
BOLETIN

del centro panamericano de fiebre aftosa

Nº 27-28, julio-diciembre, 1977.

No. 27-28, July-December, 1977.

contenido

contents

	p.
Estudio preliminar de cepas de tipo A del virus de la fiebre aftosa aisladas en 1976/1977	1
<i>Informe Conjunto del Laboratorio Mundial de Referencia para Fiebre Aftosa y del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa</i>	
Preliminary study of type A strains of foot-and-mouth disease virus isolated in 1976/1977	7
<i>A joint report from the World Reference Laboratory for Foot-and-Mouth Disease and the Pan American Foot-and-Mouth Disease Center</i>	
Observaciones preliminares sobre la replicación del virus en la faringe y viremia después de inoculación intradermolingual en bovinos con virus de la fiebre aftosa	13
Preliminary observations on pharyngeal virus growth and viremia after intradermolingual inoculation of cattle with foot-and-mouth disease virus.	19
<i>P. Augé de Mello; P. Sutmöller</i>	

Observaciones adicionales sobre la actividad neutralizante del líquido esófago-faríngeo de bovinos después de la exposición al virus de la fiebre aftosa	23
Further observation on neutralizing activity of oesophageal pharyngeal fluid of cattle after exposure to foot-and-mouth disease virus.	25
<i>P. Augé de Mello; P. Sutmöller</i>	
Inactivación del virus de la fiebre aftosa en la caseína	27
Inactivation of foot-and-mouth disease virus in casein.	31
<i>Osvaldo P. Gaggino; Osvaldo L. Ibarra; Ana María Sadir de Marra; Roberto A. Cacchione; Danté J. Milese; Luis Nicora; Scholein Rivenson</i>	
Susceptibilidad del carpincho o capibara (<i>Hydrochoerus hydrochoeris hydrochoeris</i>) al virus de la fiebre aftosa	35
Susceptibility of capybara (<i>Hydrochoerus hydrochoeris hydrochoeris</i>) to foot-and-mouth disease virus	43
<i>Félix J. Rosenberg; Ivo Gomes</i>	
Respuesta anamnética en bovinos a la revacunación con vacuna antiaftosa con adyuvante oleoso	49
Anamnestic response in cattle after revaccination with oil adjuvant foot-and-mouth disease vaccines	55
<i>P. Augé de Mello; Ivo Gomes</i>	
Resúmenes — Abstracts.	61
Bibliografías sobre enfermedades vesiculares Vesicular diseases bibliography.	75

ESTUDIO PRELIMINAR DE CEPAS DE TIPO A DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA AISLADAS EN 1976/1977

*Informe Conjunto del
Laboratorio Mundial de Referencia para Fiebre Aftosa*
y del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa***

La ocurrencia de fiebre aftosa de tipo A en 1977 se caracterizó por una elevada incidencia de la infección en áreas endémicas (partes de América del Sur y la Unión Soviética), según datos de vigilancia disponibles, y por brotes de considerable magnitud en países del norte de África (Marruecos y Algeria) que estaban libres de la infección desde hacía mucho tiempo. Además, se observaron brotes limitados en varios países europeos (Holanda, Alemania, Italia y Grecia). También se ha notificado la pre-

sencia del virus en otros países de África y Asia, donde la enfermedad es endémica.

En el Laboratorio Mundial de Referencia (LMR) y en el Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (CPFA) se está efectuando un estudio comparativo de cepas representativas de diferentes países. Los resultados de este estudio están contenidos en el presente informe.

En este estudio se incluyen las siguientes muestras:

- A/Holanda/1/77 recibida en el LMR el 15 de enero de 1977 de un brote ocurrido en Gulpen el 12 de enero.
- A/Alemania/1/77 recibida en el LMR el 3 de febrero de 1977 de un brote en Aachen.
- A/Marruecos/5/77 recibida en el LMR el 8 de febrero de 1977 de un brote ocurrido en Temara en enero de 1977.
- A/Algeria/1/77 recibida en el LMR el 19 de mayo de 1977 de un brote del oeste del país.
- A/Italia/1/77 recibida en el LMR el 22 de junio de 1977 de un brote en Palermo, Sicilia.
- A/Grecia/3/77 recibida en el LMR el 5 de septiembre de 1977 de un brote en Platin, Macedonia Central.
- A/Bagé/76 recibida en el CPFA el 20 de septiembre de 1976 de un brote de Rio Grande do Sul, Brasil.
- A/Venceslau/76 recibida en el CPFA el 15 de mayo de 1976 de un brote en São Paulo, Brasil.
- A/Argentina/76 (25230) recibida en el CPFA el 7 de diciembre de 1976 de un brote en Buenos Aires.

Los resultados comparativos de las pruebas de fijación de complemento se muestran en las Tablas 1 a 5 y los de pruebas de neutralización en la Tabla 6.

Las Tablas 1 y 6 indican que el A/Marruecos/5/77 es similar al A/Algeria/1/77 y que también está relacionado con el A/Holanda. Sin embargo, los resultados de las pruebas de reducción de placas muestran una relación menor entre las cepas A/Marruecos y A/Holanda.

La Tabla 2 compara entre sí el A/Holanda/1/77 y el A/Marruecos/5/77 y con otras cepas corrientes y con los subtipos A₅ y A₂₄. Los resultados sugieren una relación estrecha entre el A/Holanda/1/77 y el A/Argentina/25230, y en segundo lugar entre el A/Holanda/1/77 y el A/Marruecos/5/77.

La Tabla 3 muestra los resultados de las pruebas de fijación de complemento directa, hechas con las cepas A/Alemania/1/77 y A/Algeria/1/77. Se

observa que ambas son más parecidas al A₂₄/Cruzeiro, al A/Marruecos/5/77 y al A/Holanda/1/77 que al A₅, A₁₀ y A₂₂.

La Tabla 4, con resultados de pruebas directas, indica que la cepa A/Italia/1/77 tiene más relación con el A/Venceslau que con los otros virus incluidos en las pruebas.

La Tabla 5 presenta resultados de pruebas directas que sugieren que el A/Grecia/1/77 se parece más a una cepa anterior del mismo país (A/Grecia/1/76).

Tomados en conjunto, los resultados indican que las cepas A corrientes de Europa, África del Norte y América del Sur, aunque raramente idénticas entre sí, forman un grupo interrelacionado.

Vale la pena agregar que tres cepas recién recibidas de diferentes regiones de la India revelaron claramente, en estudios similares, pertenecer al subtipo A₂₂.

* Pirbright, Woking, Surrey, Inglaterra.

** Caixa Postal 589, ZC-00, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

TABLA 1. *Pruebas de fijación del complemento*

Antígenos	Suevos						Valores R (%)
	A ₅ /Allier	A ₁₀ /Kemron	A/Iraq/24/64	A ₂₂ /Mahmatli	A ₂₄ /Cruzeiro	A/Venceslau	
A ₅ /Allier	1,00	0,50	0,66	0,04	0,25	0,50	0,36
A ₁₀ /Kemron	0,33	1,00	0,25	0,03	0,37	0,25	0,18
A ₂₂ /Iraq/24/64	0,25	0,16	1,00	1,00	0,25	0,35	0,12
A ₂₂ /Mahmatli	0,04	0,09	1,00	1,00	0,21	0,35	0,17
A ₂₄ /Cruzeiro	0,25	0,33	0,25	0,08	1,00	0,50	0,25
A/Bagé	0,27	0,25	0,24	0,06	0,40	1,00	0,40
A/Venceslau	0,27	0,25	0,18	0,04	0,36	0,59	0,08
A/Holanda/1/77	0,19	0,43	0,49	0,07	0,49	0,25	0,25
A/Marruecos/5/77	0,15	0,21	0,25	0,06	0,49	0,17	0,25
A/Algeria/1/77	0,21	0,17	0,25	0,06	0,18	0,25	0,17
A/Grecia/1/76	0,50	0,24	0,35	0,04	0,71	0,50	0,50
						0,35	0,36
A ₅ /Allier	100						
A ₁₀ /Kemron	41	100					
A ₂₂ /Iraq/24/64	41	20	100				
A ₂₂ /Mahmatli	4	5	100	100			
A ₂₄ /Cruzeiro	25	35	25	13	100		
A/Bagé	37	25	29	14	45	100	
A/Venceslau	31	21	15	5	25	49	100
A/Holanda/1/77	29	33	29	11	49	30	25
A/Marruecos/5/77	22	18	25	11	34	17	21
A/Algeria/1/77	27	14	21	7	17	14	7
A/Grecia/1/76	50	29	24	8	42	35	30
						38	32
						42	30
						0,36	1,00

TABLA 2. Pruebas de fijación del complemento realizadas en el Centro Panamericano de Fiebre Aftosa

Muestras		r_1	r_2	R(%)
A/Holanda/1/77	x A ₅ /Westerwald	0,26	0,24	25
	x A ₂₄ /Cruzeiro	0,26	0,32	29
	x A/Bagé	0,17	0,05	9
	x A/Venceslau	0,13	0,21	17
	x A/Argentina/25230	0,74	0,75	75
	x A/Marruecos/5/77	0,40	0,46	43
A/Marruecos/5/77	x A ₅ /Westerwald	0,09	0,05	7
	x A ₂₄ /Cruzeiro	0,16	0,05	9
	x A/Bagé	0,09	0,05	7
	x A/Venceslau	0,09	0,08	8
	x A/Argentina/25230	0,26	0,28	27
	x A/Holanda/1/77	0,40	0,46	43

TABLA 3. Pruebas de fijación del complemento realizadas en el Laboratorio Mundial de Referencia

Antisueros	Títulos de sueros homólogos	Títulos de sueros (valores "r") frente a	
		A/Alemania/1/77	A/Algeria/1/77
A ₅ /Allier	640	240 (0,37)	160 (0,25)
A ₁₀ /Kemron	640	120 (0,19)	110 (0,17)
A ₂₂ /Iraq/24/64	480	120 (0,25)	120 (0,25)
A ₂₄ /Cruzeiro	1280	960 (0,75)	640 (0,50)
A/Marruecos/5/77	960	480 (0,50)	240 (0,50)
A/Holanda/1/77	1280	960 (0,75)	840 (0,66)

TABLA 4. Pruebas de fijación del complemento realizadas en el Laboratorio Mundial de Referencia*

Muestras		r ₁	r ₂	R (%)
A/Italia/1/77	x A ₅ /Allier	0,25	0,25	25
	x A ₁₀ /Kemron	0,25	0,25	25
	x A ₂₂ /Mahmatli	0,06	0,05	5
	x A ₂₂ /Iraq/24/64	0,09	0,24	15
	x A ₂₄ /Cruzeiro	0,27	0,41	33
	x A/Bagé	0,33	0,60	44
	x A/Venceslau	0,33	0,85	53
	x A/Marruecos/5/77	0,09	0,23	14
	x A/Holanda/1/77	0,08	0,53	20
	x A/Italia/1/75	0,27	0,36	31

* Suero hiperinmune de cobayo A/Italia/1/77 suministrado por el Dr. De Simone, Brescia.

TABLA 5. Pruebas de fijación del complemento realizadas en el Laboratorio Mundial de Referencia

Antisueros	Títulos de suero frente		
	Antígeno homólogo	Antígeno A/Grecia/1/77	"r"
A ₅ /Allier	1/320	1/110	0,34
A ₁₀ /Kemron	1/630	1/160	0,25
A ₂₂ /Mahmatli	1/3500	1/160	0,05
A ₂₂ /Iraq/24/64	1/890	1/220	0,25
A ₂₄ /Cruzeiro	1/450	1/220	0,49
A/Bagé	1/890	1/450	0,50
A/Venceslau	1/2500	1/450	0,18
A/Grecia/1/76	1/890	1/640	0,72

TABLA 6. *Pruebas de neutralización de virus (reducción en placas)*

Suero	Sueros de bovinos convalecientes			
	A ₅ /Francia 1/68	A ₂₄ /Cruzeiro 55	A/Marruecos 5/77	A/Holanda 1/77
A ₅ /Francia/1/68	2600*	320	600	850
A ₂₄ /Cruzeiro/55	980	2000	250	260
A/Marruecos/5/77	125	220	2340 (1800)	NR (850)
A/Holanda/1/77	2300	1920	NR (8400)	15500 (29600)

* Recíprocas del punto final 90% de seroneutralización.

Las cifras entre paréntesis fueron obtenidas en pruebas separadas.

NR: No realizadas.

Valores "r"

A ₅ /Francia/1/68	1,0	0,125	0,23	0,33
A ₂₄ /Cruzeiro/55	0,49	1,0	0,125	0,13
A/Marruecos/5/77	0,05	0,09	1,0 (0,28)	
A/Holanda/1/77	0,15	0,12	(0,47)	1,0

Valores "R"

A ₅ /Francia/1/68	100			
A ₂₄ /Cruzeiro/55	24	100		
A/Marruecos/5/77	11	11	100	
A/Holanda/1/77	22	12	36	100

PRELIMINARY STUDY OF TYPE A STRAINS OF FOOT-AND-MOUTH DISEASE VIRUS ISOLATED IN 1976/1977

*A joint report from the
World Reference Laboratory for Foot-and-mouth Disease*
and the Pan American Foot-and-Mouth Disease Center***

The incidence of type A foot-and-mouth disease in 1977 has been characterized by a high incidence of infection in endemic areas (parts of South America and the USSR) for which surveillance data are available and by outbreaks of considerable magnitude in North African countries (Morocco, Algeria) which had been free from infection for a considerable time. In addition, limited outbreaks have been observed in several European countries (Netherlands, Germany, Italy,

Greece). The virus has also been reported from other countries in Africa and Asia where infection is endemic.

A comparative study of representative strains from different countries is in progress at the World Reference Laboratory (WRL) and Pan American Foot-and-Mouth Disease Center (PAFMDC). The results of this study are presented in this report.

The following current strains were included in this study:

- A/Netherlands/1/77 received at WRL on 15th January 1977 from an outbreak in Gulpen on 12th January.
- A/Germany/1/77 received at WRL on 3rd February 1977 from an outbreak in Aachen.
- A/Morocco/5/77 received at WRL on 8th February 1977 from an outbreak in Ternara in January 1977.
- A/Algeria/1/77 received at WRL on 19th May 1977 from an outbreak in the western part of the country.
- A/Italy/1/77 received at WRL on 22nd June 1977 from an outbreak in Palermo, Sicily.
- A/Greece/3/77 received at WRL on 5th September 1977 from an outbreak in Platin, Central Macedonia.
- A/Bagé/76 received at PAFMDC on 20th September 1976 from an outbreak in Rio Grande do Sul, Brazil.
- A/Venceslau/76 received at PAFMDC on 15th May 1976 from an outbreak in São Paulo, Brazil.
- A/Argentina/76 (25230) received at PAFMDC on 7th December 1976 from an outbreak in Buenos Aires.

Results of comparative complement fixation tests are shown in Tables 1 to 5 and of neutralization tests in Table 6.

Tables 1 and 6 show that A/Morocco/5/77 is similar to A/Algeria/1/77 and is also related to A/Netherlands. Nevertheless, results by plaque reduction test show a lower relationship between both strains A/Morocco and A/Netherlands.

Table 2 compares A/Netherlands/1/77 and A/Morocco/5/77 with each other as well as with other current strains and with subtypes A₅ and A₂₄. Results suggest a close relationship between A/Netherlands/1/77 and A/Argentina/25230, the second closest pair being A/Netherlands/1/77 and A/Morocco/5/77.

Table 3 shows the results of one-way complement fixation tests performed with strains A/Ger-

many/1/77 and A/Algeria/1/77. Both are shown to be closer to A₂₄/Cruzeiro, A/Morocco/5/77 and A/Netherlands/1/77 than to A₅, A₁₀ and A₂₂.

Table 4, giving results of one-way tests, shows that strain A/Italy/1/77 is closer to A/Venceslau than to the other viruses included in the tests.

Table 5 shows results of one-way tests suggesting that A/Greece/1/77 is closest to an earlier strain from the same country (A/Greece/1/76).

Taken as a whole, the above findings indicate that current A strains from Europe, North Africa and South America, although seldom identical to one another, form an inter-related group.

It may be worth adding that three strains recently received from different regions of India were clearly shown in similar studies to belong to subtype A₂₂.

* Pirbright, Woking, Surrey, England.

** Caixa Postal 589, ZC-00, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

TABLE 1: *Complement fixation test*

Antigens	A _s /Allier	A ₁₀ /Kemron	Sera						R values (%)	
			A/Iraq/24/64	A/Iraq/22	A ₂₂	A ₂₄	A	A/Neth.	A/Moroc.	
A _s /Allier	1.00	0.50	0.66	0.04	0.25	0.50	0.36	0.44	0.33	0.35
A ₁₀ /Kemron	0.33	1.00	0.25	0.03	0.37	0.25	0.18	0.26	0.16	0.12
A ₂₂ /Iraq/24/64	0.25	0.16	1.00	1.00	0.25	0.35	0.12	0.17	0.25	0.17
A ₂₂ /Mahmatli	0.04	0.09	1.00	1.00	0.21	0.35	0.06	0.18	0.22	0.08
A ₂₄ /Cruzeiro	0.25	0.33	0.25	0.08	1.00	0.50	0.17	0.50	0.24	0.17
A/Bagé	0.27	0.25	0.24	0.06	0.40	1.00	0.40	0.35	0.17	0.17
A/Venceslau	0.27	0.25	0.18	0.04	0.36	0.59	1.00	0.25	0.17	0.08
A/Netherlands/1/77	0.19	0.43	0.49	0.07	0.49	0.25	0.25	0.25	0.17	0.08
A/Morocco/5/77	0.15	0.21	0.25	0.06	0.49	0.17	0.25	0.68	1.00	1.20
A/Algeria/1/77	0.21	0.17	0.25	0.06	0.18	0.25	0.06	0.50	0.70	1.00
A/Greece/1/76	0.50	0.24	0.35	0.04	0.71	0.50	0.35	0.86	0.50	0.36
										1.00
A _s /Allier	100									
A ₁₀ /Kemron	41	100								
A ₂₂ /Iraq/24/64	41	20	100							
A ₂₂ /Mahmatli	4	5	100	100						
A ₂₄ /Cruzeiro	25	35	25	13	100					
A/Bagé	37	25	29	14	45	100				
A/Venceslau	31	21	15	5	25	49	100			
A/Netherlands/1/77	29	33	29	11	49	30	25	100		
A/Morocco/5/77	22	18	25	11	34	17	21	65		
A/Algeria/1/77	27	14	21	7	17	14	7	50	92	100
A/Greece/1/76	50	29	24	8	42	35	30	38	42	30

TABLE 2. *Complement fixation tests performed at the Pan American Foot-and-Mouth Disease Center*

Strains		r_1	r_2	R (%)
A/Netherlands/1/77	x A ₅ /Westerwald	0.26	0.24	25
	x A ₂₄ /Cruzeiro	0.26	0.32	29
	x A/Bagé	0.17	0.05	9
	x A/Venceslau	0.13	0.21	17
	x A/Argentina/25230	0.74	0.75	75
	x A/Morocco/5/77	0.40	0.46	43
A/Morocco/5/77	x A ₅ /Westerwald	0.09	0.05	7
	x A ₂₄ /Cruzeiro	0.16	0.05	9
	x A/Bagé	0.09	0.05	7
	x A/Venceslau	0.09	0.08	8
	x A/Argentina/25230	0.26	0.28	27
	x A/Netherlands/1/77	0.40	0.46	43

TABLE 3. *Complement fixation tests performed at the World Reference Laboratory*

Antisera	Homologous serum titers	Serum titers ("r" values) against	
		A/Germany/1/77	A/Algeria/1/77
A ₅ /Allier	640	240 (0.37)	160 (0.25)
A ₁₀ /Kemron	640	120 (0.19)	110 (0.17)
A ₂₂ /Iraq/24/64	480	120 (0.25)	120 (0.25)
A ₂₄ /Cruzeiro	1280	960 (0.75)	640 (0.50)
A/Morocco/5/77	960	480 (0.50)	240 (0.50)
A/Netherlands/1/77	1280	960 (0.75)	840 (0.66)

TABLE 4. *Complement fixation tests performed at the World Reference Laboratory**

Strains		r ₁	r ₂	R(%)
A/Italy/1/77	x A ₅ /Allier	0.25	0.25	25
	x A ₁₀ /Kemron	0.25	0.25	25
	x A ₂₂ /Mahmatli	0.06	0.05	5
	x A ₂₂ /Iraq/24/64	0.09	0.24	15
	x A ₂₄ /Cruzeiro	0.27	0.41	33
	x A/Bagé	0.33	0.60	44
	x A/Venceslau	0.33	0.85	53
	x A/Morocco/5/77	0.09	0.23	14
	x A/Netherlands/1/77	0.08	0.53	20
	x A/Italy/1/75	0.27	0.36	31

* Hyperimmune guinea-pig antiserum to A/Italy/1/77 supplied by Dr. De Simone, Brescia.

TABLE 5. *Complement fixation tests performed at the World Reference Laboratory*

Antisera	Serum titers against		
	Homologous antigen	A/Greece/1/77 antigen	"r"
A ₅ /Allier	1/320	1/110	0.34
A ₁₀ /Kemron	1/630	1/160	0.25
A ₂₂ /Mahmatli	1/3500	1/160	0.05
A ₂₂ /Iraq/24/64	1/890	1/220	0.25
A ₂₄ /Cruzeiro	1/450	1/220	0.49
A/Bagé	1/890	1/450	0.50
A/Venceslau	1/2500	1/450	0.18
A/Greece/1/76	1/890	1/640	0.72

TABLE 6. *Virus neutralization (plaque reduction) tests*

Serum	Bovine convalescent sera			
	A ₅ /France 1/68	A ₂₄ /Cruzeiro 55	A/Morocco 5/77	A/Netherlands 1/77
A ₅ /France/1/68	2600*	320	600	850
A ₂₄ /Cruzeiro/55	980	2000	250	260
A/Morocco/5/77	125	220	2340 (1800)	ND (850)
A/Netherlands/1/77	2300	1920	ND (8400)	15500 (29600)

* Reciprocals of end-points corresponding to 90% sero-neutralization.

The figures in brackets were obtained in separate tests.

ND: No done.

"r" values

A ₅ /France/1/68	1,0	0,125	0,23	0,33
A ₂₄ /Cruzeiro/55	0,49	1,0	0,125	0,13
A/Morocco/5/77	0,05	0,09	1,0 (0,28)	
A/Netherlands/1/77	0,15	0,12	(0,47)	1,0

"R" values

A ₅ /France/1/68	100			
A ₂₄ /Cruzeiro/55	24	100		
A/Morocco/5/77	11	11	100	
A/Netherlands/1/77	22	12	36	100

OBSERVACIONES PRELIMINARES SOBRE LA REPLICACION DEL VIRUS EN LA FARINGE Y VIREMIA DESPUES DE INOCULACION INTRADERMOLINGUAL EN BOVINOS CON VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA

P. Augé de Mello; P. Sutmöller**

RESUMEN

Se estudió la replicación del virus de la fiebre aftosa inoculado por vía lingual en bovinos vacunados y no vacunados. Los animales no vacunados presentaban viremia hasta 6 y 12 horas después de la inoculación. También en ese período aparece la replicación del virus en la faringe. Los resultados indican que la replicación del virus en la faringe probablemente es consecuencia de la infección del tracto respiratorio superior. La aparición precoz de viremia en los animales no vacunados es indicativa de una infección de otros sitios en el momento de la inoculación en la lengua.

INTRODUCCION

La titulación de virus de la fiebre aftosa (FA) en el epitelio de la lengua en bovinos (4) ha sido ampliamente utilizada en investigaciones sobre FA. En general se acepta que la replicación del virus ocurre en el sitio de inoculación (lesiones primarias), seguida de viremia y generalización (lesiones secundarias). Sin embargo, cuando se efectúa la inoculación intradermolingual (IDL), es probable que también se infecte el tracto respiratorio superior por aerosol proveniente del retroceso de parte de la suspensión vírica que se está inoculando. La importancia de la infección del tracto respiratorio superior fue señalada por McVicar y Sutmöller (5), quienes mostraron que, entre 6 y 12 horas después de la instilación intranasal de virus de la FA, se obtenían altos títulos en materiales provenientes de la faringe.

Por otra parte, algo de la suspensión vírica podría también ser depositada un poco más profundamente que lo deseado y llegar al sistema

circulatorio. En ese caso el virus podría ser transportado a otros sitios de replicación, independientemente de las lesiones que la inoculación produciría en la lengua.

El presente estudio fue realizado con el propósito de determinar si ocurriría replicación de virus en la faringe y cómo sería la viremia después de la inoculación intradermolingual en bovinos utilizados en una prueba de potencia de una vacuna (2).

MATERIALES Y METODOS

Bovinos

Fueron usados seis bovinos mestizos cebú no vacunados, originarios de una hacienda en la cual no hubo FA durante varios años. Esos animales fueron previamente controlados en lo que se refiere a ausencia de anticuerpos protectores y neutralizantes. Cuatro de esos animales fueron vacunados con vacuna contra la FA inactivada con acetil-etileneimina y que contenía hidróxido de aluminio y saponina como adyuvantes. Esos cuatro animales fueron usados para una prueba de potencia (2) 21 días después de la vacunación. Los 2 animales restantes, no vacunados, sirvieron como controles en la prueba.

Virus

Fue usado el virus de la FA subtipo O₁ cepa Campos en forma de epitelio lingual virulento. Se hicieron diluciones seriadas decimales en Solución Salina de Earle (SSE). El epitelio de la lengua de cada uno de los bovinos vacunados fue inoculado con 0,1 ml en 4 lugares con cada una de las 4

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

diluciones que contenían aproximadamente 10 hasta 10.000 DI₅₀/ml. Los bovinos de control fueron inoculados en la misma forma pero con las diluciones de 1 hasta 1.000 DI₅₀/ml.

El virus fue inoculado previa anestesia general usando hidrato de cloral al 40% a razón de 0,2 ml por kilo de peso.

Observaciones clínicas y colecta de muestras

Los animales fueron cuidadosamente examinados a las 44 horas después de la inoculación para determinar las lesiones en la lengua, y a los 3, 5 y 7 días para las de las patas.

Se tomaron muestras de líquido esófago-faríngeo (LEF) con intervalos de 1 hora durante las primeras 6 horas; después cada 2 horas durante las 6 horas siguientes y a las 24, 30, 48 y 72 horas después de la inoculación.

Las muestras del LEF fueron diluidas inmediatamente con cantidades iguales de SSE con 1.000 u.i. de penicilina, 1 mg de estreptomicina y 125 u.i. de fungizona* por ml. Las muestras de sangre heparinizada fueron tomadas a las 6, 12, 24, 30, 48 y 72 horas después de la inoculación. Todas las muestras fueron guardadas a -70°C hasta el momento de usarlas. Antes de la inoculación del virus se retiraron muestras de suero para pruebas de anticuerpos.

Prueba de virus

Los títulos infectantes fueron determinados por la prueba de placas utilizando células IB-RS-2 en monocamada en placas de Petri de 6 cm de diámetro y goma de Karaya como fue descrito por Augé (1). Los títulos infectantes fueron expresados como log₁₀ UFP/ml de la sangre o de LEF no diluidos.

Prueba de anticuerpos

Los sueros obtenidos de las muestras de sangre retiradas antes de la infección fueron sometidos a la prueba de seroprotección de acuerdo con el

método descrito por Cunha y colaboradores (3), y los resultados expresados como índice de seroprotección (ISP).

RESULTADOS

La tabla 1 muestra los resultados de los ISP de las muestras de sueros retiradas antes de la comprobación, así como los resultados de las observaciones clínicas.

Los 2 animales no vacunados presentaron lesiones en la lengua a los 2 días postinfección (DPI) y desarrollaron vesículas en todas las patas. Todos los animales vacunados tenían anticuerpos circulantes y mostraron lesiones en la lengua, en general, solamente en los sitios inoculados con las dosis mayores de virus. No aparecieron lesiones en las patas.

La tabla 2 muestra los títulos de viremia. No se detectó virus en la sangre de los animales vacunados. Los 2 animales no vacunados tuvieron viremia hasta las 6 y 12 horas respectivamente.

Los títulos infectantes del LEF pueden verse en la tabla 3. No se detectó virus en las primeras 4 horas en el bovino 1 ni en las primeras 8 horas en el bovino 2. La replicación de virus en estos 2 animales no vacunados siguió un curso bastante similar al descrito por McVicar y Sutmöller (5) para bovinos inoculados por vía intranasal. El relativamente largo período de retraso indicaría un bajo nivel de infección inicial del área faríngea (5).

En los bovinos vacunados, la replicación del virus fue evidenciada entre las 6 y 10 horas postinoculación. El período de retraso fue mayor, pero los títulos obtenidos fueron comparables a los encontrados por McVicar y Sutmöller (5), usando 10⁵ – 10⁷ UFP por vía intranasal, en animales vacunados. En esta experiencia, un total de aproximadamente 5 x 10² DI₅₀ bovino fue usado para la inoculación IDL de los controles; y 5 x 10³ DI₅₀ bovino para los animales vacunados.

La replicación más pobre fue observada en el bovino 3. Con excepción de este animal, el título infectante del LEF alcanzó niveles de

* Squibb

10^4 UFP/ml, aunque el bovino 6 no evidenció lesiones de lengua. En este experimento preliminar, no hubo relación entre la extensión de las lesiones de lengua o los títulos de anticuerpos y el grado de replicación del virus en la faringe en el grupo de animales vacunados.

DISCUSION

La replicación del virus de la FA en el área faríngea de animales inoculados por vía IDL probablemente es el resultado de la inoculación directa del tracto respiratorio superior ya que la vía sanguínea no es probable en animales vacunados debido a los anticuerpos circulantes.

Los altos títulos obtenidos en material del área faríngea, poco tiempo después de la inoculación IDL, independientemente de los niveles de anticuerpos, indican que ésta vía de inoculación es mucho más compleja de lo que habitualmente se admítía.

También es notable la aparición precoz de virus en la sangre de animales no vacunados, en el momento que recién comienza la replicación en el área faríngea y el epitelio de la lengua se presenta normal. La cantidad de virus liberado, tanto en el área faríngea como en los sitios inoculados de la lengua, probablemente sería insuficiente para dar cuenta del mantenimiento de una viremia de aproximadamente 100 UFP/ml (6). Tales títulos indican que en la inoculación intradermolingual el virus entra en la circulación en el momento de la inoculación y se multiplica luego en otros lugares. Un hecho semejante se observó tras la inoculación de virus de la FA por vía sanguínea y se sugirió que el aumento del título en la sangre poco tiempo después de la inoculación podría ser causado por la replicación del virus en las capas germinativas de la piel o de las membranas mucosas (7).

No se puede excluir la posibilidad de inhalación de virus y la infección profunda del pulmón (7) ya que los animales estaban anestesiados durante la inoculación.

TABLA 1: Indices de seroprotección en los bovinos antes de la comprobación y resultados de las observaciones clínicas después de la exposición al virus de la fiebre aftosa tipo O₁ por inoculación intradermolingual

Bovino Nº	ISP	Lesiones de lengua					Lesiones de patas
		10^4 *	10^3	10^2	10^1	10^0	
1	0,4	—	4	4	3	1	4
2	0,5	—	4	4	4	3	4
3	4,2	2	1	0	0	—	0
4	2,3	4	2	3	4	—	0
5	4,2	4	4	2	0	—	0
6	3,8	0	0	0	0	—	0

* Dosis de virus/ml.

NOTA: Bovinos 1 y 2 controles no vacunados.

Bovinos 3, 4, 5 y 6 vacunados.

TABLA 2. Títulos infectantes en la sangre de los bovinos inoculados por vía intradermolingual con virus de la fiebre aftosa tipo O₁

Horas post-inoculación	Bovino N°					
	1	2	3	4	5	6
0	—	—	—	—	—	—
6	1,0*	—	—	—	—	—
12	2,6	1,8	—	—	—	—
24	2,6	2,3	—	—	—	—
30	2,8	2,1	—	—	—	—
48	3,1	2,1	—	—	—	—
72	1,4	2,1	—	—	—	—

* Log₁₀ UFP/ml.

NOTA: Bovinos 1 y 2 controles no vacunados.
Bovinos 3, 4, 5 y 6 vacunados.

TABLA 3. Títulos infectantes en el líquido esófago-faríngeo de bovinos inoculados por vía intradermolingual con virus de la fiebre aftosa tipo O₁

Horas post-inoculación	Bovino N°					
	1	2	3	4	5	6
0	—	—	—	—	—	—
1	—	—	—	—	—	—
2	—	—	—	—	—	—
3	—	—	—	—	—	—
4	—	—	—	—	—	—
5	1,0*	—	—	—	—	—
6	2,1	—	—	—	0,9	0,9
8	4,4	—	1,1	—	—	—
10	3,3	0,9	1,4	1,4	2,4	—
12	3,8	0,9	1,4	1,0	3,0	1,4
24	5,8	6,0	0,9	2,2	4,9	2,4
30	5,6	5,8	—	2,3	4,4	2,0
48	4,6	6,0	—	4,0	4,9	2,0
72	5,6	5,2	—	3,8	3,0	4,2

* Log₁₀ UFP/ml.

NOTA: Bovinos 1 y 2 controles no vacunados.
Bovinos 3, 4, 5 y 6 vacunados.

REFERENCIAS

1. AUGÉ DE MELLO, P. Prueba de neutralización por reducción de placas para la evaluación de anticuerpos contra la fiebre aftosa. (Plaque reduction neutralization test for the assay of antibodies against foot-and-mouth disease). *Bltn Centro Panamericano Fiebre Aftosa* 21-22: 25-29, 30-34, 1976.
2. CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA. Manual de procedimientos para el control de las vacunas antiaftosas. *Ser. Man. Téc.* 2, pp 33, 1974.
3. CUNHA, R.G.; BAPTISTA JUNIOR, J.A.; SERRÃO, U.M.; TORTURELLA, I. El uso de los ratones lactantes en la evaluación de los anticuerpos contra el virus de la fiebre aftosa y su significación inmunológica. *Gac. Vet. (Buenos Aires)* 19 (110): 243-267, 1957.
4. HENDERSON, W.M. The quantitative study of foot-and-mouth disease virus. A.R.C. *Report Series No. 8*, Agricultural Research Council, London, 1949.
5. McVICAR, J.W.; SUTMÖLLER, P. Growth of foot-and-mouth disease virus in the upper respiratory tract of non-immunized, vaccinated, and recovered cattle after intranasal inoculation. *J. Hyg. Camb.* 76 (3): 467-481, 1976.
6. SUTMÖLLER, P.; McVICAR, J.W. Pathogenesis of foot-and-mouth disease: clearance of the virus from the circulation of cattle and goats during experimental viremia. *J. Hyg. Camb.* 77 (2): 245-254, 1976.
7. SUTMÖLLER, P.; McVICAR, J.W. Pathogenesis of foot-and-mouth disease: the lung as an additional portal of entry of the virus. *J. Hyg. Camb.* 77 (2): 235-244, 1976.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la colaboración de los doctores A. Alonso Fernández e Ivo Gomes y la asistencia técnica de los señores Pedro J. Vieira y Lourival P. da Silva.

PRELIMINARY OBSERVATIONS ON PHARYNGEAL VIRUS GROWTH AND VIREMIA AFTER INTRADERMOLINGUAL INOCULATION OF CATTLE WITH FOOT-AND-MOUTH DISEASE VIRUS

P. Augé de Mello*; P. Sutmöller*

SUMMARY

Foot-and-mouth disease virus growth was studied in vaccinated and unvaccinated cattle after inoculation of the tongue epithelium. Unvaccinated cattle were already viremic by 6-12 hours after inoculation. Earliest pharyngeal virus growth also occurred at that period. The results indicate that the pharyngeal virus growth likely is a consequence of direct infection of upper respiratory tract. The early viremia in the unvaccinated cattle indicate a hematogenous infection of other sites at the time of tongue inoculation.

INTRODUCTION

Titration of foot-and-mouth disease (FMD) virus in the tongue epithelium of cattle (4), has been used extensively in FMD research. It is generally assumed that virus growth occurs at the injection sites (primary lesions) followed by viremia and generalization (secondary lesions). However, with intradermolingual (IDL) inoculation it is likely that also the upper respiratory tract becomes infected by aerosolation and spraying during the operation or by backflow of virus suspension from the inoculation site. The importance of this infection site was noted by McVicar and Sutmöller (5) who showed that within 6-12 hours the virus would reach high titers in the pharyngeal area after intranasal instillation of FMD virus.

On the other hand some of the virus suspension might also be deposited slightly less superficially than intended and reach the circulatory system. In that case the virus could be transported to other sites of virus replication independent of the tongue

lesions developing at the inoculation sites.

The present study was made to determine if pharyngeal growth would occur and what the viremia patterns would be after IDL inoculation of cattle in the course of a vaccine potency control test (2).

MATERIALS AND METHODS

Cattle

Six unvaccinated crossbred Zebu steers originating from a farm on which FMD had not occurred for several years, were used. They were previously tested for the absence of protective and neutralizing antibodies. Four of the steers were vaccinated with an acetylethyleneimine inactivated FMD vaccine adjuvanted with aluminum hydroxide-saponin. They were used for a potency test (2) 21 days later. The 2 unvaccinated cattle served as controls in the test.

Virus

FMD virus, subtype O₁ strain Campos in bovine tongue epithelium was used. Ten-fold serial dilutions were made in Earle's salt solution (ESS). The tongue epithelium of each of the vaccinated steers was inoculated with 0.1 ml at 4 sites with each of 4 dilutions which contained approximately 10 to 10,000 bovine ID₅₀/ml. The control steers were given the dilution containing 1 to 1,000 bovine ID₅₀/ml by the same route.

The virus was inoculated under general anesthesia using 40% chloral hydrate at 0.2 ml/kg body weight.

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

Clinical observation and collection of samples

The cattle were closely examined at 44 hours post-inoculation to score the tongue lesions, and at 3, 5 and 7 days post-inoculation to examine the feet.

Oesophageal pharyngeal (OP) fluid samples were collected at hourly intervals up to 6 hours, then at 2 hourly intervals up to 12 hours, and at 24, 30, 48, 72 hours.

The OP fluid samples were diluted immediately with equal part of ESS 1,000 IU penicillin, 1 mg streptomycin and 125 IU fungizon/ml. Heparinized blood samples were collected at 6, 12, 24, 30, 48 and 72 HPI. All samples were stored at -70°C until testing. Before virus inoculation, sera were collected for antibody assay.

Virus assay

Infectivity titers were determined by plaque assay using IB-RS-2 monolayers in 6 cm Petri dishes and karaya gum overlay as described by Augé (1). The infectivity titers were expressed as \log_{10} PFU/ml of blood or of undiluted OP fluid.

Antibody assay

Pre-exposure sera were tested by the mouse protection test according to the method described by Cunha *et al.* (3) with the results expressed as the mouse protection index.

RESULTS

The pre-challenge results of the mouse protection tests are listed in Table 1, together with the results of the clinical observations.

The two unvaccinated cattle had tongue lesions at 2 DPI and developed vesicles on all feet. The vaccinated cattle all had circulating antibodies and had tongue lesions usually only at the sites with the higher virus doses. Foot lesions were absent in the vaccinated cattle.

* Squibb

Table 2 lists the virus titers of the blood. No virus could be detected in the blood of the vaccinated cattle. The 2 unvaccinated steers were already viremic at 6 and 12 hours, respectively.

Virus titers of the OP fluid are listed in Table 3. No virus could be detected in the 1-4 hour samples of steer 1 or in the 1-8 hour samples of steer 2. Virus growth in these two unvaccinated steers followed a course quite similar to those described by McVicar and Sutmöller (5) for intranasally inoculated cattle. The relatively long lag period could point to a low level of initial infection of the pharyngeal area (5).

In vaccinated cattle virus growth was first seen between 6-10 hours. The lag period was longer but the virus titers comparable to those found by McVicar and Sutmöller (5), using $10^5 - 10^7$ PFU intranasally in vaccinated cattle. In this experiment a total of approximately 5×10^2 bovine ID₅₀ were used for the IDL inoculation of each of the controls and 5×10^3 bovine ID₅₀ in the vaccinated cattle.

Poorest growth was observed in steer 3. With the exception of this steer the infectivity of the OP fluid reached levels of 10^4 PFU/ml even though steer 6 had no tongue lesions. In this preliminary experiment there was no relationship between the extent of the tongue lesions or antibody titers and the degree of pharyngeal virus growth in the vaccinated cattle.

DISCUSSION

The growth of FMD virus in the pharyngeal area of these IDL inoculated cattle probably resulted from direct inoculation of the upper respiratory tract, since the hematogenous route is unlikely to occur in vaccinated cattle with circulating antibodies.

The high virus titers reached in the pharyngeal area shortly after IDL inoculation independent of antibody levels indicate that this route of infecting an animal is much more complex than usually has been assumed.

Also the early isolation of virus from the blood of unvaccinated steers is noteworthy. At that time, the growth in the pharyngeal area

had just started and the tongue epithelium, was grossly normal. The amount of virus released in the pharyngeal area or from the inoculated sites on the tongue would probably be insufficient to account for the maintenance of a viremia of approximately 100 PFU/ml of blood (6). Such virus titers indicate that after the IDL inoculation virus entered the circulation probably at the time of inoculation followed by virus production in additional

locations. A similar situation was found after intravenous infection of cattle with FMD virus, and it was suggested that the increase in blood titers shortly after intravenous infection could be caused by virus replication in the germinative layers of the skin or mucous membranes (7).

Inhalation of the virus and a deep lung infection (7) cannot be excluded, particularly since the animals were anesthetized during the inoculation.

TABLE 1. *Pre-challenge mouse protection indices (MPI) of cattle exposed to foot-and-mouth disease virus O₁ by IDL inoculation and the results of clinical observations*

Cattle No.	MPI	Tongue lesions					Foot Lesions
		10 ⁴ *	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ⁰	
1	0.4	—	4	4	3	1	4
2	0.5	—	4	4	4	3	4
3	4.2	2	1	0	0	—	0
4	2.3	4	2	3	4	—	0
5	4.2	4	4	2	0	—	0
6	3.8	0	0	0	0	—	0

* Virus dose/ml.

NOTE: Cattle 1 and 2 controls not vaccinated.

Cattle 3, 4, 5 and 6 vaccinated.

TABLE 2. *Infectivity titers of blood of cattle inoculated IDL with foot-and-mouth disease virus type O₁*

Hours post-inoculation	Cattle No.					
	1	2	3	4	5	6
0	—	—	—	—	—	—
6	1.0*	—	—	—	—	—
12	2.6	1.8	—	—	—	—
24	2.6	2.3	—	—	—	—
30	2.8	2.1	—	—	—	—
48	3.1	2.1	—	—	—	—
72	1.4	2.1	—	—	—	—

* Log₁₀ PFU/ml.

NOTE: Cattle 1 and 2 controls not vaccinated.

Cattle 3, 4, 5 and 6 vaccinated.

TABLE 3. Infectivity titers of oesophageal pharyngeal fluid from cattle inoculated IDL with foot-and-mouth disease with type O₁

Hours post-inoculation	Cattle No.					
	1	2	3	4	5	6
0	—	—	—	—	—	—
1	—	—	—	—	—	—
2	—	—	—	—	—	—
3	—	—	—	—	—	—
4	—	—	—	—	—	—
5	1.0*	—	—	—	—	—
6	2.1	—	—	—	0.9	0.9
8	4.4	—	1.1	—	—	—
10	3.3	0.9	1.4	1.4	2.4	—
12	3.8	0.9	1.4	1.0	3.0	1.4
24	5.8	6.0	0.9	2.2	4.9	2.4
30	5.6	5.8	—	2.3	4.4	2.0
48	4.6	6.0	—	4.0	4.9	2.0
72	5.6	5.2	—	3.8	3.0	4.2

* Log₁₀ PFU/ml Oesophageal pharyngeal fluid.

NOTE: Cattle 1 and 2 controls not vaccinated.

Cattle 3, 4, 5 and 6 vaccinated.

REFERENCES

1. AUGÉ DE MELLO, P. Prueba de neutralización por reducción de placas para la evaluación de anticuerpos contra la fiebre aftosa. (Plaque reduction neutralization test for the assay of antibodies against foot-and-mouth disease). *Bltn Centro Panamericano Fiebre Aftosa* 21-22: 25-29, 30-34, 1976.
2. CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA. Manual de procedimientos para el control de las vacunas antiaftosas. *Ser. Man. Téc.* 2, pp 33, 1974.
3. CUNHA, R.G.; BAPTISTA JUNIOR, J.A.; SERRÃO, U.M.; TORTURELLA, I. El uso de los ratones lactantes en la evaluación de los anticuerpos contra el virus de la fiebre aftosa y su significación inmunológica. *Gac. Vet. (Buenos Aires)* 19 (110): 243-267, 1957.
4. HENDERSON, W.M. The quantitative study of foot-and-mouth disease virus. A.R.C. *Report Series No. 8*, Agricultural Research Council, London, 1949.
5. McVICAR, J.W.; SUTMÖLLER, P. Growth of foot-and-mouth disease virus in the upper respiratory tract of non-immunized, vaccinated, and recovered cattle after intranasal inoculation. *J. Hyg. Camb.* 76 (3): 467-481, 1976.
6. SUTMÖLLER, P.; McVICAR, J.W. Pathogenesis of foot-and-mouth disease: clearance of the virus from the circulation of cattle and goats during experimental viremia. *J. Hyg. Camb.* 77 (2): 245-254, 1976.
7. SUTMÖLLER, P.; McVICAR, J.W. Pathogenesis of foot-and-mouth disease: the lung as an additional portal of entry of the virus. *J. Hyg. Camb.* 77 (2): 235-244, 1976.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors gratefully acknowledge the collaboration of Drs. A. Alonso Fernández and Ivo Gomes and the technical assistance of Messrs. Pedro J. Vieira and Lourival P. da Silva.

OBSERVACIONES ADICIONALES SOBRE LA ACTIVIDAD NEUTRALIZANTE DEL LIQUIDO ESOFAGO-FARINGEO DE BOVINOS DESPUES DE LA EXPOSICION AL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA

P. Augé de Mello*; P. Sutmöller*

COMUNICACION BREVE

McVicar y Sutmöller (4) publicaron un informe sobre los niveles y la persistencia de los anticuerpos neutralizantes del líquido esófago-faríngeo (LEF) en un grupo pequeño de bovinos convalecientes de fiebre aftosa (FA).

En el informe presente describimos un estudio adicional sobre la actividad neutralizante del LEF y del suero en un grupo de 6 bovinos, 4 de los cuales fueron vacunados con una vacuna trivalente inactivada. Todos fueron inoculados por vía intradermolingual con virus de la FA, subtipo O₁, 3 semanas después de la vacunación. Detalles sobre tipo de bovinos, vacuna, cepas de virus usados y la historia de la enfermedad son presentados en otro informe (2). Doce muestras de suero y del LEF fueron recogidas con intervalos de 1 semana y se estudió su actividad neutralizante, frente a los virus subtipo O₁, A₂₄ y C₃. En las muestras de suero se utilizó la prueba de microneutralización (3). La actividad neutralizante de las muestras del LEF fue comprobada por la técnica de reducción de placas, de acuerdo con el método descrito por McVicar *et al.* (5) con las modificaciones introducidas por Augé (1). El título de neutralización del LEF es expresado como la dilución que reduce 70% de las placas. Los cálculos fueron efectuados en la forma descrita (5). El estado de portador fue determinado por emulsificación del LEF con trifluortricloroetano (TTE) en la forma descrita por Sutmöller y Cotral (6), e inoculación del material así tratado en cultivos de células IB-RS-2 y BHK.

Ninguna de las muestras del LEF recogidas en el momento de la inoculación del virus de FA subtipos A₂₄, O₁ y C₃, y ninguno de los bovinos desarrollaron actividad neutralizante en el LEF frente a

A₂₄ y C₃, durante la duración de este estudio.

La tabla 1 resume los resultados de las pruebas de reducción de placas de las muestras de LEF frente al virus O₁. Una semana después de la inoculación ya se observó actividad neutralizante, pero los valores más altos fueron encontrados entre 4 y 9 semanas después de la exposición. Los títulos más bajos se encontraron en el bovino n° 3, del cual no fue posible aislar virus después de la multiplicación inicial.

Una elevación de los títulos de seroneutralización fue observada para los anticuerpos O₁ en los animales no vacunados y en los vacunados cuyos títulos eran menores de 1:100 en el momento de la infección. Sin embargo, el título de anticuerpos del suero del bovino n° 3 disminuyó significativamente durante el curso de este trabajo. Estos hallazgos, en general, están de acuerdo con los publicados por McVicar y Sutmöller (4). Ellos demostraron que el título neutralizante del LEF aumenta hasta llegar al máximo a las 8 semanas en los animales que permanecen portadores de virus de la FA. En cambio, el título neutralizante del LEF de animales no portadores declina a partir de las 2 semanas. Los mismos investigadores encontraron también que los títulos de anticuerpos de los sueros de animales no portadores declinan más rápidamente que los provenientes de portadores.

El presente estudio mostró la especificidad de la respuesta local a la infección por virus de la FA. Aun cuando 4 bovinos tenían actividad seroneutralizante frente a los subtipos A y C como consecuencia de vacunación anterior, no se observó esa actividad neutralizante en niveles detectables en el LEF. La infección con virus tipo O₁ no indujo actividad neutralizante detectable en el LEF frente a los tipos de virus heterólogos.

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

TABLA 1. Actividad neutralizante del líquido esófago-faríngeo proveniente de bovinos después de la exposición al virus de la fiebre aftosa tipo O₁

Semanas post-inoculación	B o v i n o N°					
	No vacunados		Vacunados			
	1	2	3	4	5	6
0	<1:2*	<1:2	<1:2	<1:2	<1:2	<1:2
1	1:80	1:6	<1:2	1:6	<1:2	1:25
2	1:3	1:10	1:3	1:10	<1:2	<1:2
3	<1:2	1:3	<1:2	1:2	1:50	1:40
4	1:10	1:10	<1:2	1:10	1:125	1:3000
5	<1:2	1:60	<1:2	1:50	1:2	1:2500
6	<1:2	1:50	<1:2	1:50	1:60	1:80
7	1:50	1:160	<1:2	1:50	1:25	1:30
8	1:200	1:30	1:60	1:50	1:100	1:40
9	1:25	1:250	1:40	1:80	1:100	1:6
10	1:80	1:30	<1:2	1:80	1:25	1:20
11	1:60	1:40	<1:2	1:60	1:16	1:30

* Dilución que reduce 70% de las placas de virus tipo O₁.

REFERENCIAS

1. AUGÉ DE MELLO, P. Prueba de neutralización por reducción de placas para la evaluación de anticuerpos contra la fiebre aftosa. (Plaque reduction neutralization test for the assay of antibodies against foot-and-mouth disease). *Bltn Centro Panamericano Fiebre Aftosa 21-22:* 25-29, 30-34, 1976.
2. AUGÉ DE MELLO, P.; SUTMÖLLER, P. Observaciones preliminares sobre la replicación del virus en la faringe y viremia después de inoculación intradermolingual en bovinos con virus de la fiebre aftosa. (Preliminary observations on pharyngeal virus growth and viremia after intradermal inoculation of cattle with foot-and-mouth disease virus). *Bltn Centro Panamericano Fiebre Aftosa 27-28:* 13-17, 19-22, 1977.
3. FERREIRA, Maria Elma V. Prueba de microneutralización para estudios de anticuerpos de la fiebre aftosa. (Microtiter neutralization test for the study of foot-and-mouth disease antibodies). *Bltn Centro Panamericano Fiebre Aftosa 21-22:* 17-20, 21-24, 1976.
4. McVICAR, J.W.; SUTMÖLLER, P. Neutralizing activity in the serum and oesophageal-pharyngeal fluid of cattle after exposure to foot-and-mouth disease virus and subsequent re-exposure. *Arch. ges. Virusforsch.* 44 (2): 173-176, 1974.
5. McVICAR, J.W.; SUTMÖLLER, P.; ANDERSON, A.A. Foot-and-mouth disease virus: Plaque reduction neutralization test. *Arch. ges. Virusforsch.* 44 (2): 168-172, 1974.
6. SUTMÖLLER, P.; COTTRAL, G.E. Improved techniques for the detection of foot-and-mouth disease virus in carrier cattle. *Arch. ges. Virusforsch.* 21: 170-177, 1967.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la colaboración de los Dres. María Elma V. Ferreira y A. Alonso Fernández, y de los Srs. Pedro J. Vieira y Lourival P. da Silva por su asistencia técnica.

FURTHER OBSERVATION ON NEUTRALIZING ACTIVITY OF OESOPHAGEAL PHARYNGEAL FLUID OF CATTLE AFTER EXPOSURE TO FOOT-AND-MOUTH DISEASE VIRUS

P. Augé de Mello*; P. Sutmöller*

BRIEF REPORT

McVicar and Sutmöller (4) reported on the levels and persistence of neutralizing antibody of the oesophageal pharyngeal (OP) fluid in a small group of foot-and-mouth disease (FMD) convalescent cattle.

In the present report we describe a further study of the neutralizing activity of the OP fluid and serum in a group of 6 cattle. Four of these cattle were vaccinated with a trivalent inactivated vaccine and all were inoculated intradermally with FMD virus subtype O₁ 3 weeks later. Details on the type of cattle, vaccine, virus strain used and disease history are presented in companion report (2). Serum and OP samples were collected at 12 weekly intervals and tested for neutralizing activity against subtypes O₁, A₂₄ and C₃. Serum samples were assayed by the microneutralization test (3).

The neutralizing activity of OP fluid samples was tested by the plaque reduction test essentially according to the method described by McVicar *et al.* (5), with modifications of the plaque technique according to Augé (1). The neutralization titer of the OP fluid was expressed as the dilution reducing 70% of the plaques. The calculations were made as described (5). The carrier status of the cattle was determined by emulsification of the OP fluid with trifluorotrichloroetane (TTE) as described by Sutmöller and Cottrial (6) and inoculation of IB-RS-2 and BHK cultures with the treated material.

None of the OP fluid samples collected at the time of virus inoculation contained detectable

neutralizing activity against FMD virus types A₂₄, O₁ or C₃ and none of the cattle developed neutralizing activity in the OP fluid against A₂₄ or C₃ during the course of this study.

The results of the plaque reduction tests of the OP fluid for type O₁ are listed in table 1. Already 1 week after inoculation neutralization activity was observed but the highest values were found between 4-9 weeks after exposure. The lowest titers were found in steer 3 from which no virus could be isolated after initial virus multiplication.

A rise of serum neutralization titers was observed of O₁ antibody in the unvaccinated steers and the vaccinated steers with titers less than 1:100 at the moment of infection. However, the serum antibody titer of steer 3 decreased significantly during the course of the experiment. These findings generally agree with those of McVicar and Sutmöller (4). They showed that the neutralizing titer of the OP fluid increased to a peak at 8 weeks in animals which remained carriers of FMD but that the neutralizing titer of the OP fluid from non-carriers declined from 2 weeks on. The same investigators also found that serum antibody titers of non-carriers declined faster than those of the carriers.

The present study also showed the specificity of the local response to FMD virus infection. Even though 4 of the cattle had serum neutralizing activity against subtypes A and C, as a consequence of previous vaccination, none of it appeared in detectable levels in the OP fluid. The infection with FMD virus type O₁ did not induce any detectable neutralization activity in the OP fluid against the heterologous virus types.

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

TABLE 1. Neutralizing activity of oesophageal-pharyngeal fluid from cattle after exposure to foot-and-mouth disease virus type O₁

Weeks post-inoculation	Steer No.					
	Not vaccinated		Vaccinated			
	1	2	3	4	5	6
0	<1:2*	<1:2	<1:2	<1:2	<1:2	<1:2
1	1:80	1:6	<1:2	1:6	<1:2	1:25
2	1:3	1:10	1:3	1:10	<1:2	<1:2
3	<1:2	1:3	<1:2	1:2	1:50	1:40
4	1:10	1:10	<1:2	1:10	1:125	1:3000
5	<1:2	1:60	<1:2	1:50	1:2	1:2500
6	<1:2	1:50	<1:2	1:50	1:60	1:80
7	1:50	1:160	<1:2	1:50	1:25	1:30
8	1:200	1:30	1:60	1:50	1:100	1:40
9	1:25	1:250	1:40	1:80	1:100	1:6
10	1:80	1:30	<1:2	1:80	1:25	1:20
11	1:60	1:40	<1:2	1:60	1:16	1:30

* Dilution reducing 70% of the plaques of type O₁.

REFERENCES

1. AUGÉ DE MELLO, P. Prueba de neutralización por reducción de placas para la evaluación de anticuerpos contra la fiebre aftosa. (Plaque reduction neutralization test for the assay of antibodies against foot-and-mouth disease). *Bltn Centro Panamericano Fiebre Aftosa* 21-22: 25-29, 30-34, 1976.
2. AUGÉ DE MELLO, P.; SUTMÖLLER, P. Observaciones preliminares sobre la replicación del virus en la faringe y viremia después de inoculación intradermolingual en bovinos con virus de la fiebre aftosa. (Preliminary observations on pharyngeal virus growth and viremia after intradermal inoculation of cattle with foot-and-mouth disease virus). *Bltn Centro Panamericano Fiebre Aftosa* 27-28: 13-17, 19-22, 1977.
3. FERREIRA, Maria Elma V. Prueba de microneutralización para estudios de anticuerpos de la fiebre aftosa. (Microtiter neutralization test for the study of foot-and-mouth disease antibodies). *Bltn Centro Panamericano Fiebre Aftosa* 21-22: 17-20, 21-24, 1976.
4. McVICAR, J.W.; SUTMÖLLER, P. Neutralizing activity in the serum and oesophageal-pharyngeal fluid of cattle after exposure to foot-and-mouth disease virus and subsequent re-exposure. *Arch. ges. Virusforsch.* 44 (2): 173-176, 1974.
5. McVICAR, J.W.; SUTMÖLLER, P.; ANDERSON, A.A. Foot-and-mouth disease virus: Plaque reduction neutralization test. *Arch. ges. Virusforsch.* 44 (2): 168-172, 1974.
6. SUTMÖLLER, P.; COTTRAL, G.E. Improved techniques for the detection of foot-and-mouth disease virus in carrier cattle. *Arch. ges. Virusforsch.* 21: 170-177, 1967.

ACKNOWLEDGMENTS

We gratefully acknowledge the collaboration of Dr. Maria Elma V. Ferreira and Dr. A. Alonso Fernández and the technical assistance of Messrs. Pedro J. Vieira and Lourival P. da Silva.

INACTIVACION DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EN LA CASEINA*

*Osvaldo P. Gaggino**; Osvaldo L. Ibarra**; Ana María Sadir de Marra**;
Roberto A. Cacchione**; Danté J. Milese***; Luis Nicora**; Scholein Rivenson***

RESUMEN

En este trabajo se estudia la persistencia del virus de la fiebre aftosa en caseína de leche producida de acuerdo con el método industrial argentino, usando leche de calidad standard experimentalmente infectada con virus de la fiebre aftosa tipo C₃. Las muestras fueron tratadas con fluorocarbono y se utilizaron métodos de concentración de virus.

No se ha detectado la presencia de virus en ninguna de las muestras. Se deduce que la caseína, producida por el proceso industrial que se usa en la Argentina, no parece ser un vehículo diseminador de la fiebre aftosa.

INTRODUCCION

Experimentos realizados por el Centro de Enfermedades Animales de Plum Island (Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de América, Greenport, N.Y., E.U.A.), utilizando la cepa Mecklenburg del virus de la fiebre aftosa (FA) del tipo A, demostraron su sobrevivencia en la caseína. Esta se obtuvo coagulando la leche descremada con ácido clorhídrico durante 1 hora. Al iniciarse esos experimentos, el título en la leche descremada era entre el 10^{5,2} y 10^{6,1} UFP/ml (2). Aunque este proceso para producir leche descremada es utilizado en otros países, difiere fundamentalmente del que se utiliza en la Argentina (4).

En vista de esos resultados, las investigaciones

que aquí se describen estaban dirigidas a obtener información sobre la persistencia del virus de la FA en la caseína producida por el método industrial argentino, partiendo de leche descremada infectada experimentalmente con una muestra del virus de la FA presente en ese país.

MATERIALES Y METODOS

Animales de experimentación

Se utilizaron 12 novillos de 18-22 meses de edad, libres de anticuerpos específicos, adquiridos en una zona libre de FA en la provincia de Chubut, Argentina.

Virus

Se obtuvo partiendo de una cepa del virus C₃ Resende del cepario del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (I.N.T.A.), originaria del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa, que fue inoculada por vía intradermolingual (IDL) en 8 bovinos de condiciones similares a los descriptos anteriormente. A las 24 h se recogió el epitelio lingual virulento, con un título infeccioso para ratón lactante (DI₅₀) de 10^{9,74}/g.

Leche descremada

Se utilizó leche descremada de calidad standard, sin pasteurizar. Sobre la misma se realizaron los controles previos de calidad (Tabla 1).

* El presente trabajo fue solventado en parte, mediante subsidio especial de SANCOR Cooperativas Unidas Ltda., y presentado en el Primer Congreso y IV Jornadas Argentinas de Microbiología, Buenos Aires, 7-11 de junio de 1976.

** Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (I.N.T.A.), Rivedavia 1439, Buenos Aires, Argentina.

***Supervisor de Control de Calidad de SANCOR Cooperativas Unidas Ltda.

Las opiniones expresadas por los autores no necesariamente reflejan las del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa ni de la Organización Panamericana de la Salud.

TABLA 1. *Características de la leche descremada*

Acidez	18,5°D
Grasa	0,03%
Lactosa	4,92%
Cenizas	0,71%
Sólidos totales	8,88%
Cloruros	0,12%
Descenso crioscópico	-0,51 2°C
Prueba de conservantes	
Formol	neg.
Agua oxigenada	neg.
Cloro libre	neg.
Inhibidores termoestables	
Antibióticos	neg.
Amonio cuaternario	neg.
Recuentos de microorganismos	
Prueba de la coagulasa de estafilococos	neg. (1:1)
Salmonellas	neg. (1:25)

Con una porción de esta leche, con pH ajustado a 7,1 y a 4° C, se preparó una solución virulenta concentrada, obteniéndose un título de $10^{9,29}$ DI₅₀RL/ml. Parte de esta porción se incorporó a un volumen de la leche desnatada, calentada previamente a 43° C con un pH de 6,64, completándose posteriormente con esta última a 15 litros, de modo de tener una concentración final de 10⁶ DI₅₀RL/ml. Con esta leche descremada contaminada, se elaboró a continuación la caseína según la técnica industrial argentina.

Obtención de la caseína

La caseína se obtuvo siguiendo los procedimientos siguientes: floculación, maduración, lavado, prensado, molienda y secado.

La floculación de la caseína se produjo por la acción del ácido láctico, proveniente en parte del agregado de suero ácido de leche y en parte por la fermentación láctica de las termobacterias. Las características del suero ácido fueron 156° D de acidez; pH de 3,55 y 0,05% de grasa. El examen bacterioscópico mostró abundante cantidad de bastones grampositivos, largos, delgados, apareados

e inmóviles, no esporulados, y una pequeña cantidad de levaduras. La floculación se obtuvo mezclando esta leche contaminada con una cantidad predeterminada de suero ácido, de tal manera de obtenerse un pH igual a 5 manteniéndose la temperatura de coagulación a 43° C.

Se utilizaron dos bidones plásticos que contenían respectivamente la leche descremada y el suero. Ambos fueron calentados previamente a 43° C. Las bocas de salida de estos bidones se colocaron de tal manera que la leche descremada y el suero se mezclaban antes de pasar a través de una espiral de temperatura controlada. Desde esta espiral, el material era llevado a un tanque igual al que se utiliza en la producción del virus de la FA por el método de Frenkel. Este tanque tiene cierre hermético con agitación mecánica vertical y una doble pared para facilitar la circulación de agua, de modo tal que la temperatura se mantiene automáticamente a 43° C. Dentro del tanque se mantuvo una presión ligeramente superior a la normal mediante la inyección de aire. El tiempo de maduración fue de 350 min. El lavado se hizo por sistema de agua corriente en el mismo tanque.

El prensado se realizó durante 13 horas en una prensa manual con un molde de queso cubierto enteramente por tela suiza. Para la molienda se usó un molino eléctrico.

A continuación se procedió al secado en una estufa de laboratorio a 63,5° C con circulación forzada de aire durante 2 h.

Durante el proceso de maduración se obtuvieron muestras para determinar la acidez, el pH y la infectividad. También se midió el pH del agua de lavado de la caseína.

Se determinó el pH de una suspensión del producto final en agua y se hicieron los correspondientes controles de calidad. El pH del agua del primer lavado fue 5,8 y el del segundo lavado fue de 6,7. El pH de la caseína en 10% de suspensión en agua fue de 4,6.

Preparación de la caseína para las pruebas de infectividad

1. Se preparó una suspensión de caseína al 10% en solución buffer fosfato, usando un homogeneizador de alta velocidad.

2. A partir de esta suspensión de caseína se hizo el agregado de hidróxido de sodio 1,5 normal a un pH de 7,6 en una mezcla permanente.

3. Parte del caseinato de sodio fue tratado con un volumen equivalente de triclorotrifluoretano (TTE) usando un homogeneizador de alta velocidad a 16.000 rpm durante 4 min. Durante esta operación, el material fue enfriado en un baño de hielo. La fase acuosa se obtuvo de la mezcla por centrifugación a 1.200 g durante 10 min a 4° C. Este procedimiento tenía por finalidad separar todas las eventuales partículas infecciosas en la proteína, anticuerpos, caseína, etc. (1).

4. Una porción del caseinato de sodio tratado con TTE se precipitó mediante el agregado de polietilenglicol 6.000 (PEG) para concentrar las eventuales partículas residuales del virus (3). La concentración final de PEG fue de 7,5% p/v. El agregado de PEG se llevó a cabo con agitación magnética. La mezcla se dejó sedimentar durante toda la noche a 4° C. Se centrifugó 90' a 2.000 g y a 4° C y el precipitado se resuspendió en 1/5 de su volumen original.

Las secuencias de pH y de acidez durante el proceso de maduración se observan en la Tabla 2.

Las muestras de los tratamientos mencionados - 1, 2, 3 y 4 - tuvieron un pH de 5,30, 7,62, 7,57 y 7,59, respectivamente. Estas muestras fueron inoculadas en bovinos y en ratones lactantes.

Pruebas de infectividad

Fueron inoculados 12 bovinos (3 para cada uno de los cuatro tratamientos) usando 2 ml por vía IDL distribuidos en 20 puntos de la lengua y 20 ml por vía intramuscular (IM) a cada animal. Diariamente se registró la temperatura y fueron examinadas las bocas y las patas de todos los animales a los 3, 5, 7, 10 y 14 días postinoculación.

Todas las muestras inoculadas a los bovinos también fueron inoculadas a 74 ratones lactantes por vía IM a la dosis de 0,05 ml por ratón.

RESULTADOS

Los datos relativos a las pruebas de calidad de la caseína terminada que se realizaron en el laboratorio de control, se presentan en la Tabla 3.

TABLA 2. Acidez y pH del proceso de maduración de la caseína

Tiempo (min.)	Acidez (º Dornic)	pH
0	38,5	4,95
140	43,0	4,80
230	47,0	4,70
300	53,5	4,50
350	65,5	4,28

TABLA 3. Composición de la caseína elaborada

Solución	Completa
Color	Blanco cristalino
Consistencia	Muy buena
Olor	Natural
Aspectos	Algo sucia, poco
Acidez total	8,7 ml
Materia grasa	1,0%
Cenizas	0,0%
Humedad	4,3%

Al hacerse la clasificación del producto final se obtuvieron 47 puntos sobre un máximo de 50.

En los ratones lactantes se observaron algunas reacciones no específicas en el sitio de inoculación y ocurrieron también algunas muertes debido a las características de los materiales inoculados.

Con materiales provenientes de los ratones muertos se hicieron pasajes ciegos. Tanto los materiales de los ratones muertos como los que se obtuvieron de los pasajes ciegos, fueron sometidos a pruebas de fijación del complemento (FC) con resultados negativos.

Las muestras extraídas a los 140 y a los 350 min fueron tituladas en ratones lactantes, siendo el título de $10^{1,29}$ por ml para la primera y negativo para la segunda. No se observaron variaciones importantes en la temperatura corporal de los bovinos inoculados, como así tampoco se observaron lesiones atribuibles al virus de la FA.

Catorce días después de inoculados con las muestras de caseína, los bovinos fueron reinoculados por vía IDL en 20 puntos con 10^4 DI₅₀ RL del mismo virus que se usó para contaminar la leche.

Todos los animales inoculados mostraron lesiones típicas de FA lo que comprobó su sensibilidad.

Muestras de epitelio recogidas a las 72 h post-inoculación fueron positivas para el virus C₃ Re-sende en la prueba de FC.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

El método para obtener el material contaminado para la experiencia - contaminar la leche artificialmente o infectar vacas experimentalmente (2) - parece no tener una influencia definitiva en los resultados obtenidos, los que resultan ser similares en ambos casos. Por eso se decidió utilizar el primer método a fin de disponer de un control más eficiente sobre la concentración del virus. La detección del virus en la muestra obtenida a los 140 min de coagulación está de acuerdo con los resultados informados por el grupo de Plum Island (2). Una exposición ulterior a la acción del ácido, aparentemente causa una pérdida de la infectividad residual.

Aun cuando no hay resultados experimentales concluyentes con respecto a la estabilidad del virus de la misma cepa, obtenida de cultivos o de epite-

lio celular, experiencias comparativas de inactivación con hidroxilamina (5) sugieren que hay una mayor estabilidad del virus cuando es obtenido de epitelio virulento. Una observación similar se hace rutinariamente cuando se almacena virus de este origen.

El uso de TTE para la separación del virus de los anticuerpos y otros componentes proteicos, y el uso del PEG para la precipitación y concentración del virus probablemente aumentan la sensibilidad del sistema utilizado para detectar cualquier virus residual. No obstante, en estos tratamientos no fue posible detectar virus residual en la caseína preparada de acuerdo con el procedimiento industrial argentino utilizando una leche contaminada experimentalmente con un alto contenido de virus. Se debe destacar que las muestras fueron inoculadas a animales muy susceptibles, lo que conduce a la conclusión de que el virus no sobrevive a la acción conjunta de un pH y una temperatura superior a los 40° C por un período relativamente largo.

Estos resultados sugieren que la caseína producida por el método industrial argentino no parece ser un vehículo para la diseminación de la FA.

REFERENCIAS

1. BROWN, F.; CARTWRIGHT, B. Purification of the virus of foot-and-mouth disease by fluorocarbon treatment and its dissociation from neutralizing antibody. *J. Immunol.* 85: 309-313, 1960.
2. CALLIS, J.; HYDE, J.L.; BLACKWELL, J.H.; CUNLIFFE, H.R. Survival of foot-and-mouth disease virus in milk and milk products. *Bull. Off. int. Epizoot.* 83 (3-4): 183-191, 1975.
3. FAYET, M.T. Concentration du virus de la fièvre aphteuse par le polyéthylene glycol. *Ann. Inst. Pasteur* 118 (3): 356-366, 1970.
4. RASMUSSEN, SVEND B. Elaboración de la caseína láctica sistema pH. Manual del Caseinero, capítulo X, pág. 59, Buenos Aires, 1954.
5. RIVENSON, W.; ZULOAGA, G.G. Inactivación del virus aftoso por la hidroxilamina. *Bull. Off. int. Epizoot.* 61 (9-10): 1123-1142, 1964.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen vivamente a las siguientes organizaciones por su cooperación: Centro Panamericano de Zoonosis (CEPANZO/OPS); Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (CPFA/OPS); Servicio Nacional de Productos Ganaderos (SEAG); Servicio Nacional de Producción y Comercialización Animal (SEAG); Servicio Nacional de Sanidad Animal (SEAG); Servicio de Laboratorio de SENASA (SEAG); Instituto Nacional de Tecnología Industrial (I.N.T.I.); SANCOR Cooperativas Unidas Ltda.; Centro de Industria Lechera; La Serenísima S.A.

INACTIVATION OF FOOT-AND-MOUTH DISEASE VIRUS IN CASEIN*

*Osvaldo P. Gaggino **; Osvaldo L. Ibarra **; Ana María Sadir de Marra **;
Roberto A. Cacchione **; Danté J. Milese ***; Luis Nicora **; Scholein Rivenson ***

SUMMARY

This experiment studied the persistence of foot-and-mouth disease (FMD) virus in casein produced according to the Argentine industrial method, using standard quality milk experimentally contaminated with type C₃ FMD virus. The samples were treated with fluorocarbon, and virus concentration methods were used.

No FMD virus was detected in any of the samples. Thus, casein produced according to the industrial process used in Argentina is an unlikely vehicle for the spread of FMD.

INTRODUCTION

Experiments made at the Plum Island Animal Disease Center (U.S. Department of Agriculture, Greenport, N.Y., U.S.A.) using the Mecklenburg strain of type A foot-and-mouth disease (FMD) virus showed that this strain survived in casein. This casein was obtained by coagulating skim-milk with hydrochloric acid and leaving the mixture for 1 hour. At the start of these experiments the virus titer in the skim-milk was 10^{5.2} and 10^{6.1} PFU/ml (2). Although this process for producing skim-milk is used in other countries, it differs fundamentally from that used in Argentina (4).

In view of the above results, the research described here attempted to obtain information on the persistence of FMD virus in casein produced by the Argentine industrial method starting from skim-milk experimentally infected with a virus

strain present in that country.

MATERIALS AND METHODS

Experimental animals

Twelve steers, 18-22 months old, were used. These animals were free of specific antibodies and came from an FMD-free zone, the Province of Chubut, Argentina.

Virus

The FMD virus C₃ Resende of the Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (I.N.T.A.) strain collection was used, originally obtained from Pan American Foot-and-Mouth Disease Center. The stock virus was obtained by intra-dermolumgual inoculation of 8 cattle similar to those used in the experiments. At 24 hours, tongue epithelium was harvested; it had an infectivity titer of 10^{9.74}/mouse ID₅₀/g.

Skim-milk

Standard quality unpasteurized skim-milk was used. Results of earlier quality controls are shown in Table 1. Using a portion of this milk at 4° C, pH adjusted at 7.1, a concentrated virulent suspension was prepared with a titer of 10^{9.29} mouse ID₅₀/ml. Part of this portion was incorporated into the skim-milk which had been previously heated to 43° C, with a pH of 6.64. The volume

* Research for this article was sponsored, in part, by the SANCOR United Cooperatives, Ltd., and presented at the First Congress and IV Argentine Workshop on Microbiology, Buenos Aires, 7-11 June 1976.

** Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (I.N.T.A.), Rivadavia 1439, Buenos Aires, Argentina.

***Supervisor of Quality Control of SANCOR United Cooperatives, Ltd.

The opinions expressed by the authors do not necessarily reflect those of the Pan American Foot-and-Mouth Disease Center nor of the Pan American Health Organization.

TABLE 1. *Characteristics of the skinned milk*

Acidity	18.5° D
Fat	0.03%
Lactose	4.92%
Ashes	0.71%
Total solids	8.88%
Chlorides	0.12%
Chrysoscopic decrease	-0.51 2°C
Test for preservatives	
Formaldehyde	neg.
Hydrogen peroxide	neg.
Free chlorine	neg.
Thermostable inhibitors	
Antibiotics	neg.
Quaternaire ammonium	neg.
Bacterial counts	
Staphylococcus coagulase test	neg. (1:1)
Salmonella	neg. (1:25)

was completed to 15 liters to obtain a final concentration of 10^6 mouse ID₅₀/ml. With this contaminated skim-milk the casein was prepared according to the standard industrial process used in Argentina.

Preparation of the casein

The casein was prepared by the following procedures: flocculation, maturation, rinsing, pressing, grinding and drying.

Flocculation of the casein was produced by the action of lactic acid which was produced in part by the addition of acid whey and in part by the lactic fermentation of the thermobacteria. The whey had the following characteristics: 156° D of acidity; pH 3.55 and 0.05% fat. Bacterioscopic examination showed an abundance of large, thin, paired, immobile gram-positive rods, no evidence of spore and a small number of yeast cells. The flocculation was obtained by mixing the contaminated skim-milk with a predetermined amount of whey sufficient to obtain a pH of 5. The temperature during coagulation was 43° C.

Two plastic containers were used, holding respectively the skim-milk and whey. Both had

been previously heated to 43° C. The spouts of the containers were joined so that the skim-milk and the whey were mixed before passing through a controlled-temperature spiral. From this spiral the material moved into a tank, the same as is used for the production of FMD virus according to the Frenkel method. This tank is a hermetically sealed container with mechanical vertical agitation and a double wall to facilitate the circulation of water to maintain the temperature automatically at 43° C. A slightly higher than normal internal pressure was maintained by the injection of air. The time of maturation was 350 min. The rinsings were done by running water in the same tank.

The pressing was carried out over 13 h in a manual press in a cheese mold internally covered with "Swiss gauze". An electric mill was used for the grinding.

Next, the material was dried in a laboratory oven at 63.5° C with forced air circulation for 2 hours.

During the maturation process samples were obtained to determine the acidity, pH and infectivity. The pH of the water from the casein rinsing drainings was also measured.

The pH of a suspension of the final product in water was determined and the corresponding quality controls were made. The pH of water from the first rinsing was 5.8 and 6.7 from that of the second rinsing. The pH of the casein in a 10% suspension in water was 4.6.

Preparation of the casein for the infectivity assays

1. A high velocity homogenizer was used to prepare 10% of casein in phosphate buffer.
2. From this suspension sodium casein was made by adding sodium hydroxide 1.5 N, pH 7.6 with continuous mixing.
3. Part of the sodium caseinate was treated with an equal volume of trichlorotrifluoroethane (TTE) using a homogenizer at 16,000 rpm for 4 min. During the operation the material was cooled in an ice bath. The aqueous phase was obtained from the mixture by centrifugation for 10 min at 1,200 g, 4° C. This procedure was used to separate all eventual infective particles from the protein such as antibodies and casein (1).

4. A portion of the sodium caseinate treated with TTE was precipitated by adding polyethylene glycol 6,000 (PEG) to concentrate all eventual residual virus particles (3). The final concentration of PEG was 7.5%, weight/volume. PEG was added during continuous mixing. The mixture was left to sediment overnight at 4° C. It was centrifuged during 90' at 2,000 g and at 4° C, and the precipitation was resuspended in 1/5 of the original volume.

The sequence of pH and acidity during the maturation process is given in Table 2.

TABLE 2. Acidity and pH during the maturation of the casein

Time (min.)	Acidity (° Dornic)	pH
0	38.5	4.95
140	43.0	4.80
230	47.0	4.70
300	53.5	4.50
350	65.5	4.28

The pH of the samples of treatments 1, 2, 3 and 4 above were 5.30, 7.62, 7.57 and 7.59, respectively. These samples were inoculated in cattle and suckling mice.

Infectivity assays

Twelve cattle -- 3 for each of the four treatments -- were inoculated using 2 ml for the intradermolingual routes distributed in 20 points and 20 ml by intramuscular route per animal. Daily body temperature was recorded, and the mouths and feet of all animals were examined on 3, 5, 7, 10 and 14 days post-inoculation.

Each of the samples inoculated in cattle also was used to inoculate 74 suckling mice by the intramuscular route, 0.05 ml per mouse.

RESULTS

Quality evaluations of the finished casein made in the control laboratory are given in Table 3.

TABLE 3. Composition of the processed casein

Solubility	Complete
Color	White crystalline
Consistency	Very good
Odor	Natural
Aspect	Slightly dirty
Total acidity	8.7 ml
Fatty material	1.0%
Ashes	0.0%
Moisture	4.3%

Evaluation of the final product resulted in 47 points from a maximum of 50.

For the suckling mice some non-specific reactions were observed at the inoculation site and some deaths occurred due to the characteristics of the injected materials.

Blind passages were made on materials from the dead mice. Materials from both the dead mice and from the blind passages were submitted to CF tests with negative results.

The samples collected at 140 min contained $10^{1.29}$ /mouse ID₅₀/ml. The 350 min sample was negative.

The inoculated cattle showed no signs of fever and no FMD lesions could be observed.

Fourteen days after the cattle were inoculated with the samples of casein they were again inoculated at 20 sites intradermolingually with 10^4 mouse ID₅₀ of the same virus used to contaminate the milk. All the inoculated animals developed typical generalized lesions of FMD, thus demonstrating the sensitivity of the cattle.

Epithelial samples collected at 72 hours post-inoculation were positive for virus C₃ Resende by the CF test.

DISCUSSION AND CONCLUSIONS

The method of obtaining contaminated starting material -- artificial contamination or the use of milk from experimentally infected cattle (2) -- does not seem to have definitely influenced the results obtained, which were similar in both cases. Thus, it was decided to use the first method in order to provide a more efficient control over the

virus concentration. Detection of virus in the sample obtained at 140 min of coagulation is in keeping with the results reported by the Plum Island group (2). Further exposure to the acid apparently caused the loss of residual infectivity.

Even though there are no conclusive experimental results with regard to the stability of virus of the same strain obtained from all culture or tongue epithelium comparative experiments with hydroxilamine inactivation (5) suggest a higher stability of virus obtained from bovine tongue epithelium. Similar observations were made routinely with storage of FMD virus of this origin.

The use of TTE for the separation of virus from antibodies and other protein components and the

use of PEG for the precipitation and concentration of virus probably increased the sensitivity of the test system used for detecting residual virus. In spite of these treatments no residual virus was detected in casein prepared according to the standard Argentine industrial process using experimentally contaminated milk with a high virus content. It must also be noted that the samples were tested in highly susceptible cattle which leads to the conclusion that the virus does not survive the joint action of low pH and the temperature above 40° C for a prolonged period of time.

These results suggest that casein produced according to the industrial process used in Argentina is an unlikely vehicle for the spread of FMD.

REFERENCES

1. BROWN, F.; CARTWRIGHT, B. Purification of the virus of foot-and-mouth disease by fluorocarbon treatment and its dissociation from neutralizing antibody. *J. Immunol.* 85: 309-313, 1960.
2. CALLIS, J.; HYDE, J.L.; BLACKWELL, J.H.; CUNLIFFE, H.R. Survival of foot-and-mouth disease virus in milk and milk products. *Bull. Off. int. Epizoot.* 83 (3-4): 183-191, 1975.
3. FAYET, M.T. Concentration du virus de la fièvre aphteuse par le polyéthylène glycol. *Ann. Inst. Pasteur* 118 (3): 356-366, 1970.
4. RASMUSSEN, SVEND B. Elaboración de la caseína láctica sistema pH. Manual del Caseinero, capítulo X, pág. 59, Buenos Aires, 1954.
5. RIVENSON, W.; ZULOAGA, G.G. Inactivación del virus aftoso por la hidroxilamina. *Bull. Off. int. Epizoot.* 61 (9-10): 1123-1142, 1964.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors gratefully acknowledge the following organizations for their assistance: Centro Panamericano de Zoonosis (CEPANZO/PAHO); Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (CPFA/PAHO); Servicio Nacional de Productos Ganaderos (SEAG); Servicio Nacional de Producción y Comercialización Animal (SEAG); Servicio Nacional de Sanidad Animal (SEAG); Servicio de Laboratorio de SENASA (SEAG); Instituto Nacional de Tecnología Industrial (I.N.T.I.); SANCOR Cooperativas Unidas Ltda.; Centro de Industria Lechera; La Serenísima S.A.

SUSCEPTIBILIDAD DEL CARPINCHO O CAPIBARA (*Hydrochoerus hydrochoeris*) AL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA

Félix J. Rosenberg*; Ivo Gomes*

RESUMEN

Ocho carpinchos (*Hydrochoerus hydrochoeris*) fueron expuestos por vía intramuscular al virus O₁ de la fiebre aftosa. Se logró aislar el virus de la mayoría de los órganos de cuatro animales sacrificados entre 24 y 48 horas posteriores a la inoculación (PI). Los otros cuatro carpinchos desarrollaron lesiones vesiculares en todas las patas entre 72 y 96 horas PI, con excreción viral en materias fecales hasta, por lo menos, 10 días PI y desarrollo de anticuerpos de neutralización y anti-VIA.

Estos resultados sugieren la realización de pruebas de contacto entre carpinchos y con bovinos teniendo en cuenta su amplia distribución en las áreas consideradas endémicas de fiebre aftosa donde mantienen un contacto estrecho con la población bovina.

INTRODUCCION

Uno de los problemas epidemiológicos más críticos con respecto a la fiebre aftosa que aún no ha recibido respuesta adecuada es el de la persistencia del virus en el campo durante los períodos interpidémicos. Si bien se ha postulado que el propio bovino portador sería el mayor responsable por la permanencia de la enfermedad en las áreas endémicas, existen ciertas observaciones que implicarían, asimismo, a diversas especies de animales silvestres, particularmente roedores, como reservorios ecológicos de los agentes causantes de la fiebre aftosa (1).

Varios autores han demostrado la susceptibilidad de especies de pequeños mamíferos silvestres al virus de la fiebre aftosa, tanto en forma natural a campo como el caso del erizo (*Erinaceus europeus*) (2) o por diversas vías experimentales de

exposición como la rata marrón (*Rattus norvegicus*) (3), la nutria (*Myocastor coypus*), el topo (*Talpa europaea*), la ardilla gris (*Sciurus carolinensis*) y el arvícola (*Arvicola amphibius amphibius*) (4,5), el peludo o armadillo (*Chaetophractus villosus*) (6) y el agouti (*Dasyprocta aguti*) (7). En ningún caso, sin embargo, se ha podido establecer si estas especies pueden constituir reservorios naturales de virus, si juegan un papel importante como difusores de la enfermedad durante la ocurrencia de brotes en las especies domésticas o si constituyen apenas huéspedes accidentales del virus.

De todos los pequeños mamíferos silvestres de distribución común en América del Sur, el carpincho, capibara o chigüire (*Hydrochoerus hydrochoeris*) merece atención especial por tratarse de una especie difundida principalmente en las áreas endémicas de fiebre aftosa donde mantiene un alto grado de competencia ecológica con la especie bovina (8).

Debido a que no existe ningún antecedente experimental sobre el carpincho y la fiebre aftosa, el presente estudio tuvo como objetivo la determinación de la susceptibilidad de esta especie cuando expuesta al virus por vía parenteral y sistémica.

MATERIALES Y METODOS

Animales de experimentación

Fueron utilizados 7 carpinchos jóvenes (12-20 kg de peso) y 1 adulto (35-45 kg) provenientes del municipio de Presidente Prudente, estado de São Paulo, Brasil, capturados y gentilmente cedidos por el servicio del Programa de Combate a la Fiebre Aftosa en ese estado. Las pruebas fueron realizadas en porquerizas con piso de cemento que

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

el Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (CPFA) posee en su sede en Río de Janeiro (Fotografías 1 y 2).

Virus y vía de exposición

Los animales fueron inoculados por vía intramuscular (IM) en el muslo con 6 ml de una suspensión que contenía $10^{7.36}$ DICT₅₀/ml de virus O₁ Campos.

Colecta de materiales y exámenes clínicos

Los carpinchos inoculados fueron examinados diariamente con el fin de detectar el aparecimiento de lesiones vesiculares en la boca y patas. Dos animales fueron sacrificados a las 24 y otros dos a las 48 horas postinoculación (PI). De estos 4 animales se colectaron muestras de sangre y órganos para someterlas a pruebas de aislamiento de virus.

De los 4 animales restantes se recogieron muestras de materias fecales con el fin de intentar aislamiento de virus en los días 4, 5, 6 y 10 PI.

Las muestras de órganos y heces fueron conservadas en medio Vallée con antibióticos y mantenidas a -70°C hasta su procesamiento.

Para la detección de anticuerpos se obtuvieron muestras de sangre por punción cardíaca o de la vena safena a los 0, 15, 37 y 69 días PI. Los sueros se conservaron a -20°C hasta su utilización.

Pruebas de aislamiento de virus

Las muestras de sangre heparinizada para la detección de viremia fueron inoculadas en ratones lactantes por vía intraperitoneal y tituladas en monocapas de células IB-RS-2 (9).

Para los ensayos de aislamiento de virus de órganos y heces, los materiales fueron suspendidos en 10 partes (peso/volumen) de medio Earle con antibióticos con la adición de 7 partes de triclorotri-fluoretano (TTE) en un omnimixer Sorvall*.

Las suspensiones fueron centrifugadas por 30 minutos a 800 g. El sobrenadante de las suspensiones de órganos fue inoculado en volúmenes de 0,2 ml sobre monocapas de células IB-RS-2 con medio semi-sólido. Los sobrenadantes de las suspensiones de heces fueron inoculados en volúmenes de 10 ml sobre monocapas de células IB-RS-2 en botellas Roux.

Pruebas para la detección de anticuerpos séricos

Se utilizaron las pruebas de doble difusión de agar para la detección de anticuerpos anti-VIA (10) y la microtécnica de seroneutralización (11) para la titulación de anticuerpos específicos.

RESULTADOS

Lesiones clínicas

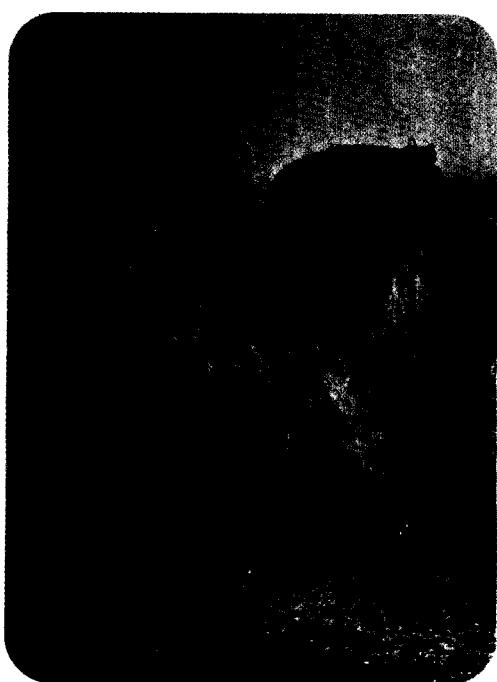
Los 4 carpinchos sacrificados a las 24 y 48 horas PI no desarrollaron ningún tipo de lesión macroscópica. Sin embargo, los 4 animales sobrevivientes desarrollaron lesiones vesiculares graves en las 4 patas entre 72 y 96 horas PI (Fotografías 3 y 4). Estas lesiones abarcaban la totalidad de la mucosa interdigital asemejándose a las lesiones producidas por el virus de la fiebre aftosa en suinos. No se observaron lesiones en la lengua, mucosas labiales o encías. De las lesiones vesiculares se aisló en todos los casos virus O₁.

Tres de los carpinchos murieron entre 13 y 38 días PI, presumiblemente como consecuencia de accidentes.

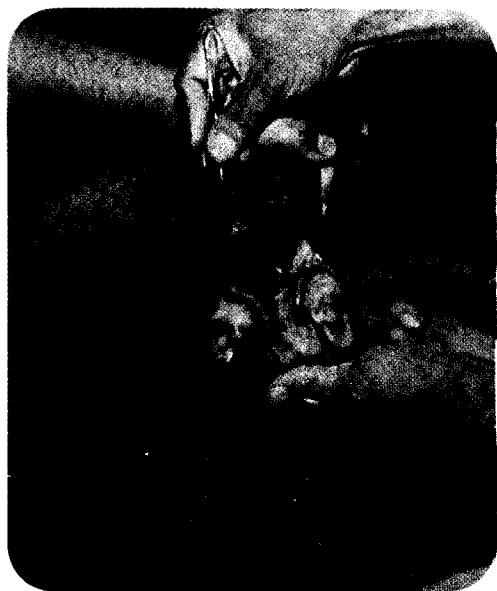
Titulación de virus en órganos

La tabla 1 presenta los títulos virales de materiales de órganos provenientes de los 4 carpinchos sacrificados entre 24 y 48 horas PI. Se consiguió detectar virus en la mayoría de los extractos de órganos. En general se obtuvieron aislamientos más frecuentes y títulos virales más altos en los animales sacrificados 48 horas PI que en aquellos sacrificados a las 24 horas PI.

* Dupont Co. Inst. Prod. Div. Sorvall Operations, Newtown, Conn. 06470 U.S.A.



FOTOGRAFIAS 1 y 2. *Tres de los carpinchos utilizados (1 adulto y 2 jóvenes) en las instalaciones del CPFA.*



FOTOGRAFIAS 3 y 4. *Lesiones vesiculares características de fiebre aftosa en el espacio interdigital de carpinchos inoculados 96 horas antes con virus O₁ de la fiebre aftosa por vía intramuscular*

TABLA 1. Aislamiento de virus de órganos de carpinchos inoculados por vía intramuscular con virus de la fiebre aftosa tipo O₁ Campos

Muestra	Horas postinoculación			
	24		48	
	Animales Nº 1	Nº 2	Animales Nº 3	Nº 4
Sangre (ratones)	3/8*	7/8	8/8	7/8
Sangre (IB-RS-2)	—	—	3,3**	—
Faringe	1,7***	—	3,0	1,7
Laringe	—	2,0	2,5	—
Pulmón	—	—	3,4	1,7
Duodeno	1,7	2,0	1,7	1,7
Cálon	1,7	1,7	2,3	2,0
Recto	2,0	1,7	2,5	2,0
Hígado	—	—	2,5	1,7
Páncreas	2,3	2,3	2,8	2,0
Riñón	—	2,0	3,0	2,0
Vejiga urinaria	2,2	—	2,2	2,0
Glándula sublingual	1,7	—	2,9	2,0
Bazo	—	2,0	2,5	—
Ganglio retrofaríngeo	—	2,0	3,2	1,7
Ganglio mediastínico	1,7	1,7	2,0	1,7
Ganglio inguinal ^{1/}	3,5	2,0	4,6	2,8
Músculo inoculado	2,6	3,3	2,4	NT
Corazón	1,7	—	—	2,3

^{1/} En los animales 1, 3 y 4 el ganglio corresponde a la pata inoculada; en el 2 a la pata opuesta.

* Número de muertos/total inoculados.

** Log DI₅₀ %/ml de sangre.

*** Log UFP/g.

NT No testado.

— Negativo.

Aislamientos de virus de materias fecales

En la tabla 2 se indican los resultados de la inoculación de suspensiones de heces en cultivos de tejidos.

Se logró aislar virus O₁ de, por lo menos, una muestra de cada uno de los 4 carpinchos. En dos de ellos fue posible aislar virus hasta el 10^º día PI.

TABLA 2. Aislamientos de virus de heces de carpinchos inoculados por vía intramuscular con virus de la fiebre aftosa tipo O₁ Campos

Animal nº	Días postinoculación			
	4	5	6	10
5	—	+	—	+
6	+	+	+	+
7	NT	NT	+	—
8	+	+	+	—

+ Positivo.

— Negativo.

NT No testado.

Desarrollo de anticuerpos

Ninguno de los 8 carpinchos poseía anticuerpos detectables contra la fiebre aftosa antes de la exposición al virus. Los tres animales sobrevivientes desarrollaron anticuerpos de neutralización y contra el antígeno VIA entre 15 y 37 días PI (Tabla 3).

DISCUSION

En este estudio preliminar se encontró que, cuando el carpincho es expuesto por vía sistémica al virus de la fiebre aftosa, éste replica activamente en diversos órganos produciendo lesiones vesiculares generalizadas en las patas, similares a las observadas en las especies domésticas afectadas por esta enfermedad en forma natural. Llaman particularmente la atención los altos títulos virales obtenidos en los ganglios linfáticos correspondientes al sitio de inoculación, lo que indicaría que posiblemente éste haya sido el sitio primario de replicación del virus.

Ha sido demostrada previamente la susceptibilidad de varios mamíferos silvestres expuestos al virus de la fiebre aftosa por diversas vías. Entre estos merecen especial mención los erizos, aparentemente sensibles a la infección natural a campo (2). Otras especies sensibles a la exposición por contacto y/o ingestión incluyen la rata marrón (3), la nutria (4), la ardilla (5), el peludo o armadillo (6) y el agouti (7).

TABLA 3. Desarrollo de anticuerpos de microneutralización y anti-VIA
en carpinchos inoculados por vía intramuscular con
virus de la fiebre aftosa tipo O₁ Campos

Animal nº	Días postinoculación							
	0		15		37		69	
	MN ¹	VIA ²	MN	VIA	MN	VIA	MN	VIA
5*	<1,0	—	1,65	—	2,7	+		
6*	<1,0	—						
7*	<1,0	—	1,8	+				
8	<1,0	—	2,25	+	2,55	+	2,4	+

1. Microneutralización = Recíproca del logaritmo de la dilución que neutraliza 100-200 DI₅₀.

2. — = Negativo; + = Positivo.

* Animal nº 5 muerto 38 días PI; nº 6 muerto 13 días PI; nº 7 muerto 22 días PI.

El carpincho merece atención particular porque, además de compartir habitats y nichos ecológicos comunes con el bovino - particularmente en las zonas de bañados - comparte con éste los escasos lugares secos para pernoctar, como se deduce de la observación de grandes cantidades de heces de ambas especies en esos lugares. Las zonas de bañados muy extensas son, por otra parte, una característica común de las regiones consideradas como ecosistemas endémicos de reserva de virus en el sur del continente (Ej.: Chaco Paraguayo, en Paraguay; Pantanal Matogrossense, Brasil; provincia de Entre Ríos, Argentina y los llanos orientales en Colombia (12).

La susceptibilidad del carpincho a la inoculación intramuscular de esta cepa de virus de la fiebre aftosa no significa, necesariamente, que este

animal sea un verdadero reservorio de virus. Por el contrario, puede ser un huésped secundario del virus transmitido por el propio bovino, en cuyo caso su interés epidemiológico no pasaría del de un eventual transmisor de virus durante brotes agudos.

Los resultados de este estudio, relativos a la susceptibilidad del carpincho al virus de la fiebre aftosa, el íntimo contacto existente entre carpinchos y bovinos y la mayor distribución de carpinchos en áreas sospechosas de ser endémicas para la fiebre aftosa, sugieren la importancia de la realización de estudios de contacto entre carpinchos y especies susceptibles domésticas, especialmente bovinas, la investigación de la persistencia del virus en individuos infectados, así como estudios de campo tendientes a establecer la prevalencia de infección por fiebre aftosa en carpinchos de áreas endémicas.

REFERENCIAS

1. ROSENBERG, F.J. El conocimiento de la fiebre aftosa con particular referencia a Sudamérica. *Ser. Monog. Cient. Técn.* N° 5, Centro Panamericano de Fiebre Aftosa, 50 pp., 1975.
2. McLAUCHLAN, J.D.; HENDERSON, W.M. The occurrence of foot-and-mouth disease in the hedgehog under natural conditions. *J. Hyg. Camb.* 45: 474-479, 1947.
3. CAPEL-EDWARDS, M. Foot-and-mouth disease in the brown rat. *J. Comp. Path.* 80 (4): 543-548, 1970.
4. CAPEL-EDWARDS, M. Foot-and-mouth disease in the *Myocastor coypus*. *J. Comp. Path.* 77: 217-221, 1967.
5. CAPEL-EDWARDS, M. The susceptibility of three British small mammals to foot-and-mouth disease.

6. *J. Comp. Path.* 81 (3): 433-438, 1971.
6. CAMPION, R.L. Receptividad del *Chaetophactus vellosus* (peludo) al virus de la fiebre aftosa. *Gac. Vet. (Buenos Aires)* 12 (69): 3-14, 1950.
7. FEDERER, K.E. Susceptibility of the agouti (*Dasyprocta aguti*) to foot-and-mouth disease. *Zbl. Vet. Med., B-16* (9): 847-854, 1969.
8. OJASTI, J. Estudio biológico del chigüire o capibara. Ed. Fondo Nac. de Invest. Agrop. Venezuela, 275 pp., 1973.
9. PEREIRA DE CASTRO, M. Clonal variation in the swine kidney cell line 1B-RS-2 in relation to morphology, karyotype and susceptibility to the foot-and-mouth disease virus. *Arqs. Inst. Biol. São Paulo* 37 (2): 103-127, 1970.
10. McVICAR, J.W.; SUTMÖLLER, P. Foot-and-mouth disease: the agar gel diffusion precipitation test for antibody to virus-infection-associated (VIA) antigen as a tool for epizootiologic surveys. *Am. J. Epid.* 92 (4): 273-278, 1970.
11. FERREIRA, M. E. V. Prueba de microneutralización para estudios de anticuerpos de la fiebre aftosa. (Microtiter neutralization test for the study of foot-and-mouth disease antibodies). *Bltn Centro Panamericano Fiebre Aftosa* 21-22: 17-20, 21-24, 1976.
12. ROSENBERG, F.J.; ASTUDILLO, V.M.; GOIĆ, R.; OBIAGA, A. Estrategias regionales para el combate a la fiebre aftosa: Un enfoque ecológico. (Manuscrito en preparación).

SUSCEPTIBILITY OF CAPYBARA (*Hydrochoerus hydrochoeris hydrochoeris*) TO FOOT-AND-MOUTH DISEASE VIRUS

Félix J. Rosenberg*; Ivo Gomes*

SUMMARY

Eight capybaras (*Hydrochoerus hydrochoeris hydrochoeris*) were exposed by the intramuscular route of foot-and-mouth disease virus (FMDV) type O₁. Virus was isolated from most of the organs collected from four animals slaughtered 24 to 48 hours post-inoculation (PI). The remaining capybaras developed vesicular lesions in their feet between 72 and 96 hours PI. Virus was shed with feces until at least 10 days PI. Neutralizing and VIA antibodies were developed.

Further contact studies between capybaras and cattle are suggested not only because of the positive results obtained but also because of the high capybara population density in areas considered to be endemic to FMD where a close contact with cattle can be observed.

INTRODUCTION

One of the most critical and as yet unsolved epidemiological problems in foot-and-mouth disease (FMD) is the survival of the virus in the field during interepidemic intervals. Although carrier cattle are suspected as being responsible for the persistence of the disease in endemic areas, certain observations would indicate that various species of wild animals, particularly rodents, may also act as ecologic reservoirs of the FMD causal agents (1).

Several authors have demonstrated the susceptibility of small wild mammals to FMD in both natural field conditions, as shown for the hedgehog (*Erinaceus europeus*) (2), and by various experimental inoculation routes. The latter include the brown rat (*Rattus norvegicus*) (3), the coypu (*Myocastor coypus*), the mole (*Talpa europeae*), grey squirrel (*Sciurus carolinensis*) and water vole

(*Arvicola amphybius amphybius*) (4,5), the armadillo (*Chaetophractus villosus*) (6) and the agouti (*Dasyprocta aguti*) (7). However, in none of these experiments was it possible to indicate whether these species may be considered as actual natural virus reservoirs, whether they play an important role in dissemination of the disease during epidemic outbreaks in domestic animals or if they only constitute an accidental host in the virus cycle.

Of all commonly distributed small wild mammals in South America, the capybara or "water pig" (*Hydrochoerus hydrochoeris*) merits special attention. This species is widely distributed particularly in FMD endemic areas where it maintains a high degree of ecological competition with cattle (8).

No previous experimental data are available relating capybaras to FMD. The present study was designed to determine the susceptibility of this species when exposed to the virus by the parenteral and systemic route.

MATERIALS AND METHODS

Experimental animals

Seven young (12-20 kg) and one adult (35-45 kg) capybaras were used. They were captured in the municipality of Presidente Prudente, state of São Paulo, Brazil, and donated to the Pan-American Foot-and-Mouth Disease Center (PAFMDC) by the FMD campaign service in that state. All tests were performed in adapted swine boxes with cement floors at the PAFMDC (Pictures 1 and 2).

Exposure routes and virus

The animals were inoculated intramuscularly in the leg with 6 ml of a virus suspension containing

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

$10^{7.36}$ TCID₅₀/ml. The virus strain used was O₁ Campos.

Sample collection and clinical examinations

The inoculated capybaras were examined daily to detect the appearance of vesicular lesions in the mouth and feet. Two animals were slaughtered at 24 hrs and two others at 48 hrs post-inoculation (PI). Blood and organ specimens for virus isolation trials were collected from these animals.

Of the remaining 4 animals feces were collected at 4, 5, 6 and 10 days PI.

Organ and feces samples were maintained at -70°C in Vallée medium with antibiotics until used.

For antibody studies blood samples were obtained by cardiac puncture or from the safena vein at 0, 15, 37 and 69 days PI. Sera were kept at -20°C until tested.

Virus isolation trials

Heparinized blood samples were inoculated intraperitoneally in newborn mice and IB-RS-2 (9) cell monolayers.

For virus isolation assays from organs and feces, the specimens were suspended in 10 parts (weight/volume) of Earle medium with antibiotics and mixed in a Sorvall* omnimixer with the addition of seven parts of trichloro trifluoroethane (TTE).

The suspensions were centrifuged at 800 g for 30 minutes. Two tenths of ml of the supernatants from the organ suspensions were inoculated onto IB-RS-2 cell monolayers in semisolid medium. Ten ml of the feces supernatants were inoculated into Roux bottles containing IB-RS-2 cell monolayers in liquid media.

Serum antibody assays

Agar double diffusion tests were used for the detection of VIA antibodies (10) and the microneutralization test (11) for the titration of specific antibodies.

RESULTS

Clinical lesions

None of the 4 animals slaughtered at 24 and 48 hrs PI developed macroscopic lesions. However, all the remaining capybaras developed serious vesicular lesions in their 4 feet between 72 and 96 hrs PI (Pictures 3 and 4). These lesions involved all of the interdigital mucosa and were similar to the vesicular lesions produced by FMD in swine. No lesions were observed in tongue, lips or gums. Virus O₁ was isolated from all vesicular lesions.

Three capybaras died between 13 and 38 days PI, presumably because of handling accidents.

Virus titration in organs

Virus titers of organ specimens obtained from the 4 capybaras killed at 24 and 48 hrs are shown on Table 1. Virus was detected in most of the organ extracts. In general, virus was isolated more often and virus titers were higher from the animals slaughtered at 48 hrs than from those slaughtered at 24 hrs PI.

Virus isolation from feces

Table 2 shows the results of the feces suspensions inoculated onto tissue cultures.

Virus O₁ was isolated from at least one sample of each of the 4 capybaras. In two animals virus was recovered for up to 10 days PI.

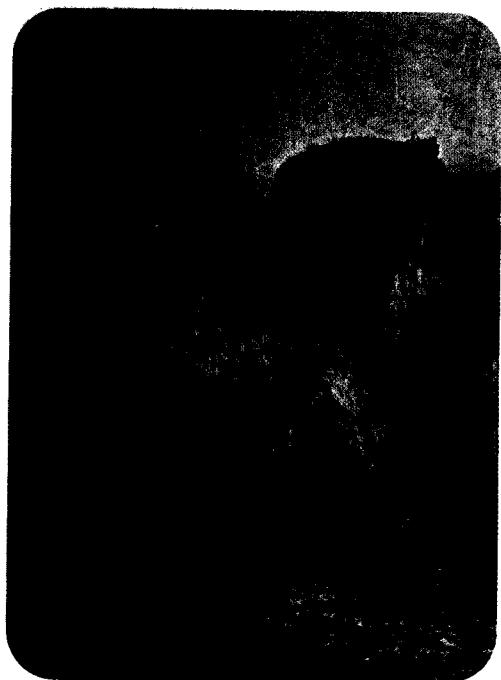
Development of antibodies

None of the 8 capybaras had detectable antibodies in their sera before virus exposure. The 3 surviving animals developed neutralizing and VIA antibodies between 15 and 37 days PI (Table 3).

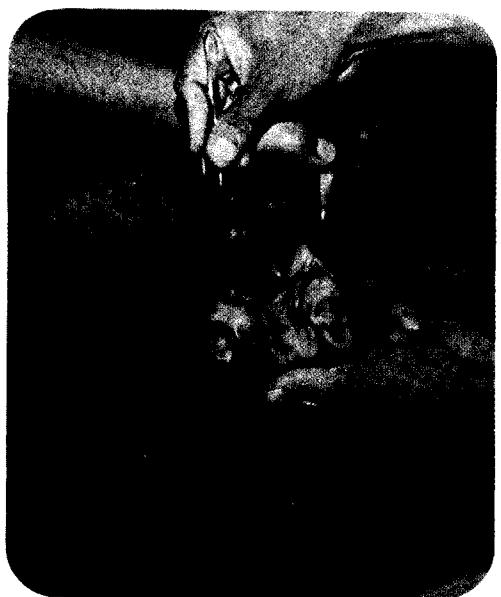
DISCUSSION

This preliminary study has shown that FMD virus inoculated into capybaras by the systemic route actively replicates in several organs, producing generalized vesicular lesions in the feet

* Dupont Co. Inst. Prod. Div. Sorvall Operations, Newtown, Conn. 06470 U.S.A.



PICTURES 1 and 2. *Three of the capybaras used in this study (one adult and 2 young) at the PAMFDC premises.*



PICTURES 3 and 4. *Vesicular lesions characteristic of FMD at the interdigital space of capybaras inoculated intramuscularly 96 hrs before with FMDV O₁.*

TABLE 1. *Virus isolation from organs of capybaras inoculated intramuscularly, with foot-and-mouth disease virus type O₁ Campos*

Specimen	Hours post-inoculation			
	24		48	
	Animal No. 1	Animal No. 2	Animal No. 3	Animal No. 4
Blood (mice)	3/8*	7/8	8/8	7/8
Blood (IB-RS-2)	—	—	3.3**	—
Farinx	1.7***	—	3.0	1.7
Larinx	—	2.0	2.5	—
Lung	—	—	3.4	1.7
Duodenum	1.7	2.0	1.7	1.7
Colon	1.7	1.7	2.3	2.0
Rectum	2.0	1.7	2.5	2.0
Liver	—	—	2.5	1.7
Pancreas	2.3	2.3	2.8	2.0
Kidney	—	2.0	3.0	2.0
Urinary bladder	2.2	—	2.2	2.0
Sublingual gland	1.7	—	2.9	2.0
Spleen	—	2.0	2.5	—
Retropharyngeal lymphnode	—	2.0	3.2	1.7
Mediastinic lymphnode	1.7	1.7	2.0	1.7
Inguinal lymphnode ^{1/}	3.5	2.0	4.6	2.8
Inoculated muscle	2.6	3.3	2.4	NT
Heart	1.7	—	—	2.3

^{1/} The lymphnode corresponds to the inoculated leg in animals 1, 3 and 4 and to the opposite leg in animal 2.

* Number of death/total inoculated.

** Log ID₅₀%/ml of blood.

*** Log PFU/g.

NT Not tested.

— Negative.

similar to the lesions observed in domestic susceptible animals when infected naturally by FMD. The relatively high virus titers obtained from the inguinal lymph nodes corresponding to the inoculated leg indicate that this is presumably the primary virus replication site.

The susceptibility of various small wild mammals exposed by different routes to FMD virus has been already demonstrated. Special reference must be made to the hedgehog, which is apparently susceptible to natural field infection (2). Other species which might become infected by contact and/or food exposure include the brown rat (3), the coypu (4), squirrel (5), armadillo (6) and agouti (7).

Of all these wild species the capybaras merit special attention. Capybaras share common habitats with cattle, particularly in flooded areas, where they share scarce dry sleeping places at night, as indicated by the large amounts of cattle and capybara feces observed at those places. The extensive flooded areas existing in South America are as well a characteristic of the endemic FMD ecosystems considered to be virus reservoirs in the southern part of the continent (i.e. Paraguayan Chaco, Paraguay; Mato Grosso's Pantanal, Brazil; the province of Entre Ríos, Argentina, and the eastern plains of Colombia (12).

The susceptibility of capybaras to the intramuscular inoculation of this FMD virus strain does not necessarily mean that this species constitutes an actual virus reservoir. On the contrary it might well be a secondary host to virus transmitted by cattle, in which case its epidemiological interest would not exceed that of an occasional virus transmitter during acute outbreaks.

The results obtained in the present study in relation to the susceptibility of capybaras to FMD virus, the close contact existing between capybaras and cattle in the field and the characteristic distribution of this species in areas suspected to be endemic for FMD, suggest the need for the development of contact studies between capybaras and with susceptible domestic species, particularly cattle, as well as the investigation of virus persistence in infected animals and field studies to determine FMD infection prevalence rates in capybaras of endemic areas.

TABLE 2. *Virus isolation from feces of capybaras inoculated intramuscularly with foot-and-mouth disease virus type O₁ Campos*

Animal No.	Days post-inoculation			
	4	5	6	10
5	—	+	—	+
6	+	+	+	+
7	NT	NT	+	—
8	+	+	+	—

+ Positive.

— Negative.

NT Not tested.

TABLE 3. *Microneutralization and VIA antibody development in capybaras inoculated intramuscularly with foot-and-mouth disease virus type O₁ Campos*

Animal No.	Days post-inoculation							
	0		15		37		69	
	MN ¹	VIA ²	MN	VIA	MN	VIA	MN	VIA
5*	<1.0	—	1.65	—	2.7	+		
6*	<1.0	—						
7*	<1.0	—	1.8	+				
8	<1.0	—	2.25	+	2.55	+	2.4	+

1. Microneutralization = Reciprocal of the logarithm of the dilution neutralizing 100-200 ID₅₀.

2. — = Negative; + = Positive.

* Animal No. 5 died 38 days PI; No. 6 died 13 days PI; No. 7 died 22 days PI.

REFERENCES

- ROSENBERG, F.J. El conocimiento de la fiebre aftosa con particular referencia a Sudamérica. *Ser. Monog. Cient. Técn.* No. 5, Centro Panamericano de Fiebre Aftosa, 50 pp., 1975.
- McLAUCHLAN, J.D.; HENDERSON, W.M. The occurrence of foot-and-mouth disease in the hedgehog under natural conditions. *J. Hyg. Camb.* 45: 474-479, 1947.
- CAPEL-EDWARDS, M. Foot-and-mouth disease in the brown rat. *J. Comp. Path.* 80 (4): 543-548, 1970.
- CAPEL-EDWARDS, M. Foot-and-mouth disease in the *Myocastor coypus*. *J. Comp. Path.* 77: 217-221, 1967.
- CAPEL-EDWARDS, M. The susceptibility of three British small mammals to foot-and-mouth disease. *J. Comp. Path.* 81 (3): 433-438, 1971.
- CAMPION, R.L. Receptividad del *Cheetophactus vellosus* (peludo) al virus de la fiebre aftosa. *Gac. Vet. (Buenos Aires)* 12 (69): 3-14, 1950.
- FEDERER, K.E. Susceptibility of the agouti (*Dasyprocta aguti*) to foot-and-mouth disease. *Zbl. Vet. Med., B-16* (9): 847-854, 1969.
- OJASTI, J. Estudio biológico del chigüire o capibara. Ed. Fondo Nac. de Invest. Agrop. Venezuela, 275 pp., 1973.
- PEREIRA DE CASTRO, M. Clonal variation in the swine kidney cell line IB-RS-2 in relation to morphology, karyotype and susceptibility to the foot-and-mouth disease virus. *Arqs. Inst. Biol. São Paulo* 37 (2): 103-127, 1970.
- McVICAR, J.W.; SUTMÖLLER, P. Foot-and-mouth disease: the agar gel diffusion precipitation test for antibody to virus-infection-associated (VIA) antigen as a tool for epizootiologic surveys. *Am. J. Epid.* 92 (4): 273-278, 1970.
- FERREIRA, M. E. V. Prueba de microneutralización para estudios de anticuerpos de la fiebre aftosa. (Micrititer neutralization test for the study of foot-and-mouth disease antibodies). *Bltn Centro Panamericano Fiebre Aftosa* 21-22: 17-20, 21-24, 1976.
- ROSENBERG, F.J.; ASTUDILLO, V.M.; GOIC, R.; OBIAGA, A. Regional strategies for the control of foot-and-mouth disease: An ecological approach. (Manuscript in preparation).

RESPUESTA ANAMNESTICA EN BOVINOS A LA REVACUNACION CON VACUNA ANTAFTOSA CON ADYUVANTE OLEOSO

P. Augé de Mello; Ivo Gomes**

RESUMEN

Se compararon los resultados obtenidos con tres vacunas antiaftosas inactivadas, preparadas con los mismos antígenos: la primera adicionada de adyuvante oleoso, la segunda con hidróxido de aluminio-saponina y la tercera sin adyuvante. En todas ellas la respuesta anamnética se observó ya a los 4 días postrevacunación (DPR) alcanzando a partir del 6º DPR valores de expectativa porcentual de protección de 99%.

La vacuna de adyuvante oleoso indujo los más altos niveles de anticuerpos y la más prolongada persistencia. Además, en la vacuna oleosa, la cepa A₂₄ Cruzeiro presentó amplia cobertura hasta a los 180 DPR frente a 3 cepas de virus A inmunológicamente diferentes, mientras que con la vacuna de hidróxido de aluminio-saponina, a los 60 DPR presentaba bajos índices de seroprotección frente a las muestras estudiadas.

Se deduce que la vacuna de adyuvante oleoso puede ser de gran utilidad en vacunaciones periforiales estratégicas ya que induce una excelente respuesta anamnética y con amplia cobertura inmunológica a los 180 DPR.

INTRODUCCION

Las vacunas antiaftosas con adyuvante oleoso, tanto en investigaciones de laboratorio (13) como en ensayos de campo en condiciones controladas, han demostrado poseer un alto valor inmunogénico cuando son aplicadas en bovinos jóvenes y adultos, permitiendo un esquema de vacunación con intervalos de 6 meses para los animales menores de 2 años (3) y con intervalos de 12 meses (4), a partir de esa edad.

La rapidez de la respuesta anamnética inducida

por la vacuna antiaftosa asume gran importancia en la estrategia de la lucha contra la fiebre aftosa puesto que la vacunación en anillo es una de las opciones frente a la aparición de un foco (6). Así, es interesante conocer el comportamiento de la vacuna con adyuvante oleoso en estas circunstancias, toda vez que este tipo de inmuñoadyuvante tiene, entre otras propiedades, la de retardar la liberación de antígeno (12) alcanzando el punto máximo de inducción de anticuerpos después de los 60 días de la primovacunación (3).

En el presente trabajo se compara la respuesta anamnética así como la duración de la inmunidad de tres vacunas antiaftosas inactivadas: una con adyuvante oleoso; la segunda con hidróxido de aluminio-saponina y la tercera con una suspensión de virus sin ningún adyuvante. También se estudia el comportamiento inmunológico de la cepa A₂₄ frente a tres cepas de virus A serológicamente diferentes: A cepa Bagé (1976), A cepa Venceslau (1976) (9) y A cepa Macabú (1977) (14).

MATERIALES Y METODOS

Antígenos

Se utilizaron los virus de la fiebre aftosa subtipos O₁ cepa Campos; A₂₄ cepa Cruzeiro y C₃ cepa Resende obtenidos a partir de células BHK₂₁ Cl₁₃ cultivadas en frascos rolantes. Las muestras fueron inactivadas por medio de 2-bromoetilamina en solución alcalina (BEI) en la concentración de 0,001 M durante 24 horas a 37° C (5). Los títulos infecciosos fueron determinados en cultivo celular y expresados en dosis infecciosas cultivo celular 50% (DICC₅₀/dosis de vacuna). Los títulos fijadores del complemento fueron determinados al principio y al final del proceso de inactivación. Después

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

de la inactivación las suspensiones víricas fueron sometidas a prueba de inocuidad en cultivo celular con un mínimo de tres pasajes. Todas las pruebas realizadas obedecieron a los criterios para el control de las vacunas antiaftosas (7). En la tabla 1 están especificadas las características de los antígenos utilizados.

TABLA 1. *Características de los antígenos utilizados*

Antígenos de la fiebre aftosa	Títulos	
	DICC ₅₀ /dosis	FC
O ₁ Campos	7,5	1/14
A ₂₄ Cruzeiro	7,5	1/14
C ₃ Resende	7,3	1/15

DICC₅₀ = Dosis infecciosa cultivo celular 50%.

FC = Fijadores del complemento con 4 unidades de complemento y 90 minutos de incubación a 37° C.

Preparación de las vacunas

A partir de las suspensiones de virus monovalentes inactivadas se preparó una suspensión trivalente mezclando los antígenos en partes iguales. La suspensión trivalente fue dividida en tres partes y con cada una se preparó una vacuna con el mismo contenido inmunogénico:

Vacuna con adyuvante oleoso

Una mezcla de monooleato de mannide* y de aceite mineral** en la proporción de 1:10, fue emulsionada con igual cantidad de suspensión trivalente (3).

Vacuna con adyuvante de hidróxido de aluminio-saponina

Una suspensión coloidal de Al(OH)₃ (concentración mínima de 2% de Al₂O₃) fue mezclada en

partes iguales con la suspensión del antígeno. Despues de perfecta homogeneización de la suspensión se adicionó la saponina en cantidad suficiente para que contenga 5 mg por dosis de vacuna.

Suspensión de virus sin adyuvante

La suspensión trivalente fue mezclada en partes iguales con tampón fosfatado 0,04 M en 50% de glicerina.

Bovinos

Se utilizaron treinta bovinos con características predominantes de cebú entre 4 y 6 meses de edad, sin historia de vacunación ni de exposición previa a la fiebre aftosa y sin anticuerpos circulantes específicos en el momento en que fueron primovacunados con una vacuna inactivada con hidróxido de aluminio-saponina elaborada en la planta de producción de vacunas del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa, conteniendo el equivalente a 7 ml de suspensión vírica trivalente O₁, A₂₄ y C₃, e inoculada por vía subcutánea en la dosis de 5 ml.

Vacunación

Cinco meses después de la primovacunación los bovinos fueron sangrados y divididos en tres grupos al azar. Un grupo fue revacunado con la vacuna antiaftosa de adyuvante oleoso; el segundo grupo con vacuna de hidróxido de aluminio-saponina, y el tercer grupo con la suspensión de virus sin adyuvante. Todas las vacunas fueron aplicadas en dosis de 5 ml: la vacuna de hidróxido de aluminio-saponina por vía subcutánea y las otras dos por vía intramuscular.

Estudio de anticuerpos

Los bovinos fueron sangrados a los 2, 4, 6 y 10 días postrevacunación (DPR) y luego cada 30 días hasta completar 180 días para los revacunados con vacuna oleosa y 120 días para los demás grupos. Los niveles de anticuerpos circulantes fueron determinados por los índices de seroprotección (ISP) en ratones lactantes (8).

* Arlacel A - ICI America Inc. Atlas Chemicals Division.

** Marcol 52 - Exxon Corporation, U.S.A.

RESULTADOS

Los ISP para los tres tipos de virus de la fiebre aftosa y para los tres grupos experimentales están representados en la tabla 2. La respuesta anamnésica fue detectada ya a los 4 DPR alcanzando a partir del 6º DPR valores de expectativa porcentual de protección (EPP) de 99% (10) en todos los casos.

Los gráficos 1, 2 y 3 muestran las curvas de anticuerpos detectados para los tres tipos de virus con los diferentes tratamientos. Fue bastante evidente el efecto del inmunoadyuvante en la persistencia de los anticuerpos circulantes. La vacuna oleosa indujo anticuerpos circulantes que persistieron por un período superior a 6 meses para los tres tipos de virus, hecho ése que no se observó para la vacuna de hidróxido de aluminio-saponina que presentó el punto máximo de anticuerpos a los 30 DPR cayendo enseguida en forma acentuada.

Los niveles de anticuerpos del grupo de bovinos que recibió la suspensión de virus sin adyuvante declinaron rápidamente aun cuando en los tres grupos se haya observado la misma respuesta anamnésica.

En todos los tratamientos, las cepas O₁ Campos y C₃ Resende demostraron ser inmunogénicamente inferiores a la cepa A₂₄ Cruzeiro. En la tabla 3 se observa la respuesta inmunológica de la cepa A₂₄ Cruzeiro frente a las cepas A Bagé, A Venceslau y A Macabú cuando se utiliza hidróxido de aluminio-saponina o emulsión oleosa como inmunoadyuvante. La cobertura inmunológica inducida por la vacuna preparada con hidróxido de aluminio-saponina no fue satisfactoria a partir de los 60 DPR mientras que la vacuna oleosa mostró un alto nivel de cobertura frente a las cepas en estudio por un período superior a los 180 DPR.

DISCUSION

Aun en animales primovacunados con la vacuna contra la fiebre aftosa de adyuvante oleoso, en que el nivel más elevado de anticuerpos se observa después de los 60 días (3), Graves *et al.* encontraron, tanto en bovinos como en suinos vacunados con vacuna oleosa monovalente A, un alto nivel de protección entre 3 y 14 días de la primovacunación (11). En animales revacunados encontramos que

TABLA 2. *Respuesta anamnésica en bovinos inducida por la vacuna anti-aftosa*

V a c u n a	Virus de la fiebre aftosa	Días postrevacunación				
		0*	2	4	6	10
Con adyuvante oleoso	O ₁	1,8 ± 1,2**	1,9 ± 1,1	2,4 ± 1,1	4,3 ± 0,5	5,0
	A ₂₄	2,5 ± 1,2	2,8 ± 0,9	3,4 ± 0,6	4,4 ± 0,6	5,0
	C ₃	1,3 ± 0,2	1,4 ± 0,6	1,8 ± 0,8	4,5 ± 0,5	5,0
Con hidróxido de aluminio-saponina	O ₁	1,5 ± 0,5	1,7 ± 0,6	3,0 ± 0,8	4,0 ± 0,5	5,0
	A ₂₄	2,2 ± 0,8	2,6 ± 1,0	3,3 ± 0,6	4,3 ± 0,8	5,0
	C ₃	1,1 ± 0,6	1,4 ± 0,4	2,0 ± 0,6	4,6 ± 0,5	5,0
Sin adyuvante	O ₁	1,8 ± 0,9	1,7 ± 0,7	2,5 ± 1,1	4,4 ± 0,5	4,7 ± 0,7
	A ₂₄	2,7 ± 1,0	3,0 ± 0,8	3,5 ± 0,8	4,5 ± 0,9	4,9 ± 0,2
	C ₃	1,7 ± 0,7	1,6 ± 0,5	2,0 ± 0,9	3,8 ± 1,1	4,2 ± 1,2

* Despues de la primovacunación con una vacuna inactivada con hidróxido de aluminio-saponina.

** Media de los índices de seroprotección y desviación standard. Los valores ≥ 3,6 representan una expectativa porcentual de protección (EPP) de 99% (10).

GRAFICO 1. *Media del índice de seroprotección del virus tipo O₁ de bovinos revacunados con vacunas con adyuvante oleoso, con hidróxido de aluminio-saponina o antígeno sin adyuvante.*

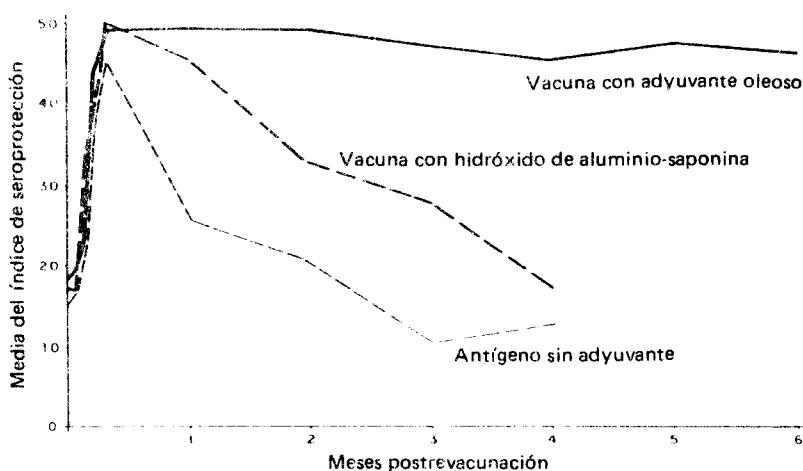


GRAFICO 2. *Media del índice de seroprotección del virus tipo A₂₄ de bovinos revacunados con vacunas con adyuvante oleoso, con hidróxido de aluminio-saponina o antígeno sin adyuvante.*

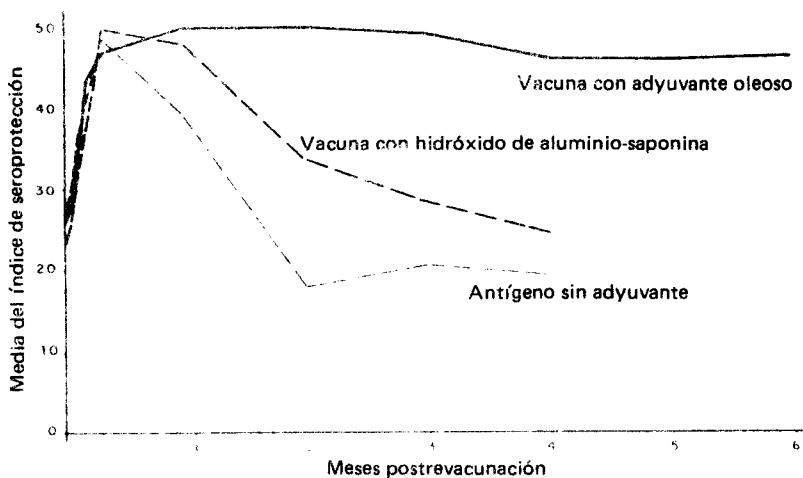


GRAFICO 3. *Media del índice de seroprotección del virus tipo C₃ de bovinos revacunados con vacunas con adyuvante oleoso, con hidróxido de aluminio-saponina o antígeno sin adyuvante.*

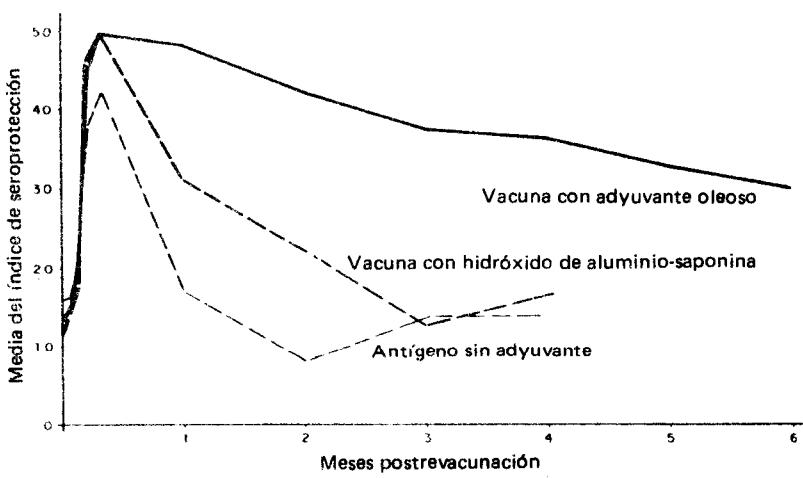


TABLA 3. *Respuesta inmunológica de la cepa A₂₄ Cruzeiro frente a 3 cepas de virus A inmunológicamente diferentes*

Vacunas	Días después de la revacunación	Cepas de virus A			
		Cruzeiro	Bagé	Venceslau	Macabú
Adyuvante oleoso	60	5,0*	3,4 ± 0,9	2,9 ± 1,2	3,6 ± 0,9
	120	4,6 ± 0,4	4,3 ± 1,2	3,4 ± 1,0	3,3 ± 0,8
	180	4,7 ± 0,5	3,8 ± 0,9	2,8 ± 1,2	3,1 ± 1,1
Hidróxido de aluminio-saponina	60	3,4 ± 1,1	1,8 ± 0,9	0,4 ± 0,5	1,5 ± 0,4
	120	2,4 ± 0,6	1,2 ± 0,9	1,1 ± 0,9	1,4 ± 0,3

* Media de los índices de seroprotección y desviación standard.

la respuesta inmediata inducida por los antígenos de fiebre aftosa parece no depender de la presencia de un inmunoadyuvante. La respuesta anamnética en bovinos alcanza valores de EPP de 99% (10) a partir del 6º DPR con o sin la presencia de un inmunoadyuvante incorporado al antígeno, mientras que la persistencia de anticuerpos depende del tipo de adyuvante utilizado y en ese aspecto el adyuvante oleoso es el que induce un nivel más elevado de anticuerpos y con mayor duración lo que confirma resultados anteriores (3, 4, 13).

Una observación de gran importancia fue la diferencia de cobertura inmunológica inducida por los diferentes inmunoadyuvantes. Así, la cepa A₂₄ Cruzeiro, en la vacuna con adyuvante oleoso,

presentó amplia cobertura hasta a los 180 DPR frente a las 3 cepas de virus A inmunológicamente diferentes mientras que la vacuna preparada con hidróxido de aluminio-saponina, a los 60 DPR presentaba bajos ISP frente a las muestras estudiadas. Se evidencia así, confirmando trabajos anteriores (1, 2, 9), que las vacunas oleosas aumentan marcadamente la cobertura inmunológica de los antígenos de la fiebre aftosa.

Los resultados obtenidos por Graves *et al.* (11) en animales primovacunados y la excelente respuesta anamnética con amplia cobertura inmunológica a los 180 DPR indican que ese tipo de vacuna antiaftosa podrá ser utilizada en vacunaciones perifocales estratégicas.

REFERENCIAS

1. ALONSO FERNANDEZ, A.; SÖNDALM, M.S.; GOMES, I.; AUGÉ DE MELLO, P. Inmunidad cruzada en bovinos entre varias cepas del virus de la fiebre aftosa tipo C. (Cross immunity of cattle with type C strains of foot-and-mouth disease virus). *Bltn Centro Panamericano Fiebre Aftosa 23-24:* 33-35, 1976.
2. ALONSO FERNANDEZ, A.; SÖNDALM, M.S.; GOMES, I.; AUGÉ DE MELLO, P. Vacuna oleosa: cobertura inmunológica de las cepas del virus de la fiebre aftosa, tipo A, representativas de Sudamérica. (Oil adjuvanted vaccine: immunological coverage of representative strains of foot-and-mouth disease type A virus in South America). *Bltn Centro Panamericano Fiebre Aftosa 26:* 49-50, 51-52, 1977.
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.; ASTUDILLO, V.; GOMES, I.; CAMPOS GARCIA, J.T. Respuesta inmunitaria de bovinos adultos vacunados contra la fiebre aftosa

- con vacuna oleosa. (Immune response of adult cattle vaccinated with oil adjuvanted foot-and-mouth disease vaccines). *Bltn Centro Panamericano Fiebre Aftosa* 26: 23-25, 27-29, 1977.
5. BAHNEMANN, H.G.; AUGÉ DE MELLO, P.; ABRACON, D.; GOMES, I. Immunogenicity in cattle of foot-and-mouth disease vaccines inactivated with binary ethyleneimine. *Bull. Off. int. Epiz.* 81 (11-12): 1335-1343, 1974.
 6. CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTO-SA. Manual de procedimientos para la atención de un predio donde ocurre fiebre aftosa. *Ser. Man. Técn.* 1, 45 pp., 1974.
 7. CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTO-SA. Manual de procedimientos para el control de las vacunas antiaftosas. *Ser. Man. Técn.* 2, 33 pp., 1974.
 8. CUNHA, R.G.; BAPTISTA JUNIOR, J.A.; SERRAO, U.M.; TORTURELLA, I. El uso de los ratones lactantes en la evaluación de los anticuerpos contra el virus de la fiebre aftosa y su significación inmunológica. *Gac. vet.* 19 (110): 243-267, 1957.
 9. GOMES, I.; AUGÉ DE MELLO, P.; ALONSO FERNANDEZ, A. Relaciones serológicas e inmunológicas entre algunas cepas de subtipos del virus de la fiebre aftosa. (Serological and immunological relationship of some strains of foot-and-mouth disease virus subtypes). *Bltn Centro Panamericano Fiebre Aftosa* 23-24: 11-15, 1976.
 10. 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, 1976.
 11. GRAVES, J.H.; MCKERCHER, P.D.; FARRIS Jr., H.E.; COWAN, K.M. Early response of cattle and swine to inactivated foot-and-mouth disease vaccine. *Res. vet. Sci.* 9: 35-40, 1968.
 12. HILLEMAN, M.R. Critical appraisal of emulsified oil adjuvants applied to viral vaccines. *Progr. med. Virol.* 8: 131-182. Karger Basel/New York, 1966.
 13. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE; PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. Vacunas contra la fiebre aftosa. I. Comparación entre vacunas preparadas con virus inactivado con formalina y adsorbido en hidróxido de aluminio y vacunas preparadas con virus inactivado con acetiletileneimina emulsificado con adyuvante incompleto de Freund. (Foot-and-mouth disease vaccines. I. Comparison of vaccines prepared from virus inactivated with formalin and adsorbed on aluminum hydroxide gel with saponin and virus inactivated with acetylathyleneimine and emulsified with incomplete Freund's adjuvant). *Bltn Centro Panamericano Fiebre Aftosa* 19-20: 1-8, 9-16, 1975.
 14. SÖNDALH, M.S.; GOMES, I.; GIACOMETTI, H.; ROSENBERG, F.J. Actuación del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa frente a un brote de virus A de la fiebre aftosa en el municipio de Conceição de Macabú, Rio de Janeiro. *Bltn Centro Panamericano Fiebre Aftosa* (en prensa).

ANAMNESTIC RESPONSE IN CATTLE AFTER REVACCINATION WITH OIL ADJUVANTED FOOT-AND-MOUTH DISEASE VACCINES

P. Augé de Mello*; Ivo Gomes*

SUMMARY

The immune response to three inactivated foot-and-mouth disease (FMD) vaccines was compared: the first vaccine was prepared with oil adjuvant, the second with aluminum hydroxide-saponin and the third did not contain adjuvant. With all three vaccines an anamnestic response was observed on the 4th day after revaccination, and from the 6th day on the expected percentage of protection was 99%.

The anamnestic response of the oil adjuvanted vaccine was characterized by high antibody levels which persisted for a long period. Moreover, the A₂₄ Cruzeiro strain in the oil adjuvanted vaccine gave a wide coverage for least 180 days against three immunologically different A strains. After an initial favorable anamnestic response the aluminum hydroxide-saponin vaccine at 60 days post-revaccination (DPR) gave low mouse protection indices against those different samples.

The results showed that oil adjuvanted FMD vaccines can be very useful for strategic ring vaccinations in view of the excellent anamnestic response of long duration and wide immunological coverage.

INTRODUCTION

Experiments both in the laboratory (13) and in the field under controlled conditions have shown that oil adjuvanted FMD vaccines can efficiently protect young and adult cattle. The duration of this protection allows for vaccination at 6-month intervals of animals less than 2 years (3) and a yearly vaccination (4) of older animals.

The speed at which the anamnestic response occurs after FMD vaccination is of great importance

for ring vaccination, which is one of the options in the strategy of FMD control during an outbreak (6). It is thus important to know what the action of oil adjuvanted vaccines would be under such conditions, particularly since one of the characteristics of this adjuvant appears to be its slow release of the antigen (12), attaining a maximum induction of antibodies as late as 60 days after the first vaccination (3).

The present work compares the anamnestic response, as well as the duration of immunity, of three inactivated FMD vaccines: one with oil adjuvant; the another with aluminum hydroxide-saponin, and a third with a virus suspension containing no adjuvant. The immunological coverage of the A₂₄ strain is also compared to three serologically different A strains: A Bagé (1976), A Venceslau (1976) (9) and A Macabú (1977) (14).

MATERIALS AND METHODS

Antigens

The following FMD virus subtypes were used: O₁ strain Campos, A₂₄ strain Cruzeiro and C₃ strain Resende. All three strains were produced in BHK₂₁ C₁₃ cells in roller bottle cultures. The virus suspensions were inactivated by 2-bromoethyleneimine in alkaline solution (BEI) at a concentration of 0.001 M during 24 h at 37° C (5). The infective titers were determined in cell culture and expressed as 50% infective cell culture (CCID₅₀/vaccine dose). Complement fixation titers were determined before and after the inactivation process. After inactivation the antigen suspensions were assayed for the absence of infectivity in cell culture with the minimum of three passages. All tests were made in accordance with the standards

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

for FMD vaccine control (7). Table 1 specifies the characteristics of the antigens.

TABLE 1. *Characteristics of the antigens*

Foot-and-mouth disease antigens	Titers	
	CCID ₅₀ /doses	CF
O ₁ Campos	7.5	1/14
A ₂₄ Cruzeiro	7.5	1/14
C ₃ Resende	7.3	1/15

CCID₅₀ = 50% Infective cell culture doses.

CF = Complement fixation with 4 units of complement at 90 minutes of incubation at 37° C.

equal parts of buffer phosphate 0.04 M and 50% glycerin.

Cattle

Thirty zebu cattle 4-6 months old were used; they had no history of FMD vaccination or exposure and were free of FMD circulating antibodies. They were vaccinated with a trivalent aluminum hydroxide-saponin vaccine produced in the production plant of the Pan American Foot-and-Mouth Disease Center, containing the equivalent of 7 ml of trivalent virus suspension (O₁, A₂₄ and C₃). The cattle were inoculated subcutaneously with 5 ml.

Vaccination

Five months after the first vaccination the cattle were bled and divided randomly into three groups. One group was revaccinated with the oil adjuvanted vaccine, the second group with the aluminum hydroxide-saponin vaccine and the third with the virus suspension without antigen. Five ml doses were used for all vaccines, the aluminum hydroxide-saponin vaccine was given subcutaneously and the others by the intramuscular route.

Antibody studies

The cattle were bled at 2, 4, 6 and 10 days post-revaccination (DPR) and at 30 days intervals up to 120 days. The animals revaccinated with oil vaccine were bled up to 180 days. The levels of circulating antibodies were determined by the mouse protection test in suckling mice (8).

RESULTS

The mouse protection indices (MPI) for the three types of FMD virus and for the three experimental groups are listed in Table 2. The anamnestic response was already detected at 4 DPR and at day 6 reached an expected percentage of protection (EPP) of 99% (10) in all cases.

Figures 1, 2 and 3 show the antibody curves for the three types of virus with different treatments. The effect of adjuvant on the persistence of the

Preparation of the vaccines

A trivalent mixture of the antigens was prepared by mixing equal parts of each of the inactivated virus suspensions. The trivalent suspension was divided in three parts so that each vaccine contained the same amount of antigen.

Oil adjuvanted vaccine

A mixture of mannide mono-oleate* and mineral oil** in the proportion of 1:10 was emulsified with an equal amount of trivalent suspension (3).

Aluminum hydroxide-saponin vaccine

A colloidal suspension of Al(OH)₃ (minimum concentration of 2% Al₂O₃) was mixed in equal parts with the inactivated suspension. After complete homogenization of the suspension saponin was added so that each vaccine dose would contain 5 mg.

Virus suspension without antigen

The trivalent suspensions were mixed with

* Arlacel A - ICI America Inc. Atlas Chemicals Division.

** Marcol 52 - Exxon Corporation U.S.A.

TABLE 2. Anamnestic response of cattle after revaccination with foot-and-mouth disease vaccine

Vaccine	Foot-and-mouth disease virus	Days post-revaccination				
		0*	2	4	6	10
Oil adjuvanted	O ₁	1.8 ± 1.2 **	1.9 ± 1.1	2.4 ± 1.1	4.3 ± 0.5	5.0
	A ₂₄	2.5 ± 1.2	2.8 ± 0.9	3.4 ± 0.6	4.4 ± 0.6	5.0
	C ₃	1.3 ± 0.2	1.4 ± 0.6	1.8 ± 0.8	4.5 ± 0.5	5.0
Aluminum hydroxide-saponin	O ₁	1.5 ± 0.5	1.7 ± 0.6	3.0 ± 0.8	4.0 ± 0.5	5.0
	A ₂₄	2.2 ± 0.8	2.6 ± 1.0	3.3 ± 0.6	4.3 ± 0.8	5.0
	C ₃	1.1 ± 0.6	1.4 ± 0.4	2.0 ± 0.6	4.6 ± 0.5	5.0
Without adjuvant	O ₁	1.8 ± 0.9	1.7 ± 0.7	2.5 ± 1.1	4.4 ± 0.5	4.7 ± 0.7
	A ₂₄	2.7 ± 1.0	3.0 ± 0.8	3.5 ± 0.8	4.5 ± 0.9	4.9 ± 0.2
	C ₃	1.7 ± 0.7	1.6 ± 0.5	2.0 ± 0.9	3.8 ± 1.1	4.2 ± 1.2

* After the first vaccination with inactivated aluminum hydroxide-saponin vaccine.

** Mean of the mouse protection indices and standard deviation. Values of ≥ 3.6 represent an expected percentage of protection (EPP) of 99% (10).

circulating antibodies was quite clear. Oil adjuvanted vaccines induced circulating antibodies which persisted for more than 6 months for the three types of virus. This prolonged duration of immunity was not observed with the aluminum hydroxide-saponin vaccines, which induced maximum antibodies levels at 30 DPR followed by a rather steep decrease.

Antibody levels of the cattle group which had received the virus suspension without adjuvant decreased rapidly even though each of the groups showed an anamnestic response similar to the other two groups.

In all treatments strains O₁ Campos and C₃ Resende were immunogenically inferior to strain A₂₄ Cruzeiro. Table 3 lists the immunological response of the A₂₄ Cruzeiro aluminum hydroxide-saponin vaccine and the oil adjuvanted vaccine against the virus strains A Bagé, A Venceslau and A Macabú. Immunological coverage of the induced antibodies for the vaccine prepared with the aluminum hydroxide-saponin was unsatisfactory from 60 days onward. The oil vaccine showed high levels of coverage for the strains under study for a period of more than 180 days.

DISCUSSION

Even though the highest level of antibodies occurs after 60 days in animals vaccinated for the first time with oil adjuvanted FMD vaccine (3), Graves *et al.* observed high levels of protection between 3 and 14 days after the first vaccination (11) of cattle and swine vaccinated with an oil adjuvanted vaccine. We found that the immediate antibody response to FMD virus antigens does not depend on the presence of the adjuvant. The anamnestic response of cattle reached EPP values of 99% (10) from the 6th day on independent of whether or not adjuvant was incorporated in the vaccine. However the persistence of antibodies depended on the type of adjuvant used. In this regard the oil adjuvanted induced the highest level of antibodies and the longest duration of protection, confirming earlier results (3, 4, 13).

The differences in the immunological coverage induced by the different adjuvants was of great importance. Thus the A₂₄ strain Cruzeiro with oil adjuvanted vaccine gave a wide coverage up to 180 DPR against three immunologically different A strains while the vaccine prepared with the

FIGURE 1. Mean mouse protection index type O₁ of cattle revaccinated with oil adjuvanted vaccine, aluminum hydroxide-saponin vaccine or antigen without adjuvant.

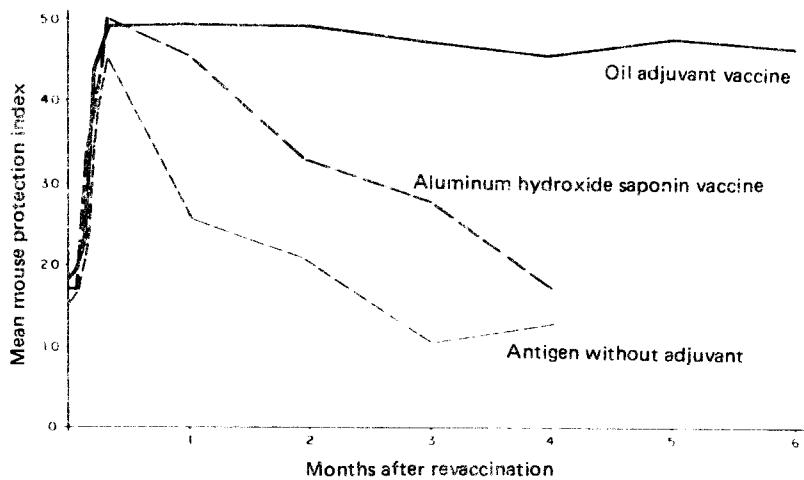


FIGURE 2. Mean mouse protection index type A₂₄ of cattle revaccinated with oil adjuvanted vaccine, aluminum hydroxide-saponin vaccine or antigen without adjuvant.

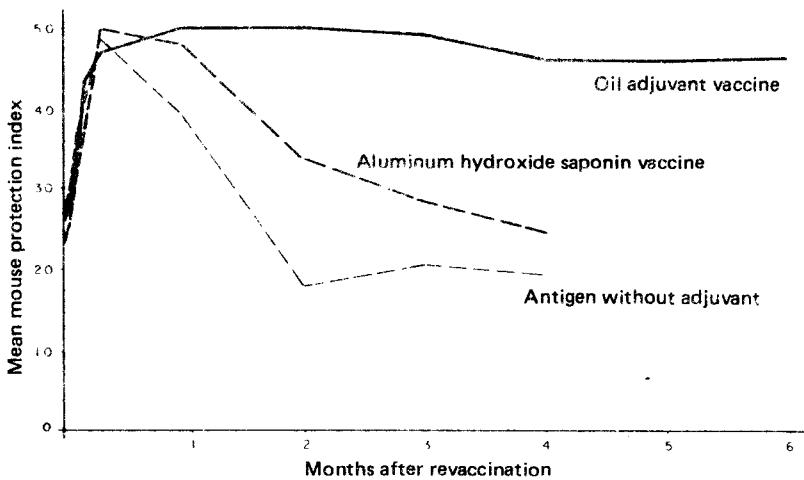


FIGURE 3. Mean mouse protection index type C₃ of cattle revaccinated with oil adjuvanted vaccine, aluminum hydroxide-saponin vaccine or antigen without adjuvant.

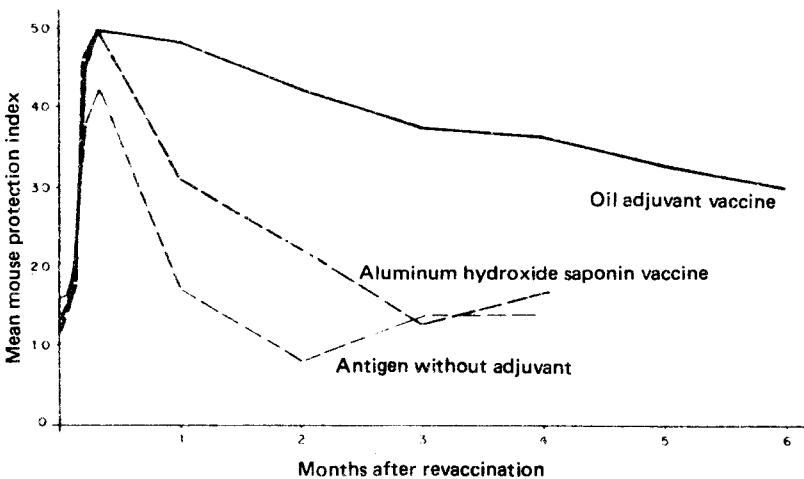


TABLE 3. *Immunological response of A₂₄ Cruzeiro strain against 3 virus strains immunologically different*

Vaccine	Days post-revaccination	A virus strains			
		Cruzeiro	Bagé	Venceslau	Macabú
Oil adjuvanted	60	5.0*	3.4 ± 0.9	2.9 ± 1.2	3.6 ± 0.9
	120	4.6 ± 0.4	4.3 ± 1.2	3.4 ± 1.0	3.3 ± 0.8
	180	4.7 ± 0.5	3.8 ± 0.9	2.8 ± 1.2	3.1 ± 1.1
Aluminum hydroxide-saponin	60	3.4 ± 1.1	1.8 ± 0.9	0.4 ± 0.5	1.5 ± 0.4
	120	2.4 ± 0.6	1.2 ± 0.9	1.1 ± 0.9	1.4 ± 0.3

* Mean of mouse protection indices and standard deviation.

aluminum hydroxide-saponin gave low MPIs against the strains studied already at 60 DPR. This study confirms earlier work (1, 2, 9) that oil adjuvanted vaccines notably increase the immunological coverage of the FMD virus antigens.

The results obtained by Graves *et al.* (11) in

animals vaccinated for the first time and the excellent anamnestic response with a wide immunological coverage up to 180 DPR indicates that oil adjuvant FMD vaccine could be used in strategic ring vaccinations.

REFERENCES

1. ALONSO FERNANDEZ, A.; SÖNDALH, M.S.; GOMES, I.; AUGÉ DE MELLO, P. Inmunidad cruzada en bovinos entre varias cepas del virus de la fiebre aftosa tipo C. (Cross immunity of cattle with type C strains of foot-and-mouth disease virus). *Bltn Centro Panamericano Fiebre Aftosa* 23-24: 33-35, 1976.
2. ALONSO FERNANDEZ, A.; SÖNDALH, M.S.; GOMES, I.; AUGÉ DE MELLO, P. Vacuna oleosa: cobertura inmunológica de las cepas del virus de la fiebre aftosa, tipo A, representativas de Sudamérica. (Oil adjuvanted vaccine: immunological coverage of representative strains of foot-and-mouth disease type A virus in South America). *Bltn Centro Panamericano Fiebre Aftosa* 26: 49-50, 51-52, 1977.
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.; ASTUDILLO, V.; GOMES, I.; CAMPOS GARCIA, J.T. Respuesta inmunitaria de bovinos adultos vacunados contra la fiebre aftosa con vacuna oleosa. (Immune response of adult cattle vaccinated with oil adjuvanted foot-and-mouth disease vaccines). *Bltn Centro Panamericano Fiebre Aftosa* 26: 23-25, 27-29, 1977.
5. BAHNEMANN, H.G.; AUGÉ DE MELLO, P.; ABRACON, D.; GOMES, I. Immunogenicity in cattle of foot-and-mouth disease vaccines inactivated with binary ethyleneimine. *Bull. Off. Int. Epiz.* 81 (11-12): 1335-1343, 1974.
6. CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA. Manual de procedimientos para la atención de un predio donde ocurre fiebre aftosa. *Ser. Man. Técn.* 1, 45 pp., 1974.
7. CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA. Manual de procedimientos para el control de las vacunas antiaftosas. *Ser. Man. Técn.* 2, 33 pp., 1974.

8. CUNHA, R.G.; BAPTISTA JUNIOR, J.A.; SERRAO, U.M.; TORTURELLA, I. El uso de los ratones lactantes en la evaluación de los anticuerpos contra el virus de la fiebre aftosa y su significación inmunológica. *Gac. vet.* 19 (110): 243-267, 1957.
9. GOMES, I.; AUGÉ DE MELLO, P.; ALONSO FERNANDEZ, A. Relaciones serológicas e inmunológicas entre algunas cepas de subtipos del virus de la fiebre aftosa. (Serological and immunological relationship of some strains of foot-and-mouth disease virus subtypes). *Bltn Centro Panamericano Fiebre Aftosa* 23-24: 11-15, 1976.
10. 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, 1976.
11. GRAVES, J.H.; MCKERCHER, P.D.; FARRIS Jr., H.E.; COWAN, K.M. Early response of cattle and swine to inactivated foot-and-mouth disease vaccine. *Res. vet. Sci.* 9: 35-40, 1968.
12. HILLEMAN, M.R. Critical appraisal of emulsified oil adjuvants applied to viral vaccines. *Progr. med. Virol.* 8: 131-182. Karger Basel/New York, 1966.
13. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE; PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. Vacunas contra la fiebre aftosa. I. Comparación entre vacunas preparadas con virus inactivado con formalina y adsorbido en hidróxido de aluminio y vacunas preparadas con virus inactivado con acetiletileneimina emulsificado con adyuvante incompleto de Freund. (Foot-and-mouth disease vaccines. I. Comparison of vaccines prepared from virus inactivated with formalin and adsorbed on aluminum hydroxide gel with saponin and virus inactivated with acetylethyleneimine and emulsified with incomplete Freund's adjuvant). *Bltn Centro Panamericano Fiebre Aftosa* 19-20: 1-8, 9-16, 1975.
14. SÖNDAHL, M.S.; GOMES, I.; GIACOMETTI, H.; ROSENBERG, F.J. Actuación del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa frente a un brote de virus A de la fiebre aftosa en el municipio de Conceição de Macabú, Rio de Janeiro. *Bltn Centro Panamericano Fiebre Aftosa* (in press).

resúmenes

abstracts

BLACK, L.

Texto en inglés. *Vet. Rec.* 100 (10):195-198, 1977. (*FMD Bull. Wellcome* 16 (3): 17, 1977). [Wellcome Foot-and-Mouth Disease Vaccine Laboratory, Pirbright, Woking, Surrey, England]

Alergia en bovinos después de vacunación contra la fiebre aftosa

Se inyectaron derivados de células BHK, saponina e hidróxido de aluminio, todos los cuales presentes frecuentemente en vacunas antiaftosas, por vía subcutánea en 10 bovinos, y se siguieron los niveles de las reaginas anti-BHK. Los anticuerpos reagínicos alcanzaron su título más alto entre una y dos semanas después de estimulación y disminuyeron durante la tercera semana. Tuvieron una media de vida en el suero de unos tres días, dada la decadencia exponencial, y, por lo general, no se pudieron detectarlos a cuatro semanas después del último contacto con antígeno. Unos hemaglutininos pasivos no desarrollaron tan rápidamente y, por lo general, se necesitaron dos o más estimulaciones para producir niveles de anticuerpos detectables. También fueron más lentos a declinar y demostrables durante 10 semanas por lo menos después del último contacto con antígeno en la mayoría de los casos. Las reacciones clínicas provocadas por la inoculación intradermal del lisato de células BHK en bovinos sensibilizados no fueron correlacionadas con la reagina de suero ni con los títulos de hemaglutinino pasivo ni con su relación la una con las otras al momento de reaccionar.

Allergy in cattle after foot-and-mouth disease vaccination

BHK cell derivatives, saponin and aluminum hydroxide, all of which are commonly present in foot-and-mouth disease vaccines, were injected subcutaneously into ten cattle and the levels of anti-BHK reagins and passive haemagglutinating antibodies in their sera were followed. Reaginic antibodies rose to a peak titer at one to two weeks after the stimuli and waned during the third week. They had a serum half-life of about three days, assuming exponential decay, and were generally undetectable four weeks after the last contact with antigen. Passive haemagglutinins were slower to develop and two or more stimuli were normally required to elicit detectable antibody levels. They were also slower to subside and were demonstrable for at least ten weeks after last contact with antigen in most cases. Clinical reactions provoked by the intradermal inoculation of BHK cell lysate into sensitized cattle were not correlated with the serum reagin or passive haemagglutinin titers or with their ratio to one another at the time of the reactions.

BLACK, L.

Texto en inglés. *J. Immunol. Methods* 15 (2): 193-195, 1977. (*FMD Bull. Wellcome* 16 (4): 25, 1977). [Wellcome Foot-and-Mouth Disease Vaccine Laboratory, Pirbright, Woking, Surrey, England]

La actividad de adyuvantes de saponina e hidróxido de aluminio para promover reaginas

Se compararon saponina e hidróxido de aluminio como adyuvantes para promover reaginas

The adjuvant activity of saponin and aluminum hydroxide for promoting reagins

Saponin and aluminum hydroxide were compared as adjuvants for promoting serum reagins

de suero en bovinos de 18 a 24 meses de edad mediante un lisato de células BHK como alergeno, y la prueba pasiva de anafilaxis cutáneo para demostrar los anticuerpos. Los resultados indicaron que saponina fue un adyuvante más eficiente que el hidróxido de aluminio, y provocó reaginas en todos los 5 bovinos inyectados, mientras que el hidróxido de aluminio las provocó en solamente 2 de los 5 animales. Los títulos de anticuerpos inducidos fueron más altos cuando se utilizó la saponina. Los títulos de anticuerpos provocados por ambos adyuvantes juntos fueron solamente un poco más altos que con la saponina sola. El lisato de células BHK sin adyuvante no provocó reaginas detectables.

in 18 to 24 month old steers using BHK cell lysate as allergen and the passive cutaneous anaphylaxis test to demonstrate the antibodies. Results indicated that saponin was a more efficient adjuvant than aluminum hydroxide and provoked reagins in all 5 injected cattle whereas the latter did so in only 2 of 5 animals. The titers of antibodies induced were higher when saponin was used. The antibody titers provoked by both adjuvants together were only marginally higher than when saponin was the only adjuvant. BHK cell lysate without adjuvant provoked no detectable reagins.

BROWN, F.

Texto en inglés. *In "Chemotherapy"*, Vol. 6, Plenum Press, N.Y.: 199-201, 1976. (*FMD Bull. Wellcome* 16 (2): 11, 1977). [Animal Virus Research Institute, Pirbright, Surrey, England]

La replicación de picornavirus

La replicación de picornavirus envolvió adsorción, penetración, liberación de ARN, replicación de ARN y la unión de la progenie del ARN y proteína. Los picornavirus se reproducen en el citoplasma de células y el proceso es independiente de la síntesis del ARN, que es dependiente de ADN y de la reproducción del ADN. El virus ARN inyectado funcionó como su propio mensajero de ARN que es trasladado en la proteína del virus y como una plantilla para la síntesis por una polimerasa de ARN dependiente de ARN de una nueva ARN. Este ARN es complementario al ARN del virus y a su vez representa la plantilla para la síntesis de las nuevas copias del ARN del virus. Ahora se sabe bastante detalle sobre la etapa de traslación del ciclo de reproducción. Se halló que dos compuestos químicos, guanidina y 2-(α -hydroxibencilo) bencimidazola inhiben la multiplicación de varios picornavirus sin que afecten el metabolismo de las células huéspedes. En cuanto al virus aftoso, tres de los siete tipos conocidos no son afectados por guanidina mientras que los otros cuatro son muy inhibidos.

Replication of picornaviruses

Replication of picornaviruses involves adsorption, penetration, release of RNA, replication of RNA and assembly of the progeny RNA and protein. Picornaviruses replicate in the cytoplasm of cells and the process is independent of DNA-dependent RNA synthesis and of DNA replication. Injected virus RNA acts as its own messenger RNA which is translated into virus protein and as template for the synthesis by a virus RNA dependent RNA polymerase of new RNA. This RNA is complementary to the virus RNA and serves in turn as the template for the synthesis of new copies of virus RNA. The translation step of the replication cycle is now known in some detail. Two chemical compounds, guanidine and 2-(α -hydroxybenzyl) benzimidazole, have been found to inhibit the multiplication of several picornaviruses without affecting host cell metabolism. In the case of foot-and-mouth disease virus, three of the seven known types are not affected by guanidine whereas the other four are greatly inhibited.

CUNLIFFE, H.R.; RICHMOND, J.Y.; CAMPBELL, C.H.

Texto en inglés. *Can. J. comp. Med.* 41 (1): 117-121, 1977. (*FMD Bull. Wellcome* 16 (2): 11, 1977). [Plum Island Animal Disease Center, Greenport, Long Island, New York 11944, U.S.A.]

Inductores de interferonas y vacunas antiaftosas.

La influencia de dos polinucleótidos sintéticos sobre respuestas de anticuerpos e inmunidad en cobayos y porcinos

Se investigaron las respuestas inmunológicas de cobayos y porcinos a vacunas antiaftosas combinadas con copolímero de ácidos poliriboadenílico-poliribouridílicos (poli A-U). Los resultados fueron algo desilusionantes. Hubo evidencia que ciertas dosis de poli A-U combinadas con vacuna acuosa alteraron la respuesta de cobayos desde 1.500 o 7.500 μ g de poli A-U en la vacuna impidió lesiones primarias al sitio de inoculación observadas en cobayos descargados después de recibir vacuna sólo. Dosis aumentadas de poli A-U resultaron en el desarrollo de lesiones primarias y generalizadas cuando se descargaron a los cobayos, sugiriendo que dosis más altas estorbaron la resistencia inmunológica de los cobayos. No hubo ninguna evidencia que poli A-U realzó la resistencia de cobayos o porcinos a vacunas antiaftosas emulsificadas. Sin embargo, los primeros anticuerpos producidos en respuesta a vacunas emulsificadas fueron realizados por inyección simultánea de cerdos con el ácido poliriboninosínico-poliribocitídico (poli I-C), aunque esta respuesta realizada no se sostuvo. La administración de poli I-C sólo, antes de tratamiento, no indujo resistencia a la fiebre aftosa.

Interferon inducers and foot-and-mouth disease vaccines. Influence of two synthetic polynucleotides on antibody response and immunity in guinea pigs and swine

The immunological responses of guinea pigs and pigs to foot-and-mouth disease vaccines combined with polyriboadenylic-polyribouridyllic acid copolymer (poly A-U) were investigated. Results were somewhat disappointing. There was evidence that certain doses of poly A-U combined with aqueous vaccine altered the guinea pig response in that 1,500 or 7,500 μ g of poly A-U in the vaccine prevented the primary site lesion observed in guinea pigs challenged after receiving vaccine only. Increased poly A-U doses resulted in development of primary and generalized lesions on challenge, suggesting that the higher doses interfered with the immunological resistance of the guinea pigs. There was no evidence that poly A-U enhanced the immunological resistance of guinea pigs or swine to emulsified foot-and-mouth disease vaccines. However, early antibody produced in response to emulsified vaccines was enhanced by simultaneous injection of pigs with polyriboninosinic-polyribocytidyllic acid (poly I-C), although this enhanced response was not sustained. Pre-treatment of pigs with poly I-C alone did not induce resistance to foot-and-mouth disease.

DHENNIN, L.; GOURREAU, J.M.; DHENNIN, L.; LAHELLEC, M.

Texto en francés. *Proc. 20th Wld. vet. Congr.*, Thessalonika, 3: 2161-2165. 1976. (*FMD Bull. Wellcome* 16 (2): 13, 1977). [Laboratoire Central de Recherches Vétérinaires, 22 rue Pierre-Curie, 94700, Maisons-Alfort, France]

Resultados de dos años de investigaciones sobre la enfermedad vesicular del cerdo

La enfermedad vesicular del cerdo se registró en Francia por la primera vez en 1973. Un total de 29 casos ocurrieron durante ese año y hubieron 2 brotes adicionales en 1975. Esta enfermedad no se pudo distinguir de la fiebre aftosa sólo por signos

Results of two years research on swine vesicular disease

Swine vesicular disease was first recorded in France in 1973. A total of 29 cases occurred during that year with a further two outbreaks in 1975. The disease could not be differentiated from foot-and-mouth disease on clinical signs

clínicos. El diagnóstico diferencial es posible por pruebas de fijación del complemento, técnicas de inmunofluorescencia, o por pruebas de seroneutralización. Una vacuna preparada con virus inactivado e incorporando un adyuvante oleoso resultó en una buena protección contra la enfermedad. El virus puede persistir en órganos y tejidos de cerdos infectados hasta ocho días y se puede detectar en secreciones y excreciones hasta tres meses después de la infección. Desde enero de 1975, la enfermedad es de declaración obligatoria en Francia.

alone. Differential diagnosis is possible using complement fixation tests, immunofluorescence techniques, or serum neutralization tests. A vaccine prepared from inactivated virus and incorporating an oil emulsion adjuvant has given good protection against the disease. The virus can persist in organs and tissues of infected pigs for eight days and can be detected in secretions and excretions for up to three months after infection. Since January 1975, the disease has been officially notifiable in France.

DHENNIN, L.; LABIE, J.

Texto en francés. *Bull. Acad. vet. Fr.* 49 (2): 243-249, 1976. (*FMD Bull. Wellcome* 16 (2): 12, 1977). [Laboratoire Central de Recherches Vétérinaires, 22 rue Pierre-Curie, 94700, Maisons-Alfort, France]

Termoresistencia del virus aftoso en la leche de vacas infectadas

Se ha investigado el efecto del calor sobre el virus aftoso, cepa O Lausanne, en la leche de vacas infectadas. Se recogió la leche de vacas infectadas por vía intravenosa y diatélica con virus. Se verificó la presencia de virus por inoculación de ratones. Calentando la leche a varias temperaturas durante 20 segundos, el título del virus disminuyó rápidamente entre 60°C y 68°C. La leche infectada calentada a 50°C no afectó mucho el título del virus. A 60°C, el virus se inactivó completamente después de 320 segundos. Se concluyó que el virus contuvo una fracción termoresistente, y se consideró que es posible que ésta pueda ser relacionada a la asociación del virus con las proteínas de la leche.

DINKA, S.K.; SWANEY, L.M.; McVICAR, J.W.

Texto en inglés. *Can. J. Microbiol.* 23 (3): 295-299, 1977. (*FMD Bull. Wellcome* 16 (4): 24, 1977). [Plum Island Animal Disease Center, Greenport, Long Island, New York 11944, U.S.A.]

Selección de un clon estable de células de riñón de fetos de cerdos, MVPK-1, para ensayos del virus aftoso

Se ha demostrado que la línea celular proveniente de células de riñón de fetos de cerdos (MVPK-1),

Heat resistance of foot-and-mouth disease virus in milk from infected cows

The effect of heat on foot-and-mouth disease virus strain O Lausanne in milk taken from infected cattle has been investigated. The milk was collected from cows infected intravenously and diahetically with virus. The presence of virus was checked by inoculation of mice. Heating the milk at various temperatures for 20 seconds showed that the virus titer decreased rapidly between 60°C and 68°C. Heating infected milk at 50°C had virtually no effect on the virus titer. At 60°C the virus was completely inactivated after 320 seconds. It was concluded that the virus contained a heat resistant fraction and it was thought possible that this might be related to the association of virus with the milk proteins.

Selection of a stable clone of the MVPK-1 fetal porcine kidney cell for assays of foot-and-mouth disease virus

The MVPK-1 cell line, derived from foetal pig kidney cells, has been shown to be highly

es muy susceptible a los siete tipos del virus aftoso. Se adaptó la línea celular para crecer en un medio contenido un 5% de suero bovino. La susceptibilidad de las células adaptadas disminuyó mientras que estas células se envejecieron a 37°C. Se aislaron varios clones de las células adaptadas, y se compararon sus características de crecimiento y susceptibilidad sostenida al virus aftoso. Un clon (clon 7) mantuvo una susceptibilidad uniforme al virus durante un período de 3 días a 37°C, y resultó ser superior a los otros clones en cuanto a estas características. Este clon ha mantenido una susceptibilidad satisfactoria a cada uno de los siete tipos del virus aftoso a través de 40 subcultivos. Se concluyó que células MVPK-1, clon 7, podrían reemplazar células primarias del riñón bovino en ensayos virales rutinarios, pero que no fueron tan sensibles como estas células ni como células de tiroides bovino y de riñón de cerdo para detectar el virus aftoso en especímenes animales.

susceptible to foot-and-mouth disease virus of all seven types. The cell line was adapted to grow in a medium containing 5% bovine serum. The susceptibility of the adapted cells decreased as they aged at 37°C. A number of clones were isolated from the adapted cells and their growth characteristics and sustained susceptibility to foot-and-mouth disease virus were compared. One clone (clone 7) maintained uniform susceptibility to the virus over a three day period at 37°C and proved superior to other clones as regards the characteristics mentioned. This clone has now maintained satisfactory susceptibility to each of the seven types of foot-and-mouth disease virus through 40 subcultures. It is concluded that MVPK-1 clone 7 cells could replace primary bovine kidney cells for routine viral assays but was not as sensitive as these cells or bovine thyroid and swine kidney cells for the detection of foot-and-mouth disease virus in animal specimens.

GOIĆ M., R.

Texto en inglés. *Proc. 9th Inter-American Meeting on FMD and Zoonoses Control, PAHO Scientific Publication No. 334: 97-104, 1976. (FMD Bull. Wellcome 16 (5): 30, 1977). [Pan American Foot-and-Mouth Disease Center, Caixa Postal 589, ZC-00, Rio de Janeiro, Brasil]*

Sitios para la cuarentena de animales en las Américas

En 1974 el Centro Panamericano de Fiebre Aftosa envió un cuestionario a todos los países de las Américas para hallar información sobre sitios para la cuarentena de animales, incluyendo planes, leyes y regulaciones. Durante 1975 se recibió información de 22 países. Un análisis de la información recibida indicó que la infraestructura de los sitios de cuarentena de animales en las Américas no era adecuada al efecto. Se descubrió que 20 países no tenían ninguna estación cuarentenaria. En vista de los riesgos en juego, varios países esperan en la actualidad poder establecer tales sitios. Los Estados Unidos de América y México están desarrollando planes para unidades de seguridad máxima. Bolivia, Brasil, Colombia, Chile, Ecuador, Paraguay y Perú tienen proyectos que incluyen estaciones cuarentenarias en los programas para el control de la fiebre aftosa que se realizan con la

Animal quarantine stations in the Americas

In 1974, the Pan American Foot-and-Mouth Disease Center sent a questionnaire to all the countries of the Americas in order to gain information on animal quarantine stations, including plans, laws and regulations. Information from 22 countries was received during 1975. Analysis of the information supplied indicated that the infrastructure of animal quarantine stations in the Americas was inadequate for the purpose. It appeared that 20 countries had no quarantine station of any kind. In view of the risks involved many countries are now planning to set up such stations. The United States and Mexico are developing plans for maximum security units. Bolivia, Brazil, Colombia, Chile, Ecuador, Paraguay and Peru have projects involving quarantine stations included in plans for the control of foot-and-mouth disease which are being carried out with financial aid from

ayuda financiera del Banco Interamericano de Desarrollo. Los problemas que afectan los planes para sitios de cuarentena en América del Sur incluyen una carencia de mano de obra especializada así como de información sobre las necesidades y condiciones exigidas por ambientes diferentes. Una evaluación precisa de las importaciones de animales en los diferentes países es muy necesaria.

the Inter-American Development Bank. Problems involved in the planning of quarantine stations in South America include lack of specialized manpower and lack of information on the needs and conditions required by differing environments. There is a need for accurate evaluation of animal imports in the different countries.

GORREAU, J.M.

Texto en francés. *Recl. Méd. vét.* 152 (3): 193-195, 1976. (*FMD Bull. Wellcome* 16 (1): 5, 1977). [Laboratoire Central de Recherches Vétérinaires, 94700 Maisons-Alfort, France]

Vacunación de porcinos contra la enfermedad vesicular del cerdo

Se han preparado vacunas contra la enfermedad vesicular del cerdo de virus cultivados en células de riñón de cerdo. Las vacunas se inactivaron con formaldehido o glicidaldehido y adyuvantes oleosos incorporados. En ensayos de laboratorios, se demostró que las vacunas protegieron entre el 70 y el 80% de los cerdos. La inmunidad apareció entre 6 y 8 días después de la vacunación. Los títulos de anticuerpos neutralizantes inducidos por las vacunas fueron constantes durante seis meses, disminuyendo progresivamente hasta los nueve meses. Se mostró además que la cerda pudo transmitir la inmunidad a su cría a través del calostro.

Vaccination of pigs against swine vesicular disease

Vaccines against swine vesicular disease have been prepared from virus grown on pig kidney cell cultures. The vaccines were inactivated with formaldehyde or glycidaldehyde and incorporated oil emulsion adjuvants. In laboratory trials, the vaccines were shown to protect 70 to 80% of pigs. Immunity appeared 6 to 8 days after vaccination. The neutralizing antibody titers induced by vaccines remained constant for six months then progressively declined until the ninth month. It was further shown that immunity could be transmitted from sow to piglet via the colostrum.

HENDRIE, E.W.; WATSON, J.; HEDGER, R.S.; ROWE, L.W.; GARLAND, A.J.

Texto en inglés. *Vet. Rec.* 100: 363-365, 1977. (*FMD Bull. Wellcome* 16 (4): 27, 1977). [Animal Virus Research Institute, Pirbright, Woking, Surrey, England]

La enfermedad vesicular del cerdo: estudios serológicos adicionales de cerdos presentados para matanza en el Reino Unido

Desde la publicación de los resultados del primer estudio sobre suero para la enfermedad vesicular del cerdo en Gran Bretaña (Watson & Hedger, véase el Boletín sobre la Fiebre Aftosa 13 (12) (edición inglesa): abstr. N° 176, 1974), se han realizado tres estudios adicionales. Durante los cuatro estudios, un total global de 9760 sueros fueron examinados, provenientes de cerdos de 958 granjas

Swine vesicular disease: continuing serological surveys of pigs presented for slaughter in the United Kingdom

Since publication of the results of the first serum survey for swine vesicular disease in Great Britain (Watson & Hedger, see FMD Bulletin 13 (12): abstr. No. 176, 1974), three further surveys have been carried out. During all four surveys, an overall total of 9760 sera have been examined, involving pigs from 958 premises in the first three surveys and an unknown number

para los tres primeros estudios, y una cifra desconocida de granjas para el cuarto estudio. Se visitaron unas 43 granjas como fuentes de origen o posibles fuentes de origen de los cerdos, de las cuales se habían obtenido resultados o positivos, o inconcluyentes. Se registró un caso clínico de la enfermedad con los resultados del primer estudio, pero subsecuentemente no se confirmó ningún caso clínico adicional, aunque se hallaron lesiones que hacen pensar en la enfermedad en algunos cerdos en cuatro de las granjas visitadas. Muestras serológicas adicionales tomadas en estas granjas indicaron que no existió una condición vesicular en vías de propagación. Los tres últimos estudios confirmaron los hallazgos del primer estudio de que no había evidencia de una infección muy difundida y no detectada con el virus de la enfermedad vesicular del cerdo en Gran Bretaña.

of premises in the fourth survey. Some 43 farms were visited as sources of origin or possible sources of origin of the pigs from which positive or inconclusive results were obtained. One clinical case of disease was reported with the results of the first survey, but no further clinical cases were subsequently confirmed although lesions suggestive of the disease were found in some pigs on four of the premises visited. Further serological samples taken from these premises provided no evidence that a spreading vesicular condition existed. The last three surveys supported the findings of the first survey that there was no evidence of widespread, undetected infection with swine vesicular disease virus in Great Britain.

MARTINS, R.M.

Texto en portugués. *Bol. Inst. Pesq. vet. "Desiderio Finamor"* 3: 47-59, 1975. (*FMD Bull. Wellcome* 16 (2): 9, 1977). [Instituto de Pesquisas Veterinárias "Desiderio Finamor", Caixa Postal 2076, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil]

Correlación inmunológica entre dos cepas, tipo C₃, del virus aftoso en cobayos

Se compararon desde el punto de vista inmunológico, las cepas de virus C₃ Resende y C₃ Indaial en cobayos. La cepa C₃ Resende fue más inmunogénica que la cepa C₃ Indaial. La vacuna C₃ Resende protegió a cobayos contra infección con el virus C₃ Indaial en una manera semejante a animales vacunados con una vacuna C₃ Indaial. La vacuna C₃ Indaial confirió una inmunidad satisfactoria en cobayos a la descarga con virus homólogo. Se halló que las dos cepas mostraron un nivel elevado de afinidad inmunológica, y se confirmó que se puede considerar que pertenecen al mismo subtipo (C₃).

Immunological correlation between two type C₃, strains of foot-and-mouth disease virus in guinea pigs

Foot-and-mouth disease virus strains C₃ Resende and C₃ Indaial have been compared immunologically in guinea pigs. The C₃ Resende strain was more immunogenic than the C₃ Indaial strain. A C₃ Resende vaccine protected guinea pigs against infection with C₃ Indaial virus in a comparable way to animals vaccinated with a C₃ Indaial vaccine. The C₃ Indaial vaccine conferred satisfactory immunity in guinea pigs to challenge with homologous virus. It was found that the two strains had a high degree of immunological affinity and it was confirmed that they could be regarded as belonging to the same subtype (C₃).

OMOHUNDRO, R.E.; ATWELL, J.K.

Texto en inglés. *J. Amer. vet. med. Ass.* 169 (11): 1200-1201, 1976. (*FMD Bull. Wellcome* 16 (1): 3,

1977). [Emergency Programs, Veterinary Services, APHIS, Federal Bld., Hyattsville, Maryland 20782, U.S.A.]

El problema del "tapón del Darién" en cuanto a la fiebre aftosa

La América del Norte se ha mantenido libre de la fiebre aftosa desde la erradicación de brotes en México en 1954. Hasta ahora, la región no desarrollada entre Panamá y Colombia, llamada "la barrera de Darién" ha representado una barrera efectiva para el comercio, y, por consiguiente, ha evitado la transmisión de la enfermedad en la región. La parte sin construir de la Carretera Panamericana que unirá América del Norte y América del Sur se llama el "tapón del Darién". Mide unos 322 km. Las industrias ganaderas de Panamá, Centroamérica, México, los Estados Unidos de América y Canadá han expresado sus dudas sobre la conveniencia de construir una carretera por esta región, visto que representa una barrera efectiva contra la transmisión de la fiebre aftosa. Así, el Consejo Nacional de Seguridad de los Estados Unidos recomendó que no se aceptaran más ofertas para la construcción de la carretera hasta que programas efectivos de vigilancia y control de la enfermedad con Panamá y Colombia pudiesen ser establecidos. Se ha llegado a acuerdos cooperativos entre Panamá y Colombia, y se han hecho muchos progresos. No será conveniente continuar la construcción de la parte del Darién de la Carretera Panamericana hasta que los objetivos de los programas de control se hayan alcanzado.

The Darien gap foot-and-mouth disease problem

North America has remained free from foot-and-mouth disease since the eradication of outbreaks in Mexico in 1954. The area of undeveloped land between Panama and Colombia known as the Darien barrier has, so far, provided an effective barrier to commerce and has consequently served to suppress the movement of the disease in the area. The uncompleted portion of the Pan American Highway, which will join north and south America is known as the Darien Gap. It covers about 322km. The livestock industries of Panama, Central America, Mexico, United States and Canada have expressed reservations on the desirability of highway construction through this area in view of the barrier which had previously provided an effective barrier against the spread of foot-and-mouth disease. Thus, the U.S. National Security Council recommended that no further bids for highway construction should be accepted until effective disease surveillance and control programs could be established with Panama and Colombia. Cooperative agreements have been entered into with Panama and Colombia and much progress has been achieved. It will not be desirable to resume construction on the Darien section of the Pan American Highway until the aims of the control programs have been achieved.

PALACIOS, G.C.; NESTOR LEONALDI, G.

Texto en inglés. *Proc. 9th Inter-American Meeting on FMD and Zoonoses Control, PAHO Scientific Publication No. 334: 109-117, 1976. (FMD Bull. Wellcome 16 (5): 30, 1977).* [Director, National Center for Agriculture and Livestock Research, Ministry of Agriculture and Livestock, Caracas, Venezuela]

Cuarentena contra la fiebre aftosa en países afectados por la enfermedad: la experiencia en Venezuela

La primera estación de cuarentena de Venezuela se estableció en Turiama, en 1939. La segunda, de seguridad máxima, se estableció en la isla de La Orchila, en 1945. En esta última, se examinaron

Quarantine against foot-and-mouth disease in disease-affected countries: the experience in Venezuela

The first quarantine station in Venezuela was established at Turiama in 1939. A second, maximum security station was set up on the island of La Orchila in 1945. At the latter station,

los bovinos para comprobar su estado de portadores del virus aftoso, de brucelosis y de tuberculosis. Durante el período 1967 a 1975, un total de 1.989 animales pasaron por la estación cuarentenaria. De éstos, un 4.9% fueron rechazados. La razón más importante para el rechazo fue la brucelosis (69% de los animales). La experiencia en Venezuela ha sugerido que la cuarentena de animales en el país de origen es muy importante como requisito previo para la entrada a una estación de cuarentena en el país importador. Para disminuir el riesgo de introducción de enfermedades, se consideró prudente transferir los animales procedentes de una estación de cuarentena a una granja estatal o centro experimental antes de enviarlos a sus destinos finales.

bovines are checked as to their carrier status in respect of the virus of foot-and-mouth disease, brucella and tuberculosis. During the period 1967 to 1975 a total of 1,989 animals passed through the quarantine station. Of these 4.9% were rejected. The most important cause of rejection was brucellosis (69% of rejected animals). Experience in Venezuela has suggested that quarantine of animals in the country of origin is very important as a basic prerequisite for admission to a station in the importing country. In order to decrease the risk of introducing diseases, it is considered advisable to transfer the animals leaving quarantine stations to a state farm or experimental center before they are sent to their final destinations.

RICHARDS, R.A.

Texto en inglés. *Proc. 20th Wld. vet. Congr.*, Thessalonika, 3: 2166-2170, 1976. (*FMD Bull. Wellcome* 16 (2): 14, 1977). [Ministry of Agriculture, Fisheries & Food, Tolworth, Surrey, England]

Factores epizootiológicos en el control y erradicación de la enfermedad vesicular del cerdo en Gran Bretaña

La enfermedad vesicular del cerdo se diagnosticó por primera vez en Gran Bretaña en diciembre de 1972. Durante los dos años siguientes, se confirmaron 337 brotes y se sacrificaron unos 180.000 cerdos, que costó unos seis millones de libras. Estudios epizootiológicos de los brotes indicaron que habían varios factores que afectaban significativamente el curso de la enfermedad. El virus puede permanecer viable en la carne durante muchos meses y fue claro que no se dio debida atención al manejo de los restos de alimentos llevados a las granjas, por lo que la transmisión del virus se produjo por la cadena cerdo-alimentos-cerdos. Los mercados de ganado y vehículos contaminados que sirvieron para el transporte de animales fueron otros factores importantes en la transmisión de la enfermedad. Se señaló que no hubo casi ninguna transmisión por aerosol de la enfermedad de propiedades infectadas. Los procedimientos de desinfección adaptados en primer lugar fueron muy semejantes a los procedimientos efectivos para la fiebre aftosa. Sin embargo, la enfermedad vesicular

Epizootiological factors in the control and eradication of swine vesicular disease in Great Britain

Swine vesicular disease was first diagnosed in Great Britain in December 1972. During the following two years, 337 outbreaks were confirmed and some 180,000 pigs slaughtered at a cost of about £ 6 million. Epizootiological studies of the outbreaks indicated that there were a number of factors which had an important bearing on the course of the disease. The virus can remain viable in meat tissues for many months and it was clear that if due attention was not paid to disease security in the handling and processing of swill brought on to farm premises then recycling of virus from pigs via the food chain to swill and back to pigs could occur. Livestock markets and contaminated livestock vehicles were other factors of importance in the spread of the disease. It was pointed out that there was a virtual absence of any aerosol spread of disease from infected premises. Disinfection procedures initially adopted for infected premises followed closely those found to be effective for foot-and-mouth disease. However, swine vesicular disease reappeared on six premises

del cerdo reapareció en seis propiedades después de repobladas y hubo evidencia que virus viable persistió desde el brote previo. Se introdujeron procedimientos de desinfección incluyendo fuertes desinfectantes alcalinos y lanzallamas después de un intervalo de 2 semanas después de la desinfección principal.

following restocking and there was evidence that viable virus had persisted from the previous outbreak. Amended disinfection procedures involving use of strong alkaline disinfectants and use of flame guns after an interval of two weeks following main disinfection were introduced.

RWEYEMAMU, M.M.; BOOTH, J.C.; PAY, T.W.F.

Texto en inglés. *J. Hyg. (Camb.)* 78 (1): 99-112, 1977. (*FMD Bull. Wellcome* 16 (1): 4, 1977). [Wellcome FMD Vaccine Laboratory, Pirbright, Nr. Woking, Surrey, England]

Estudios sobre la cinética de neutralización con cepas del virus aftoso, tipo SAT₂. 1. Factores que incluyen la tasa y patrón de neutralización

Estudios de la cinética de inactivación de cepas del virus aftoso, tipo SAT₂, indicaron que en muchos casos, la tasa de neutralización no fue rectilínea. Las desviaciones observadas de las cinéticas del orden primero representaron reacciones bifásicas o parabólicas y reacciones por pasos. La tasa inicial fue rápida y no mostró ninguna fase de "lag" ni hombro. Se pudieron reducir al mínimo los efectos de desviaciones de la linearidad por la dilución del antisero hasta un punto apropiado. El tratamiento de mezclas del virus y anticuerpo con globulinas de anti-especie resultó en una mejoría de la tasa de neutralización de reacciones homólogas sin cambiar significativamente las relaciones entre estas dos reacciones. Este tratamiento redujo considerablemente la cantidad de fracción persistente. Cuando se intentó desagregar el virus se observó que el sulfato de dodecil de sodio inhibió la neutralización de virus por antiseros específicos.

Neutralization kinetic studies with type SAT₂ foot-and-mouth disease virus strains. 1. Factors that influence the rate and pattern of neutralization

A study of the kinetics of inactivation of foot-and-mouth disease virus type SAT₂ strains indicated that, in most cases, the rate of neutralization was not rectilinear. The deviations from first-order kinetics observed represented biphasic or parabolic and step-wise reactions. The initial rate was rapid and showed no lag phase or shoulder. The effects of deviations from linearity could be minimized by dilution of antiserum to an appropriate extent. Treatment of virus-antibody mixtures with anti-species globulin resulted in enhancement of the rate of neutralization of homologous and heterologous reactions without any significant alteration of the relation between the two. This treatment also considerably reduced the amount of the persistent fraction. In attempts to disaggregate virus it was observed that sodium dodecyl sulphate inhibited neutralization of virus by specific antiserum.

SWANEY, L.M.

Texto en inglés. *Amer. J. vet. Res.* 37 (11): 1319-1322, 1976. (*FMD Bull. Wellcome* 16 (2): 12, 1977). [Plum Island Animal Disease Center, Greenport, Long Island, New York 11944, U.S.A.]

Susceptibilidad de una nueva línea celular de riñón de feto de cerdo al virus aftoso

La línea celular de riñón de feto de cerdo de

Susceptibility of a new foetal pig kidney cell line (MVPK-1) to foot-and-mouth disease virus

The Mengelin-Vaughn porcine kidney (MVPK-1)

Mengeling-Vaughn se derivó en 1970 de células de riñón de feto de cerdo (MVPK-1) que fueron refractarias a la hemaglutinación del virus de la encéfalomalietitis de cerdos. Las células fueron susceptibles a los siete tipos del virus aftoso porque los virus formaron tantas placas, o más placas, sobre células MVPK como sobre células primarias de riñón bovino después de 25 horas de incubación bajo una capa de 0,6% de goma tragacanto sin suero. El virus pasado en células primarias de riñón bovino no tuvo que adaptarse a la nueva línea celular para obtener los resultados indicados anteriormente. La línea celular MVPK-1 perdió rápidamente su susceptibilidad a 37°C después de alcanzar la confluencia, pero retuvo susceptibilidad cuando fue mantenida a la temperatura ambiente. Se concluyó que la nueva línea celular podría potencialmente reemplazar células de riñón bovino para varios fines.

cell line was derived in 1970 from foetal pig kidney cells which were refractory to haemagglutinating encephalomyelitis virus of pigs. The cells were susceptible to all seven types of foot-and-mouth disease virus in that the viruses formed as many or more plaques on MVPK-1 cells as on primary bovine kidney cells following 25 hours inoculation under 0.6% gum tragacanth overlay lacking serum. Virus which had been passaged in primary bovine kidney cells did not have to be adapted to the new cell line to obtain the results noted above. The MVPK-1 cell line lost susceptibility rapidly at 37°C after confluence had been reached but retained susceptibility if maintained at room temperature. It was concluded that the new cell line had potential for replacing bovine kidney cells for a variety of purposes.

TERPSTRA, C.; FRENKEL, S.; STRAVER, P.J.; BARTELING, S.J.; VAN BEKKUM, J.G.

Texto en inglés. *Vet. Microbiol.* 1 (1): 71-83, 1976. (*FMD Bull. Wellcome* 16(4): 24, 1977). [Central Veterinary Institute, Virology Dept., Lelystad, Holland]

Comparación de técnicas de laboratorio para evaluar la potencia antigenica de cultivos y vacunas de la fiebre aftosa

Se compararon varias suspensiones de tipo A de la fiebre aftosa cultivadas en Frenkel, mediante la prueba de fijación del complemento cuantitativa y la prueba para combinar anticuerpos para evaluar el contenido antigenico del componente 140S. Los resultados obtenidos se compararon con los de las pruebas de infectividad. Se utilizaron suspensiones para formular vacuna completa, y la potencia de estas vacunas se calculó mediante la técnica de DP₅₀ en cobayos y el método de combinar anticuerpos. La correlación entre los resultados obtenidos mediante varias pruebas de infectividad (ratones jóvenes, pruebas de placa en monocapas o suspensiones de BHK) fue pobre y, a excepción de pruebas de placa en cultivos de suspensión de BHK, no demostró mucha relación con los resultados de pruebas serológicas. El coeficiente de correlación entre valores obtenidos en pruebas de fijación del complemento y de combinar

Comparison of laboratory techniques for the evaluation of the antigenic potency of foot-and-mouth disease virus cultures and vaccines

A number of suspensions of type A foot-and-mouth disease virus grown in Frenkel culture were compared using a quantitative complement fixation test and an antibody combining test in order to evaluate the antigenic content of 140S component. Results obtained were compared with results obtained in infectivity assays. The suspensions were then used to formulate complete vaccine and the potency of these was measured using a guinea pig PD₅₀ technique and the antibody combining method. The correlation between the results obtained using different infectivity assays (baby mice, plaque tests in BHK monolayers or suspensions) was poor and, with the exception of plaque tests in BHK suspension cultures, little relationship to the results of serological test was apparent. The correlation coefficient between values obtained in complement fixation and antibody combining tests was 0,82 in the case of virus

anticuerpos fue 0,82 para suspensiones virales y 0,88 para vacunas completas. Se probaron dos lotes de vacunas por la técnica DP₅₀ en bovinos, utilizando grupos de 20 bovinos por cada dilución de vacuna. Los resultados indicaron que las diferencias observadas en valores de DP₅₀ en bovinos y las observadas en pruebas en cobayos fueron de la misma envergadura, siempre que se utilizaran suficientes animales para ambas pruebas. Los resultados de pruebas cuantitativas de fijación del complemento y de combinar anticuerpos estuvieron de acuerdo con los resultados de pruebas de DP₅₀ de cobayos, y proporcionarían información valiosa sobre la calidad de cultivos de Frenkel.

suspensions and 0.88 in the case of finished vaccines. Two batches of vaccine were tested by the cattle PD₅₀ technique using groups of 20 cattle per vaccine dilution. Results indicated that differences observed in cattle PD₅₀ values were of the same magnitude as those observed in guinea pig tests provided that sufficient numbers of animals were used for both tests. The results of quantitative complement fixation tests and antibody combining tests were in good agreement with the results of guinea pig PD₅₀ tests and could provide valuable information on the quality of Frenkel cultures.

TOKUDA, G.

Texto en inglés. *Jap. agric. Res. Quart.* 9 (4): 217-220, 1975. (*FMD Bull. Wellcome* 16 (1): 5, 1977). [Nat. Inst. Anim. Heith, Kodaira, Tokyo 187, Japán]

La enfermedad vesicular del cerdo en el Japón

Se confirmaron brotes de enfermedad vesicular del cerdo por la primera vez en Japón en noviembre de 1973 en dos granjas en las prefecturas de Ibaraki y Kanagawa. La enfermedad se propagó un poco, pero el brote se erradicó dentro de un mes. Las medidas para esta erradicación incluyeron el sacrificio de 580 cerdos y restricciones sobre el movimiento de animales. Pruebas en el laboratorio con virus aislado de estos brotes indicaron que se produjeron efectos citopáticos en cultivos celulares primarios de riñón de cerdo y las líneas celulares de riñón de cerdo PK-15 y ESK. Ratones lactantes no mostraron signos clínicos después de la inoculación intraperitoneal o intracerebral. Signos clínicos típicos de la enfermedad vesicular del cerdo se produjeron en cerdos inoculados con extractos de epitelio vesicular o con virus cultivado en células. Anticuerpos neutralizantes del virus se detectaron en sueros infectados de cerdos a los cinco días después de la infección y alcanzaron un pico entre 7 y 10 días. El virus mostró un nivel elevado de reacción cruzada con el virus Coxsackie B₅ pero no lo mostró con otros enterovirus porcinos.

Swine vesicular disease appeared in Japan

Outbreaks of swine vesicular disease were confirmed for the first time in Japan in November 1973 on two farms in Ibaraki and Kanagawa prefectures. Some spread of the disease occurred but the outbreak was eradicated within one month. Measures used for eradication included slaughter of 580 pigs and restriction of movement of animals. Laboratory tests with virus isolated from the outbreaks indicated that it produced cytopathic effect in primary pig kidney cell cultures and in PK-15 and ESK pig kidney cell lines. Suckling mice showed no clinical signs following intraperitoneal or intracerebral inoculation. Typical clinical signs of swine vesicular disease were reproduced in pigs by inoculating extracts of vesicular epithelium or cell cultured virus. Virus neutralizing antibody was detectable in infected pig sera on the fifth day following infection and reached a peak at 7 to 10 days. The virus showed a high degree of cross-reactivity with Coxsackie B₅ virus but not with any other porcine enterovirus.

WELLS, K.F.

Texto en inglés. *Proc. 9th International Meeting on FMD and Zoonoses Control, PAHO Scientific Publication No. 334: 105-108, 1976. (FMD Bull. Wellcome 16 (5): 31, 1977). [Veterinary Director General, Health of Animal Branch, Department of Agriculture, Ottawa, Ontario, Canada]*

Estaciones de cuarentena en países libres de la fiebre aftosa

A excepción de un único brote en 1952, Canadá ha permanecido libre de la fiebre aftosa. Siempre ha estado libre de peste bovina y pleuroneumonía contagiosa. "The Health of Animals Branch" del Ministerio de Agricultura canadiense tiene la responsabilidad de impedir la introducción de enfermedades animales exóticas. Las condiciones para la importación de animales son rígidas y complicadas. Se utilizan tres métodos básicos: certificado de salud; certificado de salud con el período mínimo de cuarentena; y certificado de salud con el período máximo de cuarentena. Para la importación de animales de Estados Unidos de América, el ganado debe ir acompañado de un certificado de salud que cubra inspección específica de salud y pruebas específicas diagnósticas. En cuanto al ganado de otros países, sólo se distribuye permisos cuando se consideran fuera de peligro, desde el punto de vista de la salud. El ganado de países históricamente libres de enfermedades animales graves, puede entrar en Canadá a través de una de las dos estaciones de cuarentena mínima. Los bovinos del Reino Unido entran en esta categoría. Los animales procedentes de países no históricamente libres de fiebre aftosa entran en Canadá a través de las estaciones de cuarentena de seguridad máxima, en las islas de Grosse Ile o St. Pierre.

Quarantine stations in foot-and-mouth disease-free countries

With the exception of a single outbreak in 1952, Canada has been free from foot-and-mouth disease. It has always been free from rinderpest and contagious pleuro-pneumonia. The Health of Animals Branch of the Canadian Department of Agriculture is responsible for preventing the introduction of foreign animal diseases. The conditions for import of animals are rigid and complicated. Three basic approaches are used: health certification only; health certification plus period of minimum quarantine; and health certification plus period of maximum quarantine. For importation from the United States, livestock must be accompanied by a health certificate covering specific health inspection and diagnostic tests. With respect to livestock from countries other than the United States import permits are only issued when it is considered safe to do so from a health standpoint. Livestock from countries historically free from serious animal diseases enter Canada via one of the two minimum quarantine stations. Cattle from the United Kingdom fall into this category. Animals from countries not historically free from foot-and-mouth disease enter Canada through the maximum security quarantine stations on the islands of Grosse Ile or St. Pierre.

bibliografía sobre enfermedades vesiculares**vesicular diseases bibliography**

AHL, R.; RUMP, A.

Un ensayo de interferonas bovinas en cultivos de la línea celular porcina IB-RS-2. *Texto en inglés.* (Assay of bovine interferons in cultures of the porcine cell line IB-RS-2). *Infect. Immun.* 14 (3): 603-606, 1976. (*FMD Bull. Wellcome* 16 (2): 13, 1977). [Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere, D-74, Tübingen, West Germany]

ANSELMO, F.P.; MOREIRA, E.C.; OLINDA, S.; SANTANA, J.S. de; ARAÚJO, M.L.R.

Incidencia de la fiebre aftosa en la región del Triângulo, Minas Gerais. *Texto en portugués.* (Incidence of foot-and-mouth disease in the region of Triângulo, Minas Gerais). *Arq. Esc. vet.* (Univ. Federal Minas Gerais) 28 (1): 131-141, 1976. (*FMD Bull. Wellcome* 16 (4): 22, 1977).

BAUER, K.; MÜLLER, H.; EISSNER, G.

Investigaciones sobre la significación epidemiológica de animales que excretan crónicamente el virus aftoso. *Texto en alemán.* (Investigations on the epidemiological significance of animals which chronically excrete foot-and-mouth disease virus). *Berl. Münch. tierärztl. Wschr.* 90 (1): 1-5, 1977. (*FMD Bull. Wellcome* 16 (3): 15, 1977). [Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere, D-74, Tübingen, West Germany]

BOOTH, J.C.

Demostración de determinantes antigenicos sensibles a tripsina comunes a la partícula intacta del virus y a la partícula 12S de la cepa UGA 6/70 del virus aftoso, tipo SAT₂. *Texto en inglés.* (Demonstration of trypsin-sensitive antigenic determinants common to the intact virus particle and the 12S subunit of the UGA 6/70 strain of foot-and-mouth disease virus type SAT₂). *J. gen. Virol.* 34 (3): 551-555, 1977. (*FMD Bull. Wellcome* 16 (3): 16, 1977). [Wellcome Foot-and-Mouth Disease Vaccine Laboratory, Pirbright, Woking, Surrey, England]

BURROWS, R.; MANN, J.A.; GOODRIDGE, D.; WARTHALL, A.E.; DONE, J.T.

Enfermedad vesicular del cerdo. Estudios en cerdas preñadas. *Texto en inglés.* (Swine vesicular disease. Studies in pregnant sows). *Zbl. VetMed. (B)* 24 (3): 177-182, 1977. (*FMD Bull. Wellcome* 16 (6): 42, 1977). [Animal Virus Research Institute, Pirbright, Woking, Surrey, England]

CAVANAGH, D.; SANGAR, D.V.; ROWLANDS, D.J.; BROWN, F.

Sitios inmunogénicos y de fijación de células del virus aftoso: evidencia adicional para su situación sobre un solo péptido del cápside. *Texto en inglés.* (Immunochemical and cell attachment sites of foot-and-mouth disease virus: further evidence for their location on a single capsid polypeptide). *J. gen. Virol.* 35 (1): 149-158, 1977. (*FMD Bull. Wellcome* 16 (4): 23, 1977). [Animal Virus Research Institute, Pirbright, Woking, Surrey, England]

FORD, G.W.

Brotes de la fiebre aftosa y de la enfermedad vesicular del cerdo en Malta. *Texto en inglés.* (The outbreaks of foot-and-mouth disease and swine vesicular disease in Malta). *Wild anim. Rev.* 20: 42-44, 1976. (*FMD Bull. Wellcome* 16 (1): 1, 1977). [55 Kiteley's Green, Leighton Buzzard, Bedfordshire, England]

HARRIS, T.J.R.; BROWN, F.

Análisis bioquímico de una cepa virulenta y una cepa avirulenta del virus aftoso. *Texto en inglés.* (Biochemical analysis of a virulent and an avirulent strain of foot-and-mouth disease virus). *J. gen. Virol.* 34 (1): 87-105, 1977. (*FMD Bull. Wellcome* 16 (1): 4, 1977). [Animal Virus Research Institute, Pirbright, Woking, Surrey, England]

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

La inducción de anticuerpos neutralizantes e inmunidad en cobayos vacunados por péptidos tratados con bromuro de cianógeno de VP₃ del virus aftoso. *Texto en inglés.* (Induction of neutralizing antibodies and immunity in vaccinated guinea pigs by cyanogen bromide-peptides of VP₃ of foot-and-mouth disease virus). *J. gen. Virol.* 34 (2): 397-400, 1977. (*FMD Bull. Wellcome* 16 (3): 16, 1977). [Federal Research Institute for Animal Virus Diseases, P.O. Box 1149, D-74 Tübingen, West Germany]

KAADEN, O.; EISSNER, G.; BÖHM, H.O.

Estudios sobre excretores permanentes de virus en bovinos vacunados e infectados experimentalmente con la fiebre aftosa. *Texto en inglés.* (Studies on permanent virus excretors in cattle vaccinated and experimentally infected with foot-and-mouth disease). *Anim. Res. Dev.* 1: 20-33, 1975. (*FMD Bull. Wellcome* 16 (2): 8, 1977). [Research Institute for Animal Virus Diseases, P.O. Box 1149, D-74, Tübingen, West Germany]

KANT, R.; GUPTA, B.M.

La actividad antiviral del 6-MFA, producto de crecimiento del hongo *A. ochraceus*, contra el virus aftoso. *Texto en inglés.* (Antiviral activity of 6-MFA, growth product of fungus *A. ochraceus*, against foot-and-mouth disease virus). *Current Science (India)* 45 (22): 805-806, 1976. (*FMD Bull. Wellcome* 16 (4): 26, 1977). [Division of Virology, Central Drug Research Institute, Lucknow, India]

KONO, M.; SAITO, T.; TOKUI, T.; TOKUDA, G.; SASAHARA, J.

Análisis de anticuerpos con bajos títulos contra la enfermedad vesicular del cerdo en porcinos de campo con referencia especial a las relaciones entre este virus y el virus Coxsackie B₅. *Texto en japonés.* (Analysis of low-titer antibody against swine vesicular disease produced in pigs in the field with special reference to the relationship between this virus and Coxsackie B₅ virus). *Virus (Tokyo)* 25 (1-2): 53-57, 1975. (*FMD Bull. Wellcome* 16 (3): 19, 1977). [National Institute of Animal Health, Tokyo, Japan]

LIEBERMANN, H.; MEISSNER, J.; SCHULZE, P.; THALMANN, G.

Algunas propiedades físico-químicas de la partícula 73S del virus aftoso. *Texto en alemán.* (Some physico-chemical properties of the 73S unit of foot-and-mouth disease virus). *Arch. exp. VetMed.* 30 (6): 813-821, 1976. (*FMD Bull. Wellcome* 16 (4): 23, 1977). [Friedrich-Leöffler Institute für Tierseuchenforschung., Insel Riems bei Greifswald, DDR-2201]

McGARRITY, G.J.

La transmisión y el control de infecciones por micoplasma de cultivos celulares. *Texto en inglés.* (Spread and control of mycoplasma infection of cell cultures). *In Vitro* 12 (9): 643-648, 1976. (*FMD Bull. Wellcome* 16 (3): 19, 1977). [Institute for Medical Research, Camden, New Jersey 08103, U.S.A.]

MOORE, D.M.

La caracterización de tres partículas antigenicas del virus de la enfermedad vesicular del cerdo. *Texto en inglés.* (Characterization of three antigenic particles of swine vesicular disease virus). *J. gen. Virol.* 34 (3): 431-445, 1977. (*FMD Bull. Wellcome* 16 (3): 20, 1977). [Plum Island Animal Disease Center,

Greenport, Long Island, New York 11944, U.S.A.]

MURRAY, M.D.; SNOWDEN, W.A.

El papel de animales salvajes en la transmisión de enfermedades exóticas en Australia. *Texto en inglés.* (The role of wild animals in the spread of exotic diseases in Australia). *Austr. vet. J.* 52 (12): 547-554, 1976. (*FMD Bull. Wellcome* 16 (2): 8, 1977). [Research Institute for Animal Virus Diseases, Tübingen, West Germany]

PIRES PRADO, J.A.; KASSICK, V.V.; CARDOSO, E.A.

La técnica de inhibición de la fijación del complemento para evaluar anticuerpos de la fiebre aftosa. I. Correlación con la prueba de seroprotección en bovinos vacunados por la primera vez (prueba de control de vacuna). *Texto en portugués.* (The complement-fixation inhibition technique for the evaluation of foot-and-mouth disease antibodies. I. Correlation with serum protection test in cattle vaccination for the first time (vaccine control test). *Bol. Inst. Pesq. vet. "Desiderio Finamor"* 3: 37-46, 1975. (*FMD Bull. Wellcome* 16 (2): 9, 1977). [Instituto de Pesquisas Veterinárias "Desiderio Finamor", Caixa Postal 2076, Porto Alegre, RS, Brasil]

POPOVIC, M.; PANJEVIC, D.; DUJIN, T.; SALAHOVIC, K.; PAPUGA, D.

Contribución a la inmunización de cerdos contra la fiebre aftosa. I. Títulos de anticuerpos neutralizantes del virus en el suero de cerdas y lechones vacunados con la vacuna monovalente tipo C de Wellcome. *Texto en croata.* (Contribution on the immunization of pigs against foot-and-mouth disease. I. Virus neutralizing antibody titers in the serum of sows and piglets vaccinated with Wellcome monovalent type C vaccine). *Vet. Glasn.* 30 (8): 673-679, 1976. (*FMD Bull. Wellcome* 16 (6): 40, 1977. [Veterinarski Institut, Novi Sad, Yugoslavia]

RAKHMANIN, P.P.; ALEXIN, R.M.; ANTONYUK, V.P.; DARDA, P.N.; KRUGLIKOV, B.A.; RAUSHENBAK, G.V.

La dinámica del desarrollo de inmunidad en ovinos inoculados con dosis diferentes de vacuna preparada de virus aftoso lapinizado de subtipo A₂₂ y que contiene saponina. *Texto en ruso.* (Dynamics of the development of immunity in sheep given different doses of vaccine prepared from lapinized foot-and-mouth disease virus subtype A₂₂). *Veterinariya* (Moscow) 1: 49-51, 1977. (*FMD Bull. Wellcome* 16 (2): 10, 1977). [Glavnoe Upravlenie Veterinarii, Ministerstvo Sel'skogo Khozyaistva, Moscow, U.S.S.R]

RWEYEMAMU, M.M.; BOOTH, J.C.; PARRY, N.; PAY, T.W.F.

Estudios sobre neutralizaciones cinéticas con cepas del virus aftoso tipo SAT₂. II. Diferenciación antigenica de cepas de vacuna. *Texto en inglés.* (Neutralization kinetics studies with type SAT₂ foot-and-mouth disease virus strains. II. Antigenic differentiation of vaccine strains). *J. Hyg. (Camb.)* 78 (3): 429-438, 1977. (*FMD Bull. Wellcome* 16 (6): 38, 1977). [Wellcome Foot-and-Mouth Disease Vaccine Laboratory, Pirbright, Woking, Surrey, England]

SANGAR, D.V.; BLACK, D.N.; ROWLANDS, D.J.; BROWN, F.

Mapa bioquímico del genoma del virus aftoso. *Texto en inglés.* (Biochemical mapping of the foot-and-mouth disease virus genome). *J. gen. Virol.* 35 (2): 281-297, 1977. (*FMD Bull. Wellcome* 16 (5): 33, 1977). [Animal Virus Research Institute, Pirbright, Woking, Surrey, England]

SØRENSEN, K.J.

Examen electroforético comparativo del virus de la enfermedad vesicular del cerdo y del virus Coxsackie B₅. *Texto en inglés.* (A comparative electrophoretic examination of swine vesicular disease virus

and Coxsackie B₅ virus). *Arch. Virol.* 53 (3): 235-241, 1977. (*FMD Bull. Wellcome* 16 (4): 28, 1977). [State Veterinary Institute for Virus Research, Lindholm, Kalvehave, Denmark]

SUGIMURA, T.; EISSNER, G.

Determinación de tipos del virus aftoso mediante la técnica de anticuerpos fluorescentes. *Texto en inglés.* (Typing of foot-and-mouth disease virus by fluorescent antibody technique). *Nat. Inst. anim. Hlth Quart.* 16: 152-159, 1976. (*FMD Bull. Wellcome* 16 (4): 22, 1977). [Second Research Division, National Institute of Animal Health, Kodaira, Tokyo 187, Japan]

TEKERLEKOV, P.; MITEV, G.; ANTOV, A.; GERGOV, P.

Estudio sobre la inmunidad de cerdos vacunados con la vacuna antiaftosa tipo C. *Texto en búlgaro.* (Studies on the immunity of pigs vaccinated with type C foot-and-mouth disease vaccine). *Vet. Med. Nauk.* (Sofia) 13 (8): 56-61, 1976. (*FMD Bull. Wellcome* 16 (6): 41, 1977). [Tsentralen Vet. Inst., Sofia, Bulgaria]

TRAUTMAN, R.

Teoría de la acción en masa unificada para la neutralización de virus y radioinmunología. *Texto en inglés.* (Unified mass-action theory for virus neutralization and radioimmunology). *Scand. J. Immunol.* 5 (6-7): 609-622, 1976. (*FMD Bull. Wellcome* 16 (5): 33, 1977). [Plum Island Animal Disease Laboratory, Greenport, New York 11944, U.S.A.]

VASCONCELLOS, S.A.; CORTES, J.A.; ENRIQUEZ ROZAS, C.E.; ITO, F.H.; GUIMARÃES, L.N.B.

Observaciones sobre el uso de vacuna antiaftosa inactivada en vacas preñadas. *Texto en portugués.* (Observations on the use of inactivated foot-and-mouth disease vaccine in pregnant cows). *Rev. Fac. Med. vet. Zootec.* (Univ. S. Paulo) 13 (1): 209-211, 1976. (*FMD Bull. Wellcome* 16 (5): 32, 1977). [Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil]

. . .

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 Goic, Jefe de Asesoría de Campo
Dr. Horacio Mónaco, Jefe de Adiestramiento e Información
Srta. Patricia Chain, Oficial de Comunicaciones

PAN-AMERICAN FOOT-AND-MOUTH DISEASE CENTER BULLETIN**INVITATION TO CONTRIBUTORS**

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

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

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

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

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

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

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

EDITORIAL COMMITTEE

Dr. Paul Sutmöller, Chief of Laboratories
Dr. Roberto Goić, Chief of Field Services
Dr. Horacio Mónaco, Chief of Training and Information
Ms. Patricia Chain, Communications Officer