
BOLETIN

del centro panamericano de fiebre aftosa

Nº 31-32, julio-diciembre, 1978.

No. 31-32, July-December, 1978.

contenido

contents

	p.
Vacuna antiaftosa con adyuvante oleoso para cerdos.	
I. Vacuna de emulsión doble aplicada por diferentes vías	1
Foot-and-mouth disease oil adjuvanted vaccines for pigs.	
I. Double emulsion vaccine applied by different routes	7
<i>P. Augé de Mello; Ivo Gomes</i>	
Vacuna antiaftosa con adyuvante oleoso para cerdos.	
II. Vacunación intraperitoneal de cerdos jóvenes con emulsión doble	13
Foot-and-mouth disease oil adjuvanted vaccine for pigs.	
II. Intraperitoneal vaccination of young pigs with double emulsion vaccine	21
<i>P. Augé de Mello; Ivo Gomes; A. Alonso Fernández; J. C. Mascarenhas</i>	
Vacuna antiaftosa con adyuvante oleoso:	
Estudio cooperativo	29
Oil adjuvanted foot-and-mouth disease vaccine:	
a cooperative study	35
<i>Argentina (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria [INTA]) and the United States (Plum Island Animal Disease Center [PIADC])</i>	

p.

Comparación de vacunas con adyuvante oleoso preparadas con Arlachel A y Montanide 80	41
Comparison of oil adjuvanted vaccines prepared with Arlachel A and Montanide 80	43
<i>Ivo Gomes; P. Augé de Mello</i>	
Evaluación de estrategias alternativas para el control de la fiebre aftosa en Paraguay	45
Evaluation of alternative strategies for foot-and-mouth disease control in Paraguay	53
<i>Félix J. Rosenberg; Vicente Astudillo</i>	
Resúmenes — Abstracts	61
Bibliografías sobre enfermedades vesiculares Vesicular diseases bibliography	78

CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA
Caixa Postal 589 ZC-00 - 20 000 Rio de Janeiro, RJ, Brasil

VACUNA ANTIAFTOSA CON ADYUVANTE OLEOSO PARA CERDOS. I. VACUNA DE EMULSION DOBLE APLICADA POR DIFERENTES VIAS

P. Augé de Mello¹; Ivo Gomes¹

RESUMEN

La inmunidad contra la fiebre aftosa obtenida en cerdos jóvenes con vacuna oleosa de emulsión doble, utilizando antígenos sin concentración ni purificación, fue satisfactoria hasta 110 días post-vacunación (DPV), por cualquiera de las vías subcutánea, intramuscular o intraperitoneal, no mostrando diferencia significativa con la vacuna de emulsión primaria aplicada por vía subcutánea. Entretanto, la comprobación a los 110 DPV evidenció algunos problemas en la interpretación de los resultados, por cuanto se observó que animales con altos títulos de anticuerpos presentaron algunas lesiones vesiculares aunque sin afectar su estado general. La vacuna de emulsión doble aplicada por la vía intraperitoneal no produjo reacciones locales ni alteraciones macroscópicas de los ganglios regionales indicando ser más adecuada que la vacuna de emulsión primaria para su utilización en condiciones de campo.

INTRODUCCION

En numerosos trabajos (3, 5, 8, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 21), realizados con la aplicación en cerdos de vacunas antiaftosas de adyuvante oleoso en forma de emulsión primaria, se han obtenido resultados promisorios en cuanto a la protección conferida. Sin embargo, estas vacunas no resultaron del todo aceptables para su aplicación en el campo, debido a las reacciones que provocaban en los tejidos del punto de inoculación y en los respectivos ganglios linfáticos regionales (13, 18, 20).

Anderson *et al.* (1) y Mowat (17) confirmaron después, que con vacunas de adyuvante oleoso, en forma de emulsión doble (11), conteniendo anti-

geno purificado y concentrado, aplicadas en pequeños volúmenes de 0,1 a 0,5 ml por vía intradérmica (ID) en la cara dorsal de la oreja, las reacciones en los tejidos eran aceptables y se obtuvo un nivel de inmunidad satisfactorio. También Anderson *et al.* (1) sugieren que este tipo de formulación y de dosis producen reacciones de menor intensidad que la formulación de emulsión primaria, tanto en el punto de inoculación como en los ganglios linfáticos regionales y por lo tanto podría ser más aceptable para uso en la práctica.

En este trabajo se estudió la inmunidad obtenida en cerdos jóvenes con vacuna oleosa de emulsión doble utilizando antígenos de fiebre aftosa, sin concentración ni purificación. También se observaron las lesiones que produjo la vacuna inoculada por las vías subcutánea (SC), intramuscular (IM) o intraperitoneal (IP).

MATERIALES Y METODOS

Vacunas

La emulsión primaria fue preparada como está descrita anteriormente (2) usando aceite mineral² y 10% de monooleato de manitol³ emulsificado en partes iguales con la suspensión trivalente de antígeno inactivado por etileneimina binaria (4). La emulsión doble (11) consistió en la emulsión primaria, emulsificada mecánicamente⁴ en un volumen igual de solución salina fosfato, 0,04 M, pH 7,4 con 2% de polioxietileno 20 monooleato de sorbitan⁵. La tabla 1 muestra las características de los antígenos utilizados.

²Marcol 52, Exxon Corporation U.S.A.

³Arlacel A, ICI America Inc. Atlas Chemicals Division.

⁴Silverson, Machines (Sales) Ltd. London.

⁵Tween 80, ICI America Inc. Atlas Chemicals Division.

¹Centro Panamericano de Fiebre Aftosa, Caixa Postal 589, ZC-00, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

TABLA 1. Características de los antígenos de la fiebre aftosa utilizados^a

Antígenos	Títulos	
	DICC ₅₀ /ml	FC
O ₁ Campos	7,5	1/14
A ₂₄ Cruzeiro	7,5	1/14
C ₃ Resende	7,3	1/15

^a Botellas rolantes de 2 ℓ de células BHK 21 C 13.
DICC₅₀ = Dosis infecciosas cultivo de células 50%.
FC = Fijación del complemento.

Porcinos

Se utilizaron cerdos mestizos con predominancia de raza Landrace, de 2 meses de edad y recientemente destetados, con un peso aproximado de 20 kg. Tres grupos de 10 cerdos cada uno fueron inoculados con la vacuna de emulsión doble por vía SC en la base de la oreja, IM en la tabla del cuello e IP, respectivamente. Otro grupo de 10 cerdos fue inoculado por vía SC también en la base de la oreja con la vacuna de emulsión primaria. Para que todos los cerdos recibieran la misma cantidad de antígenos y fase oleosa la vacuna de emulsión primaria se inoculó en un volumen de 1,5 ml y la de emulsión doble en 3,0 ml.

Estudios de los anticuerpos

Se tomaron muestras de sangre de los cerdos antes de ser vacunados y a los 30, 60 y 90 días post-vacunación (DPV). Los sueros fueron evaluados por la prueba de microneutralización (MN) (7) frente a las cepas de virus de la fiebre aftosa usadas en la elaboración de las vacunas. Los sueros de 90 DPV también fueron evaluados por la prueba de seroprotección (SP) (6) frente a la cepa O₁ Campos.

Exposición al virus

La prueba de evaluación de la inmunidad fue realizada a los 110 DPV frente a la cepa O₁ Campos. Fueron inoculados por vía intraplantar 4 cerdos sin vacunar con 10^{4,6} dosis letales 50% para

ratones lactantes (DL₅₀) del virus O₁ Campos y colocados en una misma unidad de aislamiento junto a los grupos de animales vacunados y 4 cerdos también sin vacunar que sirvieron de control.

Después de iniciada la comprobación los cerdos fueron examinados diariamente para verificar las lesiones, hasta completar 12 días de observación.

Criterio de evaluación por puntaje

Las lesiones observadas se evaluaron de acuerdo con una clasificación de 1 a 5. Así, se determinó 1 punto para la presencia de una o más lesiones vesiculares en cada miembro, hocico y/o labio en un total máximo de 5 puntos por animal.

RESULTADOS

La tabla 2 resume los resultados obtenidos en las pruebas de MN a los 30, 60 y 90 DPV. Durante el experimento no se hallaron diferencias significativas entre los niveles de anticuerpos de los cerdos vacunados con vacuna de emulsión primaria o de emulsión doble. Tampoco se observó diferencia en la inducción de la respuesta con las diferentes vías de aplicación de esas vacunas.

La tabla 3 muestra las observaciones clínicas de los cerdos a los 110 DPV frente al virus de la fiebre aftosa O₁ Campos. La mayoría de los cerdos vacunados presentaron algún tipo de lesión vesicular, aun cuando hayan sido superficiales. Los animales no presentaron ningún decaimiento moviéndose bien sin nada que los pudiera perjudicar desde el punto de vista económico. La evaluación por puntaje en forma individual y la media por grupo, muestran una marcada diferencia con el grupo de control en que 2 cerdos inoculados y 2 contactos, murieron por infección de fiebre aftosa. Los sobrevivientes presentaron el máximo puntaje.

En la mayoría de los casos no hubo concordancia entre los niveles de anticuerpos y las lesiones observadas. Varios animales, 18 de los 38 comprobados, aun cuando tuvieron un índice de seroprotección (ISP) $\geq 2,5$ tuvieron algún tipo de lesión vesicular. Solamente 3 de 35 fueron negativos con ISP $\geq 4,0$. En las pruebas de MN 27 de 38 cerdos presentaron lesiones con títulos neutralizantes

≥ 2,0 y los 3 animales negativos tenían títulos ≥ 2,4. Por otro lado, con esos mismos títulos, 8 generalizaron.

En los exámenes post-mortem realizados entre los 30 y los 40 días después de la descarga, se observó que los cerdos inoculados con la emulsión primaria presentaban reacciones tisulares inaceptables en el punto de inoculación y depósitos de la emulsión oleosa en los ganglios linfáticos regiona-

les. La vacuna en forma de doble emulsión inoculada por vía SC o IM produjo lesiones locales aceptables en el punto de inoculación. Macroscópicamente no se observaron depósitos de emulsión oleosa en los ganglios linfáticos regionales. Llamó la atención que con la vacuna de doble emulsión, inoculada por vía IP, no se observó compromiso tisular ni depósito macroscópico de la emulsión oleosa en los ganglios linfáticos mesentéricos.

TABLA 2. Promedio de los títulos de neutralización de los sueros obtenidos de cerdos vacunados con vacuna de adyuvante oleoso

Vía de inoculación	Tipo de emulsión	Tipo de virus	Días postvacunación			
			0	30	60	90
SC	Primaria	O ₁	<1,0	2,19 ± 0,18	2,06 ± 0,32	2,15 ± 0,28
		A ₂₄	<1,0	2,52 ± 0,26	2,15 ± 0,31	1,95 ± 0,35
		C ₃	<1,0	2,18 ± 0,32	1,97 ± 0,32	2,21 ± 0,40
	Doble	O ₁	<1,0	2,44 ± 0,32	2,14 ± 0,35	2,10 ± 0,35
		A ₂₄	<1,0	2,39 ± 0,40	1,97 ± 0,38	1,94 ± 0,40
		C ₃	<1,0	2,19 ± 0,29	1,97 ± 0,41	2,15 ± 0,27
IM	Doble	O ₁	<1,0	2,42 ± 0,35 ^a	2,04 ± 0,52	2,35 ± 0,38
		A ₂₄	<1,0	2,61 ± 0,33	2,46 ± 0,57	2,13 ± 0,50
		C ₃	<1,0	2,34 ± 0,28	2,08 ± 0,52	2,47 ± 0,40
IP	Doble	O ₁	<1,0	2,54 ± 0,36	2,03 ± 0,19	2,16 ± 0,38 ^a
		A ₂₄	<1,0	2,78 ± 0,29	2,46 ± 0,25	2,25 ± 0,38
		C ₃	<1,0	2,53 ± 0,43	2,34 ± 0,30	2,38 ± 0,42

^a Promedio de 9 cerdos 1 muerto.

SC = Subcutánea. IM = Intramuscular. IP = Intraperitoneal.

TABLA 3. Reacciones clínicas individuales de los cerdos a los 110 días postvacunación con exposición por contacto con virus de subtipo O₁ cepa Campos de la fiebre aftosa

Vía de inoculación	Tipo de emulsión	Evaluación de anticuerpos			Lesiones	Promedio "Score"
		Animal N°	MN	ISP		
SC	Primaria	1	2,4	4,4	1P	2,3
		2	2,1	1,3	4P	
		3	1,8	0,3	4P	
		4	2,1	4,0	2P, L	
		5	1,7	1,2	2P, H	
		6	2,3	4,1	1P	
		7	2,0	2,3	4P	
		8	2,6	> 4,6	Neg.	
		9	2,3	3,7	2P	
		10	2,4	2,0	2P	
	Doble	11	1,5	0,3	4P, H	3,1
		12	2,3	2,2	3P	
		13	2,0	0,5	4P, H	
		14	2,3	> 4,0	2P	
		15	2,3	1,5	1P, H	
		16	2,1	0,4	3P	
		17	2,4	4,0	Neg.	
		18	2,7	3,0	4P	
		19	1,8	1,0	2P	
		20	1,8	0,5	4P, H, L	
IM	Doble	21	2,4	3,9	1P	2,0
		22	2,1	1,4	2P	
		23	2,0	> 3,6	2P	
		24	2,9	> 4,6	1P	
		25	2,4	5,0	2P	
		26	2,9	> 3,6	4P	
		27	2,0	1,9	4P	
		28	2,0	0,5	2P	
		29	2,7	> 4,0	Neg.	
IP	Doble	30	1,8	1,4	4P	2,1
		31	2,6	4,0	3P	
		32	2,3	> 3,6	3P	
		33	1,8	0,9	4P	
		34	2,3	2,0	2P	
		35	2,3	1,6	1P	
		36	...	> 4,6	1P	
		37	2,7	> 4,6	2P	
38	1,7	0,6	1P			
Control		<1,0	...	4P, H, L ^a	5	

^a Todos los animales tenían lesiones generalizadas y 4 murieron después de la infección.

MN = Microneutralización. ISP = Índice de seroprotección.

P = Pata. H = Hocico. L = Labio.

... = No fue hecho.

DISCUSION

El tiempo de duración del experimento se limitó a 110 DPV por considerarse que es el tiempo aproximado de vida útil de un cerdo a partir del destete, que es cuando recibiría la aplicación de la vacuna, hasta su envío al matadero, con excepción de los reproductores y de los vientres. Por lo tanto, el experimento trató de aproximarse al máximo a las condiciones de cría de la especie porcina.

Aun cuando desde el punto de vista de la protección los resultados obtenidos no fueron satisfactorios, ya que la mayoría de cerdos vacunados presentaron alguna lesión vesicular después de la comprobación por contacto a los 110 DPV, su valor práctico ha sido evidente, por cuanto la presencia de lesiones no afectó el estado general de los animales que continuaron alimentándose normalmente sin ningún decaimiento. Por otro lado, los controles se infectaron severamente, 2 contactos y 2 inoculados murieron, mientras que los sobrevivientes sufrieron una acentuada pérdida de peso, tornándose caquéticos sin posibilidad de recuperación.

El experimento puso en evidencia algunos problemas que deben ser tenidos en cuenta en el futuro, en pruebas con vacunas antiaftosas en cerdos. Se observó que animales con altos títulos de anticuerpos, evaluados por las pruebas de SP y de MN, presentaron algunas lesiones vesiculares confirmando datos obtenidos por otros autores (19). Gomes (9) describió también la presencia de lesiones en cerdos convalecientes con altos niveles de anticuerpos, cuando son sometidos a reexposición con virus homólogo. Estas observaciones indicarían que tales lesiones probablemente son producidas por replicación local de virus.

En este experimento, llamó la atención que se hayan observado dos veces más lesiones en las patas posteriores que en las anteriores. Este hecho sugiere que, probablemente, en el examen diario de los animales se producen microtraumas que permiten la inoculación y replicación del virus del medio ambiente, lo que confirmaría las observaciones de Gomes (9). Creemos que muchas de las lesiones observadas fueron causadas, en verdad, por el exceso de examen de los porcinos realizado diariamente. Se debe destacar sin embargo que las

lesiones computadas en los primeros días de observación eran fácilmente visibles en el 12º día, descartándose la posibilidad de que hubiese pasado inadvertida cualquier lesión existente en los primeros días, si se hubiera realizado solamente la lectura final.

Analizando los niveles de anticuerpos se observa que la vía IP proporcionó respuestas de anticuerpos similares a los obtenidos por las vías SC e IM, pero sin reacciones locales ni alteración macroscópica de los ganglios linfáticos lo que confirma observaciones preliminares (P. Augé de Mello, datos no publicados) que indicaron que esa formulación no produce reacción local, ni alteración macroscópica de los ganglios linfáticos regionales, al paso que la emulsión primaria por la misma vía produce minúsculos depósitos fácilmente visibles en los ganglios mesentéricos y en el abdomen. Por lo tanto, la vacuna antiaftosa para cerdos en forma de emulsión doble, aplicada por vía IP parece ser más promisoras que la vacuna de emulsión primaria. Este hecho nos lleva a programar nuevas experiencias usando solamente la vacuna en forma de emulsión doble, inoculada por vía IP.

REFERENCIAS

1. ANDERSON, E.C.; MASTERS, R.C.; MOWAT, G.N. Immune response of pigs to inactivated foot-and-mouth disease vaccines. Response to emulsion vaccines. *Res. vet. Sci.* 12: 242-350, 1971.
2. 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.
3. BACHRACH, H.L.; McKERCHER, P.D. Immunology of foot-and-mouth disease in swine: Experimental inactivated virus vaccine. *J. Am. vet. Med. Ass.* 160 (4): 521-526, 1972.
4. BAHNEMANN, H.G.; AUGÉ DE MELLO, P.; ABARACON, D.; GOMES I. Immunogenicity in cattle of foot-and-mouth disease vaccines inactivated with binary ethylenimine. *Bull. Off. int. Epiz.*

- 87 (11-12): 1335-1343, 1974.
5. CAPORALE, G.; ROSSI, G.A.; PELLICIONI, A. Vaccination of swine against foot-and-mouth disease (FMD) with hydroxylamine and acetyleneimine inactivated virus. *Vet. ital.* 20: 137-147, 1969.
 6. CUNHA, R.G.; BAPTISTA Jr., J.A.; SERRÃO, U.M.; TORTURELLA, I. El uso de los ratones lactantes en la evaluación de los anticuerpos contra el virus de la fiebre aftosa y su significación inmunológica. *Gac. vet., B. Aires* 19 (110): 243-267, 1957.
 7. FERREIRA, Maria Elma V. Prueba de microneutralización para estudios de anticuerpos de la fiebre aftosa. (Microtiter neutralization test for the study of foot-and-mouth disease antibodies). *Bltm Centro Panamericano Fiebre Aftosa* 21-22: 17-20, 21-24, 1976.
 8. GRAVES, J.H.; McKERCHER, P.D.; FARRIS, H. E.; COWAN, K.M. Early response of cattle and swine to inactivated foot-and-mouth disease virus. *Res. vet. Sci.* 9: 35-40, 1968.
 9. GOMES, I. Fiebre aftosa: reacción de cerdos convalecientes a la exposición de virus homólogo. (Foot-and-mouth disease: reaction of convalescent pigs to homologous virus exposure). *Bltm Centro Panamericano Fiebre Aftosa* 26: 15-18, 19-22, 1977.
 10. GIRAUD, M.; GUILLOTEAU, B.; PERROT, A.; DEBROCK, C.; PRUNET, P. Recherches sur l'activité d'un nouveau vaccin anti-aphteux chez le porc. *Bull. Off. int. Epiz.* 71 (3-4): 285-306, 1969.
 11. HERBERT, W.T. Multiple emulsions - A new form of mineral-oil antigen adjuvant. *Lancet* 16: 771, 1965.
 12. McKERCHER, P.D.; GIORDANO, A.R. Foot-and-mouth disease in swine. I. The immune response of swine to chemically-treated and non-treated foot-and-mouth disease virus. *Arch. ges. Virusforsch.* 20: 39-53, 1967.
 13. McKERCHER, P.D.; GAILIUNAS, P. Response of swine to inactivated foot-and-mouth disease vaccine. Duration of immunity and local tissue reaction. *Arch. ges. Virusforsch.* 28 (2): 165-176, 1969.
 14. McKERCHER, P.D.; FARRIS, Jr. H.E. Foot-and-Mouth Disease in Swine: Response to inactivated vaccines. *Arch. ges. Virusforsch.* 22 (3-4): 451-461, 1967.
 15. McKERCHER, P.D. Response to swine to oil adjuvant vaccine. *International Symposium on Foot-and-Mouth Disease* 8: 151-160, 1967.
 16. MORGAN, D.O.; McKERCHER, P.D.; BACH-RACH, H.L. Quantitation of the antigenicity and immunogenicity of purified foot-and-mouth disease virus vaccine for swine and steers. *Appl. Microbiol.* 20 (5): 770-774, 1970.
 17. MOWAT, G.N. Quantities of purified antigen required to immunize swine against foot-and-mouth disease. *Bull. Off. int. Epiz.* 77 (5-6): 887-897, 1972.
 18. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE AND PAN-AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. Vacunas contra la fiebre aftosa. II. Estudios sobre la duración de la inmunidad en bovinos y porcinos. (Foot-and-mouth disease vaccines. II. Studies on duration of immunity in cattle and pigs). *Bltm Centro Panamericano Fiebre Aftosa* 19-20: 17-23, 24-30, 1975.
 19. WITTMANN, G.; BAUER, K.; MUSSGAY, M. Experiments on vaccination of pigs with ethyl-ethyleneimine (EEI) diethylaminoethyl dextran (DEAE-D) foot-and-mouth disease vaccines. Influence of route of inoculation and dose of antigen on the duration of immunity. *Arch. ges. Virusforsch.* 36: 251-264, 1972.
 20. WITTMANN, G.; BAUER, K. Local reactions after infecting pigs with foot-and-mouth disease vaccine containing Freund's adjuvant. *Berl. Münch tierärztl. Wschr.* 82 (1): 2-4, 1969.
 21. WITTMANN, G.; BAUER, K.; MUSSGAY, M. Essais de vaccination de porcs avec des vaccins à base de virus aphteux inactivé. I. Essais avec du virus O inactivé par l'hydroxylamine, le formol, la chaleur et le pH. *Bull. Off. int. Epiz.* 71 (3-4): 351-379, 1969.

FOOT-AND-MOUTH DISEASE OIL ADJUVANTED VACCINES FOR PIGS. I. DOUBLE EMULSION VACCINE APPLIED BY DIFFERENT ROUTES

P. Augé de Mello¹; Ivo Gomes¹

SUMMARY

Satisfactory immune response was obtained up to 110 days post-vaccination (DPV) with subcutaneous, intramuscular and intraperitoneal inoculation of oil adjuvanted double emulsion vaccine containing unconcentrated and unpurified antigens. No significant differences in response were observed between the different routes of application when compared to primary emulsion vaccine applied subcutaneously. However, challenge at 110 DPV showed some problems in interpretation of results. Several pigs developed vesicular lesions despite high antibody titers. These lesions did not affect the general health of the animals. The double emulsion vaccine, IP application, produced no local reactions nor macroscopic alteration of the regional lymph nodes. For field use intraperitoneal vaccination with double emulsion appears preferable to primary emulsion.

INTRODUCTION

Several papers (3, 5, 8, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 21) reported good levels of protection obtained from primary emulsion oil vaccines in pigs. However, these vaccines were not always acceptable in the field because of tissue reactions at the point of inoculation and the regional lymph nodes (13, 18, 20).

Anderson *et al.* (1) and Mowat (17) confirmed that oil adjuvanted vaccine provided acceptable local tissue reactions and satisfactory immunity when prepared in double emulsion (11) with purified, concentrated antigens and applied in small volumes of 0.1 to 0.5 ml intradermally in the dorsal site of the ear. Anderson *et al.* (1) suggested

that this double emulsion formulation administered in small doses produces less reaction than the primary emulsion, both at the point of the inoculation and in the regional lymph nodes. It should therefore be more acceptable for use in the field.

In the present study young pigs were inoculated with double emulsion oil adjuvanted vaccine using foot-and-mouth disease (FMD) antigens without concentration or purification. Observations were made of the lesions produced by this type of vaccine when applied by subcutaneous (SC), intramuscular (IM) and intraperitoneal (IP) routes.

MATERIALS AND METHODS

Vaccines

Primary oil emulsion vaccines were prepared as described (2) using mineral oil² and 10% of monooleate of manitol³ emulsified with equal parts of a trivalent antigen suspension inactivated by binary ethylenimine (4). The double emulsion (11) was made from the primary emulsion by mechanical emulsification⁴ of the primary emulsion with an equal volume of phosphate buffer saline for 0.04 M, pH 7.4 with 2% of polyoxyethylene 20 monooleate of sorbitan⁵. Table 1 lists the characteristics of the antigens.

Pigs

Recently weaned, 2-month old Landrace pigs of approximately 20 kg were used. Three groups of 10 pigs each were inoculated with the double emulsion vaccine: one group subcutaneously at

¹Pan-American Foot-and-Mouth Disease Center, Caixa Postal 589, ZC-00, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

²Marcol 52, Exxon Corporation U.S.A.

³Arlacel A, ICI America Inc. Atlas Chemicals Division.

⁴Silverson, Machines (Sales) Ltd. London.

⁵Tween 80, ICI America Inc. Atlas Chemicals Division.

the base of the ear; the second group intramuscularly in the side of the neck; and the third group intraperitoneally. A fourth group of 10 pigs was inoculated subcutaneously at the base of the ear with a primary emulsion vaccine. To ensure that all pigs received the same quantity of antigen and oil phase, 1.5 ml of the primary emulsion vaccine was inoculated and 3.0 ml of the double emulsion vaccine.

TABLE 1. *Characteristics of foot-and-mouth disease antigens*^a

Antigens	Titers	
	CCID ₅₀ /ml	FC
O ₁ Campos	7.5	1/14
A ₂₄ Cruzeiro	7.5	1/14
C ₃ Resende	7.3	1/15

^a2 ℓ Roller bottles of BHK 21 C 13 cells.

CCID₅₀ = 50% infective cell culture doses.

CF = Complement fixation.

Antibody studies

Blood samples were collected from the pigs before vaccination and at 30, 60 and 90 DPV. The serum was tested by the microneutralization test (7) against the strains of FMD virus used in vaccine preparation. The 90 DPV sera were also tested by the mouse protection test (6) against O₁ Campos, the challenge strain.

Virus challenge

The animals were challenged at 110 DPV against strain O₁ Campos. Four unvaccinated pigs received intraplantar inoculation with 10^{4.6} mouse LD₅₀% of the O₁ Campos virus. These 4 pigs were placed in the same isolation unit with the vaccinated animals, along with 4 unvaccinated controls pigs.

The pigs were then examined daily for lesions until the 12th day, when the last observation was made.

Scoring criterion

Observed lesions were classified according to their location. One point was given for each affected leg plus one for snout or lip, giving a total of 5 possible points per animal.

RESULTS

The results of the microneutralization tests at 30, 60 and 90 DPV are summarized in Table 2. No significant differences appeared in the antibody levels of pigs vaccinated with primary or double emulsion vaccines. Also, no differences were observed in the immune response when the 3 vaccination application routes were compared.

Table 3 shows the results of clinical observations of the pigs at 110 DPV against FMD virus O₁ Campos. Most of the vaccinated pigs presented some type of vesicular lesion, even if only superficial. The animals did not appear to suffer and moved about easily. Thus there was no economic loss due to the disease. Evaluation by individual scores and group averages showed marked differences with the control group since two pigs in the inoculated groups and two in the contact groups died of FMD infection. The survivors in the control groups all had maximum scores.

In most cases no correlation existed between antibody levels and observed lesions. Eighteen of the 38 animals challenged showed some type of vesicular lesion, despite mouse protection indices (MPI) ≥ 2.5 . Only 3 of 35 were negative with MPI ≥ 4.0 . In the microtiter test 27 of the 38 pigs showed lesions and had neutralization titers ≥ 2.0 , while the negative animals had titers ≥ 2.4 . However, 8 animals with the same titers generalized.

The post-mortem examination carried out 30-40 days after challenge showed that pigs inoculated with primary emulsion oil vaccine had unacceptable tissue reaction at the point of inoculation.

There were also oil emulsion deposits in the regional lymph nodes. The double emulsion vaccine inoculated subcutaneously or intramuscularly produced acceptable local lesions at the point of inoculation. No macroscopic deposits of oil

emulsion were observed in the regional lymph nodes. It is noteworthy that the double emulsion vaccine inoculated intraperitoneally produced no tissue reaction nor macroscopic deposits in the mesenteric lymph nodes.

TABLE 2. Mean of microneutralization titers of sera obtained from pigs vaccinated with oil adjuvanted vaccine

Inoculation route	Emulsion type	Virus type	Days post-vaccination			
			0	30	60	90
SC	Primary	O ₁	<1.0	2.19 ± 0.18	2.06 ± 0.32	2.15 ± 0.28
		A ₂₄	<1.0	2.52 ± 0.26	2.15 ± 0.31	1.95 ± 0.35
		C ₃	<1.0	2.18 ± 0.32	1.97 ± 0.32	2.21 ± 0.40
	Double	O ₁	<1.0	2.44 ± 0.32	2.14 ± 0.35	2.10 ± 0.35
		A ₂₄	<1.0	2.39 ± 0.40	1.97 ± 0.38	1.94 ± 0.40
		C ₃	<1.0	2.19 ± 0.29	1.97 ± 0.41	2.15 ± 0.27
IM	Double	O ₁	<1.0	2.42 ± 0.35 ^a	2.04 ± 0.52	2.35 ± 0.38
		A ₂₄	<1.0	2.61 ± 0.33	2.46 ± 0.57	2.13 ± 0.50
		C ₃	<1.0	2.34 ± 0.28	2.08 ± 0.52	2.47 ± 0.40
IP	Double	O ₁	<1.0	2.54 ± 0.36	2.03 ± 0.19	2.16 ± 0.38 ^a
		A ₂₄	<1.0	2.78 ± 0.29	2.46 ± 0.25	2.25 ± 0.38
		C ₃	<1.0	2.53 ± 0.43	2.34 ± 0.30	2.38 ± 0.42

^a Mean of 9 pigs (1 died).

SC = Subcutaneous. IM = Intramuscular. IP = Intraperitoneal.

TABLE 3. Individual clinical reactions of pigs at 110 days post-vaccination with exposure by contact FMDV strain O₁ Campos

Inoculation route	Emulsion Type	Antibody evaluation			Lesions	Score mean
		Animal No.	MN	MPI		
SC	Primary	1	2.4	4.4	1P	2.3
		2	2.1	1.3	4P	
		3	1.8	0.3	4P	
		4	2.1	4.0	2P, L	
		5	1.7	1.2	2P, S	
		6	2.3	4.1	1P	
		7	2.0	2.3	4P	
		8	2.6	> 4.6	Neg.	
		9	2.3	3.7	2P	
		10	2.4	2.0	2P	
	Double	11	1.5	0.3	4P, S	3.1
		12	2.3	2.2	3P	
		13	2.0	0.5	4P, S	
		14	2.3	> 4.0	2P	
		15	2.3	1.5	1P, S	
		16	2.1	0.4	3P	
		17	2.4	4.0	Neg.	
		18	2.7	3.0	4P	
		19	1.8	1.0	2P	
		20	1.8	0.5	4P, S, L	
IM	Double	21	2.4	3.9	1P	2.0
		22	2.1	1.4	2P	
		23	2.0	> 3.6	2P	
		24	2.9	> 4.6	1P	
		25	2.4	5.0	2P	
		26	2.9	> 3.6	4P	
		27	2.0	1.9	4P	
		28	2.0	0.5	2P	
		29	2.7	> 4.0	Neg.	
IP	Double	30	1.8	1.4	4P	2.1
		31	2.6	4.0	3P	
		32	2.3	> 3.6	3P	
		33	1.8	0.9	4P	
		34	2.3	2.0	2P	
		35	2.3	1.6	1P	
		36	...	> 4.6	1P	
		37	2.7	> 4.6	2P	
38	1.7	0.6	1P			
Control		<1.0	...	4P, S, L ^a	5	

^a All animals had generalized lesions and 4 died after infection.

MN = Microneutralization. MPI = Mouse protection indices.

P = Pad. S = Snout. L = Lip.

... = not done.

DISCUSSION

The experiment was limited to 110 DPV since this period was considered essential to the pig's protection, in the productive period between weaning and slaughter, not counting breeder stocks. The experiment was thus designed to approximate as closely as possible commercial pig breeding conditions.

Protection results were not entirely satisfactory since the majority of vaccinated pigs presented some vesicular lesion after challenge by contact at 110 DPV; however, the practical value of the vaccination was evident. The lesions did not affect the overall health of the animals, and they continued to feed normally. The control animals however were severely infected: 2 of the contacts and 2 of the inoculated animals died, while the survivors suffered a precipitate weight loss, became cachectic and did not recover.

The experiment pointed to some problems which must be considered in future vaccine experiments using pigs. As noted by other authors (19), pigs with high antibody titers had some vesicular lesions. Gomes (9) also observed that pigs with high antibody levels could develop lesions when reexposed to homologous virus, thus indicating that the lesions are probably produced by local virus replication.

In this experiment the hind feet were twice as often affected as the front feet. Gomes (9) suggested that excessive examination of the animals produces microtraumas, small skin abrasions, which permit introduction of virus from the environment. We believe that many of the lesions observed were actually caused by the daily examination of the pigs. It should also be noted that lesions observed in the first few days were still easily visible at the 12th day. Thus any lesion appearing within the first few days would not be overlooked if only one reading was made at 10 or 12 days.

Analysis of antibody levels showed that the IP route gave an immune response similar to those obtained by the SC and IM routes, although the IP route produces neither local reactions nor macroscopic changes in the lymph nodes. This result confirmed the preliminary observation made by

Augé de Mello (unpublished data) which indicated that this formulation does not produce a local reaction nor a macroscopic alteration of the regional lymph nodes. It should be mentioned that primary emulsion vaccine applied by the IP route produces small, easily visible deposits in the mesenteric lymph nodes as well as in the abdomen. Therefore for pigs FMD vaccine in the form of double emulsion and use of IP seem to be more promising than primary emulsion. These results indicate the need for further experiments using only double emulsion vaccine inoculated by the IP route.

REFERENCES

1. ANDERSON, E.C.; MASTERS, R.C.; MOWAT, G.N. Immune response of pigs to inactivated foot-and-mouth disease vaccines. Response to emulsion vaccines. *Res. vet. Sci.* 12: 242-350, 1971.
2. AUGÉ DE MELLO, P.; ASTUDILLO, V.; GOMES, I.; CAMPOS GARCIA, J.T. Aplicación en el campo de vacuna anti-aftosa 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.
3. BACHRACH, H.L.; McKERCHER, P.D. Immunology of foot-and-mouth disease in swine: Experimental inactivated virus vaccine. *J. Am. vet. Med. Ass.* 160 (4): 521-526, 1972.
4. BAHNEMANN, H.G.; AUGÉ DE MELLO, P.; ABARACON, D.; GOMES I. Immunogenicity in cattle of foot-and-mouth disease vaccines inactivated with binary ethylenimine. *Bull. Off. int. Epiz.* 81 (11-12): 1335-1343, 1974.
5. CAPORALE, G.; ROSSI, G.A.; PELLICIONI, A. Vaccination of swine against foot-and-mouth disease (FMD) with hydroxylamine and acetyleneimine inactivated virus. *Vet. ital.* 20: 137-147, 1969.
6. CUNHA, R.G.; BAPTISTA Jr., J.A.; SERRÃO, U.M.; TORTURELLA, I. El uso de los ratones lactantes en la evaluación de los anticuerpos contra el virus de la fiebre aftosa y su significación inmunológica. *Gac. vet.*, B. Aires 19 (110): 243-267, 1957.
7. FERREIRA, Maria Elma V. Prueba de microneutralización para estudios de anticuerpos de la fiebre aftosa. (Microtiter neutralization test for the study

- of foot-and-mouth disease antibodies). *Bln Centro Panamericano Fiebre Aftosa 21-22*: 17-20, 21-24, 1976.
8. GRAVES, J.H.; McKERCHER, P.D.; FARRIS, H. E.; COWAN, K.M. Early response of cattle and swine to inactivated foot-and-mouth disease virus. *Res. vet. Sci. 9*: 35-40, 1968.
 9. GOMES, I. Fiebre aftosa: reacción de cerdos convalecientes a la exposición de virus homólogo. (Foot-and-mouth disease: reaction of convalescent pigs to homologous virus exposure). *Bln Centro Panamericano Fiebre Aftosa 26*: 15-18, 19-22, 1977.
 10. GIRAUD, M.; GUILLOTEAU, B.; PERROT, A.; DEBROCK, C.; PRUNET, P. Recherches sur l'activité d'un nouveau vaccin anti-aphteux chez le porc. *Bull. Off. int. Epiz. 71* (3-4): 285-306, 1969.
 11. HERBERT, W.T. Multiple emulsions - A new form of mineral-oil antigen adjuvant. *Lancet 16*: 771, 1965.
 12. McKERCHER, P.D.; GIORDANO, A.R. Foot-and-mouth disease in swine. I. The immune response of swine to chemically-treated and non-treated foot-and-mouth disease virus. *Arch. ges. Virusforsch. 20*: 39-53, 1967.
 13. McKERCHER, P.D.; GAILIUNAS, P. Response of swine to inactivated foot-and-mouth disease vaccine. Duration of immunity and local tissue reaction. *Arch. ges. Virusforsch. 28* (2): 165-176, 1969.
 14. McKERCHER, P.D.; FARRIS, Jr. H.E. Foot-and-Mouth Disease in Swine: Response to inactivated vaccines. *Arch. ges. Virusforsch. 22* (3-4): 451-461, 1967.
 15. McKERCHER, P.D. Response to swine to oil adjuvant vaccine. *International Symposium on Foot-and-Mouth Disease 8*: 151-160, 1967.
 16. MORGAN, D.O.; McKERCHER, P.D.; BACH-RACH, H.L. Quantitation of the antigenicity and immunogenicity of purified foot-and-mouth disease virus vaccine for swine and steers. *Appl. Microbiol. 20* (5): 770-774, 1970.
 17. MOWAT, G.N. Quantities of purified antigen required to immunize swine against foot-and-mouth disease. *Bull. Off. int. Epiz. 77* (5-6): 887-897, 1972.
 18. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE AND PAN-AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. Vacunas contra la fiebre aftosa. II. Estudios sobre la duración de la inmunidad en bovinos y porcinos. (Foot-and-mouth disease vaccines. II. Studies on duration of immunity in cattle and pigs). *Bln Centro Panamericano Fiebre Aftosa 19-20*: 17-23, 24-30, 1975.
 19. WITTMANN, G.; BAUER, K.; MUSSGAY, M. Experiments on vaccination of pigs with ethyl-ethyleneimine (EEI) diethylaminoethyl dextran (DEAE-D) foot-and-mouth disease vaccines. Influence of route of inoculation and dose of antigen on the duration of immunity. *Arch. ges. Virusforsch. 36*: 251-264, 1972.
 20. WITTMANN, G.; BAUER, K. Local reactions after infecting pigs with foot-and-mouth disease vaccine containing Freund's adjuvant. *Berl. Münch tierärztl. Wschr. 82* (1): 2-4, 1969.
 21. WITTMANN, G.; BAUER, K.; MUSSGAY, M. Essais de vaccination de porcs avec des vaccins à base de virus aphteux inactivé. I. Essais avec du virus O inactivé par l'hydroxylamine, le formol, la chaleur et le pH. *Bull. Off. int. Epiz. 71* (3-4): 351-379, 1969.

VACUNA ANTIAFTOSA CON ADYUVANTE OLEOSO PARA CERDOS. II. VACUNACION INTRAPERITONEAL DE CERDOS JOVENES CON EMULSION DOBLE¹

P. Augé de Mello²; Ivo Gomes²; A. Alonso Fernández²; J.C. Mascarenhas³

RESUMEN

Se comparó la inmunogenicidad inducida en cerdos a los 30 y 110 días postvacunación (DPV) por una vacuna antiaftosa trivalente de emulsión doble con la de dos vacunas similares que contenían antígeno concentrado por precipitación con polietilenglicol (PEG). Los títulos de fijación de complemento (FC) de los antígenos eran de una (1X) y 10 veces (10X) la concentración en relación al título original. Las vacunas se utilizaron para vacunar cerdos recién destetados a la dosis de 3 ml, por vía intraperitoneal. La vacuna FC 10X además fue usada en dosis de 0,3 ml.

Todas las vacunas indujeron elevados niveles de anticuerpos para las tres cepas de virus de la fiebre aftosa y excelente protección frente al subtipo O₁ cepa Campos, particularmente con la vacuna FC 10X usada a la dosis de 3 ml. No se observaron efectos colaterales indeseables.

En este experimento se observó una buena correlación entre los niveles de anticuerpos a los 30 DPV y la protección a la descarga, tanto en la prueba de seroprotección en ratones como en la prueba de microneutralización. Sin embargo, a los 110 DPV la correlación no fue satisfactoria, una vez que había porcinos protegidos frente a exposición del virus pero que presentaban bajos niveles de anticuerpos circulantes.

No se observaron diferencias entre las descargas de comprobación por inoculación intraplantar y la exposición por contacto a los 30 días.

INTRODUCCION

En un trabajo anterior (2) se informó que una vacuna antiaftosa de adyuvante oleoso y emulsión doble (7), aplicada en cerdos jóvenes por vía intraperitoneal no producía lesiones locales en los tejidos ni cambios macroscópicos en los ganglios linfáticos regionales. Por tanto, este tipo de formulación y vía de aplicación parecieron más adecuados para uso en el campo que la vacuna de emulsión primaria (12). Además, la inmunogenicidad de estas vacunas usadas por vía intraperitoneal fue satisfactoria y los resultados no demostraron diferencias significativas con los de la aplicación subcutánea o intramuscular.

En el presente trabajo se presentan los resultados obtenidos al aplicar en cerdos jóvenes, por vía intraperitoneal, vacunas antiaftosas trivalentes con adyuvante oleoso en forma de emulsión doble, con diferentes cantidades de antígenos y adyuvantes. También se comparan la exposición al virus de la fiebre aftosa (FA), por inoculación intraplantar y la exposición por contacto a los 30 días postvacunación (DPV). Finalmente, se discute la correlación entre los niveles de anticuerpos circulantes y la protección frente a la descarga del virus de la FA.

MATERIALES Y METODOS

Vacunas

Los antígenos utilizados en la preparación de las vacunas fueron producidos con los virus de la FA subtipos: O₁ cepa Campos, A₂₄ cepa Cruzeiro y C₃ cepa Resende. Las suspensiones de virus fueron inactivadas con etileneimina binaria (3). De cada suspensión monovalente inactivada de antígeno, una porción fue precipitada con 10% (p/v) de polietilenglicol (PEG) 6.000 y centrifugada a 800 g durante 60 min. El sedimento

¹Este trabajo fue realizado con aportes financieros de FRIGOBRA - Cia. Brasileira de Frigoríficos y del Instituto Vallée S.A.

²Centro Panamericano de Fiebre Aftosa, Caixa Postal 589, ZC-00, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

³Secretaria de Agricultura do Estado do Paraná, Rua dos Funcionários, 1559, Curitiba, PR, Brasil.

fue resuspendido en medio Eagle (pH 7,4), hasta que los títulos de fijación del complemento (FC) (4) fueron respectivamente una (1X) ó 10 veces (10X) mayores que el título de la suspensión original del antígeno. La Tabla 1 muestra las características de cada antígeno.

TABLA 1. Características de los antígenos de la FA^a

Antígenos	Títulos		Conc. 10X ^b
	DICC ₅₀	FC	
O ₁ Campos	7,0	1/12	1/130
A ₂₄ Cruzeiroiro	7,0	1/26	1/250
C ₃ Resende	7,3	1/16	1/140

^a Producido en células BHK 21 C 13 en botellas rolantes.

^b Concentración por PEG 6.000.

DICC₅₀ = Dosis infectantes de cultivos celulares.

FC = Fijación del complemento.

Con partes iguales de las suspensiones monovalentes se prepararon las tres suspensiones trivalentes, que estaban formadas, respectivamente, por: 1) referencia - antígenos sin tratamiento con PEG; 2) FC 1X - antígenos tratados con PEG con título de FC igual al de los antígenos originales; y 3) FC 10X - antígenos tratados con PEG con título de FC 10X mayor que el de los antígenos originales.

Con cada suspensión trivalente se preparó una vacuna con adyuvante oleoso de doble emulsión, por el procedimiento descrito anteriormente (2).

Prueba de potencia

Se inocularon grupos de cobayos con 0,5 ml de diluciones 1:3 de la vacuna de referencia (antígenos N° 1), preparadas en solución salina fosfatada con 2% de polioxietilene 20 monooleato de sorbitana⁴ (pH 7,4). Treinta días después estos cobayos fueron inoculados en el cojinete plantar con

10³ dosis generalizantes cobayo de virus de la FA cepa O₁ Campos (8).

Los resultados demostraron que 0,5 ml de la vacuna de referencia contenían 11 DP₅₀ cobayo.

Porcinos

En este experimento se utilizaron cerdos de raza Humus-Seghers⁵, de 2 meses de edad, destetados y con un peso aproximado de 20 kg. Cuatro grupos de 25 cerdos cada uno fueron vacunados por vía intraperitoneal de la siguiente manera: los cerdos del grupo 1 recibieron 3 ml de la vacuna de referencia; el grupo 2 fue vacunado con la vacuna FC 1X a la dosis de 3 ml; los grupos 3 y 4 fueron vacunados con la vacuna FC 10X con 3 y 0,3 ml respectivamente. Se dejaron sin vacunar ocho cerdos para que sirvieran de control y como donadores de virus.

Exposición al virus

A los 30 DPV, de los 25 cerdos vacunados de cada grupo, 16 fueron separados al azar y expuestos a la cepa O₁ Campos y 8 de ellos recibieron 10^{4,6} dosis letales 50% para ratones lactantes (DL₅₀) por vía intraplantar en la pata derecha. Los 8 restantes quedaron como contactos. De los 4 animales no vacunados, 2 recibieron la misma descarga y 2 fueron dejados como controles. Los animales permanecieron en íntimo contacto en unidades de aislamiento separadas para cada tipo de comprobación.

A los 110 DPV los cerdos restantes de cada grupo se expusieron por contacto de manera similar, infectando dos cerdos donadores y agregando dos cerdos controles sin vacunar.

Los cerdos fueron examinados clínicamente al 12° día después del inicio de la exposición al virus.

Estudio de los anticuerpos

Se hicieron colectas de sangre de todos los cerdos a 0 días y 30 días DPV. De los cerdos no

⁴ Tween 80 - ICI America Inc. Atlas Chemical Division.

⁵ HUMUS AGRICOLA S.A. Via Armando Sales Oliveira, SP-322 km 356, Pitangueiras, SP, Brasil.

descargados a los 30 días se hicieron tomas a 60 y 90 DPV.

Los títulos de anticuerpos neutralizantes se determinaron por la prueba de microneutralización (MN) (6) frente a las 3 cepas de virus usadas para la preparación de las vacunas. Los sueros de 30 y 90 DPV se utilizaron en la prueba de seroprotección (SP) en ratones lactantes (5) frente al virus de la FA O₁ cepa Campos.

RESULTADOS

La tabla 2 muestra los niveles de anticuerpos circulantes frente a los tres tipos de virus de la FA a los 30, 60 y 90 DPV. Se puede observar que todas las vacunas desarrollaron adecuados niveles

de anticuerpos. La vacuna de referencia y la no concentrada (FC 1X) que contenían la misma cantidad de antígeno dieron resultados similares, mientras que la concentrada (FC 10X) produjo niveles más altos cuando fue inoculada en la dosis mayor (3 ml). Sin embargo, esta misma vacuna, a la dosis de 0,3 ml produjo resultados inferiores, particularmente frente al subtipo O₁ Campos a los 60 y 90 DPV.

En la Tabla 3 se presentan los resultados de las descargas de virus a los 30 y 110 DPV frente a la cepa O₁ Campos.

A los 30 y 110 DPV la vacuna FC 10X a la dosis de 3 ml demostró la mejor protección y ninguno de los animales expuestos presentó signos clínicos de FA. La misma vacuna a la dosis de 0,3 ml confirió una protección baja a los 30 y 110 DPV.

TABLA 2. Promedio y desviación estándar de los títulos de neutralización de sueros obtenidos de cerdos vacunados con vacuna antiáftosa con adyuvante oleoso de emulsión doble

Vacuna	Dosis (ml)	Tipo de virus	Días postvacunación			
			0	30	60	90
Referencia	3	O	<1,0	2,51 ± 0,56 ^a	2,17 ± 0,34 ^b	2,55 ± 0,33 ^b
		A	<1,0	2,80 ± 0,65	2,85 ± 0,46	2,73 ± 0,51
		C	<1,0	2,72 ± 0,57	2,40 ± 0,39	2,52 ± 0,33
FC 1X	3	O	<1,0	2,65 ± 0,50	2,48 ± 0,70	2,75 ± 0,23
		A	<1,0	3,23 ± 0,49	3,3 ± 0,32	3,2 ± 0,09
		C	<1,0	2,78 ± 0,53	2,66 ± 0,35	2,9 ± 0,09
FC 10X	3	O	<1,0	2,63 ± 0,34	2,58 ± 0,53	2,58 ± 0,53
		A	<1,0	3,23 ± 0,27	3,27 ± 0,56	3,20 ± 0,57
		C	<1,0	3,0 ± 0,45	2,65 ± 0,57	2,85 ± 0,74
FC 10X	0,3	O	<1,0	2,18 ± 0,60	1,82 ± 0,23	1,88 ± 0,35
		A	<1,0	2,50 ± 0,73	2,65 ± 0,42	2,37 ± 0,56
		C	<1,0	2,32 ± 0,66	2,17 ± 0,57	1,93 ± 0,43

^a 25 animales por grupo.

^b Promedios tomados de 9 animales por grupo con excepción del grupo FC 1X en el cual un animal murió a los 60 DPV y 4 murieron antes de los 90 DPV.

TABLA 3. *Protección contra el virus de la FA O₁ Campos en cerdos vacunados con vacuna antiáftosa con adyuvante oleoso de emulsión doble*

Vacuna	Dosis (ml)	Descarga			
		30 DPV		110 DPV	
		IDP	Contacto	IDP	Contacto
Referencia	3	7/8 ^a	7/8	...	6/9
FC 1X	3	7/8	8/8	...	3/3 ^b
FC 10X	3	8/8	8/8	...	8/9
	0,3	4/8	7/8	...	5/9
Controles		1/2 ^c	0/2	0/2	0/2

^aNúmero de animales protegidos sobre animales comprobados.

^bCinco animales murieron entre 60 y 90 DPV.

^cUn cerdo murió después de inoculado.

DPV = Días postvacunación.

IDP = Inoculación intradermoplantar.

La vacuna de referencia y la no concentrada (FC 1X) fueron igualmente satisfactorias a los

30 DPV. A los 110 DPV la vacuna de referencia indujo un buen nivel de protección pero la interpretación de los resultados de la vacuna de FC 1X fue afectada porque 5 animales de este grupo murieron entre 60 y 90 DPV debido a causas no relacionadas con la FA. Los 3 cerdos restantes estaban protegidos y la respuesta de anticuerpos a 30, 60 y 90 DPV fue similar a la de la vacuna de referencia.

La Tabla 4 muestra la correlación entre protección frente a la exposición al virus y niveles de anticuerpos circulantes (MN y SP) a los 30 DPV. Cuando se tomó el valor ≥ 2 para las pruebas de MN o de SP (5), se observó una correlación entre la protección y los niveles de anticuerpos de $r = 0,83$ y $0,79$ respectivamente. De los 64 cerdos comprobados, 8 desarrollaron lesiones vesiculares y 7 de éstos no tenían anticuerpos detectables en las pruebas utilizadas (0,0 y 0,9) y desarrollaron lesiones de generalización. Un animal de los ocho que tenían título de neutralización entre 1,5 y 1,9 e índice de seroprotección (ISP) en el rango de 1,0 a 1,9 desarrolló lesiones en 2 patas. Hubo 4 y 3 cerdos protegidos con un valor de $< 2,0$ para las pruebas de SP y MN respectivamente.

TABLA 4. *Anticuerpos en cerdos 30 DPV con una vacuna antiáftosa con adyuvante oleoso de emulsión doble con descarga por inoculación intraplantar o por contacto frente a la cepa O₁ Campos*

Tipo de prueba	Rango de anticuerpos	Número de animales	Número de patas afectadas				
			0	1	2	3	4
Seroprotección	0,0 - 0,9	8	1	-	-	-	7
	1,0 - 1,9	4	3	-	1	-	-
	2,0 - 2,9	0	0	-	-	-	-
	$\geq 3,0$	52	52	-	-	-	-
	Total	64	56	0	1	0	7
Microneutralización	0,0 - 0,9	7	-	-	-	-	7
	1,0 - 1,4	0	-	-	-	-	-
	1,5 - 1,9	4	3	-	1	-	-
	2,0 - 2,4	17	17	-	-	-	-
	$\geq 2,5$	36	36	-	-	-	-
Total	64	56	0	1	0	7	

Utilizando el mismo valor 2, los resultados a los 110 DPV muestran una escasa correlación entre la protección a la descarga y las pruebas de MN y de SP ($r = 0,02$ y $0,03$ respectivamente), como se muestra en la Tabla 5.

TABLA 5. *Anticuerpos en cerdos a los 110 DPV con una vacuna antiaftosa con adyuvante oleoso de doble emulsión en descarga por inoculación intradermoplantar o por contacto frente a la cepa O₁ Campos*

Tipo de prueba	Rango de anticuerpos	Número de animales	Número de patas afectadas				
			0	1	2	3	4
Seroprotección	0,0 – 0,9	9	6	2	–	–	1
	1,0 – 1,9	3	3	–	–	–	–
	2,0 – 2,9	8	6	2	–	–	–
	≥ 3,0	10	8	1	1	–	–
	Total	30	23	5	1	0	1
Microneutralización	0,0 – 0,9	0	–	–	–	–	–
	1,0 – 1,4	0	–	–	–	–	–
	1,5 – 1,9	8	6	1	–	–	1
	2,0 – 2,4	12	7	4	1	–	–
	≥ 2,5	10	10	–	–	–	–
Total	30	23	5	1	0	1	

DISCUSION

La vacuna antiaftosa de adyuvante oleoso en forma de emulsión doble aplicada por vía intraperitoneal en cerdos recién destetados, indujo niveles significativos de anticuerpos circulantes y no provocó efectos colaterales indeseables ni anomalías macroscópicas en los nódulos linfáticos regionales. Estos datos confirman observaciones anteriores (2).

La protección inducida por estas vacunas frente al virus de la FA O₁ fue excelente, sobre todo con antígenos que fueron concentrados 10 veces y aplicados a la dosis de 3 ml. Sin embargo, cuando la misma vacuna se utilizó a la dosis de 0,3 ml, los resultados fueron inferiores a los obtenidos con la vacuna de referencia y a la de concentración FC 1X que contenían la misma cantidad de antígeno.

Varios investigadores (1, 9, 10, 11) han estudia-

do vacunas para cerdos aplicadas en pequeños volúmenes, utilizando antígenos concentrados y purificados con el objetivo de reducir o prevenir reacciones indeseables en los tejidos debidas al adyuvante oleoso. Los resultados obtenidos en este experimento parecen indicar que reduciendo la cantidad de adyuvante oleoso disminuye la inmunogenicidad de la vacuna.

Se observó una buena correlación a los 30 DPV, entre los títulos o índices de anticuerpos y la protección de los cerdos frente a la descarga (Tabla 4). Si se presume que animales con valores de MN o ISP < 2 no están protegidos, se puede ver que 4 de 12 cerdos con ISP < 2, no desarrollaron lesiones. Un quinto cerdo con ISP < 2 presentó lesiones solamente en 2 patas. Los resultados de la prueba de MN son bastante similares; 3 de 11 no desarrollaron lesiones y 1, sólo en 2 patas. Ya con un valor de > 3,0 para el ISP y > 2,0 para la

prueba de MN, todos los cerdos estaban protegidos. La correlación entre los niveles de anticuerpos en ambas pruebas y la protección de animales a la descarga a los 110 DPV fue menos satisfactoria que a los 30 DPV. En la prueba de SP esta diferencia se debe al mayor número de animales protegidos con índices de < 2 que al de cerdos no protegidos con altos niveles de anticuerpos. En la prueba de MN, 7 de 20 cerdos con títulos de 1,5 a 2,4 desarrollaron lesiones en 1 ó 2 patas.

En el trabajo anterior (2) la descarga en cerdos vacunados a los 110 DPV indicó algunos problemas de interpretación de las lesiones, como en el caso de cerdos con altos niveles de anticuerpos neutralizantes que desarrollaron lesiones vesiculares. Este hecho fue relacionado con el examen frecuente de los animales después de la exposición y la producción de abrasiones en la piel, que permiten la penetración y replicación local del virus, causando lesiones locales en animales con niveles significativos de anticuerpos. Otros factores, como la diferencia de peso de los animales a los 30 ó 110 DPV, también podrían ser relacionados con las diferencias observadas en las pruebas de descarga.

Leeuw *et al.* (8) estudiaron la reacción de cerdos vacunados después de la exposición al virus por diferentes métodos. En esos experimentos los cerdos se expusieron al virus por medio de isopos, contacto e inoculación y fueron mantenidos separados o en grupos. Los autores concluyeron que el número de animales enfermos en el grupo tuvo influencia sobre los resultados y que la exposición por contacto fue el método más severo. En este experimento no se observaron diferencias entre la exposición por inoculación intraplantar y el contacto a los 30 DPV, probablemente debido al estrecho contacto entre los animales vacunados y los no-vacunados enfermos. De los 32 cerdos en cada grupo de exposición, 26 estaban protegidos frente a la inoculación intraplantar y 30 para la exposición por contacto. Como no se hizo una estratificación previa basada en los niveles de anticuerpos, en el grupo de animales inoculados hubo 4 cerdos vacunados con 0,3 ml de vacuna concentrada (FC 10X) y bajos niveles de anticuerpos mientras en el grupo de contacto había solamente uno.

A los 110 DPV, 9 de 12 cerdos tenían niveles

de anticuerpos < 2 en la prueba de seroprotección y aún estaban protegidos. Esto es particularmente significativo por el alto nivel de infecciosidad en el ambiente debido a que todos los cerdos controles, inoculados y contactos, enfermaron con lesiones generalizadas. La protección de animales sin anticuerpos circulantes detectables también ha sido informada (8).

El método de descarga por contacto no mostró diferencia con la exposición por inoculación. Por la facilidad de su ejecución podría ser considerado como método de elección para las pruebas de rutina de control de vacuna antiaftosa en cerdos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a los Dres. Vicente Astudillo y Juan Antonio Obiaga por el análisis estadístico, al Dr. Daniel Abaracón, por la provisión de los antígenos inactivados y al Dr. Eduardo Centeno por la concentración de los mismos.

REFERENCIAS

1. ANDERSON, E.C.; MASTERS, R.C.; MOWAT, G.N. Immune response of pigs to inactivated foot-and-mouth disease vaccines. *Res. vet. Sci.* 12: 342-350, 1971.
2. AUGÉ DE MELLO, P.; GOMES, I. Vacuna anti-aftosa con adyuvante oleoso para cerdos. I. Vacuna de emulsión doble aplicada por diferentes vías. (Foot-and-mouth disease oil adjuvanted vaccines for pigs. I. Double emulsion vaccine applied by different routes). *Bln Centro Panamericano Fiebre Aftosa 31-32*: 1-6, 7-12, 1978.
3. BAHNEMANN, H.G.; AUGÉ DE MELLO, P.; ABARACON, D.; GOMES I. Immunogenicity in cattle of foot-and-mouth disease vaccines inactivated with binary ethylenimine. *Bull. Off. int. Epiz.* 81 (11-12): 1335-1343, 1974.
4. CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA. Manual de procedimientos para el control de las vacunas antiaftosas. *Ser. Man. Téc.* (en revisión).
5. 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., B. Aires* 19 (110): 243-267, 1957.

6. FERREIRA, MARIA 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.
7. HERBERT, W.J. Multiple emulsions. A new form of mineral-oil antigen adjuvant. *The Lancet 2*: 771, 1965.
8. LEEUW, P.W. de; TIESSINK, J.W.A.; VAN BEKKUM, J.C. The challenge of vaccinated pigs with foot-and-mouth disease vaccine. *Zbl. Vet. Med. B*, 26: 98-109, 1979.
9. McKERCHER, P.D.; BACHRACH, H.L. A foot-and-mouth disease vaccine for swine. *Can. J. comp. Med.* 40: 67-74, 1976.
10. MORGAN, D.O.; McKERCHER, P.D.; BACHRACH, H.L. Quantitation of the antigenicity and immunogenicity of purified foot-and-mouth disease virus vaccine for swine and steers. *Appl. Microbiol.* 20 (5): 770-774, 1970.
11. MOWAT, G.N. Quantities of purified antigen required to immunize swine against foot-and-mouth disease. *Bull. off. int. Epiz.* 77: 887-897, 1972.
12. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE; PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. 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 acetyleneimine and emulsified with incomplete Freund's adjuvant. Collaborative research Plum Island Animal Disease Center and Pan American Foot-and-Mouth Disease Center. *Bltn Centro Panamericano Fiebre Aftosa 19-20*: 1-8, 9-16, 1975.

FOOT-AND-MOUTH DISEASE OIL ADJUVANTED VACCINE FOR PIGS. II. INTRAPERITONEAL VACCINATION OF YOUNG PIGS WITH DOUBLE EMULSION VACCINE¹

P. Augé de Mello²; Ivo Gomes²; A. Alonso Fernández²; J.C. Mascarenhas³

SUMMARY

A trivalent double emulsion FMD vaccine was compared at 30 and 110 days post-vaccination (DPV) in pigs with 2 similar vaccines containing antigens concentrated by polyethylene glycol (PEG) precipitation. The antigens in those two vaccines had 1X and 10X the CF capacity of the original antigens. The vaccines were used to vaccinate recently weaned pigs by the intraperitoneal route in a 3 ml dose. The 10X CF vaccine was also used in a 0.3 ml dose.

All vaccines induced good levels of circulating antibodies for the three strains of the FMD virus and the protection against FMD virus subtype O₁ strain Campos was excellent, particularly in the 10X CF vaccine used in the 3 ml dose. No undesirable side effects were observed.

In this experiment a good correlation was observed between antibody levels at 30 DPV and protection at challenge both for the mouse protection test and for the microneutralization test. At 110 DPV there was a poor correlation of the mouse protection test and protection at challenge caused, in particular, by pigs with low mouse protection indices.

During the challenge at 30 days a comparison between foot-inoculation and contact methods of exposure revealed no differences between the two.

INTRODUCTION

An earlier paper (2) reported that a double emulsion (7) foot-and-mouth disease (FMD) oil adjuvanted vaccine, when applied intraperitoneally in recently weaned pigs produced no undesirable local tissue reactions nor macroscopic changes in the regional lymph nodes. Thus, this type of formulation and route of application appeared more suitable for use in the field than primary emulsion vaccine (12). Also the immunogenicity of these vaccines when used intraperitoneally was satisfactory, and the results were not significantly different from subcutaneous or intramuscular application.

The present paper reports some further studies on the intraperitoneal vaccination of young pigs with oil adjuvanted double emulsion FMD vaccines containing different quantities of antigen and adjuvant. At 30 DPV comparisons were also made between the intraplantar needle exposure and contact exposure. Finally, the correlation between circulating antibodies and FMD virus challenge is discussed.

MATERIALS AND METHODS

Vaccines

The antigens used in the formulation of the vaccines were FMD virus O₁ strain Campos, A₂₄ strain Cruzeiro and C₃ strain Resende. The virus suspensions were inactivated with binary ethylenimine (3). From each monovalent inactivated antigen suspension a portion was precipitated with 10% (w/v) of polyethylene glycol (PEG) 6000, followed by centrifugation at 800 g for 60 min. The sediment was resuspended in Eagle's medium (pH 7.4) to the extent that the complement fixation (CF) titer (4) was respectively 1X or 10X the CF titer of

¹This work was supported by grants from the FRIGOBRAS - Cia. Brasileira de Frigoríficos and the Instituto Vallée S.A.

²Pan American Foot-and-Mouth Disease Center, Caixa Postal 589, ZC-00, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

³Secretaria de Agricultura do Estado do Paraná, Rua dos Funcionários, 1559, Curitiba, PR, Brazil.

the original antigen suspension. Table 1 shows the characteristics of each of the antigens.

TABLE 1. *Characteristics of the FMD antigens*^a

Antigens	Titers		
	CCID ₅₀	CF	10X conc. ^b
O ₁ Campos	7.0	1/12	1/130
A ₂₄ Cruzeiro	7.0	1/26	1/250
C ₃ Resende	7.3	1/16	1/140

^aProduced in BHK 21 C 13 cells cloned in roller bottles.

^bConcentration by PEG 6000.

CCID₅₀ = Cell culture infectious doses.

CF = Complement fixation.

Equal parts of the monovalent antigen suspensions, with or without PEG treatment, were mixed to form 3 trivalent suspensions: 1) reference - antigens without PEG treatment; 2) 1X CF - PEG - treated antigens with CF titers similar to those of the original antigens; and 3) 10X CF - PEG - treated antigens with a 10X higher CF titer than the original antigens.

With each of the trivalent suspensions a double emulsion oil adjuvanted vaccine was formulated as described (2).

Potency test

Groups of guinea pigs (GP) were inoculated with 0.5 ml of 3-fold dilutions of the reference vaccine (Antigens No. 1) in buffered saline phosphate with 2% polyoxyethylene 20 sorbitan monooleate⁴ (pH 7.4). Thirty days later these guinea pigs were inoculated in one footpad with 10³ GP generalizing doses of FMD virus strain O₁ Campos (8).

The results showed that 0.5 ml of the reference vaccine contained 11 GP PD₅₀.

Pigs

Two-month old recently weaned hybrid Humus-Seghers⁵ pigs of approximately 20 kg were used in this experiment. Four groups of 25 pigs each were vaccinated intraperitoneally as follows: pigs of Group 1 received 3 ml of the reference vaccine (Antigens No. 1); Group 2 was vaccinated with 1X CF vaccine (Antigens No. 2) at a 3 ml dose; Groups 3 and 4 were vaccinated with 10X CF vaccine (Antigens No. 3) with 3 ml and 0.3 ml, respectively. Eight pigs were left unvaccinated to serve as future controls and virus donors.

Challenge of immunity

At 30 DPV 16 of the 25 vaccinated pigs of each group were exposed to FMD virus O₁, strain Campos. Eight pigs were inoculated in the heel of the right hind foot with 10^{4.6} mouse LD₅₀ and 8 were kept as controls. Two of the 4 unvaccinated pigs were similarly exposed and 2 remained as control. The animals were maintained in intimate contact and were all housed in separate isolation units for each type of challenge.

At 110 DPV the remaining pigs of each group were exposed by contact in a similar manner by infecting 2 donor pigs and adding 2 unvaccinated control pigs.

The pigs were examined for FMD on the 12th day after the start of virus exposure.

Antibodies

Serum was collected from all pigs at 0 days and at 30 DPV. Of those pigs not challenged at 30 days, serum was also collected at 60 and 90 DPV.

Circulating neutralizing antibody titers were determined by the microneutralization test (MNT) (6) against the 3 virus strains used for the preparation of the vaccines. The 30 and 90 DPV sera were also used in a mouse protection test (MPT) (5) against FMD virus O₁ strain Campos.

⁴Tween 80 - ICI America Inc. Atlas Chemical Division.

⁵HUMUS AGRICOLA S.A. Via Armando Sales Oliveira, SP-322 km 356, Pitangueiras, SP, Brazil.

RESULTS

Table 2 shows the levels of neutralizing antibodies at 30, 60 and 90 DPV against the 3 types of FMD virus. It can be observed that all vaccines induced adequate levels of circulating antibody. The reference vaccine and the 1X CF vaccine which contained the same amount of antigen gave similar results while the 10X CF vaccine induced a higher response when used as a 3 ml dose. However, this same vaccine produced poorer results when used as a 0.3 ml dose, particularly against type O₁ Campos, at 60 and 90 DPV.

The results of the challenge test at 30 and 110 DPV against type O₁ Campos are listed

in Table 3.

At 30 and 110 DPV the 10X CF vaccine in the 3 ml dose showed the best protection with none of the exposed animals showing any sign of clinical FMD. The same vaccine in the 0.3 ml dose gave lower protection both at 30 and 110 DPV.

The reference vaccine as well as the 1X CF were equally satisfactory at 30 DPV. At 110 DPV the reference vaccine still induced a good level of protection but the interpretation of the 1X CF vaccine was difficult because 5 animals in this group died between 60 and 90 DPV from causes not related to FMD. The 3 remaining pigs were protected and the antibody responses at 30, 60 and 90 DPV were similar to those of the reference vaccine.

TABLE 2. Mean and standard deviation of the neutralization titers of sera obtained from pigs vaccinated with double emulsion oil adjuvanted FMD vaccine

Vaccine	Doses (ml)	Type of virus	Days post-vaccination			
			0	30	60	90
Reference	3	O	<1.0	2.51 ± 0.56 ^a	2.17 ± 0.34 ^b	2.55 ± 0.33 ^b
		A	<1.0	2.80 ± 0.65	2.85 ± 0.46	2.73 ± 0.51
		C	<1.0	2.72 ± 0.57	2.40 ± 0.39	2.52 ± 0.33
1X FC	3	O	<1.0	2.65 ± 0.50	2.48 ± 0.70	2.75 ± 0.23
		A	<1.0	3.23 ± 0.49	3.3 ± 0.32	3.2 ± 0.09
		C	<1.0	2.78 ± 0.53	2.66 ± 0.35	2.9 ± 0.09
10X FC	3	O	<1.0	2.63 ± 0.34	2.58 ± 0.53	2.58 ± 0.53
		A	<1.0	3.23 ± 0.27	3.27 ± 0.56	3.20 ± 0.57
		C	<1.0	3.0 ± 0.45	2.65 ± 0.57	2.85 ± 0.74
	0.3	O	<1.0	2.18 ± 0.60	1.82 ± 0.23	1.88 ± 0.35
		A	<1.0	2.50 ± 0.73	2.65 ± 0.42	2.37 ± 0.56
		C	<1.0	2.32 ± 0.66	2.17 ± 0.57	1.93 ± 0.43

^a 25 animals per group.

^b Means from 9 animals per group with the exception of 1X CF group in which one animal died at 60 DPV and 4 died before completing 90 DPV.

TABLE 3. Protection of pigs against FMDV O₁ Campos after vaccination with a double emulsion oil adjuvanted FMD vaccine

Vaccine	Doses (ml)	Challenge			
		30 DPV		110 DPV	
		IDP	Contact	IDP	Contact
Reference	3	7/8 ^a	7/8	...	6/9
1X CF	3	7/8	8/8	...	3/3 ^b
10X CF	3	8/8	8/8	...	8/9
	0.3	4/8	7/8	...	5/9
Controls		1/2 ^c	0/2	0/2	0/2

^aNumber of animals protected over animals challenged.

^bFive pigs died between 60 and 90 DPV.

^cOne pig died after inoculation.

DPV = Days post-vaccination.

IDP = Intradermoplar inoculation.

The correlation between protection at challenge and the levels of circulating antibodies (MNT and MPT) at 30 DPV are presented in Table 4. If the value of ≥ 2 is taken to indicate protection for the MNT or the MPT (5), then there exists an excellent correlation between protection and antibody levels, $r = 0.83$ and 0.79 , respectively. Eight out of 64 pigs challenged developed vesicular lesions. Seven of those did not have detectable antibodies in each of the tests (0.0 and 0.9) and developed generalized lesions. One animal of the 8 which had a neutralization titer between 1.5 and 1.9 and an MPI in the 1.0 and 1.9 range, only developed lesions on 2 feet. There were 4 and 3 protected pigs with a value below 2.0 for the MPT and the MNT, respectively.

Using a similar value of 2 the results at 110 DPV, as listed in Table 5, indicated a poor correlation between protection at challenge and the neutralization test and the mouse protection ($r = 0.02$ and 0.03 , respectively).

TABLE 4. Antibodies of pigs at 30 DPV with a double emulsion oil adjuvanted FMD vaccine in challenge by intradermoplar inoculation or by contact against FMDV O₁ Campos

Type of test	Range of antibodies	Number of animals	Number of affected feet				
			0	1	2	3	4
Serumprotection	0.0 - 0.9	8	1	-	-	-	7
	1.0 - 1.9	4	3	-	1	-	-
	2.0 - 2.9	0	-	-	-	-	-
	≥ 3.0	52	52	-	-	-	-
	Total	64	56	0	1	0	7
Microneutralization	0.0 - 0.9	7	-	-	-	-	7
	1.0 - 1.4	0	-	-	-	-	-
	1.5 - 1.9	4	3	-	1	-	-
	2.0 - 2.4	17	17	-	-	-	-
	≥ 2.5	36	36	-	-	-	-
Total	64	56	0	1	0	7	

TABLE 5. *Antibodies of pigs 90 and 110 DPV with a double emulsion oil adjuvanted FMD vaccine in challenge by intradermoplantar inoculation or by contact against FMDV O₁ Campos*

Type of test	Range of antibodies	Number of animals	Number of affected feet				
			0	1	2	3	4
Serumprotection	0.0 – 0.9	9	6	2	–	–	1
	1.0 – 1.9	3	3	–	–	–	–
	2.0 – 2.9	8	6	2	–	–	–
	≥ 3.0	10	8	1	1	–	–
	Total	30	23	5	1	0	1
Microneutralization	0.0 – 0.9	0	–	–	–	–	–
	1.0 – 1.4	0	–	–	–	–	–
	1.5 – 1.9	8	6	1	–	–	1
	2.0 – 2.4	12	7	4	1	–	–
	≥ 2.5	10	10	–	–	–	–
Total	30	23	5	1	0	1	

DISCUSSION

Double emulsion oil adjuvanted FMD vaccine used intraperitoneally in recently weaned pigs induced adequate levels of circulating antibodies, which confirmed earlier observations (2). There were also no undesirable side effects nor abnormalities in the regional lymph nodes.

The protection produced by these vaccines against FMD O₁ virus was excellent, particularly with antigens which were concentrated to a 10-fold CF titer and applied in a 3 ml dose. However, when this same vaccine was used in a 0.3 ml dose the results were inferior to those obtained with the reference vaccine or the 1X CF vaccine containing similar amounts of antigen per dose.

Several investigators (1, 9, 10, 11) have studied vaccines applied in small volumes with purified concentrated antigens for the immunization of pigs. Such smaller volumes are used to reduce or to prevent undesirable tissue reaction to the oil adjuvant. However, results obtained in the present experiment seem to indi-

cate that reducing the quantity of oil adjuvant decreases the immunogenicity of the vaccine.

A good correlation was observed between the circulating antibodies at 30 DPV, between antibody titers or indices and protection of the pigs at challenge (Table 4). If animals with MNT or MPI values < 2 are assumed not to be protected, it can be seen that for the MPT, 4 out of 12 pigs with values lower than 2 did not develop FMD. A fifth pig with an MPI < 2 was partially protected (2 feet). The results of the MNT are quite similar; 3 of 11 pigs did not develop lesions and one pig had lesions on 2 feet. With a value of > 3.0 for the MPI and > 2.0 with MNT all pigs were protected. The correlation between levels of antibodies in both tests and the protection of animals at challenge at 110 DPV was less satisfactory than at 30 DPV. In the MPT this difference is due to the larger number of protected animals with indices < 2 rather than to non-protected pigs with high levels of antibodies. In the MNT there were several pigs (7/20) with titers in the 1.5 - 2.4 range which developed lesions in 1 or 2 feet.

Earlier work (2) indicated that challenge at 110 DPV of vaccinated pigs caused some problems in the interpretation of lesions, such as in the case of pigs with high antibody levels that developed vesicular lesions, and that frequent examination of animals after virus exposure may produce abrasions of skin permitting the entry and local replication of virus, thus causing local lesions in animals with significant levels of antibody. Factors such as the difference in weight of the animals at 30 or 110 DPV may relate to the difference in the challenge results.

Leeuw *et al.* (8) studied the reaction of vaccinated pigs after different methods of virus exposure. In those experiments the pigs were exposed by swabbing, contact or inoculation and kept separately or in groups. Among other conclusions these investigators indicate that the results of such exposure are strongly influenced by diseased roommates and that contact exposure was the most severe of the methods used. In our results there were no differences between inoculation or contact exposure at 30 DPV, probably because of the intimate contact between vaccinated and diseased non-vaccinated pigs. Of 32 pigs challenged in each group 26 were protected after inoculation and 30 by contact. Since no previous stratification on the basis of antibody levels was made, 4 pigs vaccinated with a 0.3 ml dose of the 10X CF vaccine with low antibody levels were in the inoculated group against only one similar animal in the contact group.

At 110 DPV a relatively large number of pigs had antibody levels < 2 (9/12) in the mouse protection test and still were protected. This is particularly noteworthy because of the high level of infectivity in the environment caused by the inoculated and contact control pigs which all became severely ill with generalized lesions. Protection of animals without detectable circulating antibodies has also been reported (8).

No difference was observed between needle or contact challenge. Because of its practicability, the contact challenge may be the method of choice for routine vaccine positive control tests in pigs.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank Dr. Vicente Astudillo and Dr. Juan Antonio Obiaga for the statistical analysis and Dr. Daniel Abaracón and Eduardo Centeno for the supply of the inactivated FMD antigens and concentration respectively.

REFERENCES

1. ANDERSON, E.C.; MASTERS, R.C.; MOWAT, G.N. Immune response of pigs to inactivated foot-and-mouth disease vaccines. *Res. vet. Sci.* 12: 342-350, 1971.
2. AUGÉ DE MELLO, P.; GOMES, I. Vacuna anti-aftosa con adyuvante oleoso para cerdos. I. Vacuna de emulsión doble aplicada por diferentes vías. (Foot-and-mouth disease oil adjuvanted vaccines for pigs. I. Double emulsion vaccine applied by different routes). *Bltn Centro Panamericano Fiebre Aftosa 31-32*: 1-6, 7-12, 1978.
3. BAHNEMANN, H.G.; AUGÉ DE MELLO, P.; ABARACON, D.; GOMES I. Immunogenicity in cattle of foot-and-mouth disease vaccines inactivated with binary ethylenimine. *Bull. Off. int. Epiz.* 81 (11-12): 1335-1343, 1974.
4. CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA. Manual de procedimientos para el control de las vacunas antiaftosas. *Ser. Man. Téc.* (in revision).
5. 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., B. Aires* 19 (110): 243-267, 1957.
6. FERREIRA, MARIA 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.
7. HERBERT, W.J. Multiple emulsions. A new form of mineral-oil antigen adjuvant. *The Lancet* 2: 771, 1965.
8. LEEUW, P.W. de; TIESSINK, J.W.A.; VAN BEKKUM, J.C. The challenge of vaccinated pigs with foot-and-mouth disease vaccine. *Zbl. Vet. Med. B*, 26: 98-109, 1979.
9. McKERCHER, P.D.; BACHRACH, H.L. A foot-and-mouth disease vaccine for swine. *Can. J. comp. Med.* 40: 67-74, 1976.

-
10. MORGAN, D.O.; McKERCHER, P.D.; BACHRACH, H.L. Quantitation of the antigenicity and immunogenicity of purified foot-and-mouth disease virus vaccine for swine and steers. *Appl. Microbiol.* 20 (5): 770-774, 1970.
 11. MOWAT, G.N. Quantities of purified antigen required to immunize swine against foot-and-mouth disease. *Bull. off. int. Epiz.* 77: 887-897, 1972.
 12. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE; PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. 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 acetyleneimine and emulsified with incomplete Freund's adjuvant. Collaborative research Plum Island Animal Disease Center and Pan American Foot-and-Mouth Disease Center. *Bltm Centro Panamericano Fiebre Aftosa 19-20:* 1-8, 9-16, 1975.

VACUNA ANTIAFTOSA CON ADYUVANTE OLEOSO: ESTUDIO COOPERATIVO

Argentina (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria [INTA])¹

y

Estados Unidos de América (Centro de Enfermedades Animales de Plum Island [PIADC])²

RESUMEN

Se presenta un resumen de los estudios cooperativos sobre vacunas contra la fiebre aftosa realizados por el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina, el Centro Panamericano de Fiebre Aftosa, Brasil, y el Centro de Enfermedades Animales de Plum Island, Estados Unidos de América. Estos estudios se refieren a la respuesta inmunitaria obtenida en novillos con (1) vacunas de virus Frenkel preparadas con adyuvantes oleosos e hidróxido de aluminio. Cuando la inmunidad de los novillos fue comprobada a los 30 días, la vacuna Frenkel con adyuvante de hidróxido de aluminio y saponina dio una mejor protección. En el trabajo principal (11), se estudió la respuesta de novillos a las 3 vacunas producidas en BHK emulsificadas con adyuvante oleoso. Las tres vacunas fueron así preparadas: en una, la suspensión del virus fue usada en la misma concentración en que fue cultivada; y en las otras dos, fue concentrada 100 veces por la técnica de polietilenglicol y luego diluida a concentraciones de 20X y 1X, respectivamente. La respuesta de anticuerpos y la protec-

ción obtenida por las tres vacunas fue similar. Se concluye que en los tres grupos los animales tuvieron una protección similar cuando su inmunidad fue comprobada, lo que indica que estas concentraciones diferentes de antígeno no resultaron en diferencias significativas de protección.

INTRODUCCION

Se presenta un resumen de los resultados obtenidos en estudios cooperativos sobre vacunas de virus de la fiebre aftosa (FA) realizados en Argentina por el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), el Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (CPFA), Brasil, y el Centro de Enfermedades Animales de Plum Island (PIADC), Estados Unidos de América, durante un período de varios años (1968-1975) (9, 11, 12). En este trabajo se evalúa la respuesta inmunitaria de vacunas de adyuvante oleoso y de hidróxido de aluminio en bovinos (parte I) y la respuesta inmunitaria después de la vacunación y revacunación con una vacuna antiaftosa emulsificada con adyuvante oleoso (parte II). En los estudios preliminares se compararon los resultados de vacunas en las cuales los virus utilizados como antígenos se cultivaron en células BHK, se inactivaron con acetilileneimina (AEI) y se emulsificaron con adyuvante oleoso (PIADC e INTA), y vacunas en que los virus usados como antígenos se obtuvieron en cultivos de Frenkel, se inactivaron con formaldehído y se combinaron con hidróxido de aluminio y saponina. Los bovinos vacunados fueron mantenidos en una unidad de aislamiento en la Península Valdés, provincia Chubut, Argentina.

MATERIALES Y METODOS

Selección de cepas de virus de la FA

Por recomendación de representantes del CPFA, las cepas de virus de la FA subtipos O₁ Caseros,

¹S. Rivenson; O. Ibarra; O.P. Gaggino; O. Laporte; H. García Olano; J.C. Pizzi; L. Marangunich. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Servicio Nacional de Programación y Evaluación Técnica, San José 151, 2º Piso, Buenos Aires, Argentina.

²J.J. Callis; P.D. McKercher; J.H. Graves; H.L. Bachrach; K.M. Cowan; H.R. Cunliffe. USDA, Science and Education Administration, Federal Research, Plum Island Animal Disease Center, P.O. Box 848, Greenport, New York 11944, U.S.A.

"La mención de una marca registrada o de propiedad de un producto no constituye una certificación de garantía de ese producto por parte del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de América ni implica su aprobación ni la exclusión de otros productos utilizables con fines similares."

A₂₄ Cruzeiro y C₃ Resende, seleccionadas para la preparación de la vacuna fueron semejantes a las mencionadas previamente (9, 11).

Vacunas

Para la parte inicial (I) de estos estudios fueron preparadas cuatro vacunas trivalentes: 1) virus de la FA cultivado en Frenkel, inactivado con formaldehído y combinado con adyuvante hidróxido de aluminio y saponina; 2) virus de la FA cultivado como en el número 1) pero combinado con la fórmula oleosa del INTA; 3) virus de la FA cultivado en células BHK, inactivado con AEI y emulsificado con adyuvante oleoso del PIADC, y 4) similar al número 3) pero emulsificado con el adyuvante oleoso del INTA (1, 2, 10).

En la segunda parte (II) que constituye la principal del estudio informado (9), fueron usadas tres vacunas trivalentes, como sigue: 1) Vacuna 1 - virus cultivado en células BHK, inactivado con AEI y emulsificado con adyuvante oleoso (fórmula de INTA) (2); 2) Vacuna 2 - virus cultivado como en 1), concentrado 100 veces por la técnica de polietilenglicol (13) y después reconstituido para contener aproximadamente la misma masa antigénica de la Vacuna 1; y 3) Vacuna 3 - virus procesado como la Vacuna 2, pero ajustado para contener 20 veces la masa antigénica de las Vacunas 1 y 2.

Pruebas de inocuidad

La infectividad de cada antígeno preparado en el PIADC fue probada inoculando la lengua de 6 novillos en 20 puntos con 0,1 ml del virus inactivado (8). Todos los antígenos y los productos finales fueron posteriormente probados en forma similar en Argentina antes de usar en la parte I y en el PIADC antes de usar en la parte II.

Pruebas de potencia

Los antígenos BHK preparados en el PIADC para la parte I fueron probados como vacunas monovalentes y trivalentes antes de su envío a la Argentina. Las vacunas monovalentes fueron inoculadas en 6 novillos y su inmunidad fue comprobada con virus homólogos a los 30 días postvacunación (DPV). Los mismos antígenos fueron usados

en la vacuna trivalente y una dosis de 5 ml de esta vacuna fue inoculada en cada uno de los 6 novillos y la inmunidad fue comprobada a los 30 DPV.

En Argentina se realizó una prueba de potencia a los 30 días con las vacunas 1, 2, 3 y 4. Con cada vacuna se inocularon 27 novillos y estos animales, totalizando 108, y los controles fueron mantenidos en una estación de aislamiento en Puesto Larralde en la Península Valdés.

En la prueba de potencia de la parte II, 12 novillos fueron inoculados por vía subcutánea, con una dosis de 5 ml, utilizando 4 novillos para cada vacuna - 1, 2 y 3. Fue determinada la dosis protectora 50% bovino para el virus O de las vacunas 1 y 2 (9).

Vacunación

Para el estudio (II) fueron seleccionados 371 novillos entre 1 y 2 años de edad procedentes de Chubut, provincia meridional de Argentina, ubicada en el área libre de FA de la Patagonia, los cuales fueron transferidos para la estación de mantenimiento de bovinos en la Península Valdés. Los sueros de los novillos seleccionados fueron examinados en el INTA para comprobar la presencia de anticuerpos de la FA por la prueba de seroprotección (5). Fueron seleccionados para usar en este estudio aquellos con un índice de seroneutralización menor que uno. Se formaron 4 grupos de 52 animales cada uno, un grupo para cada una de las 3 vacunas y un grupo de controles sin vacunar. Cada grupo de 52 animales fue escogido de 371 animales por el método de selección al azar en un computador (9).

Serología

Se extrajeron muestras de sangre de los animales vacunados y los controles a 0, 30, 60, 120, 180, 240, 300, 365, 455 y 545 DPV. Los sueros fueron examinados en el PIADC para comprobar anticuerpos contra los tipos O, A y C del virus de la FA de acuerdo con varias técnicas serológicas, incluyendo la inmunodifusión radial (4), microneutralización (14), reducción de placas (3), DP₅₀ ratón (6) y prueba de seroprotección en ratón lactante (5).

Los valores obtenidos para las 5 pruebas frente al virus de FA (9), se analizaron junto con los resultados de comprobación de inmunidad. De

acuerdo con este análisis, las pruebas que indicaron con más efectividad cuales eran los animales protegidos y los no protegidos fueron la seroprotección y la DP_{50} en ratón lactante.

Comprobación de inmunidad

En los estudios de potencia realizados en la Argentina (inicial, parte I), los novillos se transportaron en camión desde la Península Valdés a Buenos Aires, donde fueron divididos en 3 grupos y colocados en establos aislados, distribuidos de acuerdo con el tipo de virus (O, A y C) para ser usados en la prueba de inmunidad. Cada grupo, incluyendo los controles, consistió de 9 animales seleccionados al azar de los diferentes grupos de vacuna. La descarga de virus se hizo con epitelio lingual bovino refrescado en bovino dentro de un período de 60 días y recientemente titulado en ratones. La dosis de virus de descarga fue de 10.000 DL_{50} ratón contenida en 1 ml e inoculada por vía intradermolingual en 4 puntos de la lengua infectando 0,25 ml por punto. A las 48 horas de la descarga, los animales control de cada grupo fueron examinados, para comprobar si la dosis de virus de descarga era efectiva, colectándose tejidos para tipificación por fijación del complemento (FC) para comprobar si la infección fue causada por el virus de descarga. Todos los animales fueron examinados a los 5 y 10 días después de la

descarga y los resultados finales fueron resumidos.

En el estudio principal (II), cada grupo de novillos vacunados se dividió en 3 grupos de 16 animales cada uno, por selección al azar en un computador. Cuatro animales sobrantes en cada grupo de 52 constituyeron los reemplazantes de los animales que morían o eran lesionados. La inmunidad de todos los grupos fue comprobada por exposición al virus A de la FA, de la siguiente manera: un grupo a los 6 meses, un grupo a los 12 meses, y un grupo revacunado a los 6 meses y comprobado 12 meses después.

RESULTADOS

Prueba de protección

Todos los antígenos y muestras de vacuna del estudio inicial (I) y del estudio principal (II) demostraron ser inocuas para los novillos inoculados.

Pruebas de potencia

Los resultados de la comprobación de inmunidad obtenidos en el estudio I se presentan en la Tabla 1.

En el estudio II, 1 de 4 novillos inoculados con la Vacuna 1 desarrolló una lesión secundaria en la encía; los novillos inoculados con las Vacunas 2 y 3 fueron más resistentes a la infección.

TABLA 1. Resultados del estudio inicial, cantidad de animales protegidos con la descarga, infectados con virus O, A y C de la FA a los 30 días postvacunación

Descarga Tipo virus FA	Vacunas				Controles
	Frenkel, Al(OH) ₃ y saponina	Frenkel, INTA aceite	BHK, PIADC aceite	BHK, INTA aceite	
O	9/9 ^a	1/9	6/9	3/8	0/9
A	9/9	3/9	5/9	5/9	0/9
C	9/9	7/9	8/9	9/9	1/9

^aCódigo: Numerador, número de animales protegidos; denominador, número de animales descargados.

Serología

Los análisis de anticuerpos de los sueros de los novillos (parte I) fueron realizados por la prueba de seroneutralización en cultivo celular y presentados como índices de neutralización (Tabla 2).

TABLA 2. Índices de neutralización de sueros bovinos del estudio I frente a los virus A₂₄, A₂₄₋₂₅ y A₂₅ de la FA

Vacunas	Índices con virus de la FA ^a		
	A ₂₄	A ₂₄₋₂₅	A ₂₅
Frenkel, AI (OH)3 y saponina	3,32	2,02	1,73
Frenkel, INTA aceite	1,01	1,78	1,27
BHK, PIADC aceite	3,86	0,62	0,73
BHK, INTA aceite	4,04	1,42	0,45

^aA₂₄ = virus cultivado en células BHK; A₂₄₋₂₅ = virus cultivados en cultivos Frenkel.

Los títulos de los sueros frente al virus A obtenidos por las 5 técnicas (parte II), así como los resultados de comprobación de la inmunidad, se estudiaron por análisis discriminador.

Los resultados del análisis y de los datos para los 3 grupos de comprobación de inmunidad por descarga a los 180, 365 y 545 DPV indicaron que la prueba de seroprotección fue la más efectiva para determinar los animales protegidos y los no protegidos.

Con los mismos datos, examinados por las 5 técnicas serológicas pero que incluían un adicional de 34 animales que no fueron analizados por radioinmunodifusión, la prueba DP₅₀ en ratones lactantes pareció ser la más efectiva.

Inmunidad

Los resultados de la comprobación de inmunidad por descarga de los animales (parte II) se presentan en la Tabla 3.

En general, aunque todos los grupos tenían una

protección considerable cuando su inmunidad fue comprobada frente al virus A de la FA, hubo poca diferencia entre las vacunas, tiempo de exposición y los resultados de revacunación.

Los resultados de los datos de la descarga fueron examinados por la técnica de Chi cuadrado para comparar las vacunas, la duración de la inmunidad y el posible comportamiento diferencial de las vacunas durante el tiempo estipulado o los períodos de protección bajo diferentes vacunas. No hubo valores Chi cuadrado significativos. En animales primovacunados la inmunidad a los 12 meses fue igual que a los 6 meses. En animales revacunados a los 6 meses, la inmunidad a los 12 meses también fue igual que a los 12 meses en animales primovacunados. La respuesta de las vacunas no cambió durante el tiempo de observación, así como tampoco la inmunidad de las vacunas varió a diferentes tiempos. Las vacunas protegieron contra el virus de la FA por lo menos 1 año, a cerca de tres cuartas partes de los novillos vacunados.

TABLA 3. Resultados de la comprobación de inmunidad con el virus A de la FA

Vacuna N° ^a	Días postvacunación			Total
	180	365	545 ^b	
1	13/16 ^c	11/16	9/16	33/48
2 (1X)	12/16	10/16	13/16	35/48
3 (20X)	15/16	13/16	11/16	39/48
Total	40/48	34/48	33/48	107/144

^aVacuna N° 1, virus cultivado en células BHK (no concentrada); vacuna N° 2, virus cultivado en células BHK, concentrada 100 veces y reconstituida para contener la misma masa antigénica que la N° 1; vacuna N° 3, virus igual a la N° 2, pero ajustada para contener 20 veces la masa antigénica de la N° 1 y N° 2.

^bRevacunados a los 180 días después de la vacunación inicial.

^cCódigo: Numerador, número de animales protegidos; denominador, número de animales descargados.

DISCUSION

En el estudio I, los mejores resultados se obtuvieron con vacuna producida en cultivos Frenkel y combinada con hidróxido de aluminio y adyuvante de saponina (Tablas 1 y 2). Todos los novillos vacunados con esta vacuna estaban protegidos cuando su inmunidad fue comprobada a los 30 DPV. Bajo las condiciones del estudio, todos los animales estaban completamente protegidos frente a los virus O, A y C de la FA.

Las vacunas preparadas de antígenos cultivados en cultivos BHK, inactivados con AEI y emulsificados con adyuvantes oleosos (fórmulas PIADC e INTA) protegieron 67% y 63% respectivamente de los animales en prueba.

La vacuna preparada de los antígenos de cultivos Frenkel, inactivados con formaldehído y emulsificados con aceite (INTA), protegieron sólo 42% de los novillos y produjeron la respuesta más pobre de las cuatro vacunas.

Antes de la comprobación de inmunidad del estudio I, pruebas de FC llevadas a cabo en el CPFA e INTA indicaron que el virus de la FA usado para el antígeno A en las vacunas de Frenkel incluían 2 cepas del virus A, el A₂₄ y el A₂₅. La información del CPFA indicó que el antígeno A en ambas vacunas BHK fue el A₂₄ y que no incluía el A₂₅ como en las vacunas preparadas con los antígenos Frenkel. La media de los índices de neutralización para las 4 vacunas, obtenida con cada uno de los 3 tipos de virus, aparece en la Tabla 2. Para el virus tipo A₂₄, la media de los índices de protección de las dos vacunas BHK (que fueron uniformemente altos y muy similares) fue significativamente más alta que aquella presentada por las 2 vacunas Frenkel.

El efecto real de la descarga con virus A₂₄ de la FA que contenía A₂₅ es bastante difícil de determinar. Sin embargo, Graves *et al.* (7) informaron que la inmunidad depende mucho del parentesco del subtipo de virus usado para la exposición, con el usado en la preparación de la vacuna. Posiblemente, la protección más pobre dada por los antígenos BHK, que contenían sólo virus A₂₄ de la FA, estuvo relacionada con la descarga de virus que contenía los subtipos A₂₄₋₂₅ de la FA.

En el estudio II, las reacciones que aparecieron

en los sitios de vacunación, particularmente cuando los animales eran revacunados, fueron severas pero desaparecieron alrededor de los 30 días. La inmunidad de los novillos fue comprobada frente al virus A; sin embargo, de acuerdo con la cantidad de anticuerpos detectados por los diferentes métodos, se puede suponer que la prueba tuvo un éxito razonable para 2 de los 3 tipos de virus ensayados (A y C). La respuesta de anticuerpos obtenida con el virus O, con excepción de la prueba de potencia, fue decepcionante (9). Se puede especular que este virus es más sensible y frágil que los tipos A y C y de esta forma no permanece estable en la vacuna emulsificada.

Los resultados de la descarga a los 6 meses después de la vacunación, 12 meses después de la vacunación, y 12 meses después de la revacunación (a los 6 meses) fueron ligeramente diferentes, indicando que es necesario realizar otros estudios para determinar el tiempo óptimo de revacunación con tales productos.

La respuesta obtenida con las 3 vacunas en el estudio II fue muy similar. La vacuna concentrada 20 veces no produjo una mayor respuesta de anticuerpos ni un mayor grado de protección que la vacuna cruda o la de concentración 1X.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la asistencia técnica del personal del INTA y del PIADC. También agradecen a E. Fred Schultz, Jr., Estadístico, Equipo de Análisis de Programas y Coordinación, y a John G. Phillips, Consultor en Estadística, Investigación Federal, Administración de Ciencia y Educación, USDA, por el análisis de los datos serológicos e inmunológicos.

REFERENCIAS

1. ABREU MARTINS, I. Vacunas antiaftosas hidróxido-saponinadas inactivadas por el formol. *Bltn Centro Panamericano de Fiebre Aftosa* 1: 1-19, 1971.

2. ADLER, E.; MURILLO, P.A.; RIVENSON, S. Vacunas oleosas. Preparación de una emulsión estable tipo "agua en aceite". *Revta Invest. Agrop.*; INTA, Buenos Aires, Rep. Argentina. Serie 4 Patología Animal, 3: 1-14, 1966.
3. BACHRACH, H.L.; CALLIS, J.J.; HESS, W.R.; PATTY, R.E. A plaque assay for foot-and-mouth disease virus and kinetics of virus reproduction. *Virology* 4: 224-236, 1957.
4. COWAN, K.M.; WAGNER, G.G. Immunochemical studies of foot-and-mouth disease. VIII. Detection and quantitation of antibodies by radial immunodiffusion. *J. Immun.* 105: 557-566, 1970.
5. CUNHA, R.G.; BAPTISTA, Jr. J.A.; SERRÃO, U.M.; TORTURELLA, I. El uso de los ratones lactantes en la evaluación de los anticuerpos contra el virus de la fiebre aftosa y su significación inmunológica. *Gac. vet.*, B. Aires 19 (110): 243-267, 1957.
6. CUNLIFFE, H.R.; GRAVES, J.H. Formalin-treated foot-and-mouth disease virus: Comparison of two adjuvants in cattle. *Can. J. comp. Med. vet. Sci.* 27: 193-196, 1963.
7. GRAVES, J.H.; McKERCHER, P.D.; CALLIS, J.J. Foot-and-mouth disease vaccine: Influence of the vaccine virus subtype on neutralizing antibody and resistance to disease. *Am. J. Vet. Res.* 33: 765-768, 1972.
8. HENDERSON, W.M. Significance of tests for non-infectivity of foot-and-mouth disease vaccines. *J. Hyg. (Camb.)* 50: 182-194, 1952.
9. INSTITUTO NACIONAL DE TECNOLOGIA AGROPECUARIA; PLUM ISLAND ANIMAL DISEASE CENTER. Foot-and-mouth disease: A vaccine study. Int. Symp. on Foot-and-Mouth Disease, Lyon 1976. *Develop. Biol. Standard.* 35: 123-133, 1977.
10. McKERCHER, P.D.; GIORDANO, A.R. Immune response of steers inoculated with chemically-treated foot-and-mouth disease virus preparations previously studied in swine. *Arch. ges. Virusforsch.* 20: 190-197, 1967.
11. PLUM ISLAND ANIMALS DISEASE CENTER; PAN AMERICAN FOOT-AND-MOUTH DISEASE CENTER. Foot-and-mouth disease vaccines. II. Studies on the duration of immunity in cattle and pigs. *Bltn Centro Panamericano Fiebre Aftosa* 19-20: 24-30, 1975.
12. RIVENSON, S.; IBARRA, O.; GAGGINO, O. P.; LAPORTE, O.; GARCIA OLANO, H.; PIZZI, J.C.; MARANGUNICH, L. Oily vaccines in immunity to foot-and-mouth disease. Presented at the World Meat Congress held in Buenos Aires, Argentina, August 3-6, 1976.
13. WAGNER, G.G.; CARD, J.L.; COWAN, K.M. Immunochemical studies of foot-and-mouth disease. VII. Characterization of foot-and-mouth disease virus concentrated by polyethylene glycol precipitation. *Arch. ges. Virusforsch.* 30: 343-352, 1970.
14. WAGNER, G.G.; McVICAR, J.W. Foot-and-mouth disease virus antibodies: Comparison of a tissue culture microneutralization test with the assay in suckling mice. *Appl. Microbiol.* 20: 995-997, 1970.

OIL ADJUVANTED FOOT-AND-MOUTH DISEASE VACCINE: A COOPERATIVE STUDY

*Argentina (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria [INTA])¹
and the
United States (Plum Island Animal Disease Center [PIADC])²*

ABSTRACT

A summation of cooperative studies on foot-and-mouth disease virus vaccines between the Argentine Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), the Pan American Foot-and-Mouth Disease Center, Brazil, and the United States Plum Island Animal Disease Center, is presented. These studies involve the immune response obtained in steers from (1) Frenkel virus vaccines prepared in oil and aluminum hydroxide adjuvants. When the immunity of the steers was challenged at 30 days, the Frenkel vaccine adjuvanted with aluminum hydroxide and saponin gave the best protection. In the major study (11), the response of steers from 3 BHK produced virus vaccines emulsified with oil adjuvant was studied. The three vaccines were prepared: one in which the virus was used in the concentration in which it was harvested; the other two from virus which was concentrated 100-fold by the polyethylene-glycol technique and then diluted to a 20X and 1X concentration. The antibody response and protection afforded by the 3 vaccines were similar. It was concluded that animals in the three groups were afforded similar

protection when their immunity was challenged, indicating that these differing concentrations of antigen provided no significant difference in protection.

INTRODUCTION

A summation of results obtained in cooperative studies on foot-and-mouth disease virus (FMDV) vaccines conducted in Argentina by the Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), the Pan American Foot-and-Mouth Disease Center (PAFMDC), Brazil, and the United States Plum Island Animal Disease Center (PIADC) over a period of several years (1968-1975) is reported (9, 11, 12). In this report, the immune response of oil adjuvant and aluminum hydroxide vaccines in cattle (part I), and the immune response after vaccination and revaccination with an FMD vaccine emulsified with oil adjuvant (part II) are evaluated. In the preliminary studies workers compared results of vaccines in which the viruses used for antigen were grown in baby hamster kidney (BHK) cells, inactivated with acetylethyleneimine (AEI) and emulsified with oil adjuvant (PIADC and INTA) and vaccines in which the virus used as antigen was grown in Frenkel cultures, inactivated with formaldehyde and combined with aluminum hydroxide and saponin adjuvant. The vaccinated cattle were kept at a holding unit in the Valdés Peninsula, Chubut Province, Argentina.

MATERIALS AND METHODS

Selection of strains of FMDV

On the advice of representatives of the Pan American Foot-and-Mouth Disease Center, the strains of FMDV subtype O₁ Caseros, subtype A₂₄ strain Cruzeiro, and subtype C₃ Resende selected for the vaccine preparation were the same as those previously reported (9, 11).

¹S. Rivenson; O. Ibarra; O.P. Gaggino; O. Laporte; H. García Olano; J.C. Pizzi; L. Marangunich. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Servicio Nacional de Programación y Evaluación Técnica, San José 151, 2° Piso, Buenos Aires, Argentina.

²J.J. Callis; P.D. McKercher; J.H. Graves; H.L. Bachrach; K.M. Cowan; H.R. Cunliffe. USDA, Science and Education Administration, Federal Research, Plum Island Animal Disease Center, P.O. Box 848, Greenport, New York 11944, U.S.A.

"Mention of a trademark or proprietary product does not constitute a guarantee or warranty of the product by the U.S. Department of Agriculture, and does not imply its approval to the exclusion of other products that may also be suitable."

Vaccines

Four trivalent vaccines were prepared for the initial part (I) of these studies: 1) FMDV grown in Frenkel cultures, inactivated with formaldehyde and combined with aluminum hydroxide saponin adjuvant; 2) FMDV grown as in 1) but combined with INTA oil formulation; 3) FMDV grown in BHK cell cultures, inactivated with AEI and emulsified with PIADC oil adjuvant; and 4) similar to 3) but emulsified with the INTA oil adjuvant (1, 2, 10).

Three trivalent vaccines were used in II, the second major part of the study as reported (9) and consisted of: 1) Vaccine 1 - virus grown in BHK cells, inactivated with AEI and emulsified with oil adjuvant (INTA formulation) (2); 2) Vaccine 2 - virus grown as above, concentrated 100-fold by the polyethylene glycol technique (13) and then reconstituted to contain approximately the same antigen mass as Vaccine 1; and 3) Vaccine 3 - virus processed as in Vaccine 2, but adjusted to contain 20-fold the antigenic mass as Vaccines 1 and 2.

Safety testing

The infectivity of each antigen prepared at PIADC was tested by inoculating the tongues of each of 6 steers at 20 sites with 0.1 ml of the inactivated virus (8). All antigens and final products were further tested in a similar manner in Argentina before use in part I and at PIADC before use in part II.

Potency tests

The BHK antigens prepared at PIADC for part I were tested as monovalent and trivalent vaccines before their transportation to Argentina. The monovalent vaccines were each inoculated into 6 steers whose immunity was challenged at 30 days postvaccination (DPV) with their homologous viruses. The same antigens were formulated into a trivalent vaccine, and a 5-ml dose of this vaccine was inoculated into each of 6 steers whose immunity was also challenged at 30 DPV.

In Argentina, a 30-day potency test was conducted with each vaccine--1, 2, 3 and 4. Twenty-

seven steers were inoculated with each vaccine, and these animals, totalling 108, with controls were kept in the isolation station at Puesto Larralde in Peninsula Valdés.

In the potency test for II, the second part of the study, 12 steers were inoculated subcutaneously, each with a 5-ml dose of vaccine, 4 steers were used with each vaccine--1, 2 and 3. A 50% bovine protective dose for O virus was determined for Vaccines 1 and 2 (9).

Vaccination

A total of 371 steers between 1 and 2 years old were selected for the study (II). They were from Chubut, the southern province of Argentina, situated in the FMD-free area of Patagonia, and were transferred to the cattle holding station in the Valdés Peninsula. Serums from the selected steers were examined for FMD antibodies at INTA by the mouse protection test (5). Only those with a serum-neutralizing index of less than 1 were selected for use in the study. They were divided into groups of 52--a group of 52 animals for each of the 3 vaccines and a group of 52 as nonvaccinated controls. Each group of 52 animals was selected from the 371 animals by pseudo random number selection on a computer (9).

Serology

Blood samples were collected from these vaccinated animals and appropriate control animals at 0, 30, 60, 120, 180, 240, 300, 365, 455 and 545 DPV. Serums were assayed for FMDV O, A and C antibodies at PIADC by a variety of serological techniques, including radial immunodiffusion (4), microneutralization (14), plaque reduction (3), mouse PD_{50} (6) and serum protection test in suckling mice (5).

The bioassay values against FMDV A for the 5 assay techniques (9), in conjunction with the results of immunity, were analyzed by stepwise linear discriminant analysis. With analysis, the assay techniques that most effectively discriminated between protected and unprotected animals were the mouse protection and the PD_{50} test in suckling mice.

Challenge of immunity

The steers in the potency study conducted in Argentina (initial, part I) were transported by truck from the Valdés Peninsula to Buenos Aires, divided into 3 groups and kept in isolation barns designated for the appropriate virus type (O, A or C) to be used in the challenge of immunity. Each group, including the control group, consisted of 9 randomly selected animals from the different vaccine groups. The challenge virus consisted of bovine tongue epithelium passaged in the bovine within 60 days, and recently titrated in mice. The dose of challenge virus consisted of 10,000 mouse LD₅₀ contained in a 1-ml volume and inoculated at 4 sites in the tongue intradermalingually, 0.25 ml/site. At 48 hours postchallenge, the control animals from each group were examined to assure that the challenge dose of virus was effective, and tissue was collected for complement-fixation (CF) typing to ascertain that the infection was caused by the correct challenge virus. All animals were examined at 5 and 10 days postchallenge, and final results were summarized.

In the major study (II), each vaccinated group of steers was divided into 3 groups of 16 animals each by random number selection on a computer. Four spare animals in each group of 52 constituted

replacements for animals which died or were injured. The immunity of all groups was challenged by exposure to FMDV A as follows: one group at 6 months, one group at 12 months, and one group revaccinated at 6 months and challenged 12 months later.

RESULTS

Safety test

All antigens and vaccine samples from the initial study (I) and the major study (II) proved innocuous to the inoculated steers.

Potency tests

The results of the challenge of immunity obtained in study I are presented in Table 1.

In study II, 1 of 4 steers inoculated with Vaccine 1 developed one secondary lesion on the gum; the steers inoculated with Vaccines 2 and 3 were resistant to infection.

Serology

The antibody assays of the steer serums (part I) were measured by a seroneutralization test in tissue culture and recorded as neutralization indices (Table 2).

TABLE 1. *Initial study results, portion of animals protected from challenge, infected with O, A and C FMDV at 30 days postvaccination*

Challenge FMDV type	Vaccines				Controls
	Frenkel, Al(OH) ₃ & saponin	Frenkel, INTA oil	BHK, PIADC oil	BHK, INTA oil	
O	9/9 ^a	1/9	6/9	3/8	0/9
A	9/9	3/9	5/9	5/9	0/9
C	9/9	7/9	8/9	9/9	1/9

^aCode: Numerator, number of animals protected; denominator, number of animals challenged.

TABLE 2. Neutralizing indices of bovine serums from study I against A₂₄, A₂₄₋₂₅ and A₂₅ FMDV

Vaccines	Index with FMDV ^a		
	A ₂₄	A ₂₄₋₂₅	A ₂₅
Frenkel, Al (OH) ₃ and saponin	3.32	2.02	1.73
Frenkel, INTA oil	1.01	1.78	1.27
BHK, PIADC oil	3.86	0.62	0.73
BHK, INTA oil	4.04	1.42	0.45

^aA₂₄ = virus grown in BHK cells; A₂₄₋₂₅ = viruses grown in Frenkel cultures.

The titers of the serums against A by the 5 techniques (part II), in conjunction with the results of the challenge of immunity, were analyzed by discriminant analysis.

The results of the analysis of the data for the 3 challenge-of-immunity groups at 180, 365 and 545 DPV indicate that the mouse protection test was the most effective discriminator between the protected and unprotected animals.

With the same data, which were tested by the 5 serological techniques but including an additional 34 animals that were not assayed by radio-immunodiffusion, the PD₅₀ test in suckling mice appeared to be the most effective discriminator.

Immunity

The results of the challenge of immunity of the animals (part II) are shown in Table 3.

In general, although all groups had considerable protection when their immunity was challenged with FMDV A, there was little difference between vaccines, time of exposure and results of revaccination.

The results of the challenge data were examined by Chi-square techniques in comparing vaccines, duration of immunity and possible differential behavior of the vaccines over time or the holding periods under different vaccines. No Chi-square value approached significance. Immunity was the same at 12 months as at 6 months and was the same after revaccination at 6 months and holding

for an additional 12 months as at 12 months. The response to the vaccines over time did not change nor did the immunity at different times differ among vaccines. The vaccines protected against FMDV in about three-fourths of vaccinated steers for at least 1 year.

DISCUSSION

In study I, the best results were obtained with vaccine produced from Frenkel cultures and combined with aluminum hydroxide and saponin adjuvant (Tables 1 and 2). All the steers vaccinated with this vaccine were protected when their immunity was challenged at 30 DPV. Under the conditions of the study, these animals were completely protected against FMDV, types O, A and C.

The vaccines prepared from antigens grown in BHK cultures, inactivated with AEI and emulsified with oil adjuvants (PIADC and INTA formulations) protected 67% and 63% respectively, of the test animals.

The vaccine prepared from the antigens grown in Frenkel cultures, inactivated with formaldehyde and emulsified with oil (INTA) protected only 42% of the steers and produced the poorest response of the 4 vaccines.

TABLE 3. Results of challenge of immunity with FMDV A

Vaccine No. ^a	Days postvaccination			
	180	365	545 ^b	Total
1	13/16 ^c	11/16	9/16	33/48
2 (1X)	12/16	10/16	13/16	35/48
3 (20X)	15/16	13/16	11/16	39/48
Total	40/48	34/48	33/48	107/144

^a Vaccine No. 1, virus grown in BHK cells (not concentrated); vaccine No. 2, virus grown in BHK cells, concentrated 100-fold and reconstituted to contain the same antigen mass as No. 1; vaccine No. 3, virus as in No. 2, but adjusted to contain 20-fold the antigenic mass of No. 1 and No. 2.

^b Revaccinated at 180 days after initial vaccination.

^c Code: Numerator, number of animals protected; denominator, number of animals challenged.

Before the challenge of immunity of study I, CF tests at PAFMDC and at INTA indicated that the FMDV used for the A antigen in the Frenkel vaccines included 2 strains of A virus--A₂₄ and A₂₅. The information from PAFMDC indicated that the A antigen in both BHK vaccines was A₂₄ and did not include A₂₅ as in the vaccines made from the Frenkel antigens. The average neutralization indices for the 4 vaccines obtained with each of the 3 virus types are given in Table 2. With type A₂₄ virus, the average protection index of the 2 BHK vaccines (which were uniformly high and very similar) was significantly higher than that of either of the 2 Frenkel vaccines.

The actual effect of the challenge with FMDV A₂₄ that contained A₂₅ is rather difficult to determine. However, Graves *et al.* (7) reported that immunity is highly dependent on the relatedness of the subtype of the virus used for the exposure to that used to prepare the vaccine. Possibly, therefore, the poorer protection afforded by the BHK antigens, which contained only FMDV A₂₄, was related to the challenge virus which consisted of FMDV A₂₄₋₂₅.

In study II, reactions obtained at the sites of vaccination, particularly when the animals were revaccinated, were severe although they disappeared within 30 days. The immunity of the steers was challenged with A virus; however, from the antibody measurements as assayed by a number of different methods, one could assume that the test was reasonably successful for 2 of the 3 virus types tested--A and C. The antibody response obtained with the O virus with the exception of the potency test was disappointing (9). One could speculate that this virus is more sensitive and fragile than types A and C and thus did not remain as stable in the emulsified vaccine.

The results of the challenge of immunity at 6 months after vaccination, 12 months after vaccination, and 12 months after revaccination (at 6 months) were only slightly different, indicating that further studies to determine the optimal time of revaccination with such products are needed.

The response obtained with the 3 vaccines (part II) was very similar. The 20-fold concentrated vaccine did not produce a greater antibody

response nor any greater degree of protection than either the crude or the 1X vaccine.

ACKNOWLEDGMENTS

The technical assistance of the staff at both INTA and PIADC is acknowledged. We also thank E. Fred Schultz, Jr., Statistician, Program Analysis and Coordination Staff; and John G. Phillips, Consulting Statistician, Federal Research, Science and Education Administration, USDA, for their analysis of the serological and immunological data.

REFERENCES

1. ABREU MARTINS, I. Vacunas antiaftosas hidróxido-saponinadas inactivadas por el formol. *Bltn Centro Panamericano de Fiebre Aftosa 1*: 1-19, 1971.
2. ADLER, E.; MURILLO, P.A.; RIVENSON, S. Vacunas oleosas. Preparación de una emulsión estable tipo "agua en aceite". *Revta Invest. Agrop.*; INTA, Buenos Aires, Rep. Argentina. Serie 4 Patología Animal, 3: 1-14, 1966.
3. BACHRACH, H.L.; CALLIS, J.J.; HESS, W.R.; PATTY, R.E. A plaque assay for foot-and-mouth disease virus and kinetics of virus reproduction. *Virology 4*: 224-236, 1957.
4. COWAN, K.M.; WAGNER, G.G. Immunochemical studies of foot-and-mouth disease. VIII. Detection and quantitation of antibodies by radial immunodiffusion. *J. Immun.* 105: 567-566, 1970.
5. CUNHA, R.G.; BAPTISTA, Jr. J.A.; SERRÃO, U.M.; TORTURELLA, I. El uso de los ratones lactantes en la evaluación de los anticuerpos contra el virus de la fiebre aftosa y su significación inmunológica. *Gac. vet.*, B. Aires 19 (110): 243-267, 1957.
6. CUNLIFFE, H.R.; GRAVES, J.H. Formalin-treated foot-and-mouth disease virus: Comparison of two adjuvants in cattle. *Can. J. comp. Med. vet. Sci.* 27: 193-196, 1963.
7. GRAVES, J.H.; McKERCHER, P.D.; CALLIS, J.J. Foot-and-mouth disease vaccine: Influence of the vaccine virus subtype on neutralizing antibody and resistance to disease. *Am. J. Vet. Res.* 33: 765-768, 1972.

8. HENDERSON, W.M. Significance of tests for non-infectivity of foot-and-mouth disease vaccines. *J. Hyg. (Camb.)* 50: 182-194, 1952.
9. INSTITUTO NACIONAL DE TECNOLOGIA AGROPECUARIA; PLUM ISLAND ANIMAL DISEASE CENTER. Foot-and-mouth disease: A vaccine study. Int. Symp. on Foot-and-Mouth Disease, Lyon 1976. *Develop. Biol. Standard.* 35: 123-133, 1977.
10. McKERCHER, P.D.; GIORDANO, A.R. Immune response of steers inoculated with chemically-treated foot-and-mouth disease virus preparations previously studied in swine. *Arch. ges. Virusforsch.* 20: 190-197, 1967.
11. PLUM ISLAND ANIMAL DISEASE CENTER; PAN AMERICAN FOOT-AND-MOUTH DISEASE CENTER. Foot-and-mouth disease vaccines. II. Studies on the duration of immunity in cattle and pigs. *Bln Centro Panamericano Fiebre Aftosa* 19-20: 24-30, 1975.
12. RIVENSON, S.; IBARRA, O.; GAGGINO, O. P.; LAPORTE, O.; GARCIA OLANO, H.; PIZZI, J.C.; MARANGUNICH, L. Oily vaccines in immunity to foot-and-mouth disease. Presented at the World Meat Congress held in Buenos Aires, Argentina, August 3-6, 1976.
13. WAGNER, G.G.; CARD, J.L.; COWAN, K.M. Immunochemical studies of foot-and-mouth disease. VII. Characterization of foot-and-mouth disease virus concentrated by polyethylene glycol precipitation. *Arch. ges. Virusforsch.* 30: 343-352, 1970.
14. WAGNER, G.G.; McVICAR, J.W. Foot-and-mouth disease virus antibodies: Comparison of a tissue culture microneutralization test with the assay in suckling mice. *Appl. Microbiol.* 20: 995-997, 1970.

COMPARACION DE VACUNAS CON ADYUVANTE OLEOSO PREPARADAS CON ARLACEL A Y MONTANIDE 80

Ivo Gomes¹; P. Augé de Mello¹

COMUNICACION BREVE

Durante los últimos años se han hecho progresos importantes sobre la preparación y uso de vacunas de la fiebre aftosa con adyuvante oleoso (1), utilizando Markol 52² emulsificado en Arlachel A³ que es un monooleato de manitol.

Recientemente recibimos muestras de otro monooleato de manitol que se comercializa con el nombre de Montanide 80⁴ y que de acuerdo con las especificaciones del productor tiene las mismas características fisicoquímicas y grado de pureza para uso biológico que el Arlachel A.

Teniendo en cuenta que el Centro Panamericano de Fiebre Aftosa ha recibido la solicitud de varios laboratorios, interesados en una eventual producción industrial de este tipo de vacuna, para indicar fuentes alternativas de emulsificantes, nosotros comparamos ambos productos sobre su toxicidad usando la prueba de Berlin (2) y sobre su efecto coadyuvante en vacunas de fiebre aftosa utilizadas en ganado joven.

No se demostraron efectos tóxicos de Arlachel A y Montanide 80 para ratones adultos (2). No hubieron diferencias de peso durante un período de observación de 15 días en los grupos de ratones inoculados por vía intraperitoneal con los dos productos. En el examen postmortem no se encontró peritonitis ni otras anomalías.

Para este experimento se prepararon dos series de vacunas antiaftosas inactivadas (1) de una suspensión acuosa trivalente que contenía las cepas de virus de fiebre aftosa O₁ Campos, A₂₄ Cruzeiro y C₃ Resende emulsificadas con Arlachel A o con Montanide 80.

Se utilizaron dos grupos de 10 bovinos jóvenes de 8-15 meses. Estos animales no tenían historia de exposición al virus aftoso ni anticuerpos detectables. Un grupo fue vacunado con la serie que contenía el Arlachel A y el otro con la serie que contenía el Montanide 80. Ambas vacunas se aplicaron en dosis de 5 ml vía intramuscular en la tabla del cuello. Se tomaron muestras de suero antes de la vacunación y a intervalos de 30 días hasta 180 días postvacunación (DPV).

No se observaron efectos indeseables en el ganado vacunado.

La Tabla 1 presenta los niveles de anticuerpos circulantes determinados por el índice de seroprotección (ISP), expresados por la media aritmética de los índices y por las expectativas porcentuales de protección (EPP) según Gomes y Astudillo (3). No se presentaron diferencias significativas entre la respuesta de anticuerpos inducida por las vacunas que contenían Arlachel A o Montanide 80 a 30, 90 y 180 DPV para las cepas O₁ Campos y A₂₄ Cruzeiro. A los 90 DPV hubo diferencias significativas entre los dos grupos con relación a la respuesta a la cepa C₃ Resende, que probablemente no tendrían importancia práctica teniendo en cuenta que la diferencia no continuó a los 180 DPV.

Como en el presente experimento no se observaron efectos indeseables en las vacunas ensayadas de Arlachel A y Montanide 80 y la respuesta inmunitaria a largo plazo fue similar para las dos sustancias emulsificantes, ambas podrían ser usadas con éxito para la formulación de vacunas contra la fiebre aftosa de adyuvante oleoso.

¹Centro Panamericano de Fiebre Aftosa. Caixa Postal 589, ZC-00, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

²Exxon Corporation U.S.A. Humble Oil and Refining Co. Hutchinson River Parkway Pelham, N.Y. 10803 U.S.A.

³ICI America Inc. Atlas Chemicals Division, Sandria Corporation, Box 800, Norwalk Ct U.S.A. 06856.

⁴SEPPIC - Montanoir, 70 Champs Elyssées 75008 Paris, France.

TABLA 1. Niveles de anticuerpos circulantes postvacunales de bovinos que recibieron vacunas de la fiebre aftosa con adyuvante oleoso con Arlacial A o Montanide 80

Virus	Emulsificante	D P V ^a		
		30	90	180
O ₁	Arlacial A	4,0 ^b	3,68 ± 0,53	2,82 ± 0,83
		99 ^c	98 ± 1,9	91 ± 10,8
	Montanide 80	3,75 ± 0,63	3,57 ± 0,49	2,91 ± 1,07
		97 ± 5,7	98 ± 2,6	89 ± 16,2
A ₂₄	Arlacial A	3,84 ± 0,21	3,99 ± 0,02	3,83 ± 0,35
		99	99	99
	Montanide 80	3,39 ± 1,10	3,55 ± 0,88	3,92 ± 0,16
		92 ± 21,4	95 ± 21,4	99
C ₃	Arlacial A	3,57 ± 0,95	3,74 ± 0,54	1,38 ± 0,54
		94 ± 14	98 ± 26	64 ± 15,5
	Montanide 80	3,20 ± 0,86	1,77 ± 0,86	1,41 ± 0,68
		88 ± 24	71 ± 21	62 ± 15,2

^a Días postvacunación.

^b Límites de confianza al 95% de la media aritmética del ISP.

^c Expectativa porcentual de protección - calculado a 30 días postvacunación, según Gomes y Astudillo (3).

REFERENCIAS

1. 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 vaccine). *Bltn Centro Panamericano Fiebre Aftosa* 26: 23-25, 27-29, 1977.
2. BERLIN, B.S. *Annals of Allergy* 20: 472-479, 1962.
3. GOMES, I.; ASTUDILLO, V. Foot-and-mouth disease: evaluation of mouse protection test results in relation to cattle immunity. *Bltn Centro Panamericano Fiebre Aftosa* 17-18: 9-16, 1975.

COMPARISON OF OIL ADJUVANTED VACCINES PREPARED WITH ARLACEL A AND MONTANIDE 80

Ivo Gomes¹; P. Augé de Mello¹

BRIEF COMMUNICATION

In recent years important progress has been made regarding the preparation and use of oil adjuvanted foot-and-mouth disease (FMD) vaccines (1) using mineral oil Marcol 52² and emulsifier Arlacel A³ which is monooleate of manitol.

Recently, we received samples of another monooleate of manitol marketed under the name Montanide 80⁴ which according to the manufacturer's specifications has the same physical-chemical characteristics and degree of purity for biological use as Arlacel A.

Since the Pan American Foot-and-Mouth Disease Center has been requested by several laboratories interested in an eventual industrial production of this type of vaccine to indicate alternative sources of emulsifier we compared both products with regard to toxicity using the test of Berlin (2) and with regard to their co-adjuvant effect in FMD vaccines in young cattle.

Both Arlacel A and Montanide 80 proved non-toxic for adult mice (2). There was no difference in weight during a 15-day observation period with groups of mice inoculated intraperitoneally with the products. Also, at post-mortem examination there was no peritonitis or any abnormality.

For the present experiment 2 batches of inactivated FMD vaccine were prepared (1) from a trivalent aqueous suspension containing FMD strains O₁ Campos, A₂₄ Cruzeiro and C₃ Resende. Each batch was emulsified with Arlacel A or Montanide 80.

Two groups of 10 cattle 8-15 months old were used. These cattle had no previous history of exposure to the virus and were free of FMD antibodies. One group of cattle was vaccinated with the batch containing Arlacel, the other with the vaccine containing Montanide. Both vaccines were applied in 5-ml dose intramuscular at the side of the neck. Sera from the cattle were collected before vaccination and at 30-day intervals up to 180 days post-vaccination (DPV).

No undesirable side effects were observed in the vaccinated cattle.

Table 1 lists the levels of circulating antibody as determined by the mouse protection test and expressed as arithmetic means of the mouse protection indices (MPI) and the expected percentages of protection (EPP) according to Gomes and Astudillo (3). There were no significant differences between the antibody response induced by the vaccines containing Arlacel A or Montanide 80 at 30, 90 and 180 DPV for the strains O₁ Campos, and A₂₄ Cruzeiro. At 90 DPV a significant difference was observed between the 2 groups with regard to the response to strain C₃ Resende, which likely has no practical importance since the trend did not continue at 180 DPV.

Since there were not observed undesirable side effects of the two batches of Arlacel A and Montanide 80 tested, and since the long-term immune response was similar for the 2 emulsifying substances, both products could be successfully used for the formulation of oil adjuvanted FMD vaccine.

¹ Pan American Foot-and-Mouth Disease Center, Caixa Postal 589, ZC-00, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

² Exxon Corporation U.S.A. Humble Oil and Refining Co. Hutchinson River Parkway Pelham, N.Y. 10803 U.S.A.

³ ICI America Inc. Atlas Chemicals Division, Sandria Corporation, Box 800, Norwalk Ct U.S.A. 06856.

⁴ SEPPIC - Montanoir, 70 Champs Elyssées 75008 Paris, France.

TABLE 1. *Circulating antibody levels after vaccination of cattle with oil adjuvanted FMD vaccines containing Arlcel A or Montanide 80*

Virus	Emulsifier	DPV ^a		
		30	90	180
O ₁	Arlcel A	4.0 ^b 99 ^c	3.68 ± 0.53 98 ± 1.9	2.82 ± 0.83 91 ± 10.8
	Montanide 80	3.75 ± 0.63 97 ± 5.7	3.57 ± 0.49 98 ± 2.6	2.91 ± 1.07 89 ± 16.2
A ₂₄	Arlcel A	3.84 ± 0.21 99	3.99 ± 0.02 99	3.83 ± 0.35 99
	Montanide 80	3.39 ± 1.10 92 ± 21.4	3.55 ± 0.88 95 ± 21.4	3.92 ± 0.16 99
C ₃	Arlcel A	3.57 ± 0.95 94 ± 14	3.74 ± 0.54 98 ± 26	1.38 ± 0.54 64 ± 15.5
	Montanide 80	3.20 ± 0.86 88 ± 24	1.77 ± 0.86 71 ± 21	1.41 ± 0.68 62 ± 15.2

^a Days post-vaccination.

^b Confidence limits at 95% from the arithmetic mean of SPI.

^c Expected percentage of protection - calculated by Gomes and Astudillo (3) at 30 days after vaccination.

REFERENCES

1. 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 vaccine). *Bln Centro Panamericano Fiebre Aftosa* 26: 23-25, 27-29, 1977.
2. BERLIN, B.S. *Annals of Allergy* 20: 472-479, 1962.
3. GOMES, I.; ASTUDILLO, V. Foot-and-mouth disease: evaluation of mouse protection test results in relation to cattle immunity. *Bln Centro Panamericano Fiebre Aftosa* 17-18: 9-16, 1975.

EVALUACION DE ESTRATEGIAS ALTERNATIVAS PARA EL CONTROL DE LA FIEBRE AFTOSA EN PARAGUAY¹

Félix J. Rosenberg²; Vicente Astudillo²

RESUMEN

Todos los países sudamericanos están llevando a cabo programas nacionales de combate a la fiebre aftosa basados en una estrategia uniforme de vacunación sistemática y masiva. A partir de 1972 se inició por primera vez un programa piloto alternativo de combate a la enfermedad en un sector del Chaco paraguayo, basado en el estricto control de movimientos de animales susceptibles y eliminación de focos, prescindiendo de la vacunación sistemática y masiva a partir del segundo año de su ejecución. Durante el tercer año se firmó un convenio por el cual la comunidad ganadera se comprometía a contribuir con una cuota anual destinada a reforzar las medidas de vigilancia epidemiológica y a eventuales emergencias.

Durante los primeros 26 meses del programa no hubo evidencias de enfermedad en el área. Desde febrero de 1974 hasta diciembre de 1976 ocurrieron 3 brotes afectando un total de 1.839 bovinos sobre una población de 120.000 animales.

Se hizo una comparación entre la morbilidad observada (A) y la que sería de esperar según un modelo teórico alternativo que simuló lo que habría ocurrido si se hubiera aplicado una estrategia de vacunación masiva sistemática (B). Ambos efectos se relacionaron a un segundo modelo que consideró la ocurrencia de la enfermedad si no se hubiera tomado ninguna acción de control organizada (C). La morbilidad global obtenida fue de

1.839, 2.530 y 25.297 bovinos enfermos respectivamente para los modelos A, B y C.

Fueron estimadas las pérdidas directas debidas a la fiebre aftosa tomando como indicadores el atraso en el engorde, la disminución de producción de leche, la dificultad para la comercialización y las muertes. Se estimó una pérdida total de EUA\$ 19.005 para el período de estudio en el programa piloto. El modelo B arrojó una pérdida estimada en EUA\$ 3.092 y de acuerdo con el modelo C se habrían perdido 108.836 dólares.

Para la estimación de costos se tomó en cuenta apenas el aporte de la comunidad ganadera ya que los costos de operación de SENALFA fueron considerados fijos. Se estimaron en 102.720, 247.194 y 34.924 dólares respectivamente, los costos para los programas A, B y C.

Las relaciones costo-beneficio para los programas A y B fueron estimadas en relación con el modelo C, obteniéndose una relación de 1,21 para el programa realizado (A) y de 0,57 para el modelo B. Además de señalarse una clara diferencia a favor del modelo A se notó que la vacunación masiva cada 4 meses resulta una estrategia demasiado costosa en pequeñas áreas donde la enfermedad se presenta en forma esporádica.

Los resultados obtenidos refuerzan el concepto de estrategias regionales para el control de la fiebre aftosa recientemente propuesto.

INTRODUCCION

Los programas nacionales para el control de la fiebre aftosa (FA) en América del Sur comenzaron a organizarse en la década del 60. El primero en establecerse, en 1961, fue el de Argentina, seguido por Paraguay y Uruguay en 1968 y por el Brasil y Chile en 1970. En la actualidad todos los países sudamericanos están llevando a cabo programas nacionales, que cubren aproximadamente el 70% de la población bovina del continente.

¹ Este trabajo fue originalmente presentado en el Primer Simposio sobre Nuevas Técnicas en Epidemiología y Economía Veterinarias, Reading, Inglaterra, 12-15 de julio de 1976 y publicado en sus Anales, Ed. Ellis, Shaw, Stephens, págs. 181-194.

² Centro Panamericano de Fiebre Aftosa, OPS/OMS, Caixa Postal 589-ZC-00, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

La estrategia básica de estos programas consiste en una campaña de vacunación masiva y sistemática. Los bovinos mayores de 4 años de edad son vacunados cada 4 meses. Los movimientos de ganado, cualquiera sea su destino, son permitidos solamente con la presentación de un certificado de vacunación. Cuando se presenta un brote de fiebre aftosa, la campaña es intensificada mediante vacunaciones en anillo y aislamiento de los establecimientos afectados durante períodos que alcanzan hasta 30 días después del último caso clínico.

En Paraguay se sometió a prueba, por primera vez, un enfoque diferente para el combate de la fiebre aftosa, como una alternativa a las tradicionales campañas sistemáticas de vacunación de toda la población bovina del país.

Para tal efecto, se ejecutó un programa piloto en el centro de la región occidental, el Chaco paraguayo, elaborado teniendo en cuenta las diferencias epidemiológicas de distintos sectores. Este programa comenzó en enero de 1972 bajo la dirección del Servicio Nacional de Lucha contra la Fiebre Aftosa (SENALFA), con la cooperación técnica del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (CPFA).

DATOS HISTORICOS

El área piloto corresponde a una colonia Mennonita establecida hace unos 50 años por un grupo de inmigrantes procedentes de Europa y de Canadá. En la actualidad ocupan cerca de un millón de hectáreas (10.000 km²) localizadas aproximadamente unos 400 kilómetros al noroeste de Asunción, la capital de la República. El grupo está dividido en tres colonias, 145 aldeas y alrededor de 1.700 establecimientos con unos 160.000 bovinos.

Hasta 1971 no había en la región programa alguno de control de la FA. Ese año, en las colonias Mennonitas se presentó una epidemia de FA causada por un virus del subtipo O₁. En esa oportunidad, SENALFA, juntamente con el CPFA, decidieron llevar a cabo una encuesta epidemiológica retrospectiva en las colonias. Esta encuesta se realizó en agosto de 1971, abarcando del 70 al 80% de la población bovina de las aldeas, la cual arrojó los siguientes resultados: el 10% de las aldeas y el 46% de los establecimientos nunca habían te-

nido FA. Entre 1966 y 1970, del 2 al 4% de los establecimientos habían tenido la enfermedad anualmente. En 1966 y en 1969 aparentemente hubieron brotes epidémicos localizados. En la epidemia de 1971 se afectaron el 58% de las aldeas, el 27% de los establecimientos y el 17% de los bovinos.

Además, el 61% de los establecimientos encuestados declararon no haber vacunado jamás a sus animales; el 26% lo habían hecho en forma ocasional; mientras que sólo el 13% manifestaron haber vacunado sus animales contra la FA, con intervalos de un año.

Partiendo de estos datos básicos y analizando las condiciones ecológicas locales se sugirió que el virus de la FA no era endémico en la región y que los brotes fueron causados por la introducción del virus a la región de las colonias Mennonitas.

ESTRATEGIA Y EFECTOS DEL PROGRAMA PILOTO

Metas, actividades e implementación

Sobre la base de la premisa que la enfermedad no era autóctona en el área y considerando la sólida estructura comunitaria de los Mennonitas, se establecieron las siguientes metas para el programa piloto:

1. Evitar cualquier difusión ulterior del virus existente.
2. Evitar la introducción del virus de la FA en el área, a través de: a) vacunación masiva durante el primer año del programa (1972), realizada con personal oficial; b) estricto control de los movimientos de animales susceptibles; c) cuarentena de los animales introducidos al área de las colonias; d) activa vigilancia epidemiológica destinada a la rápida detección de la enfermedad y seguimiento de la prevalencia de la infección; e) participación activa de la comunidad en todos los niveles de la campaña; f) eliminación de focos; y g) vacunación tampón en áreas adyacentes.

Como no pudo implementarse el punto g), durante 1973, se decidió reiniciar la campaña de vacunación masiva en el área. Sin embargo, solamente se completó un ciclo de vacunación (noviembre de 1973).

Para una mejor implementación del programa piloto, en septiembre de 1974 se firmó un convenio entre SENALFA y las colonias Mennonitas. Uno de los puntos principales del convenio era la participación conjunta de SENALFA y de las colonias para sufragar los costos del programa. Como en el área no se llevaban a cabo vacunaciones en gran escala, los colonos admitieron pagar una cuota anual equivalente al 70% del precio de tres dosis de vacuna por cabeza de bovino adulto y la mitad de esa suma por cada ternero menor de 4 meses. La mitad de la suma total anual debía ser aplicada a los costos fijos del programa, tales como personal adicional para la vigilancia epidemiológica, gasolina y control de los movimientos de ganado en áreas adyacentes al área piloto. El 50% restante debía ser guardado en reserva para actividades de emergencia en los focos, tales como sacrificio o vacunaciones en anillo, o ambas medidas. Si no ocurrían brotes, este fondo sería utilizado en otras actividades no relacionadas a FA, destinadas a mejorar la salud animal general en el área.

Efectos del programa sobre la enfermedad

En julio de 1973 (18 meses después de iniciado el programa piloto) se llevó a cabo una encuesta serológica para determinar las tasas de prevalencia de la infección, utilizando la prueba de anticuerpos V/A (1). Los resultados sugirieron que los terneros nacidos después del brote de 1971 no habían sido infectados, lo cual evidenció un primer éxito del programa piloto en controlar la diseminación del virus. El área permaneció libre de enfermedad clínica por 26 meses (enero de 1972 a febrero de 1974).

A fines de febrero de 1974 comenzaron a registrarse casos de FA en la zona sur del área del programa piloto. El virus fue probablemente introducido en las colonias Mennonitas por contacto con bovinos de establecimientos adyacentes, los que a su vez habían sido infectados por animales introducidos de otras regiones en las cuales estaba ocurriendo una extensa epidemia ocasionada por virus del tipo C.

En el lapso de 8 semanas, el número de bovinos enfermos en las colonias alcanzó la cifra de 112,

localizados en 10 aldeas a lo largo del límite sudeste de las colonias. La estrategia de control fue la vacunación en anillo que cubrió 33.000 bovinos, o sea aproximadamente una cuarta parte del total de la población de las colonias. Todo el sector afectado fue mantenido en estricto aislamiento hasta la desaparición total del brote.

En julio de 1975, un nuevo brote de la enfermedad fue detectado en la zona central de las colonias y se diagnosticó virus del tipo C. El brote afectó un solo establecimiento, que tenía 55 cabezas bovinas y de las cuales enfermaron 20. Aun cuando no pudo determinarse el origen del foco, se observó la coincidencia con el sacrificio de un cerdo salvaje en el local unos días antes de la aparición del primer caso.

En diciembre de 1975 se presentaron brotes simultáneos en varios lugares de las colonias, sin que pudiera establecerse relación con animales introducidos, previa cuarentena. Hasta abril de 1976 se vieron afectados 35 establecimientos con un total de 1.704 bovinos. En todos los episodios se identificó virus de tipo O. Aun cuando la enfermedad tuvo una diseminación relativamente amplia, quizá por el efecto de múltiples fuentes primarias de infección, se controló sin que se observaran los padrones epidémicos típicos (Figura 1).

La Tabla 1 resume la ocurrencia de FA desde la iniciación del programa piloto, 1972 a 1976.

EFFECTOS COMPARATIVOS DE LAS ESTRATEGIAS ALTERNATIVAS

Morbilidad

Los tres tipos del virus de la FA presentes en Sudamérica tienen características epidemiológicas propias (2). El virus de tipo O parece tener ciclos epidémicos que se presentan cada 4-5 años, probablemente relacionados con la vida media de la población bovina. El virus de tipo A, debido a su gran plasticidad, generalmente origina brotes epidémicos irregulares, tanto en el tiempo como en el espacio. Finalmente, el virus de tipo C ocasiona epidemias ampliamente difundidas y a intervalos bien largos, no predecibles, y permanece poco manifiesto en los períodos interepidémicos.

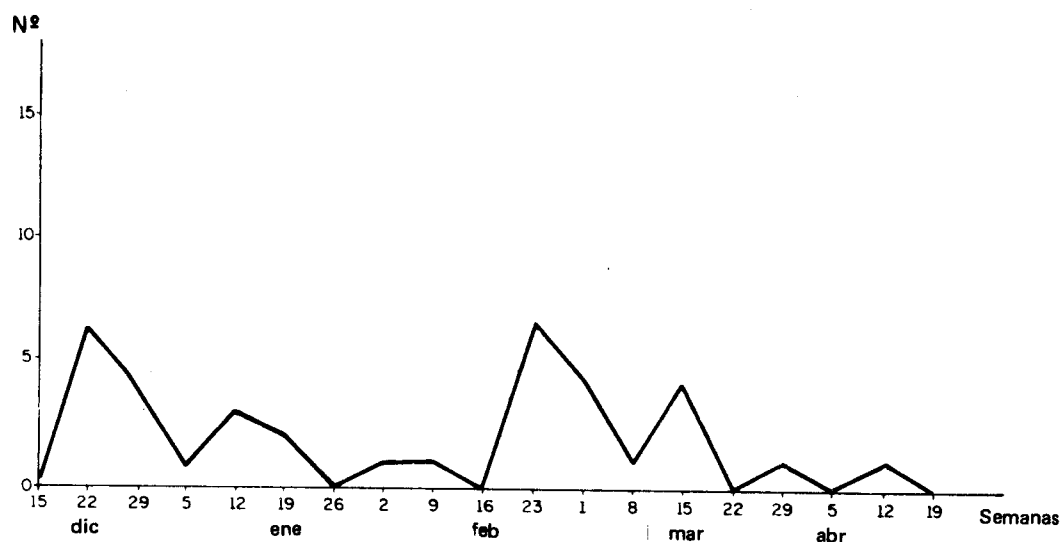


FIGURA 1. Número de brotes semanales. Colonias Mennonitas, Paraguay, 15 diciembre 1975-19 mayo 1976.

TABLA 1. Ocurrencia de fiebre aftosa. Colonias Mennonitas, Paraguay, junio 1972 - mayo 1976

Años	Aldeas			Establecimientos			Bovinos		
	Total	Afectados	%	Total	Afectados	%	Total	Afectados	$\times 10^3$
1972-1973	145	—	—	1.506	—	—	90.638	—	—
1973-1974	145	10	7	1.574	12	0,8	111.345	115	1
1974-1975	145	—	—	1.634	—	—	113.100	—	—
1975-1976	145	23	16	1.712	36	2,1	130.824	1.724	13

El comportamiento de la enfermedad en el área de las colonias Mennonitas no escapó a las características generales mencionadas precedentemente. Sin embargo, se debe destacar que el virus de la FA tipo A, nunca se comprobó en esa área.

La Figura 2 muestra los porcentajes de las aldeas y de los establecimientos afectados desde 1966 hasta mayo de 1976. Los ciclos de cinco

años mencionados para el virus O están representados por los picos que se observan en 1966, 1971 y 1976.

Las ondas epidémicas del virus C están reflejadas en los pequeños picos de 1969 y 1974. Se puede notar que aun cuando las características del período 1967-1971 se reproducen en el período 1972-1976, las tasas de este último son consistentemente más bajas.

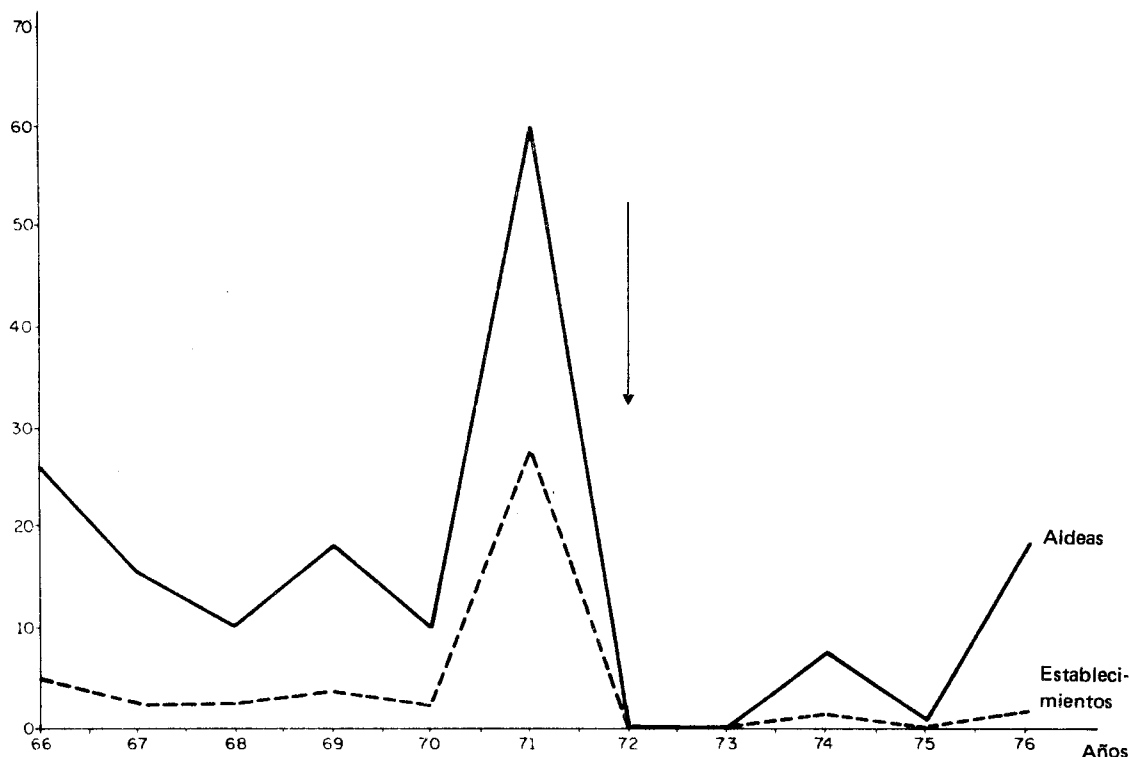


FIGURA 2. Porcentaje de aldeas y establecimientos afectados. Colonias Mennonitas, Paraguay, 1966-31 mayo 1976.

Con el objeto de evaluar los resultados de la estrategia del Programa Piloto, denominado Modelo A, se hizo una comparación con otros dos modelos estratégicos teóricos alternativos. El primero, Modelo B, simula lo que habría ocurrido si se hubiera aplicado una estrategia de vacunación masiva sistemática. El segundo, Modelo C, considera la ocurrencia de la enfermedad si no se hubiera tomado ninguna acción de control organizada, suponiendo que la curva de 1967-1971 se habría reproducido en el período 1972-1976.

Para simulación de la morbilidad en el Modelo B se admitieron las siguientes premisas: a) las características de la enfermedad, con respecto a su origen y difusión, no son afectadas por la vacunación masiva. Esta premisa se basa en las observaciones de campo que indican que un programa de vacunación no altera el padrón de las variaciones

estacionales y cíclicas. Recientes investigaciones sobre la patogenia del virus de la FA, que demuestran que los anticuerpos humorales no ejercen una influencia significativa en la replicación local del virus en la faringe de los animales infectados (3), parecen confirmar dichas observaciones de campo; b) la vacunación solamente influye sobre la protección frente a los síntomas clínicos. Se admite que las vacunas comerciales que se utilizan en Sudamérica protegen aproximadamente el 80% de los animales vacunados; c) fue seleccionada un área del oriente paraguayo donde se venía aplicando un programa de vacunación masiva cada 4 meses desde 1968. Teniendo en cuenta su similitud con las colonias Mennonitas se estimó que los efectos del brote de virus O de 1975-1976 podrían ser comparados. Se observó una tasa de morbilidad del 14 por mil, que representa alrededor del 8% de la tasa

de morbilidad observada en 1971 en las colonias Mennonitas; d) teniendo en cuenta las consideraciones precedentes se admitió que una vacunación masiva podría haber reducido en un 90% la morbilidad estimada en el Modelo C.

La Tabla 2 muestra una comparación estimada de la morbilidad para los Modelos A, B y C, basada en las premisas mencionadas anteriormente.

TABLA 2. Morbilidad comparativa de la fiebre aftosa de acuerdo con estrategias alternativas. Colonias Mennonitas, Paraguay, junio 1972 - mayo 1976

Años	N° de animales enfermos		
	Modelo A ^a	Modelo B	Modelo C
1	—	77	774
2	115	144	1.435
3	—	98	979
4	1.724	2.211	22.109
Total	1.839	2.530	25.297 ^b

^a Programa Piloto.

^b Además de 101 muertes (tasa de letalidad = 0,4%).

Pérdidas económicas

Fueron estimadas las pérdidas directas debidas a la FA con el objeto de medir la relación costo-beneficio del Programa Piloto. Aun cuando se utilizaron indicadores simplificados de productividad en un intento de cubrir la falta de observaciones directas, la metodología empleada es útil para expresar las pérdidas económicas asociadas con la enfermedad. No se tuvieron en cuenta los efectos variables sobre diferentes grupos etarios, así como tampoco posibles pérdidas debidas a abortos o infertilidad. Tampoco se tuvieron en cuenta las consecuencias de la inmovilización obligatoria de los rebaños afectados en el atraso del pago de préstamos, así como los riesgos e incertidumbre de las inversiones.

Para calcular las pérdidas económicas debidas a la enfermedad se tuvieron en cuenta los siguientes

conceptos:

1. Atraso en el engorde

Generalmente en Sudamérica se considera que la FA es una enfermedad benigna, que evoluciona en 6 ó 7 días, en cuyo período los animales reducen la ingestión de alimentos e incluso llegan a no comer nada. Por tanto, se admitieron las siguientes premisas: a) atraso en el engorde de 15 días para los Modelos A y B y de 30 días para el Modelo C; b) el costo de las pasturas es de 0,12 dólares por bovino/día; y c) el 50% de los animales enfermos eran novillos de engorde.

2. Producción de leche

Cerca de 10% de la población bovina está compuesto por vacas lecheras. La producción promedio de leche en esta área es de 3 litros por día (la mayoría de los animales son mestizos, cruza con animales nativos). La enfermedad reduce la producción de leche durante 15 días en promedio.

Se estimó que la producción total de leche de las vacas afectadas podría ser perdida durante estos 15 días. En el Modelo A ningún establecimiento fue afectado en el brote de 1974, pero durante el brote de 1975-76, cuando 4 establecimientos lecheros tuvieron la enfermedad, la producción lechera de ninguna de las aldeas pudo ser vendida debido al absoluto aislamiento impuesto. Esto representó una pérdida de 73.000 litros.

3. Comercialización

Las ventas de animales para la faena se centralizan a través de la administración de las colonias. La compra y venta de ganado fue interrumpida por varios períodos, a veces hasta de 90 días, en el Modelo A debido a la amplia cuarentena y en el Modelo C debido a la amplia difusión de la enfermedad.

Los animales que estaban listos para la venta debieron ser confinados en pasturas por un período mayor, representando las pérdidas mayores tanto para los Modelos A como para C.

4. Muertes

Para el Modelo C se aplicó una tasa de letalidad estimada en el 0,4%. Los terneros muertos (generalmente de 5-8 meses de edad) fueron evaluados a 1/4 del precio de matadero.

La Tabla 3 indica el total de las pérdidas anuales estimadas para los Modelos A, B y C.

TABLA 3. *Pérdidas comparativas en dólares debidas a la fiebre aftosa según estrategias alternativas. Colonias Mennonitas, Paraguay, junio 1972 - mayo 1976*

Años	Modelo		
	A	B	C
1972-1973	—	69	1.214
1973-1974	69	136	9.510
1974-1975	—	124	2.194
1975-1976	18.936	2.763	95.918
Total	19.005	3.092	108.836

Para el Modelo A no se registraron pérdidas en los años 1 y 3 y solamente se estimó una pérdida de EUA\$ 69 en la epidemia de 1974. De los EUA\$ 18.936 perdidos en la epidemia de 1975-76, más de EUA\$ 16.000 fueron debidos a la paralización del comercio de los animales.

El Modelo B no toma en consideración las pérdidas de mercado. La suma que se demuestra consiste solamente en el atraso de engorde (más de 70%) y en la reducción de la producción de leche (30%).

De acuerdo con el Modelo C se habrían perdido aproximadamente EUA\$ 110.000 durante la epidemia. El atraso en el engorde representa aproximadamente el 40% y la comercialización cerca del 49% del total de las pérdidas. El 11% restante se refiere a la reducción de la producción lechera y a las muertes.

Costos

Los costos operativos de SENALFA se consideran fijos y por tanto no difieren en forma significativa en los Modelos A y B. El único gasto variable es el aporte de la comunidad ganadera.

La Tabla 4 muestra una comparación de los costos estimados para los modelos alternativos.

Para el Modelo A los gastos de los primeros dos años fueron debidos a la vacunación masiva (95%) y a la vacunación obligatoria de los animales que iban a ser movilizados. Los gastos de los últimos dos años consistieron principalmente en las cuotas de la comunidad (EUA\$ 31.428 y EUA\$ 36.455 para los años 3 y 4 respectivamente), mientras que los gastos restantes se debieron a la vacunación de los animales en tránsito y al manejo de las haciendas para las vacunaciones masivas de los años 1975-1976. Para el período de 1974-1975 se dedujeron EUA\$ 18.000 de los costos en concepto de parte de la cuota aplicada a las acciones de sanidad agropecuaria no relacionada con el programa de fiebre aftosa.

El costo para el Modelo B consistió solamente de las vacunaciones masivas y las vacunaciones en anillo.

Para el modelo C los costos fueron estimados para la vacunación voluntaria (de acuerdo con las

TABLA 4. *Gastos comparativos en dólares debidos a la fiebre aftosa según estrategias alternativas. Colonias Mennonitas, Paraguay, junio 1972 - mayo 1976*

Años	Modelo		
	A	B	C
1972-1973	26.091	47.237	3.304
1973-1974	17.466	38.344	8.993
1974-1975	15.911	67.172	4.969
1975-1976	43.252	94.441	17.658
Total	102.720	247.194	34.924

tendencias observadas en la encuesta de 1971) y la vacunación obligatoria de los animales en tránsito.

Relación costo-beneficio

La Tabla 5 muestra las relaciones costo-beneficio para los Modelos A y B. Los beneficios fueron calculados en relación con el Modelo C, incluyendo las pérdidas debidas a la enfermedad y su costo estimado.

TABLA 5. *Relación costo-beneficio para los Modelos A y B. Colonias Mennonitas, Paraguay, junio 1972 - mayo 1976*

Modelo	Beneficio (EUA\$)	Costo (EUA\$)	Costo/beneficio (EUA\$)
A - Programa Piloto	124.756	102.720	1,21
B - Vacunación masiva	140.669	247.194	0,57

Se demuestra una clara diferencia en favor del Modelo A. También se puede notar que la vacunación masiva cada 4 meses es una estrategia demasiado costosa, por lo menos para pequeñas áreas donde la enfermedad se presenta en forma esporádica con brotes periódicos epidémicos extensivos.

CONCLUSIONES

En 1973, el CPFA indicó la necesidad de establecer políticas y estrategias regionales sobre la base de las características ecológicas de la enfermedad (4). En regiones donde la enfermedad es esporádica y el virus es generalmente introducido, no deben aplicarse programas de vacunación masiva cada 4 meses. En su lugar debe prevenirse la posible introducción del virus a la región. La concentración de gran número de animales para aplicarles periódicamente la vacuna constituye un riesgo adicional de la transmisión de enfermedades, ya sea la fiebre aftosa u otros virus que estuvieran presentes.

El suceso obtenido en el control de los ocasionales brotes ocurridos indica que, contándose con una comunidad plenamente participante, la implementación rápida de una cuarentena regional y de vacunaciones en anillo ofrecen garantías suficientes para el mantenimiento de la sanidad en el ecosistema.

Los resultados del programa piloto de Paraguay refuerzan considerablemente el concepto de estrategias regionales tanto por los progresos logrados en el control de la enfermedad como debido a las consideraciones de orden económico.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la colaboración del Servicio Nacional de Lucha contra la Fiebre Aftosa (SENALFA) de Paraguay y particularmente la del Dr. Rudolph Kaethler por su cooperación en la colecta de datos en el Programa Piloto. Una especial mención merece la permanente colaboración recibida de la Comunidad Mennonita y de sus administradores.

REFERENCIAS

- ROSENBERG, F.J.; MALAGA C., H.; ALONSO FERNANDEZ, A.; MARTINEZ, T.; BARRETO, A. Prevalencia de anticuerpos contra el antígeno asociado a la infección por virus (VIA) de la fiebre aftosa en bovinos del Chaco paraguayo. (Prevalence of antibodies against foot-and-mouth disease virus-infection-associated antigen (VIA) in cattle of the Paraguayan Chaco). *Bltm Centro Panamericano Fiebre Aftosa* 21-22: 1-8, 9-16. 1976.
- ALONSO FERNANDEZ, A.; AUGÉ DE MELLO, P.; ROSENBERG, F.J. Serological and immunological relationship of foot-and-mouth disease viruses type C in South America. *Proceedings of the European Commission for the Control of FMD*. September 23-26, 1975.
- 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: 467-481, 1976.
- ROSENBERG, F.J.; GOIC M., R. Programas de control y prevención de la fiebre aftosa en las Américas. *Bltm Centro Panamericano Fiebre Aftosa* 12: 1-22, 1973.

EVALUATION OF ALTERNATIVE STRATEGIES FOR FOOT-AND-MOUTH DISEASE CONTROL IN PARAGUAY¹

Félix J. Rosenberg²; Vicente Astudillo²

SUMMARY

All South American countries are presently carrying out national programs for the control of foot-and-mouth disease (FMD). These programs are based on uniform systematic mass vaccination strategy. Since 1972, an alternative pilot program for the control of the disease was started in a small region of the Paraguayan Chaco. The program was based on the strict control of movements of susceptible animals and the elimination of outbreaks, eliminating systematic massive vaccination after the second year of the pilot program. During the third year an agreement for the joint sharing of the program's costs was signed in which the farmers agreed to pay an annual quota to be applied to extra surveillance activities and for emergency actions should outbreaks occur.

The area had remained free of clinical disease during the first 26 months. From February 1974 until December 1976, three outbreaks occurred affecting 1,839 herds of cattle out of an average population of 120,000 animals.

A comparison was made between the observed morbidity (A) and the morbidity expected according to a theoretical alternative model which simulates what should have happened if a systematic mass vaccination strategy had been applied (B). Both effects were related to a second model which considered the occurrence of the disease with no organized action taken (C). The

overall morbidity obtained was of 1,839, 2,530 and 25,297 diseased cattle for models A, B and C respectively.

Direct losses due to FMD were estimated considering the delay in fattening, milk production, difficulties in marketing and deaths as the major indicators. A total loss of US\$ 19,005 was estimated for the pilot program during the study period. For model B the estimated loss amounted to US\$ 3,092 and, according to model C, US\$ 108,836 would have been lost.

For cost estimation only the farm community contribution was taken into account because operational costs by SENALFA were considered to be fixed. The respective costs for programs A, B and C were estimated at US\$ 102,720, 247,194 and 34,924.

Cost-benefit ratios for programs A and B were estimated in relation to Model C. A ratio of 1.21 was obtained for the pilot program and of 0.57 for model B. A clear difference was shown favoring model A. Otherwise it was noted that quarterly mass vaccination is an overly expensive strategy for small areas where the disease occurs sporadically.

The results obtained support the concept of regional strategies for the control of FMD which have been recently proposed.

INTRODUCTION

National programs for the control of foot-and-mouth disease (FMD) in South America began in the 1960's. The first one was established in Argentina in 1961, followed by Paraguay and Uruguay in 1968 and Brazil and Chile in 1970. Presently all South American countries have national programs which cover about 70% of the continent's cattle population.

The basic strategy of these programs consists in a systematic massive vaccination campaign.

¹This paper was originally presented at the First Symposium on New Techniques in Veterinary Epidemiology and Economics, Reading, England, 12-15 July, 1976, and published in its Proceedings, Ed. Ellis, Shaw, Stephens, pp. 181-194.

²Pan American Foot-and-Mouth Disease Center, PAHO/WHO, Caixa Postal 589-ZC-00, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

Cattle over 4 months of age are regularly vaccinated three times a year. Movement of cattle for any purpose is allowed only upon presentation of a vaccination certificate. When an outbreak of FMD occurs, the campaign is augmented by ring vaccination and isolation of the affected farms for as long as 30 days after the last clinical case.

The case of Paraguay, which will be discussed here, is the first in which a regional approach was tested as an alternative to the traditional massive nation-wide vaccination campaign.

This presentation reports on the effects of a pilot program in the western region of the country, the "Chaco", based on the regional characteristics of the disease. This program began in January 1972, directed by the Paraguayan National FMD Control Service (SENALFA) with the technical assistance of the Pan American Foot-and-Mouth Disease Center (PAFMDC).

HISTORICAL DATA

This area was first colonized about 50 years ago by the Mennonites, a fundamentalist religious group emigrating from Europe and Canada. Today they occupy an area of about one million hectares (10,000 km²) located approximately 400 km northwest of Asuncion, the capital city. The group is divided into 3 colonies, 145 villages and about 1,700 farms with some 180,000 cattle.

Until 1971 no FMD control program existed. In that year, an FMD epidemic of virus subtype O₁ occurred in the Mennonite Colonies. At that time, SENALFA, working with the PAFMDC, decided to carry out a retrospective epidemiological survey in the colonies. The survey took place in August 1971, covering between 70 and 80% of the villages cattle population. Ten percent of the villages and 46% of the farms had never had FMD. Between 1966 and 1970, 2-4% of the farms had had the disease yearly. In 1966 and 1969 localized epidemic outbreaks appeared to have occurred. In the 1971 epidemic, 58% of the villages had been affected, as had 27% of the farms and 17% of the cattle.

Also, 61% of the farms surveyed declared that they never vaccinated their cattle; 26% stated that they vaccinated occasionally; while only

13% reported that they vaccinated against FMD at yearly intervals.

Using this basic data and analyzing the local ecological conditions, it appeared that FMD virus was not endemic to the region and that outbreaks were caused by introduction of the virus into the Mennonite Colonies.

PILOT PROGRAM STRATEGY AND EFFECTS

Goals, Activities and Implementation

Based on the assumption that disease was not native to the area, and considering the well-established community structure of the Mennonites, the following goals were established for the pilot program:

1. Avoid further diffusion of the existing virus.
2. Avoid introduction of FMD virus into the area, through: a) official mass immunization during the first year of the program (1972); b) strict control of movements of susceptible animals; c) quarantine of animals brought into the colonies; d) active epidemiological surveillance aimed toward early detection of the disease and monitoring of the infection prevalence; e) active community participation at all levels of the campaign; f) elimination of outbreaks; and g) buffer vaccination in adjacent areas.

Because of the lack of implementation of point g) during 1973 it was decided to reinstate the mass vaccination campaigns in the area. However, only one vaccination cycle was completed (November 1973).

An agreement for the better implementation of the pilot program was signed in September 1974 between SENALFA and the Mennonite Colonies. One major breakthrough of the agreement was the joint sharing of the program's costs by SENALFA and the Colonies. Since no large-scale vaccinations were to be carried out in the area, the farmers agreed to pay an annual quota equivalent to 70% of the price of 3 doses of vaccine per head of cattle, and half of that amount for calves less than 4 months old. Half of the total annual amount would be applied to fixed program costs, such as extra surveillance personnel, gasoline, and cattle movement control!

outside the pilot area. The remaining 50% would be kept in reserve for use in outbreaks for emergency activities such as slaughter and/or ring vaccinations. Should no outbreaks occur, this fund would be invested in general animal health improvement in the area, other than FMD.

Effects on the Disease

In July 1973 (18 months after the start of the Pilot Program), a serological survey was undertaken to determine FMD infection prevalence rates by use of the VIA antibody test (1). The results suggested that cattle born after the 1971 outbreak had not been infected, thus underlining the early success of the Pilot Program in controlling the spread of the virus infection. The area had remained free of clinical disease for 26 months (Jan. 1972 - Feb. 1974).

At the end of February 1974, the southern zone of the Pilot Program area began to report cases of FMD. The virus had probably been brought into the Mennonite area by contact with cattle from the adjacent ranches, which in turn had become infected through cattle coming from neighboring regions where a widespread epidemic of virus type C was taking place.

Within 8 weeks, the number of affected cattle in the Mennonite Colonies rose to 112, located in 10 villages along the southeast border of the colonies. A ring vaccination strategy was put into operation, which covered 33,000 head of cattle, or about one-fourth of the colonies cattle population. The entire affected southeastern sector was kept in strict isolation until the outbreak was over.

In July 1975, one outbreak of the disease was reported in the central zone of the colonies. Virus type C was diagnosed. The outbreak affected only one farm with 55 head, of which 20 became sick. The origin of this outbreak was tentatively traced to the slaughter of a wild pig on the premises a few days prior to the outbreak.

In December 1975 a few simultaneous outbreaks occurred at distant points within the colonies. In no case could any relationship be found between these affected animals and quarantined cattle brought into the area. From December

1975 to April 1976, 35 farms and 1,704 heads of cattle were affected. In all instances virus type O was isolated. Although, the disease became quite widespread probably because of multiple infection sources, further diffusion of FMD was controlled and no typical epidemic patterns, occurred (Figure 1).

Table 1 summarizes the occurrence of FMD since the start of the Pilot Program (1972-1976).

COMPARATIVE EFFECTS OF ALTERNATIVE STRATEGIES

Morbidity

The three types of FMD virus present in South America have quite definite epidemiological patterns (2). Virus type O appears to have 4-5 year epidemic cycles, probably related to the cattle population half-life. Virus type A, with a greater plasticity, is generally endemic, seldom causing epidemic outbreaks. Finally, virus type C causes widespread epidemics at non-predictible intervals, and remains inactive during inter-epidemic years.

The behaviour of the disease in the Mennonite area did not deviate greatly from the above-mentioned pattern. However, it should be noted that FMD virus type A did not occur in the area.

Figure 2 shows the percentages of affected villages and farms from 1966 to May 1976. The five-year cycles of virus O are represented by the peaks in 1966, 1971 and 1976.

The epidemic waves of virus C are reflected in the smaller peaks of 1969 and 1974. It should be noted that although the patterns of the 1972-1976 period clearly reproduces the 1967-1971 pattern, the rates in the former are consistently lower.

In order to evaluate the results of the Pilot Program Strategy (Model A) it was compared with two alternative strategic models. The first, Model B, simulates what would have happened if a systematic mass vaccination strategy had been applied. The second, Model C, considers the occurrence of the disease with no organized control action taken, assuming that the 1967-1971 pattern would have been reproduced in the 1972-1976 period.

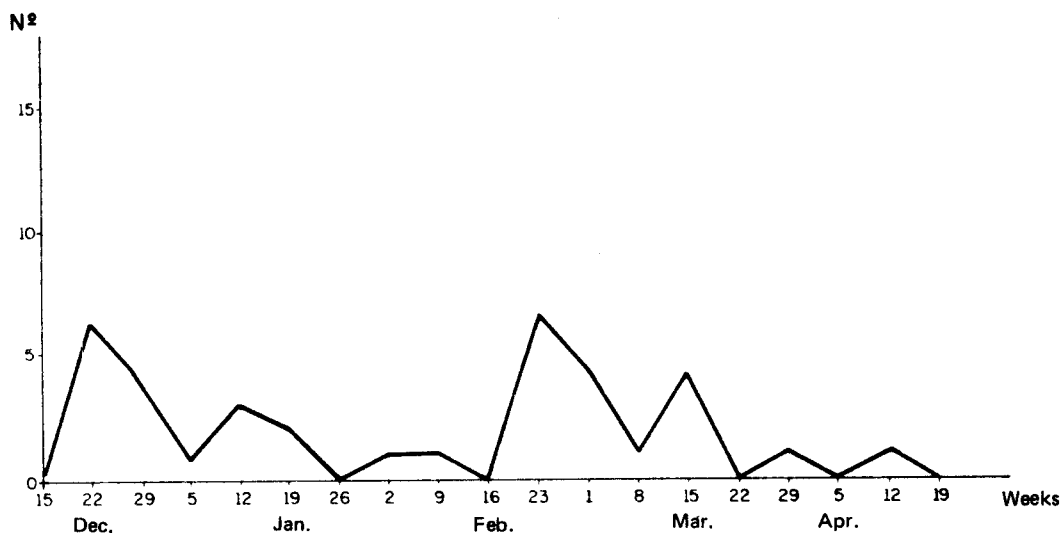


FIGURE 1. Weekly number of outbreaks. Mennonite Colonies, Paraguay, 15 December 1975-19 May 1976.

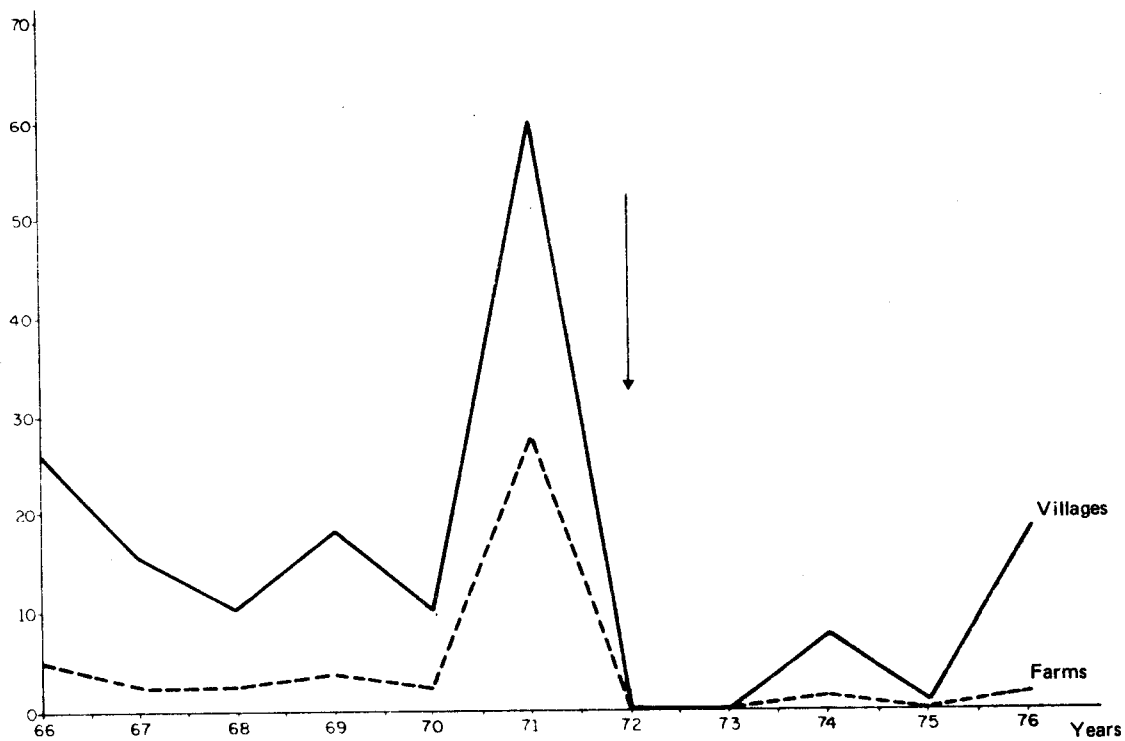


FIGURE 2. Percentage of affected villages and farms. Mennonite Colonies, Paraguay, 1966-31 May 1976.

TABLE 1. FMD occurrence. Mennonite colonies, Paraguay.
June 1972 - May 1976

Years	Villages			Farms			Cattle		
	Total	Affected	%	Total	Affected	%	Total	Affected	x10 ³
1972-1973	145	—	—	1,506	—	—	90,638	—	—
1973-1974	145	10	7	1,574	12	0.8	111,345	115	1
1974-1975	145	—	—	1,634	—	—	113,100	—	—
1975-1976	145	23	16	1,712	36	2.1	130,824	1,724	13

For the morbidity simulation in Model B the following assumptions were made: a) the pattern of the disease with respect to origin and diffusion is not affected by massive vaccination. This assumption is based on field observations which indicate that a vaccination program does not alter seasonal and cyclic variations. This fact is supported by recent investigations on FMD virus pathogenesis demonstrating that humoral antibodies do not significantly influence local virus growth in the pharynx of infected animals (3); b) vaccination only affects protection vis-à-vis clinical signs. The commercial vaccines employed in South America are expected to protect about 80% of vaccinated animals; c) an area was selected in Eastern Paraguay where mass vaccination has been applied quarterly since 1968. In view of its similarity to the Mennonite Colonies, the effects of FMD during the 1975-1976 virus O outbreak were assumed to be comparable. A morbidity rate of 14 per thousand was observed, which represents about 8% of the morbidity rate found in 1971 in the Mennonite Colonies; d) given the above considerations, it was assumed that mass vaccination would have reduced 90% of the morbidity estimated for Model C.

Table 2 gives an estimated comparison of the morbidity for Models A, B and C based on the above-mentioned assumptions.

TABLE 2. Comparative morbidity of FMD according to alternative strategies. Mennonite Colonies, Paraguay. June 1972 - May 1976

Years	No. of sick cattle		
	Model A ^a	Model B	Model C
1	—	77	774
2	115	144	1,435
3	—	98	979
4	1,724	2,211	22,109
Total	1,839	2,530	25,297 ^b

^a Pilot Program.

^b In addition to 101 deaths (lethality rate = 0.4%).

Economic Losses

Direct losses due to FMD were estimated in order to measure the benefit-cost ratio for the Pilot Program. Although simplified productivity indicators were used in an attempt to replace the lack of direct observations, the methodology employed is useful for expressing the economic

losses associated with the disease. Varying effects on different age-groups, as well as possible losses due to abortions or infertility were not considered. The impact of enforced isolation of affected herds on the delay in loan payments as well as risk and uncertainty of the investment were also not evaluated.

The following concepts were considered in order to calculate economic losses due to the disease:

1. Delay in Fattening

Generally, in South America FMD is considered a mild disease lasting for about 6-7 days during which time cattle food intake is reduced or brought to a halt. Thus the following assumptions were made: a) delay in fattening of 15 days for Models A and B, and 30 days for Model C; b) cost of pasture is US\$ 0.12 head/day; and c) 50% of the sick animals are steers.

2. Milk Production

About 10% of the affected cattle population is composed of dairy cows. Mean milk production in the area is 3 litres per day (the majority are longhorn type native crossbred animals). The disease reduces the milk production for an average of 15 days.

We estimated that the entire milk output of the affected cows would be lost during those 15 days. In Model A no dairy farms were affected in the 1974 outbreak, although during the 1975-1976 outbreak, when 4 dairy farms had the disease, none of the villages' milk production could be sold because of the absolute isolation imposed. This represented a loss of 73,000 litres.

3. Marketing

Cattle sold for slaughter are centralized by the administration of the colonies. Buying and selling of cattle was interrupted for various periods of time, sometimes up to 90 days, in Model A because of widespread quarantine and in Model C because of widespread disease.

Animals ready for sale were therefore confined

to pasture for a longer time, representing the largest losses for both Models A and C.

4. Deaths

For Model C an estimated lethality rate of 0.4% was applied. Dead calves (generally 5-8 months old) were valued at 1/4 the slaughter-house price.

Table 3 indicates the total estimated yearly losses due to Models A, B and C.

TABLE 3. Comparative losses (US\$) due to FMD according to alternative strategies. Mennonite Colonies, Paraguay. June 1972 - May 1976

Years	Model		
	A	B	C
1972-1973	—	69	1,214
1973-1974	69	136	9,510
1974-1975	—	124	2,194
1975-1976	18,936	2,763	95,918
Total	19,005	3,092	108,836

For Model A no losses were registered in years 1 and 3, and only US\$ 69 were lost in the 1974 epidemic. Of the US\$ 18,936 lost in the 1975-1976 epidemic, over US\$ 16,000 was due to the embargo on marketing.

Model B did not take into consideration marketing losses. The amount shown consists only of delays in fattening (over 70%) and reduced milk production (30%).

According to Model C almost US\$ 110,000 would have been lost in the epidemic. Delay in fattening represents approximately 40%, and marketing about 49% of the total losses. The remaining 11% are accounted for by reduced milk production and deaths.

Costs

The operating cost of SENALFA is considered to be fixed, and thus does not differ significantly for either Model A or B. The only variable cost is that of the farm community.

Table 4 presents the comparative estimated costs of the alternative models.

TABLE 4. Comparative costs (US\$) of FMD alternative strategies. Mennonite Colonies, Paraguay. June 1972 - May 1976

Years	Model		
	A	B	C
1972-1973	26,091	47,237	3,304
1973-1974	17,466	38,344	8,993
1974-1975	15,911	67,172	4,969
1975-1976	43,252	94,441	17,658
Total	102,720	247,194	34,924

For model A the costs of the first two years were due to mass vaccination (95%) and compulsory transport vaccination. The latter 2 years' costs consisted mostly of the community quota (US\$ 31,428 and US\$ 36,455 for years 3 and 4 respectively), while the remaining cost was due to transport vaccination and cattle handling for the 1975-1976 mass vaccination. For the 1974-1975 period US\$ 18,000 was deducted from the costs, the part of the quota applied to agricultural actions not related to the FMD program.

The costs for Model B consist only of massive and ring vaccinations.

For Model C, costs were estimated for voluntary vaccination (according to the trends observed in the 1971 survey) and compulsory transport vaccination.

Cost-Benefit

Table 5 figures the benefit/cost ratio for Models

A and B. The benefits were calculated in relation to Model C including losses due to the disease and its estimated cost.

TABLE 5. Benefit/Cost relation of FMD strategies A and B. Mennonite Colonies, Paraguay. June 1972 - May 1976

Model	Benefit (US\$)	Costs (US\$)	Benefit/Cost (US\$)
A - Pilot Program	124,756	102,720	1.21
B - Massive vaccination	140,669	247,194	0.57

Clear differences favoring Model A are shown. It should also be noted that quarterly mass vaccination is an overly expensive strategy, at least for small areas where the disease occurs sporadically with periodical extensive epidemic outbreaks.

CONCLUSIONS

In 1973, the PAFMDC indicated the need for regional policies and strategies based on the ecological characteristics of the disease (4). Regions where the disease is sporadic and the virus introduced from outside should not be subject to mass vaccination every four months. Instead virus should be prevented from coming in. The rounding up of large numbers of cattle for vaccination represents an additional risk of disease - including FMD - transmission should any virus be present.

The success obtained in controlling the occasional FMD outbreaks clearly shows that, when counting on a fully participative community, the rapid implementation of a regional quarantine and ring vaccinations offer sufficient warranties for the maintenance of the health conditions within the ecosystem.

The results of the Paraguayan Pilot Program strongly support a regional strategy because of the definite achievements in virus control as well as the economic considerations.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to SENALFA and particularly to Dr. Rudolph Kaethler for their support in collecting information on the Pilot Program. A special mention is also made of the continuous collaboration of the Mennonite Community and their administrators.

REFERENCES

1. ROSENBERG, F.J.; MALAGA C., H.; ALONSO FERNANDEZ, A.; MARTINEZ, T.; BARRETO, A. Prevalencia de anticuerpos contra el antígeno asociado a la infección por virus (VIA) de la fiebre aftosa en bovinos del Chaco paraguayo. (Prevalence of antibodies against foot-and-mouth disease virus-infection-associated antigen (VIA) in cattle of the Paraguayan Chaco). *Bltn Centro Panamericano Fiebre Aftosa 21-22*: 1-8, 9-16. 1976.
2. ALONSO FERNANDEZ, A.; AUGÉ DE MELLO, P.; ROSENBERG, F.J. Serological and immunological relationship of foot-and-mouth disease viruses type C in South America. *Proceedings of the European Commission for the Control of FMD*. September 23-26, 1975.
3. 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: 467-481, 1976.
4. ROSENBERG, F.J.; GOIC M., R. Programas de control y prevención de la fiebre aftosa en las Américas. *Bltn Centro Panamericano Fiebre Aftosa 12*: 1-22, 1973.

resúmenes

abstracts

ABU ELZEIN, E.M.E.; GROWTHER, J.R.

Texto en inglés. *J. Hyg. (Camb.)* 80 (3): 391-399, 1978. (*FMD Bull. Wellcome* 17 (6): 27, 1978). [Animal Virus Research Institute, Pirbright, Woking, Surrey, England]

Técnicas de la prueba inmunoabsorbente marcada con enzimas en las investigaciones del virus aftoso

Este trabajo trata de la aplicación de la prueba inmunoabsorbente marcada con enzima (ELISA) para la prueba de anticuerpos bovinos frente al virus aftoso en ganado. La prueba consiste en la adsorción de antígeno en una fase sólida (en este caso, cavidades de poliestireno en placas hemaglutinantes). Se añaden sueros con anticuerpos específicos al antígeno, y se dejan en reposo hasta que se produzca la reacción. El anticuerpo que queda sin reaccionar es eliminado por medio de un lavado. Conjugado con enzima se añade un antisuero a la especie de animal en que se obtuvieron los anticuerpos específicos al antígeno. Después de lavar para eliminar el anti-anticuerpo que no haya reaccionado se añade una solución que reacciona alterando el color, según la proporción de antisuero conjugado con enzima adherido a las cavidades. Los resultados preliminares indican que la técnica puede ser utilizada para cuantificar anticuerpos al virus aftoso en suero bovino. El virus fue adsorbido con éxito a la superficie de las placas de microprueba, siendo suficiente una concentración de 2 µg/ml para dar resultados reproducibles. El sistema buffer no afectó la integridad física del virus. La relación entre los resultados obtenidos con la técnica ELISA y con los resultados de la prueba de microneutralización es muy compleja. El método ELISA dio variaciones muy bajas entre pruebas cuando se utilizó un suero convencional. Se concluyó que el método podría ser útil para examinar los títulos de anticuerpos en el suero de grandes cantidades de bovinos o cualquier otra especie.

Enzyme-labelled immunosorbent assay techniques in foot-and-mouth disease virus research

This paper was concerned with the application of the enzyme-labelled immunosorbent assay (ELISA) for the assay of bovine antibodies against foot-and-mouth disease virus in cattle. The test involves adsorption of antigen to a solid phase (in this case polystyrene wells in haemagglutination plates). Sera containing specific antibodies to the antigen are added and allowed to react. Excess unreacted antibody is removed by washing. An enzyme-conjugated antiserum to the species of animal in which the specific antibodies to the antigen were made is then added. After washing to remove unreacted anti-antibody, a substrate solution is added which gives a colour reaction depending on the amount of enzyme-conjugated antiserum attached to the wells. Preliminary results indicate that the technique can be used to quantify antibodies to foot-and-mouth disease virus in cattle serum. The virus was successfully adsorbed to the surface of microtiter plates, a concentration of 2 µg/ml being sufficient to give reproducible results. The buffer system did not affect the physical integrity of the virus. The relationship between results obtained with the ELISA technique to neutralization test results is complicated. The ELISA method gave low inter-test variation when standard serum was used. It was concluded that the method should prove useful for the examination of antibody titers in serum from large numbers of cattle or other animals.

ANDERSEN, A.A.

Texto en inglés. *J. vet. Res.* 38 (11): 1757-1759, 1977. (*FMD Bull. Wellcome* 17 (1): 4, 1978). [Plum Island Animal Disease Center, Greenport, New York 11944, U.S.A.]

Reacciones cruzadas al virus aftoso en sueros porcinos normales

Con el objeto de determinar el alcance y la especificidad de las reacciones cruzadas de sueros porcinos normales al virus aftoso, 101 sueros extraídos de 5 rebaños fueron investigados con cinco tipos de virus, utilizando las pruebas de inmunodifusión radial (IDR) y de neutralización por reducción de placas (NRP). Según el grupo de sueros y virus utilizados, el porcentaje de sueros dando reacciones de bajo nivel osciló entre 0 y 50% con el método de NRP, y entre 0 y 20% con la técnica de IDR. Los resultados de las pruebas de seroneutralización en ratones concordaron con los resultados de anticuerpos neutralizantes obtenidos por la prueba de NRP. Los estudios realizados sobre ultracentrifugación y 2-mercaptoetanol indicaron que las reacciones cruzadas fueron provocadas por la inmunoglobulina M o macroglobulinas similares. Los resultados obtenidos y la distribución de reacciones cruzadas coincidieron con los obtenidos en suero de bovino.

ANDERSEN, A.A.

Texto en inglés. *Proc. ann. Mtg. U.S. Anim. Hlth Ass.* 81: 264-269, 1977. (*FMD Bull. Wellcome* 17 (6): 29, 1978). [Plum Island Animal Disease Center, Greenport, New York 11944, U.S.A.]

Reacciones cruzadas de sueros bovinos normales con el virus aftoso

Se revisan recientes investigaciones llevadas a cabo sobre la incidencia y duración de las reacciones cruzadas de sueros bovinos normales con el virus aftoso. Los datos disponibles sugieren que estas reacciones cruzadas son debidas a la respuesta del IgM transitorio después de una infección o reinfección del animal por un agente infeccioso con el mismo antígeno. La incidencia, ocurrencia casual, corta duración y especificidad de las reacciones cruzadas indican que las causas radican en una serie de agentes infecciosos, y que el sistema inmunitario del animal está sometido a un

Occurrence of cross reactions to foot-and-mouth disease virus in normal swine sera

In order to determine the extent and specificity of cross-reactions of normal swine sera to foot-and-mouth disease virus, 101 sera from five herds were tested with five types of virus by the plaque-reduction neutralization (PRN) and radial immuno-diffusion (RID) techniques. Depending on the group of sera and the virus used, the percentage of sera cross-reading at low levels varied from 0 to 50% with the PRN method and 0 to 20% with the RID technique. The results of serum neutralization tests in mice supported the finding of neutralizing antibody by the PRN technique. Studies involving ultracentrifugation and 2-mercaptoethanol indicated that the cross-reactions were the result of immunoglobulin M or similar macroglobulins. The results obtained and the distribution of cross-reactions were similar to those reported previously for cattle sera.

Cross-reactions of normal bovine serums with foot-and-mouth disease virus

Recent research on the incidence and duration of cross-reactions of normal bovine sera with foot-and-mouth disease virus is reviewed. The available data suggests that these cross-reactions are due to the transient IgM response after an infection or re-infection of the animal with an infectious agent that has a shared antigen. The incidence, randomness of occurrence, short duration and specificity of the cross-reactions indicate that a number of infectious agents are responsible and that the immune system of the animal is constantly being re-stimulated. The frequency and

estímulo constante. La frecuencia y ocurrencia casual de los estímulos antigénicos indican que son el resultado de la reactivación de virus latentes y no de infecciones víricas transmitidas continuamente de animal a animal en el rebaño.

randomness of the antigenic stimuli indicate that they are due to the reactivation of latent viruses rather than to virus infections being actively passed from animal to animal in the herd.

ANDERSON, E.C.; DOUGHTY, W.J.; ANDERSON, J.; BABER, D.

Texto en inglés. *J. Hyg. (Camb)* 80 (3): 451-459, 1978. (*FMD Bull. Wellcome* 17 (6): 26, 1978). [Wellcome Institute for Research on FMD, Box 18021, Embakasi, Nairobi, Kenya]

Comparación *in vitro* de las variantes de subtipo del virus aftoso causantes de la enfermedad en bovinos vacunados

***In vitro* comparison of foot-and-mouth disease virus subtype variants causing disease in vaccinated cattle**

Virus aftoso de los tipos O, A y SAT 2, aislados de animales infectados procedentes de rebaños vacunados rutinariamente dos veces por año, fueron comparados antigénicamente con cepas de virus actuales, utilizando las pruebas de fijación de complemento, neutralización e inmunodifusión radial. Los resultados indicaron que las cepas que habían infectado el ganado vacunado con mayor celeridad, tenían valores *R* frente a la cepa vacunal de 30 o menores en las pruebas de inmunodifusión radial y fijación de complemento, mientras que las cepas causantes de brotes primarios, con escasa dispersión, tenían valores *R* de 30 a 40. Diferencias triples en la concentración de anticuerpo neutralizante humoral entre la variante del campo y la cepa de vacuna en los sueros de animales vacunados fueron consideradas probablemente significativas en lo que respecta a protección.

Foot-and-mouth disease virus isolated of types O, A and SAT 2, from diseased animals in herds routinely vaccinated twice a year were compared antigenically with current vaccine strains using complement-fixation, neutralization and radial immunodiffusion tests. Results indicated that strains which had readily infected vaccinated cattle had *R* values against the vaccine strain of 30 or less in complement fixation and radial immunodiffusion tests, while strains causing primary outbreaks with little spread had *R* values of 30-40. Three-fold differences in humoral neutralizing antibody concentration between the field variant and the vaccine strain in sera from vaccinated animals were thought likely to be significant in terms of protection.

BACHRACH, H.L.

Texto en inglés. *Virology in Agriculture, Proceedings of the Beltsville Symposium on Agricultural Research*, 1: 3-32, 1977. (*FMD Bull. Wellcome* 17 (6): 25, 1978). [Plum Island Animal Disease Center, Greenport, New York 11944, U.S.A.]

Virus aftoso: propiedades, biología molecular e inmunogenicidad

Foot-and-mouth disease virus: properties, molecular biology and immunogenicity

Se revisan las recientes investigaciones realizadas sobre las propiedades, biología molecular e inmunogenicidad del virus aftoso. El virus

The results of recent investigations into the properties, molecular biology and immunogenicity of foot-and-mouth disease virus are reviewed.

se divide en sus puntos isoeléctricos y el proceso de la división se refleja en los perfiles temperatura/absorción. El ARN vírico es de cadena simple, con un canal interno poli-C y uno terminal-3' poli-A. Las homologías del ARN para los tipos de virus O, A y C oscilan entre el 44 y el 65%. En las células infectadas con virus se forman proteínas víricas sin cápsides (PVSC) y proteínas víricas. La PVSC₅ se combina con las proteínas de la célula huésped para formar dos polimerasas que catalizan la síntesis del ARN vírico y de doble cadena. Los resultados de una serie de estudios han puesto de manifiesto que la PVSC₅ es el antígeno asociado a la infección vírica (VIA). Se han establecido las relaciones cuantitativas en lo que se refiere a las cantidades de virus inactivado necesarias para inmunizar porcinos y bovinos. El antisuero a la PV₃ precipita y neutraliza el virus.

The virus dissociates at its isoelectric points and the pathways of dissociation are revealed by absorbance-temperature profiles. The viral RNA is single-stranded with internal poly C and 3'-terminal poly A tracts. RNA homologies for the O, A and C virus types range from 44 to 65%. In virus infected cells, non-capsid virus proteins (NCVP) and virus proteins are formed. NCVP₅ combines with host cell proteins to form two polymerases which catalyse the synthesis of viral and double-stranded RNA. The results of various studies have shown that NCVP₅ is the virus-infection-associated (VIA) antigen. Quantitative relationships have been established for the amounts of inactivated virus required to immunize swine and cattle. Antiserum to VP₃ precipitates and neutralizes virus.

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

Texto en inglés. *J. Hyg. (Camb)* 80 (1): 31-42, 1978. (*FMD Bull. Wellcome* 17 (2): 7, 1978). [Wellcome Foot-and-Mouth Disease Vaccine Laboratory, Pirbright, Woking, Surrey, England]

Relaciones dosis-respuesta en una prueba de microneutralización para virus aftoso

Las pruebas de microneutralización bidimensional cuánticas en virus aftosos en las que la actividad del anticuerpo neutralizante fue titulada contra una serie de dosis víricas, demostraron una variedad de curvas dosis-respuesta, algunas de las cuales eran rectilíneas, mientras que otras eran claramente curvilíneas. En los casos en que se obtuvieron respuestas no lineales con algunos antisueros, la curva determinó que los títulos de anticuerpo registrados con una dosis vírica que variaba de 10^3 a 10^5 DCT₅₀ eran muy similares. Se realizaron investigaciones sobre el efecto causado al variar las condiciones de las pruebas sobre la curva de dosis-respuesta. Se observaron notables diferencias cuando se trataron las mezclas de antisuero-virus con globulina antiespecífica, así como cuando las pruebas fueron realizadas en células de diferente susceptibilidad frente a la infección.

Dose-response relationships in a microneutralization test for foot-and-mouth disease virus

Two-dimensional quantal microneutralization tests on foot-and-mouth disease viruses, in which neutralizing antibody activity was titrated against a serial range of virus doses, demonstrated a variety of dose-response curves some of which were rectilinear, other clearly curvilinear. In the case of non-linear responses obtained with some antisera, the shape of the curve was such that antibody titers recorded with doses of virus ranging from 10^3 - 10^5 TCD₅₀ were very similar. Investigations were carried out of the effect of varying the test conditions on the shape of the dose-response curve. Significant differences were noted after treatment of the antiserum-virus mixtures with anti-species globulin and when the test was assayed in cells of differing susceptibility to infection.

BRUGH, M.; COTTRAL, G.E.

Texto en inglés. *Zbl. VetMed. (B)* 24: 680-683, 1977. (*FMD Bull. Wellcome* 17 (2): 9, 1978). [Plum Island Animal Disease Laboratory, Greenport, New York 11944, U.S.A.]

Efectos de secreciones esófago-faríngeas de bovinos sanos sobre el virus aftoso O₁

Se ha investigado el efecto del líquido esófago-faríngeo (EF) de animales sanos sobre la supervivencia *in vitro* del subtipo de virus aftoso O₁. La incubación de virus con líquido EF durante una hora a 37°C dio como resultado la misma pérdida de infectividad que la registrada cuando se utilizó medio de Hank para la incubación, por el mismo espacio de tiempo. Por consiguiente, no existe evidencia sobre la posibilidad de que el líquido EF contuviera inhibidores víricos, ni pudo demostrarse que el líquido EF afectara en modo alguno la neutralización del anticuerpo vírico.

Effect of oesophageal-pharyngeal secretions from normal cattle on foot-and-mouth disease virus O₁

The effect of oesophageal-pharyngeal (OP) fluids from normal cattle on the *in vitro* survival of foot-and-mouth disease virus of subtype O₁ is described. Incubation of virus with OP fluid for one hour at 37° C resulted in the same loss of infectivity as when virus was incubated in Hanks medium for the same period. Thus, there was no evidence for the presence of viral inhibitors in OP fluid. There was also no evidence that OP fluid interfered with the neutralization of the virus antibody.

CALVARIN, R.; GAYOT, G.

Texto en francés. *Recl. Med vet.* 154: 49-52, 1978. (*FMD Bull. Wellcome* 17 (5): 24, 1978). [Laboratoire Central de Recherches Veterinaires, 22 rue Pierre Curie, 94700 Maisons-Alfort, France]

Acción de diversos desinfectantes sobre el virus aftoso

Se ha investigado la acción de una serie de desinfectantes, aprobados y no aprobados oficialmente por las autoridades francesas, sobre el virus aftoso. Los desinfectantes se utilizaron en las concentraciones prescritas. A un volumen de 1 ml de cada desinfectante se añadió 1 ml de suspensión viral. La duración del contacto fue de 30 minutos a temperatura ambiente. La titulación del virus residual se efectuó con cultivos de células de tiroides bovino. Los desinfectantes oficiales, tales como hipocloritos de sodio y de potasio e hidróxido de sodio, resultaron altamente eficaces frente al virus aftoso. Entre los otros desinfectantes examinados, tan solo un complejo basado en fenol y un detergente yodado mostraron cierta actividad frente al virus aftoso, aunque en menor medida que los productos oficiales.

Action of various disinfectants on the virus of foot-and-mouth disease

The action of a number of disinfectants, both officially approved by the French authorities and otherwise, on foot-and-mouth disease virus has been investigated. Each disinfectant, at the prescribed concentration, was added in an amount of 1 ml to 1 ml of virus suspension and allowed to react for 30 minutes at room temperature. Residual virus was titrated using bovine thyroid cell cultures. The official disinfectants, sodium hypochlorite, potassium hypochlorite and sodium hydroxide, were shown to be highly effective against foot-and-mouth disease virus. Of the other disinfectants tested only a phenol-based product and an iodide detergent showed activity against the virus and their activities were inferior to those of the official products.

CAPSTICK, P.B.

Texto en inglés. *Br. vet. J.* 134 (1): 34-37, 1978. (*FMD Bull. Wellcome* 17 (2): 6, 1978). [Wellcome Research Laboratories, Berkhamsted Hill, Berkhamsted, Herts, England]

Programas para el control de la fiebre aftosa en Africa

El uso de vacunas para el control de la fiebre aftosa en el continente africano, iniciado en 1960, tuvo gran repercusión y en la actualidad 17 países emplean vacunas en sus programas nacionales de control. Otros cuatro países han proyectado programas similares que podrían llevarse a la práctica en los próximos 4 años. Se consideran los diferentes factores que determinan la eficacia de las campañas existentes, tales como estrictas medidas zoonosanitarias, vigilancia de la enfermedad, vacunas eficaces y eficiente distribución de las mismas. Las campañas llevadas a cabo en Kenia, Swaziland y Malawi se citan como ejemplos de campañas de control realizadas con gran éxito en Africa.

Foot-and-mouth disease control programs in Africa

Since the early 1960's the use of vaccine to control foot-and-mouth disease has grown rapidly on the African continent and some 17 countries now use vaccine in national control campaigns of varying complexity. A further four countries have control schemes projected for commencement within the next four years. The factors which influence the effectiveness of existing campaigns, such as effective zoo-sanitary regulations, disease monitoring, effective vaccines and effective vaccine distribution are considered. The campaigns in Kenya, Swaziland and Malawi are cited as examples of successful control campaigns in Africa.

DENOYA, C.D.; SCODELLER, E.A.; GIMENEZ, B.H.; VASQUEZ, C.; LA TORRE, J.L.

Texto en inglés. *Virology* 84: 230-235, 1978. (*FMD Bull. Wellcome* 17 (3): 15, 1978). [Centro de Virología Animal, Serrano 661, 1414 Capital Federal, Argentina]

Virus aftoso. 1. Estabilidad de su ácido ribonucleico

Al analizar el ácido ribonucleico (ARN) del virus aftoso por diferentes métodos, se registró una cantidad variable (30 a 90%) de moléculas fragmentadas. En el trabajo descrito en esta publicación, se aisló el ARN vírico a partir de viriones purificados, siguiendo dos métodos. El primer método produjo un ARN heterogéneo, mientras que el segundo dio como resultado un ARN homogéneo, incluso después de sometido a fuertes procesos de desnaturalización o digestión con proteasas. Un análisis del ARN vírico en gradientes de sacarosa y por electroforesis del gel de acrilamida indicó que el ARN es una molécula de cadena simple, con un peso molecular de $2,70 \pm 0,05 \times 10^6$. El coeficiente de sedimentación estimado fue de 35S. Los autores discuten la posibilidad de que la(s) nucleasa(s) pudieran ser la causa del carácter heterogéneo del ARN.

Foot-and-mouth disease virus. 1. Stability of its ribonucleic acid

A variable amount (30-90%) of fragmented molecules have been reported when foot-and-mouth disease virus RNA is analyzed by different methods. In the work described in this paper virus RNA was isolated from virions purified by two different methods. The first method produced a heterogenous RNA, whereas the second resulted in an RNA which appeared homogenous even when submitted to vigorous denaturation procedures or to digestion with proteases. Analysis of viral RNA in sucrose gradients and by acrylamide gel electrophoresis indicated that the RNA is a single-stranded molecule with a molecular weight of $2.70 \pm 0.05 \times 10^6$. The sedimentation coefficient was estimated to be 35S. The authors discuss the possible role of nuclease(s) as a cause of RNA heterogeneity.

DENOYA, C.D.; SCODOLLER, E.A.; VASQUEZ, C.; LA TORRE, J.L.

Texto en inglés. *Arch. Virol.* 57: 153-159, 1978. (*FMD Bull. Wellcome* 17 (6): 27, 1978). [Centro de Virología Animal, Serrano 661, 1414 Capital Federal, Argentina]

Actividades de ribonucleasa asociadas con virus aftoso purificado

Se presentan resultados que indican la existencia de actividades de ribonucleasa asociadas con el virus aftoso purificado. Una ribonucleasa está localizada en la parte externa del virión y su actividad específica es variable, sugiriendo que está adherida sólo superficialmente, pudiendo perderse con facilidad durante los procesos de purificación. Además, la actividad enzimática puede ser anulada sin dificultad con detergente o cloruro de cesio. La otra ribonucleasa presentó una actividad constante en todas las preparaciones examinadas, y estaba probablemente localizada en el interior del virión. Esta enzima podría ser responsable de la heterogeneidad observada normalmente en el ARN del virus aftoso extraído.

Ribonuclease activities associated with purified foot-and-mouth disease virus

Results are presented which indicate that there are ribonuclease activities associated with purified foot-and-mouth disease virions. One ribonuclease is located in the outer part of the virions and its specific activity was variable, suggesting that it was loosely attached and could be lost during purification procedures. Moreover, the enzymatic activity was easily removable by detergent or caesium chloride. The other ribonuclease had a constant activity in all preparations tested and was probably located inside the virus particle. This enzyme could be the one responsible for the heterogeneity usually observed in extracted foot-and-mouth disease virus RNA.

GIRARD, H.C.; BAYRAMOGLU, O.; EROL, N.; BURGUT, A.

Texto en inglés. *Bull. Off. int. Epiz.* 87 (3-4): 201-217, 1977. (*FMD Bull. Wellcome* 17 (1): 2, 1978). [Foot-and-Mouth Disease Institute, Ankara, Turkey]

Inactivación del virus aftoso tipo O₁ por etileneimina binaria

Los efectos negativos provocados por la formalina utilizada para la inactivación del subtipo O₁ en la producción de vacunas en Turquía, sugirieron la necesidad de realizar investigaciones sobre la posibilidad de sustituir la formalina por otro tipo de inactivante, utilizándose en las mismas etileneimina binaria (EIB). No se presentó ninguna dificultad en la preparación de EIB por ciclización de hidrobromuro de 2-bromoetilamina en condiciones alcalinas. Para la inactivación se utilizó 1% de solución de EIB a 37° C durante 24 horas. Se observó que la EIB reaccionó únicamente en el ARN vírico, sin afectar la integridad de la capa proteica. Los antígenos inactivados con EIB fueron almacenados durante tres meses a 4° C, sin apreciarse deterioro alguno en su estabilidad. Se realizaron pruebas de potencia en cobayos y en

Inactivation of O₁ foot-and-mouth disease virus by binary ethyleneimine

The fact that the foot-and-mouth disease virus subtype O₁ appeared to be adversely affected by formalin inactivation during vaccine manufacture in Turkey led to an investigation of binary ethyleneimine (BEI) as an alternative inactivant. No difficulty was experienced in preparing BEI by cyclization of 2-bromoethylamine hydrobromide under alkaline conditions. A 1% solution of BEI at 37° C for 24 hours was used for inactivation. It was shown that BEI acted only on the viral RNA and did not affect the integrity of the protein coat. No loss of stability was observed in BEI-inactivated antigens stored for three months at 4° C. Comparative potency tests of BEI-inactivated and formalin-inactivated vaccines were carried out in guinea pigs and cattle, using direct challenge methods. The potency of the

bovinos para comparar las vacunas inactivadas con formalina con las inactivadas con EIB, empleándose métodos de descarga directa. Los resultados de estas comparaciones determinaron que la potencia de la vacuna inactivada con EIB era considerablemente superior.

BEI-inactivated vaccine was significantly higher than that of the formalin-inactivated vaccines.

GRAVES, J.H.; McVICAR, J.W.; YEDLOUTSCHNING, R.J.

Texto en inglés. *Proc. ann. Mtg. U.S. Anim. Hlth. Ass.* 81: 256-263, 1977. (*FMD Bull. Wellcome* 17 (6): 29, 1978). [Plum Island Animal Disease Center, Greenport, New York 11944, U.S.A.]

Revisión de la reacción del VIA en el diagnóstico de la fiebre aftosa

Review of the VIA reaction in diagnosis of foot-and-mouth disease

El antígeno asociado a la infección vírica (VIA) es una proteína vírica sin cápside producida durante la replicación del virus y puede ser la misma que la polimerasa del ARN vírico. Puede obtenerse como un producto derivado de la purificación del virus. Por consiguiente, el antígeno VIA concentrado puede utilizarse para determinar el anticuerpo al virus aftoso. La prueba ha sido practicada en los Estados Unidos de América para examinar muestras séricas de animales de caza que iban a ser importados a dicho país. En los últimos 18 meses se han examinado muestras de 150 rumiantes procedentes de un zoológico. Muestras extraídas de dos bongos resultaron positivas al VIA. La prueba VIA sirve igualmente para determinar si un animal vacunado con virus inactivado ha podido estar expuesto subsiguientemente al virus aftoso y haber contraído la enfermedad.

The virus infection-associated (VIA) antigen is a non-capsid viral protein produced during virus replication and may be the same as the virus RNA polymerase. It may be obtained as a by-product of the purification of the virus. Concentrated VIA antigen can then be used for assay of foot-and-mouth disease virus antibody. The test has been used in the United States to assay serum samples from game animals intended for import to that country. During the last 18 months, samples from 150 zoo ruminants were tested. Samples from two bongos were positive for VIA. The VIA test has also made it possible to determine if an animal vaccinated with inactivated virus vaccine may have subsequently been exposed to and infected with foot-and-mouth disease virus.

JAMES, A.D.; ELLIS, P.R.

Texto en inglés. *Br. vet. J.* 134 (1): 47-52, 1978. (*FMD Bull. Wellcome* 17 (2): 5, 1978). [Veterinary Epidemiology and Economics Research Unit, Dept. of Agriculture and Horticulture, University of Reading, Reading, England]

Análisis de beneficios/costo en los programas de control de la fiebre aftosa

Benefit-cost analysis in foot-and-mouth disease control programs

El costo cada vez mayor del control de la fiebre aftosa y la creciente necesidad de erradicar la enfermedad, exigen un análisis riguroso del valor económico de los proyectos de control mediante técnicas de análisis de beneficios/costo, capaces de

The increasing costs of foot-and-mouth disease control and increased need to eradicate the disease call for a more rigorous analysis of the economic value of control projects by the use of benefit-cost analysis techniques. This necessitates

predecir el efecto de un determinado programa de control sobre la incidencia de aftosa. Esto puede ser muy complejo; por ejemplo, los animales debidamente vacunados estarían protegidos y, al haber menos animales portadores de la enfermedad, la incidencia de la misma en animales no vacunados fuera del área de vacunación, disminuiría. Para evaluar los beneficios de las medidas de control en la producción de animales afectados es necesario determinar los efectos más variables de la enfermedad, incluyendo la tasa de mortandad (generalmente baja), disminución en la producción de leche (normalmente significativa), infertilidad, abortos, retrasos en el desarrollo hasta alcanzar el peso requerido para el sacrificio, reducida eficacia en la conversión de alimentos y cojera. Estas pérdidas en la producción pueden ser importantes, y un estudio realizado en India reveló una proporción beneficio/costo comprendida entre 5:1 y 8:1. Las técnicas de análisis de beneficio/costo convencionales no reflejan enteramente el hecho de que los beneficios obtenidos mediante el control de la fiebre aftosa mejorarían los sistemas de producción, con el subsiguiente provecho para el desarrollo agrícola.

the prediction of the effect of a control program on the incidence of foot-and-mouth disease. This may be complex as, for example, properly vaccinated animals will be protected and, because there will be fewer infected animals to spread the disease, the incidence of disease in unvaccinated animals outside the vaccination zone will be reduced. To evaluate the benefits of control measures on the production of affected animals, it is necessary to determine the very variable effects of the disease including mortality rate (usually low), reduction in milk production (usually significant), infertility, abortion, delays in attainment of slaughter weight, reduced food conversion efficiency and lameness. Such production losses can be serious and a study in India resulted in a benefit-cost ratio of between 5:1 and 8:1. The standard benefit-cost analysis techniques do not fully reflect the fact that the benefits of controlling foot-and-mouth disease will create permanent improvements in livestock production systems with concomitant aid to agricultural development.

LOBO, C.A.; HANSON, R.P.; GUTIERREZ, A.; BELTRAN, L.E.

Texto en inglés. *Bull. Off. int. Epiz. 85* (11-12): 1075-1104, 1976. (*FMD Bull. Wellcome 17* (1): 1, 1978). [Instituto Colombiano Agropecuario, Apartado Aéreo 29743, Bogotá, Colombia]

Detección serológica de la infección aftosa contraída naturalmente en bovinos y porcinos

Se han comparado diferentes métodos para la preparación de antígeno asociado a la infección vírica (VIA). El antígeno "purificado" preparado por filtración en DEAE-Sephadex A-50 no manifestó ningún tipo de ventajas sobre el antígeno "crudo" preparado con técnicas menos costosas de precipitación con sulfato de amonio y polietilenglicol. Se estudió la respuesta de los anticuerpos al antígeno VIA en bovinos y porcinos de varias granjas. La prueba de inmunodifusión en gel de agar fue utilizada para identificar los anticuerpos anti-VIA en más del 40% de bovinos muestreados a los 8 y 9 meses postinfección, y en un 50% de porcinos muestreados a los 6 meses postinfección. La

Serological detection of natural foot-and-mouth disease infection in cattle and pigs

Methods for the preparation of foot-and-mouth disease virus infection-associated (VIA) antigen were compared. "Purified" antigen, prepared by filtration through DEAE-Sephadex A-50 did not appear to have any significant advantage over 'crude' antigen prepared by the less expensive technique of precipitation with ammonium sulphate and polyethylene glycol. The antibody response to VIA antigen was studied in cattle and pigs from several farms. Anti-VIA antibodies were identified, using the agar gel diffusion precipitation test, in over 40% of cattle sampled at 8 and 9 months after foot-and-mouth disease infection, and in 50% of pigs sampled at 6 months

elevada prevalencia de este anticuerpo después de la infección clínica indicó que la prueba de inmunodifusión en gel de agar es una medida confiable de infección en animales individuales durante los dos primeros meses después de infectados. No se pudo determinar la existencia de anticuerpos después de los 8 a 9 meses en bovinos, y 10 meses en porcinos. La vacunación reiterada utilizando vacunas inactivadas con formaldeído no afectó el desarrollo de anticuerpos VIA.

post-infection. The high prevalence of this antibody following clinical FMD indicated that the agar gel diffusion precipitation test was a reliable measure of infection in individual animals within the first two months after infection. Antibody persistence could not be determined beyond 8 to 9 months for cattle and 10 months for pigs. Repeated vaccination with formaldehyde-inactivated vaccines did not interfere with the development of VIA antibody.

McVICAR, J.W.; McKERCHER, P.D.; GRAVES, J.H.

Texto en inglés. *Proc. U.S. Anim. Hlth Ass. 80: 254-261, 1976. (FMD Bull. Wellcome 17 (5): 22, 1978).* [Plum Island Animal Disease Center, Greenport, New York 11944, U.S.A.]

Influencia del virus de la rinotraqueitis infecciosa bovina sobre portadores de fiebre aftosa

Se intentó inducir la transmisión de fiebre aftosa exponiendo bovinos portadores, en contacto con ganado susceptible, al virus de la rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR). Asimismo, animales portadores de fiebre aftosa, previamente infectados con virus IBR fueron mezclados con bovinos susceptibles y sometidos a una serie de inyecciones con córtico-esteroides. En ninguno de ambos experimentos se evidenció transmisión de fiebre aftosa de un portador a un animal susceptible.

The influence of infectious bovine rhinotracheitis virus on the foot-and-mouth disease carrier state

An attempt was made to induce transmission of foot-and-mouth disease by exposing carrier cattle to infectious bovine rhinotracheitis (IBR) virus while they were in contact with susceptible cattle. In addition, foot-and-mouth disease carrier animals previously infected with IBR virus were mixed with susceptible cattle and stressed by a series of injections with corticosteroids. Transmission of foot-and-mouth disease virus from the carrier animal to susceptible cattle was not demonstrated in either experiment.

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

Texto en inglés. *Proc. ann. Mtg. U.S. Anim. Hlth Ass. 81: 244-255, 1977. (FMD Bull. Wellcome 17 (6): 28, 1978).* [Plum Island Animal Disease Center, Greenport, New York 11944, U.S.A.]

Respuesta inmunitaria de cerdos recién nacidos frente a la vacuna de virus aftoso inactivado con adyuvante oleoso. I. Influencia del anticuerpo calostrual

Se vacunaron lechones lactantes nacidos de cerdas vacunadas y sin vacunar, con una vacuna de virus aftoso inactivado a la que se incorporó una emulsión de adyuvante oleoso. La respuesta inmunitaria de los lechones nacidos de cerdas no vacunadas y que fueron vacunados a los 28 días fue similar a la observada en cerdos adultos. No fue

Immune response of neonatal swine to inactivated foot-and-mouth disease virus with oil adjuvant. I. Influence of colostral antibody

Suckling piglets from both foot-and-mouth disease vaccinated and non-vaccinated sows were vaccinated with inactivated foot-and-mouth disease vaccine incorporating an oil emulsion adjuvant. The immune response of piglets born to non-vaccinated sows and vaccinated at 28 days old was similar to that observed in adult

posible determinar anticuerpos neutralizantes en el suero de lechones nacidos de cerdas vacunadas antes de comenzar la lactancia. El anticuerpo neutralizante adquirido mediante la ingestión del calostro no obstruyó la respuesta inmunitaria de los lechones lactantes frente a la vacunación.

swine. Neutralizing antibodies could not be demonstrated in the serum of piglets born to vaccinated sows prior to the commencement of suckling. Neutralizing antibody acquired through ingestion of colostrum did not block the immune response of suckling piglets to vaccination.

NUNES, P.

Texto en inglés. *Br. vet. J.* 134: 23-27, 1978. (*FMD Bull. Wellcome* 17 (3): 12, 1978). [Coordinador CCFA, Edifício Embaixador, 4º andar SC2, 70000, Brasília - DF, Brasil]

Plan nacional para el control de la fiebre aftosa en Brasil

El Plan Nacional Brasileño para el Control de la Fiebre Aftosa se inició en 1963. La vacunación sistemática del ganado comenzó a practicarse en 1966 en el estado de Rio Grande do Sul. El Plan se está desarrollando en cuatro etapas. En la primera de ellas se vacunaron 11 estados, completándose el primer territorio en 1974. La segunda etapa, comenzada en 1973, ampliará el número de estados integrados dentro del área de control. En 1975 se produjeron 214 millones de dosis de vacuna trivalente. Se está ejerciendo una creciente presión sobre la necesidad de un control de calidad efectivo y estricto sobre las vacunas, y un Decreto promulgado en 1976 obliga a los productores a practicar este control de calidad en el 100% de su producción anual, independientemente del control oficial ejercido por las autoridades gubernativas.

National Plan for the control of foot-and-mouth disease in Brazil

The Brazilian National Plan for the Control of Foot-and-Mouth Disease was initiated in 1963. Systematic vaccination of cattle began in 1966 in the state of Rio Grande do Sul. The plan involves four stages. The first entailed vaccination in 11 States and one Territory was completed in 1974. The second stage, which commenced in 1973 will bring further states within the foot-and-mouth disease control area. Some 214 million trivalent doses of vaccine were produced in 1975. Great stress is being laid on the need for effective quality control of vaccines and a Decree of 1976 makes it obligatory for vaccine manufacturers to quality control 100% of their output within a one-year period. This is in addition to the official control of vaccines carried out by the Government authorities.

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

Texto en portugués. *Bol. IPVDF (Guaíba)* 4: 21-31, 1977. (*FMD Bull. Wellcome* 17 (6): 26, 1978). [Desiderio Finamor Institute for Veterinary Research, Caixa Postal 2076, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil]

Comportamiento antigénico de un subtipo de virus aftoso en una población parcialmente inmune

Se realizó un estudio sobre muestras de virus del tipo A aislado en el estado de Rio Grande do Sul, entre 1972 y 1975. Para los estudios comparativos se utilizó como referencia la cepa A₂₄

Antigenic behaviour of a subtype of foot-and-mouth disease virus in a partially immune population

A study has been made of samples of foot-and-mouth disease viruses of type A isolated during 1972 to 1975 in the state of Rio Grande do Sul. The A₂₄ Cruzeiro strain was used as a reference

Cruzeiro. Los virus aislados durante 1972-1974 no parecieron presentar grandes diferencias entre sí ni con la cepa de referencia. El virus aislado en 1975 (A Uruguaiana/75) pareció diferir del A₂₄ Cruzeiro (R=29%). Una segunda cepa aislada el mismo año (A Alegrete/75) presentó una marcada diferencia con el A Uruguaiana (R=27%) y el A₂₄ Cruzeiro (R=13%). Se concluyó que se producían lentos cambios en el carácter antigénico de los tipos víricos y que ello se debía al pasaje del virus en animales parcialmente inmunes.

strain in comparative studies. Virus isolated during 1972-1974 appeared to differ only slightly amongst themselves and from the reference strain. Virus isolated in 1975 (A Uruguaiana/75) appeared to differ from the A₂₄ Cruzeiro virus (R=29%). A second strain isolated in the same year (A Alegrete/75) appeared to be very different from A Uruguaiana (R=27%) and from A₂₄ Cruzeiro (R=13%). It was concluded that slow changes in the antigenic character of type viruses occurred and that this was characteristic of the passage of virus in partially immune animals.

PRASAD, S.; SHARMA, V.K.; RAMAKANT, K.; AHUJA, K.L.; SINGH, B.

Texto en inglés. *Vet. Rec.* 102 (16): 363-364, 1978. (*FMD Bull. Wellcome* 17 (4): 1978). [Dept. Veterinary Bacteriology and Hygiene, Haryana Agricultural University, Hissar - 125004, Haryana, India]

Aislamiento de virus aftoso a partir de yakos

Se notifica la ocurrencia de fiebre aftosa en yakos (*Bos mutus grunniens*) en un área de la India donde esa especie es doméstica. El brote se registró simultáneamente en yakos y bovinos. De una población total de 60 yakos, 10 resultaron afectados, mientras que los ovinos y caprinos de las zonas circundantes no fueron afectados. En un novillo infectado se aisló virus aftoso del tipo O. Tanto los bovinos como los yakos parecieron ser susceptibles a este tipo de virus.

Isolation of foot-and-mouth disease virus from yakos

The occurrence of foot-and-mouth disease in yakos (*Bos mutus grunniens*) in an area of India where this species is domesticated is reported. The outbreak was reported simultaneously in yak and cattle. Of a total of 60 yakos, 10 were affected. Sheep and goats in the same vicinity were not affected. Foot-and-mouth disease virus of type O was isolated from an infected steer. It appeared that cattle and yakos were equally susceptible to virus of this type.

RAVAIOLI, L.; ORFEI, Z.; CEI, L.; BAREI, S.

Texto en italiano. *Arch. vet. Ital.* 28 (5-6): 185-186, 1977. (*FMD Bull. Wellcome* 17 (2): 8, 1978).

Pruebas de potencia realizadas con una serie de vacunas antiaftosas en la fecha de su caducidad

Dentro de una serie de estudios realizados experimentalmente y en el campo, relacionados con el brote aftoso del tipo C registrado en algunas zonas de Italia en 1976, se llevaron a cabo varias investigaciones sobre la potencia de una vacuna

Potency tests on a series of foot-and-mouth disease vaccine at its expiry date

As part of a series of laboratory and field studies connected with the outbreak of type C foot-and-mouth disease which occurred in some parts of Italy in 1976, checks were made on the potency of trivalent vaccine used 12

trivalente utilizada 12 meses después de producida y conservada a 5°C. Se realizaron pruebas directas de descarga en bovinos con la cepa de producción C Brescia 1964. La vacuna, que contenía un valor DP_{50} de 32 en la primera prueba después de su producción, presentó un valor DP_{50} de 14,4 a los 12 meses de conservación entre 5 y 7°C. Este último valor supera ampliamente el nivel de protección exigido por la actual legislación italiana (8 DP_{50}). La cepa vírica asociada con los brotes de 1976 en Italia había previamente mostrado cierta semejanza con la cepa de vacuna C Brescia 1964 utilizada en las pruebas.

months after manufacture and stored at 5°C. Direct tests were carried out in cattle using the C Brescia 1964 production strain for challenge infection. Vaccine which had a PD_{50} value of 32 when first tested after manufacture had a PD_{50} of 14.4 after storage for 12 months at 5 to 7°C. This latter value is well in excess of the potency level demanded by the current Italian regulations (8 PD_{50}). The virus strain associated with the outbreaks in Italy in 1976 had previously been shown to be similar to the C Brescia 1964 vaccine strain used in the tests.

REINHARDT, G.; CONTRERAS, P.; GONZALEZ, S.; FOLCH, H.

Texto en español. *Arch. Med. vet.* 9 (1): 18-22, 1977. (*FMD Bull. Wellcome* 17 (6): 28, 1978). [Fac. Ciencias Univ. Austral de Chile, Casilla 567, Valdivia, Chile]

Reacciones de hipersensibilidad en vacunación antiaftosa. I. Manifestaciones clínicas

Se comunica la presencia de reacciones de hipersensibilidad en bovinos en Chile, después de haber sido vacunados contra la fiebre aftosa. En la mayoría de los casos, los signos clínicos aparecieron a las dos o tres semanas postvacunación, presentando un aspecto ulcerativo con una leve secreción viscosa de color amarillento. Se tomaron muestras de sangre para realizar un hemograma, que reveló eosinofilia y leucopenia. La inoculación intradérmica en animales enfermos o terneros lactantes de madres enfermas produjo reacciones inflamatorias. El examen histopatológico reveló una inflamación subepitelial e infiltrado perivascular con eosinófilos y presencia de células cebadas degranuladas, no observándose necrosis vascular. Se concluyó que las reacciones alérgicas observadas son debidas a una reacción compleja que presenta características de hipersensibilidad inmediata, tardía, y mediada por un complejo antígeno-anticuerpo. Los animales se recuperaron espontáneamente hacia los 80 días postvacunación. El tratamiento con antihistaminas no pareció producir efecto alguno.

Hypersensitivity reactions against foot-and-mouth disease vaccine. I. Clinical aspects

Several cases of hypersensitivity following vaccination against foot-and-mouth disease have been reported in Chile. In most cases clinical signs appeared at two to three weeks following vaccination and consisted of ulcerative lesions on the skin with yellowish, viscous secretions. Examinations of the blood picture revealed eosinophilia and leucopenia. Intradermal inoculation of sick animals or calves suckling from sick mothers resulted in an inflammatory reaction. Biopsy revealed subepithelial inflammation and cellular infiltration with eosinophils and degranulated mast cells. No vascular necrosis was observed. It was concluded that the allergic reactions observed were of a complex nature involving reaginic antibodies, cellular mediation and antigen-antibody mediation. The animals involved recovered spontaneously by 80 days post-vaccination. Treatment of affected animals with antihistamines appeared to have no effect.

ROBSON, K.J.H.; HARRIS, T.J.R.; BROWN, F.

Texto en inglés. *J. gen. Virol.* 37: 271-276, 1977. (*FMD Bull. Wellcome* 16 (12): 74, 1975). [Animal Virus Research Institute, Pirbright, Woking, Surrey, England]

Evaluación por hibridación competitiva de la secuencia de homología entre los ARNs de los siete serotipos de virus aftoso

Se ha realizado una comparación entre los ARNs de los siete serotipos de virus aftoso por hibridación competitiva. La homología entre los tres serotipos europeos A, O y C y el serotipo Asia 1 fue de 60 a 70%. Homologías similares fueron halladas entre los tres virus del tipo SAT, mientras que la homología entre los dos grupos resultó mucho más baja (25 a 40%). La homología entre los ARNs de los subtipos en los tipos A y O fue superior a 70%. Los experimentos de competición doble realizados con los tipos europeos indicaron que éstos comparten las mismas secuencias nucleótidas.

An assessment by competition hybridization of the sequence homology between the RNAs of the seven serotypes of foot-and-mouth disease virus

A comparison has been made of the RNAs of the seven serotypes of foot-and-mouth disease virus by competition hybridization. Homology between the three European serotypes, A O and C, and the Asia 1 serotype was 60 to 70%. Similar homologies were found amongst the three SAT virus types, but homology between the two groups was much lower (25 to 40%). Homology between the RNAs of subtypes within types A and O was greater than 70%. Double competition experiments with the European types indicated a sharing of nucleotide sequences.

RWEYEMAMU, M.M.

Texto en inglés. *Br. vet. J.* 134 (1): 63-67, 1978. (*FMD Bull. Wellcome* 17 (2): 6, 1978). [Wellcome Foot-and-Mouth Disease Vaccine Laboratory, Pirbright, Woking, Surrey, England]

La selección de cepas de vacuna del virus aftoso

El principal factor a tener en cuenta en la selección de cepas de vacuna de virus aftoso para la producción de una vacuna, es una correcta especificidad serológica. En este trabajo se discuten algunos de los métodos empleados para la evaluación serológica de las cepas de vacuna. Se pone de relieve que los valores r obtenidos utilizando anticuerpos a las cepas de vacuna se prefieren como base para dicha evaluación en vez de los productos de reactividad cruzada (Valores R). Los sistemas basados en la reacción de la neutralización vírica parecen ser más apropiados para la evaluación de la cepa de vacuna, que los que se basan en la reacción de fijación de complemento. Se presenta una relación entre los valores r obtenidos en las pruebas de neutralización y las diferencias entre potencias homólogas de las vacunas. La

The selection of vaccine strain of foot-and-mouth disease virus

Correct serological specificity is the first consideration in the selection of a foot-and-mouth disease virus strain for vaccine production. In this paper, some of the methods employed in serological evaluation of vaccine strains are discussed. It is stressed that r values obtained using antisera to the vaccine strains are preferred as a basis for evaluation rather than the cross-reactivity products (R values). Systems based on the virus neutralization reaction appear to be more relevant to the evaluation of vaccine strains than those based on the complement fixation reaction. A relationship between r values obtained in the neutralization test and differences in homologous potencies of vaccines is presented. The vaccine strain must also be capable of effective, rapid growth in the cell system employed

cepa de vacuna debe igualmente tener capacidad para desarrollarse efectiva y rápidamente en el sistema celular empleado para la producción de la vacuna. El antígeno vírico producido debe contener una elevada proporción de antígeno inmunizante (cápside intacto) y tiene que permanecer estable después de inactivada la infectividad vírica. El antígeno debe inducir una inmunidad protectora adecuada en los animales vacunados cuando está incluido en la formulación de la vacuna, y necesita un período de validez no menor de un año a temperaturas de refrigeración, en el mismo estado en que fue formulado. El autor concluye que la adecuada identificación y selección de cepas víricas es un factor de gran importancia dentro del proceso de producción de una vacuna eficaz.

for vaccine production. The virus antigen produced must contain a high proportion of immunizing antigen (intact capsid) and this must be stable after inactivation of virus infectivity. The antigen must be capable of provoking adequate protective immunity in vaccinated animals when formulated into vaccine and must have a shelf-life of at least one year at refrigeration temperatures in the formulated state. The author concludes that the selection and identification of virus strains suitable for vaccine manufacture is an integral part of the production of effective vaccines.

SOLYOM, F.; SZENT-IVANYI, M.; DEAK, F.

Texto en húngaro. *Mag. Allatorv. Lap.* 33 (2): 96-102, 1978. (*FMD Bull. Wellcome* 17 (5): 22, 1978). [1107 Budapest, Szallas, U. 5/7, Hungary]

Evaluación de las vacunas aftosas de los tipos Waldmann y Frenkel. II. Estudio en porcinos

Evaluation of Waldmann and Frenkel type foot-and-mouth disease vaccines. II. Studies on swine

Se han estudiado las respuestas del anticuerpo neutralizante de cerdos frente a una o dos vacunaciones con vacunas antiaftosas Waldmann o Frenkel, y comparado con las respuestas registradas en cerdos después de infectados experimentalmente. Se determinaron los niveles de anticuerpos a las 4 y 8 semanas después de la primera vacunación y 2 semanas después de la segunda vacunación. Los niveles de las respuestas del anticuerpo neutralizante registrados después de la infección experimental fueron los más elevados. No hubo una diferencia significativa entre las respuestas de los cerdos inoculados con una dosis bovina de vacuna Waldmann y los cerdos inyectados con la vacuna Frenkel dos veces, con tres dosis bovinas cada una. Las descargas experimentales indicaron que 30 a 50% y 20 a 42% de los cerdos estaban inmunizados a las 4 y 8 semanas siguientes a la primera vacunación respectivamente. La inmunidad alcanzó un 70-83% 2 semanas después de la revacunación. La severidad de la infección experimental estaba directamente relacionada con el nivel de anticuerpos neutralizantes detectados.

The neutralizing antibody responses of pigs to one or two vaccinations with Waldmann or Frenkel foot-and-mouth disease vaccines have been studied and also compared with the responses of pigs following experimental infection with the disease. Antibody levels were determined at 4 and 8 weeks after primary vaccination and at 2 weeks after secondary vaccination. The highest neutralizing antibody responses were observed following experimental infection. There was no significant difference between the antibody responses of pigs given one bovine dose of Waldmann vaccine and that of pigs given two vaccinations with Frenkel vaccine each of three bovine doses. Challenge experiments indicated that 30 to 50% and 20 to 42% of pigs were immune at 4 and 8 weeks respectively following a single vaccination. Immunity reached 70-83% at 2 weeks following a revaccination. The severity of experimental infection was directly related to the levels of neutralizing antibodies detected.

SPIER, R.E.; WHITESIDE, J.P.; BOLT, K.

Texto en inglés. *Biotech. Bioeng.* 19: 1735-1738, 1977. (*FMD Bull. Wellcome* 17 (2): 10, 1978). [Animal Virus Research Institute, Pirbright, Woking, Surrey, England]

Tripsinización de monocamadas celulares BHK 21 cultivadas en dos unidades de proceso a gran escala

La operación de las unidades de proceso a la escala de 100L incluye la preparación de inóculos conteniendo 10^{10} células de monocapa. Normalmente dicho inóculo se prepararía mediante tripsinización de 100 botellas Roux. Esto no es práctico debido a las múltiples operaciones que este proceso lleva consigo (abrir, cerrar y verter 1.100 botellas), lo cual presenta un riesgo de contaminación inaceptable, suponiendo además, una considerable pérdida de tiempo y esfuerzo. Esta ponencia describe los métodos utilizados para cosechar un propagador a esferas de cristal de 10L y un cultivo de DEAE-Sephadex A50 de 8L. El primero se cosecha utilizando una mesa vibratoria para impartir movimiento a las esferas de cristal en la presencia de tripsina. En el segundo se arrancan las células tripsinizadas de las esferas DEAE-Sephadex A50, forzando la suspensión de células y esferas a través de un tubo capilar estrecho.

Trypsinization of BHK 21 monolayer cells grown in two large-scale unit process systems

The operation of unit process systems at the 100L scale involves preparation of inocula containing 10^{10} monolayer cells. Conventionally, such an inoculum would be prepared by the trypsinization of 100 Roux bottles. This is impractical because of the multiple operations (1,100 bottle openings, closings and pourings) introduce an unacceptable risk of contamination and also require the expenditure of considerable time and effort. This paper describes the methods used to harvest a 10L glass sphere cell propagator and an 8L DEAE-Sephadex A50 culture. The former is harvested using a vibrating table to impart some movement to the glass spheres in the presence of trypsin; the latter involves the stripping of trypsinized cells from the DEAE-Sephadex A50 beads by forcing the bead/cell suspension through a narrow-bore capillary tube.

TRAUTMAN, R.; BENNETT, C.E.

Texto en inglés. *Biophys. J.* 21 (3): 156, 1978 (Abstract only). (*FMD Bull. Wellcome* 17 (5): 23, 1978). [Plum Island Animal Disease Center, Greenport, New York 11944, U.S.A.]

Bioensayos de neutralización y protección para el virus aftoso

Se ha comprobado que las pruebas de protección *in vivo* y neutralización *in vitro* en ratones lactantes dan medidas equivalentes de concentraciones de anticuerpo aftoso. Se dedujo que la porción lineal de la función del punto final vírico frente al punto final sérico dio en ambas pruebas un coeficiente angular unitario para IgM bovino, y una curva de 2 a 3 para los anticuerpos IgM. Las más altas concentraciones de suero requeridas en la prueba de seroprotección para obtener resultados equivalentes a los obtenidos en la prueba de neutralización, respondieron principalmente a la mera dilución del suero por el ratón. El período

Neutralization and protection bioassays for foot-and-mouth disease virus

In vivo protection and *in vitro* neutralization tests in suckling mice have been shown to be equivalent measures of foot-and-mouth disease antibody concentration. It was deduced that the linear portion of the virus endpoint versus serum endpoint function for both assays had unit slope for bovine IgM and a slope of 2 to 3 for IgM antibodies. The higher serum concentration required in the mouse protection test for equivalent results to the neutralization test was accounted for mainly by the simple dilution of serum by the mouse. The period between the administration of serum and of virus influenced

transcurrido entre la administración del suero y del virus afectó adversamente las pruebas de seroprotección cuando dicho período fue menor de 6 horas, aunque no se observó ningún efecto subsiguiente entre las 6 y 120 horas.

the mouse protection tests adversely if it was less than about 6 hours but had no subsequent effect between 6 and 120 hours.

WATSON, J.

Texto en inglés. *Vet. Rec.* 102: 187-190, 1978. (*FMD Bull. Wellcome* 17 (3): 11, 1978). [Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Hook Rise South, Tolworth, Surbiton, Surrey, England]

Control de la fiebra aftosa en Gran Bretaña

El principio esencial para el control de la fiebre aftosa estriba en una estricta política de importación. En Gran Bretaña está prohibida la importación de ganado sin una licencia para tal efecto, que las Autoridades despachan sólo cuando cuentan con las garantías suficientes de que no existe riesgo de contaminación para el ganado nacional. Asimismo, existen requisitos especiales para la importación de carne y sus productos derivados. A pesar de estas medidas, es vital una vigilancia constante para evitar cualquier posibilidad de contaminación. Todo propietario de un animal afectado o sospechoso de haber contraído la enfermedad, debe notificarlo a la policía, que a su vez se encarga de notificar el hecho a las autoridades veterinarias pertinentes, aplicándose inmediatamente medidas de emergencia y restricción del movimiento. Se toman muestras de los animales sospechosos, que se envían al A.V.R.I. en Pirbright para su estudio. Si se confirma la presencia de la enfermedad, las medidas de emergencia se extienden a un radio de 10 millas alrededor de los locales infectados, practicándose inmediatamente las diligencias oportunas para tasar, sacrificar y eliminar todos los animales susceptibles de la zona infectada. Se constituye un Centro de Control para supervisar los brotes en cada área afectada. Este Centro se responsabiliza igualmente del control del movimiento de ganado en las zonas circundantes, con el fin de detectar cualquier posible dispersión de la enfermedad. Las restricciones se aplican igualmente a la leche, productos lácteos, estiércol, etc.

The control of foot-and-mouth disease in Great Britain

The first essential in the control of foot-and-mouth disease is a sound importation policy. In Britain, imports of farm livestock are prohibited except under license and licenses are issued only when the Authorities are satisfied that there is no risk to the national herd. Special importation requirements are applied to meat and meat products. In spite of these measures constant alertness to the possibility of the disease is still vital. Anyone with an animal affected with or suspected of having the disease must notify the police. The appropriate veterinary authorities are then notified and emergency movement restrictions are applied. Samples from the suspect animals are sent to A.V.R.I., Pirbright for testing. If the disease is confirmed then the standstill order is extended to a radius of 10 miles around the infected premises. Immediate arrangements are made to value, slaughter and dispose of all susceptible animals on the infected place. A Control Center is set up to supervise outbreaks in each infected area. This Center also has responsibility for livestock movements around an infected place and for tracing possible spread of infection. Milk, milk products, manure, slurry, etc are all subject to restrictions.

bibliografía sobre enfermedades vesiculares**vesicular diseases bibliography**

ANDERSEN, A.A.

Reacciones cruzadas entre enterovirus bovino y el virus aftoso I₅ de los territorios sudafricanos. *Texto en inglés.* (Cross reactions between bovine enterovirus and South African territories I₅ foot-and-mouth disease virus). *Amer. J. vet. Res.* 39 (1): 59-63, 1978. (*FMD Bull. Wellcome* 17 (3): 14, 1978). [Plum Island Animal Disease Center, Greenport, Long Island, New York 11944, U.S.A.]

ARSHADI, M.; MALDJAI, H.; FIROUZI, S.

Situación actual de la fiebre aftosa en Irán. *Texto en inglés.* (The latest situation of foot-and-mouth disease in Iran). *Bull. Off. int. Epiz.* 87 (3-4): 219-237, 1977. (*FMD Bull. Wellcome* 17 (1): 1, 1978).

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

Respuestas inmunitaria y de anticuerpos a un péptido aislado del cápside del virus de la fiebre aftosa. *Texto en inglés.* (Immune and antibody responses to an isolated capsid peptide of foot-and-mouth disease virus). *International Virology* 3 (Abstr.): 204, 1975. (*FMD Bull. Wellcome* 15 (1): 3, 1976). [Plum Island Animal Disease Center, Greenport, Long Island, New York 11944, U.S.A.]

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

Respuestas inmunitaria y de anticuerpos a una proteína aislada del cápside del virus de la fiebre aftosa. *Texto en inglés.* (Immune and antibody responses to an isolated capsid protein of foot-and-mouth disease virus). *J. Immunol.* 115 (6): 1636-1641, 1975. [Plum Island Animal Disease Center, Greenport, Long Island, New York 11944, U.S.A.]

BALLESTRINI, J.; BERNAL, C.; JIMENEZ, J.M.; MALDONADO, A.; CASTAÑEDA, J.M.; GOMEZ, G.

Últimas observaciones sobre el comportamiento de las vacunas a virus vivo contra la fiebre aftosa en Venezuela. *Texto en español.* (Observations on the behavior of live virus vaccines against foot-and-mouth disease in Venezuela). *Vet. Trop.* 1 (1): 3-14, 1976. (*FMD Bull. Wellcome* 17 (1): 3, 1978). [Instituto de Investigaciones Veterinarias, Apartado 70, Maracay, Venezuela]

BARTELING, S.J.; SUGIMORI, T.; LEEUW, P.W.

Experimentos vacunales en bovinos y suinos con vacunas antiaftosas preparadas con virus purificados con polietilenglicol producidos en cultivos de células BHK suspendidas. *Texto en inglés.* (Vaccination experiments in cattle and pigs with foot-and-mouth disease vaccines prepared from polyethylene glycol purified virus produced in BHK suspended cells). In: XVth Conference of the O.I.E. Permanent Commission on Foot-and-Mouth Disease. Paris, 10-14 October, 1978. (*FMD Bull. Wellcome* 18: 112, 1978). [Central Veterinary Institute, Virology Dept., Lelystad, Netherlands]

BRUN, A.; CHAPPUIS, G.; FAVRE, H.; ROULET, C.; TERRE, J.

Utilisation chez les jeunes bovins du vaccin antiaphteux en adjuvant huileux. In: Symp. International Fièvre Aphteuse, Lyon 5-8, Octobre 1976. IFFA-MERIEUX. Inter. Symp. FMD, Lyon 1976. *Develop. biol. Stand.* 35: 117-122, 1977.

CALLIS, J.J.

Conclusions and recommendations. Session II. Oil vaccines. Inter. Symp. FMD, Lyon 1976. *Develop. biol. Stand.* 35: 484, 1977.

CASAS OLASCOAGA, R.

Summary of current research of the Pan American Foot-and-Mouth Disease Center on oil adjuvanted vaccines. In: XVth Conference of the O.I.E. Permanent Commission on Foot-and-Mouth Disease. Paris, 10-14 October, 1978.

CASAS OLASCOAGA, R.

Resumen de las investigaciones actuales realizadas en el Centro Panamericano de Fiebre Aftosa sobre vacunas de adyuvante oleoso. *CPFA*, 1978, 33 pp.

CHAUHAN, H.N.; UPPAL, P.K.

Estudios sobre la curva de desarrollo del virus aftoso en monocapas de células de riñón de búfalo joven. *Texto en inglés*. (Growth curve studies of foot-and-mouth disease virus in buffalo calf kidney monolayers). *Indian vet. J.* 54 (8): 595-598, 1977. (*FMD Bull. Wellcome* 17 (2): 9, 1978). [Indian Veterinary Research Institute, Mukteswar-Kumaon, India]

DHENNIN, L.

Inmunización de cerdos contra la fiebre aftosa. *Texto en francés*. (Immunization of pigs against foot-and-mouth disease). *Recl. Med. vet.* (Alfort) 152 (3): 183-188, 1976.

DIMITRIADIS, I.

Separación de anticuerpos neutralizantes del virus aftoso por intercambio iónico. *Texto en griego*. (Separation of foot-and-mouth disease virus neutralizing antibodies by ion exchange). *Bull. hell. vet. med. Soc.* 28 (3): 148-156, 1977. (*FMD Bull. Wellcome* 17 (1): 2, 1978).

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

Investigación sobre la inmunogenicidad de una vacuna oleosa de la fiebre aftosa en cerdos reproductores. *Texto en servo-croata*. (Investigation of the immunogenicity of an oil foot-and-mouth disease vaccine for breeding swine). *Vet. glasn.* 30 (3): 217-230, 1976. (*FMD Bull. Wellcome* 15 (11): 76/153, 1976). [Veterinary Institute, Novi Sad, Yugoslavia]

GOSMANOV, R.G.; BOROVIC, R.V.

Alergia y nivel de anticuerpos en el suero de bovinos con fiebre aftosa. *Texto en ruso*. (Allergy and the level of antibodies in the serum of cattle with foot-and-mouth disease). *Uchen. Zap. Kazan. vet. Inst.* 122: 40-42, 1976. (*FMD Bull. Wellcome* 17 (2): 8, 1978).

HENDRIE, E.W.; BAKER, K.; HEDGER, R.; DAVIES, G.; RICHARDS, M.S.

Enfermedad vesicular del cerdo: Investigaciones serológicas 5 y 6. *Texto en inglés*. (Swine vesicular disease: serum surveys 5 and 6). *Vet. Rec.* 102 (6): 126-127, 1978. (*FMD Bull. Wellcome* 17 (2): 10, 1978). [Animal Health Division, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Tolworth, Surrey, England]

KARPINSKY, S.; TERESZCZUK, S.

Estudios sobre la supervivencia del virus de la enfermedad vesicular del cerdo bajo diferentes condiciones experimentales. *Texto en polaco*. (Studies on the survival of swine vesicular disease virus under various experimental conditions). *Med. Wet.* 33 (1): 26-29, 1977. (*FMD Bull. Wellcome* 16 (12): 77, 1977).

McKERCHER, P.D.; GRAVES, J.H.

Revisión del estado actual de los adyuvantes oleosos en vacunas antiaftosas. *Texto en inglés*. (A review of the current status of oil adjuvants in foot-and-mouth disease vaccines). Inter. Symp. FMD, Lyon, 1976. *Dev. Biol. Stand.* 35: 107-112, 1977.

McKERCHER, P.D.; BACHRACH, H.L.

Una vacuna antiaftosa para cerdos. *Texto en inglés*. (A foot-and-mouth disease vaccine for swine). *Can. J. Comp. Med.* 40 (1): 67-74, 1976.

MIZRAHI, A.

Primatone RL en medios de cultivo de células de mamífero. *Texto en inglés*. (Primatone RL in mammalian cell culture media). *Biotech. Bioeng.* 19: 1557-1561, 1977. (*FMD Bull. Wellcome* 16 (12): 76, 1977). [Dept. of Biotechnology, Israel Institute for Biological Research, Ness Ziona 70400, Israel]

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

Respuesta inmunitaria de cerdos neonatos a la vacuna antiaftosa inactivada con adyuvante oleoso. I. Influencia del anticuerpo del calostro. (Immune response of neonatan swine to inactivated foot-and-mouth disease virus vaccine with oil adjuvant. I. Influence of colostral antibody). *Proc. ann. Mtg U.S. Hlth Ass.* 81: 244-255, 1977. (*FMD Bull. Wellcome* 17 (6): 53, 1978). [Plum Island Animal Disease Center, Greenport, Long Island, New York 11944, U.S.A.]

OLIVEIRA, S.J. DE; PETZHOLD, S.A.

Estudios sobre los efectos de la infección aftosa en cobayos reactivos a la tuberculina. *Texto en portugués*. (Effects of foot-and-mouth disease virus on guinea pig tuberculin reactors). *Bol. Inst. Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor*. [Instituto de Pesquisas Veterinárias "Desidério Finamor", C.P. 2076, Porto Alegre, RS, Brasil]

PONOMAREV, A.P.; MOLCHANOVA, A.I.; UZYUMOV, V.L.

Estructura de la capa proteica del virus aftoso. *Texto en ruso*. (Structure of the protein coat of foot-and-mouth disease virus). *Veterinariya (Moscow)* 9: 39-42, 1977. (*FMD Bull. Wellcome* 16 (12): 79, 1977).

TRIPATHI, S.S.; SAXENA, V.B.

Una nota sobre los efectos de la vacunación antiaftosa en la cantidad, calidad y preservación del semen de toros Murrah. *Texto en inglés*. (A note on foot-and-mouth vaccination stress on quantity, quality and preservability of semen in Murrah bulls). *Indian J. Anim. Sci.* 46 (1): 44-47, 1976. (*FMD Bull. Wellcome* 17 (3): 16, 1978). [Govind Ballabh Pant University of Agriculture and Technology, Pantnagar 263145, India]

SOBKO, A.I.; SOKOLOV, L.N.; MISHCHENKO, V.A.; MASLOVA, N.S.; DUDNIKOV, A.I.

Inmunidad postvacunal a subtipos heterólogos de virus aftoso. *Texto en ruso*. (Post-vaccinal immunity to heterologous subtypes of foot-and-mouth disease virus). *Veterinariya (Moscow)* 9: 42-44, 1977. (*FMD Bull. Wellcome* 16 (12): 76, 1977).

SUBHARNGKASEN, S.

La fiebre aftosa en Tailandia. *Texto en inglés*. (Foot-and-mouth disease in Thailand). *Bull. Off. int. Epiz.* 87 (7-8): 633-639, 1977. (*FMD Bull. Wellcome* 17 (6) 25, 1978). [Department of Livestock Development, Bangkok, Thailand]

BOLETIN DEL CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA

INVITACION A LOS AUTORES

El BOLETIN del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa es una revista trimestral, bilingüe (español e inglés) del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa. En ella se publican trabajos que se juzgan de interés para las actividades relacionadas con los programas de prevención o de lucha contra las enfermedades vesiculares de los animales. Los autores que deseen publicar sus trabajos en esta revista deberán someterlos a la consideración del Comité Editorial, en cualquiera de los siguientes formatos o presentaciones:

Trabajo: Investigación original, presentada en forma completa, con las divisiones tradicionales: Introducción; Material y Métodos; Resultados; Discusión; Conclusiones; Referencias y Agradecimientos. Además, debe tener un Resumen de no más de 250 palabras.

Comunicación breve: Trabajo científico completo, de no más de 6 ó 7 páginas. Los resultados y discusiones pueden presentarse juntamente con los datos y 1 ó 2 cuadros como máximo.

Comunicación preliminar: Pequeño resumen de un trabajo que está en ejecución; de 3 ó 4 páginas de extensión y con no más de 2 cuadros.

Trabajo de revisión: Formato flexible.

INSTRUCCIONES A LOS AUTORES

1. Todos los trabajos que se presenten para su publicación en el BOLETIN deben estar escritos a máquina, a doble espacio, en un sola cara del papel, tamaño carta (28 x 22 cm).
2. En una hoja separada se detallarán: Apellido y nombre o iniciales del autor (o autores), cargo oficial y nombre de la institución (si pertenece a alguna) y dirección.
3. Las ilustraciones y cuadros, numerados con números arábigos, con sus respectivas leyendas y títulos, se incluirán en páginas aparte, numerados en forma consecutiva y agrupados al final del trabajo, con indicación del lugar donde deben ser incluidos.
4. Las referencias citadas deben presentarse en lista separada, por orden alfabético y con los números que les corresponden en el texto.
5. Los trabajos pueden enviarse en inglés o español o, de preferencia, en ambos idiomas. Los trabajos que se presenten en un solo idioma serán traducidos al otro por disposición del Comité Editorial, el que se reserva el derecho de aprobar las traducciones.
6. El Comité Editorial se reserva también el derecho de aceptar o rechazar la publicación de un trabajo, así como de realizar cualquier modificación editorial, como ser: la condensación u omisión de parte del texto, cuadros, ilustraciones o anexos. Los originales no se devuelven en ningún caso.
7. Publicado el trabajo, cada autor recibirá gratuitamente 25 separatas del mismo.

COMITE EDITORIAL

Dr. Paul Sutmöller, Jefe de los Laboratorios
Dr. Roberto Goić, Jefe de Asesoría de Campo
Srta. Patricia Chain, Oficial de Comunicaciones

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

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

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

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

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

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

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

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

EDITORIAL COMMITTEE

Dr. Paul Sutmöller, Chief of Laboratories
Dr. Roberto Goić, Chief of Field Services
Ms. Patricia Chain, Communications Officer