiopia]

SPIER, R.E.

Determinación del tiempo para cosechar cultivos de virus aftoso midiendo la concentración de dehidrogenasa láctica en el sobrenadante. *Texto en inglés.* (Determination of the time to harvest foot-and-mouth disease virus culture by measurements of the supernatant concentration of lactic dehydrogenase). *Biotech. Bioeng.* 19: 929-932, 1977. (*FMD Bull. Wellcome* 16 (8): 54, 1977). [Animal Virus Research Institute, Pirbright, Woking, Surrey, England]

SPIER, R.E.; STAPLE, R.F.; PRINCE, M.; ROWE, L.; FLETTON, B.; MOWAT, G.N.

Proceso simplificado para la producción de vacuna antiaftosa a partir de suspensiones de células BHK₂₁ Clon 13 desarrolladas en botellas pirex de 10 litros. *Texto en inglés.* (A simplified process for the production of foot-and-mouth disease vaccine from BHK₂₁ Clone 13 suspension cells grown in 10 litre pyrex reagents bottles). *Bull. Off. int. Epiz.* 85 (9-10): 995-1010, 1976. (*FMD Bull. Wellcome* 16 (11): 71, 1977). [Animal Virus Research Institute, Pirbright, Woking, Surrey, England]

STROBBE, R.; LACROIX, C.; CHARLIER, G.; DEBECQ, J.

Titulación rutinaria de suspensiones de virus aftoso por ultracentrifugación analítica. 2. Método de equilibrio de sedimentación. *Texto en inglés.* (Routine titration of foot-and-mouth disease virus suspensions by analytical ultracentrifugation. 2. Sedimentation equilibrium method). *Arch. exp. VetMed.* 31 (3): 397-404, 1977. (*FMD Bull. Wellcome* 16 (10): 65, 1977). [Institut National de Recherches Vétérinaires, Groeselenberg 99, B-1180 Bruxelles, Belgium]

TRAUTMAN, R.; HARRIS, W.F.

Enfoque por medio de modelos y simulación en computadora sobre el mecanismo de las pruebas de

neutralización del virus aftoso. *Texto en inglés.* (Modeling and computer simulation approach to the mechanism of foot-and-mouth disease virus neutralization assays). *Scand. J. Immunol.* 6: 831-841, 1977. (*FMD Bull. Wellcome* 16 (10): 63:1977). [Plum Island Animal Disease Center, Greenport, Long Island, New York 11944, USA]

VELEVA, E.B.

Correlación entre la estructura química y la actividad biológica de los anticuerpos de la fiebre aftosa. *Texto en búlgaro.* (Correlation between chemical structure and biological activity of foot-and-mouth disease antibodies). *Vet. Med. Nauk.* (Sofia) 14 (2): 89-93, 1977. (*FMD Bull. Wellcome* 16 (10): 64, 1977).

WATSON, J.G.; GARLAND, A.J.M.

Malta: fiebre aftosa 1975. *Texto en inglés.* (Malta: foot-and-mouth disease 1975). *State vet. J.* 32 (95): 138-151, 1977. (*FMD Bull. Wellcome* 16 (8): 50, 1977).

WATSON, J.G.; GARLAND, A.J.M.

Malta: enfermedad vesicular del cerdo 1975. *Texto en inglés.* (Malta: swine vesicular disease 1975). *State vet. J.* 32 (95): 152-156, 1977. (*FMD Bull. Wellcome* 16 (8): 55, 1977).

ZOLETTO, R.; GAGLIARDI, G.

Nuevos medios y sus ventajas para la producción de células en suspensión y virus aftoso. *Texto en inglés.* (New media and their advantages in the production of suspended cells and foot-and-mouth disease virus). *Dev. Biol. Stand.* 35: 27-31, 1977. (*FMD Bull. Wellcome* 16 (7): 48, 1977). [Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Via. G. Orus 2, 35100 Padova, Italy]

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 Sutmöller, Jefe de los Laboratorios
Dr. Roberto Goić, Jefe de Asesoría de Campo
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 Sutmöller, Chief of Laboratories
Dr. Roberto Goić, Chief of Field Services
Ms. Patricia Chain, Communications Officer