
BOLETIN

del centro panamericano de fiebre aftosa

Nºs 13-16, enero-diciembre, 1974

Nos. 13-16, January-December, 1974

contenido
contents

	p.
Immunización del animal joven contra la fiebre aftosa <i>J.B. Brooksby</i>	1
Relaciones entre el virus del león marino de California y el virus del exantema vesicular <i>J.J. Callis</i>	6
Fiebre aftosa en bovinos. Algunas relaciones entre la patogenicidad y la epizootiología <i>J.J. Callis</i>	9
Investigaciones básicas sobre las características del virus de la fiebre aftosa <i>Anton Mayr</i>	18
Algunos ensayos sobre producción de vacunas anti-aftosas inactivadas, a partir de virus multiplicado en conejos neonatos <i>Daniel Abaracón</i>	30
Portadores de virus aftoso. ¿Proceso terminal de la infección o eslabón intermedio en la cadena epidemiológica de la enfermedad? <i>Félix J. Rosenberg y Paulo Augé de Mello</i>	50

Estimado lector:

Desde hace casi dos años que no aparecía el BOLETIN del Centro. Muchas cartas recibimos de lectores que nos reclamaban no haberlo recibido y a todos ellos les contestamos individualmente explicando los motivos que nos obligaron a suspender la publicación. Ahora lo hacemos en general, para todos nuestros lectores, exponiendo las causas de nuestro silencio y anticipando nuestras ideas para el futuro.

Razones de orden presupuestario, que sería prolijo detallar, nos obligaron a reducir o suspender algunas actividades; por supuesto, esas restricciones recayeron sobre las de menor prioridad. El incremento dado a las actividades docentes obligó a dedicar el mayor esfuerzo en la publicación de materiales didácticos, monografías y manuales, de cuya disponibilidad no podíamos prescindir. También, algunos movimientos de personal afectaron el sector de publicaciones. Pero, probablemente la razón de más peso - como ocurre casi siempre - fue de orden económico: en la primera mitad de 1974 el costo del papel aumentó un 300% alcanzando más tarde el 400% con relación a su precio de 1973. Aumentos de esa magnitud, en tan corto tiempo, exceden cualquier previsión.

Superadas hoy, en gran medida, aquellas dificultades, queremos recuperar el tiempo perdido. Pero no es tan fácil cuando el tiempo es mucho. Optamos por una edición que abarque los cuatro trimestres de 1974 a la que seguirán, en los próximos meses, dos ediciones más, correspondientes a los dos semestres de 1975. Y para conservar la numeración de cuatro números por año, esta edición lleva los números 13-16 y las sucesivas serán 17-18 y 19-20 respectivamente. Suprimimos la habitual sección de "Noticias" por su falta de actualidad.

Esta edición especial incluye todas las presentaciones que se hicieron en el Simposio Internacional sobre Fiebre Aftosa que se reunió en el Centro Panamericano de Fiebre Aftosa los días 5 y 6 de noviembre de 1973.

Esperamos continuar con la aparición normal del BOLETIN a partir del primer trimestre de 1976.

La dirección.

Dear Reader:

The Center's BOLETIN has not appeared for nearly two years. We have received many letters about this and answered each of these letters individually, explaining the reasons for which we were obliged to suspend publication. We will now do the same for all of our readers, stating the causes for our silence and sharing our ideas for the future.

Financial reasons obliged us to reduce or suspend some activities which naturally affected the publication of the BOLETIN. Increases in training activities obliged us to put the greatest effort into the publication of essential training materials, monographs and manuals. Some personnel changes also affected the production of publications. But, as almost always happens, the main reason was economic: in the first half of 1974 the cost of paper increased 300%, and later 400%, in relation to 1973 prices. Such increases, in a short period of time, exceed the most carefully planned projections.

These problems have now for the most part been resolved, and we hope to make up for lost time. We have opted for the publication of one issue to include the four quarters of 1974, to be followed in a few months by two more issues, which will correspond to the two semesters of 1975. In order to maintain the enumeration of four issues per year this issue carries the numbers 13-16, and the following issues will be 17-18 and 19-20, respectively. We have suspended the "News" section as inappropriate under the circumstances.

This special edition includes all the papers presented at the International Symposium on Foot-and-Mouth Disease held at the Pan-American Foot-and-Mouth Disease Center November 5-6, 1973.

We hope to continue with normal publication of the BOLETIN as of the first quarter of 1976.

The Director.

INMUNIZACION DEL ANIMAL JOVEN CONTRA LA FIEBRE AFTOSA

Dr. J. B. Brooksby*

Considerando la importancia de la inmunización de los animales jóvenes en la más temprana edad, es sorprendente que haya tan pocas referencias autorizadas sobre este asunto. Es posible que la razón de este hecho repose en la dificultad de resolver la interrelación de las dos variables que rigen la reacción a la vacuna en los animales jóvenes. La dos variables son:

1. La persistencia de la inmunidad transmitida por la madre, que obviamente está influenciada por el nivel de inmunidad de esta última y de la eficacia con que se transmite a la prole.

2. El desarrollo de competencia inmunológica completa en el animal joven. Casi todos los investigadores están de acuerdo que hasta que un animal no alcance completa madurez, su respuesta a un estímulo antigénico único no puede ser total, pero están menos de acuerdo en cuanto a la edad en la que esta diferencia entre joven y adulto deja de ser significativa.

Las discrepancias existentes entre los autores sobre las edades críticas para cada una de estas variables probablemente dependen de factores tales como el estado nutricional, otras infecciones y aún de la raza y variedad del animal considerado. El tipo de vacuna empleada también puede jugar un papel, debido a que los adyuvantes pueden tener un comportamiento diferente en animales de diversas edades.

Tomando en cuenta estas consideraciones, obviamente es imposible establecer una regla rígida para la edad y para el régimen de vacunación que dará los mejores resultados en la inmunización de animales jóvenes en una

campana de vacunación de ámbito nacional. Sin embargo, una revisión de la literatura sugiere que pueden ser observados ciertos principios básicos y si éstos ya están implantados, para el veterinario de campo puede tornarse en un problema de logística el tratar de obtener la mejor cobertura posible del ganado joven.

PERSISTENCIA DE ANTICUERPOS PROPORCIONADOS POR LAS MADRES INMUNIZADAS

En 1966 Van Bekkum describió la persistencia de anticuerpos en terneros nacidos de madres inmunizadas. Con el programa continuo de vacunación implantado en Holanda, muchas de las madres presentaron títulos elevados de anticuerpos lo que se reflejó en el hecho que Van Bekkum notó su persistencia en los animales jóvenes, en algunos casos, hasta los 150-160 días. Sin embargo, entre los terneros hubo una marcada diferencia individual y se notó que la eficacia con la cual los terneros absorbieron anticuerpos del calostro, variaba ampliamente de un individuo a otro. Observaciones semejantes fueron informadas por Wisniewsky y Jankowska en 1972. Hubo una disminución marcada de anticuerpos después de los 3 meses, mientras que a los cuatro meses se hallaron sólo rastros de anticuerpos neutralizantes en la mayoría de los casos. Excepcionalmente, un ternero con 134 días de edad presentó títulos de anticuerpos de hasta 1:30. Los mismos autores informan que, si la vacuna es aplicada en terneros que presentan anticuerpos, cerca

* Animal Virus Research Institute, Pirbright, Woking, Surrey, England.

del 60% no reacciona con producción de nuevos anticuerpos neutralizantes. Esto es generalmente aplicable, aunque los niveles de los títulos sean muy bajos, menores que 1:10, aun cuando, en algunas circunstancias, ha sido posible obtener alguna respuesta en esta faja bastante indeterminada, lo que torna muy difícil separar la variación debida a anticuerpos de los antecedentes de competencia inmunitaria.

Wisniewsky y Jankowska (1972) compararon también el título de anticuerpos obtenido con la misma vacuna en los terneros provenientes de madres inmunizadas y no inmunizadas, mostrando claramente que el título de anticuerpos en los terneros provenientes de madres no vacunadas es tres veces más elevado que en los del grupo vacunado. Este hecho, es una buena evidencia de que los anticuerpos adquiridos pasivamente interfieren en la respuesta a la vacuna. Además, no se trata de un fenómeno todo-o-nada y probablemente podrá ser observado en la irregularidad de las respuestas de los animales jóvenes; algunos de ellos estarán adecuadamente protegidos mientras que otros no.

Las observaciones sobre la inmunidad materna en porcinos, son bien más escasas tal vez por causa de que han habido pocas oportunidades de estudiar proles de cerdas adecuadamente vacunadas. Nathans (1965) en Holanda halló que en cerdos jóvenes los anticuerpos pueden estar por debajo del nivel detectable y, no obstante, no reaccionan a vacunación. Giraud *et al.* (1969) vacunaron cerdas con 90 días de preñez. Los lechones se mostraron inmunes a la edad de un mes pero no a los dos meses. Los lechones vacunados a las 6-8 semanas de edad fueron inmunizados con éxito: 9/10 estaban protegidos contra la descarga de virus un mes después. De los datos obtenidos en terneros se justifica sugerir que los anticuerpos maternos deberían bajar suficientemente para que la vacunación pueda ser útil en algún momento entre los 3 y 4 meses. Verdaderamente se puede decir que en aquel momento la mayoría de los

animales tendrán títulos tan bajos de anticuerpos maternos que estarán en condiciones de reaccionar a la vacuna, sea con un incremento de anticuerpos o tornándose sensibilizados, de tal modo que las futuras reacciones a la vacunación serán reforzadas. En el caso de los cerdos es posible afirmar que el procedimiento equivalente sería la vacunación de los lechones a las 6 semanas de edad.

DESARROLLO DE LA COMPETENCIA INMUNOLOGICA

Mackowiak *et al.* (1962) comprobaron que en los terneros, cuanto menor era la edad menos favorablemente reaccionaban a la vacunación. A la edad de 5 a 6 meses desarrollaron sólo títulos bajos de anticuerpos, que declinaron rápidamente en 30 a 60 días. Por otra parte, animales entre 6 y 9 meses de edad presentaron anticuerpos que persistieron durante 2 a 4 meses, comparados con adultos primovacunados, cuyos anticuerpos persistieron de 4 a 6 meses. Ese fenómeno persistió aún cuando los animales fueron revacunados. Animales jóvenes revacunados a una edad menor de 12 meses permanecieron inmunes durante 8 meses, mientras que en los animales adultos la cifra fue de 12 meses. Si la vacunación inicial fue aplicada en animales menores de 6 meses y revacunados 3 meses después, su inmunidad duró sólo 3 a 4 meses y por consiguiente se sugirió que probablemente sea necesario repetir la vacunación 3 veces hasta la edad de 14 meses. Resultados semejantes fueron informados por Honigman, Gomes, Martin y Lombardo (1971). Trabajaron con animales provenientes de madres vacunadas y la vacunación se inició cuando tenían de 6 a 9 meses, momento en que el fracaso de la reacción puede vincularse con más seguridad a la competencia inmunológica que a la persistencia de anticuerpos del calostro. Sus resultados fueron publicados en el Boletín del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa y ponen de relieve que para obtener una buena respuesta en animales de

esta edad, son necesarias vacunaciones repetidas. Hay una diferencia clara entre los grupos vacunados a la edad de 6-9 meses y 9-12 meses, tanto en la respuesta inicial como en la respuesta a los diferentes regímenes de vacunación utilizados para incrementar la inmunidad. Como un ejemplo de un mal resultado que puede obtenerse, el grupo vacunado a los 6-9 meses de edad, después de la primera vacunación sólo presentó títulos insignificantes. Cuando fue revacunado a los 120 días después de la vacunación inicial, el título de anticuerpos aumentó a un nivel bastante elevado, pero cayó a los 180 días. Nuevamente revacunado el grupo a los 240 días, sólo 4 de 8 animales estaban inmunes cuando fueron comprobados a los 360 días. Estos resultados son menos satisfactorios de lo que podría esperarse de los estudios de revacunación realizados por Mackowiak *et al.* (1962) y por Muntiu *et al.* (1972).

Muntiu y sus colaboradores estudiaron en profundidad y durante muchos años el problema de la inmunización del animal joven y vale la pena mencionar algunos detalles de sus resultados. En su serie inicial (1969) determinaron qué cantidad de vacuna en ml era necesaria para proteger el 50% de los grupos de animales de la misma raza pero de diferentes edades. Los animales adultos tenían 3 o más años de edad. Para una determinada vacuna los resultados fueron los siguientes: adultos, 0,213 ml; animales de 1 año de edad, 0,916 ml; de 6 meses, 1,33 ml; y de 1 mes de edad, 3,4 ml. Por consiguiente, una dosis protectora para un animal adulto debe ser aumentada 4,3 veces para un animal de 1 año de edad, 6,2 veces para uno de 6 meses de edad y 15,9 veces para un animal de 1 mes de edad. Estas cifras son más elevadas que las encontradas por otros investigadores en el campo, pero los ensayos fueron llevados a cabo cuidadosamente con animales pertenecientes a una raza determinada y las cifras fueron establecidas en números de animales bastante considerables para permitir un grado elevado de confianza.

Los mismos datos pueden ser presentados de una manera diferente indicando el número de dosis protectoras (DP_{50}), necesarias para producir un aumento de 1,5 en el log de anticuerpos en los sueros. Para el animal viejo esta cifra es 0,8; para el de 1 año de edad, 4; para el de 6 meses, 9 y para el menor de 1 mes, 85.

Los datos pueden ser vistos también desde el punto de vista de la duración de la respuesta después de la aplicación de vacuna en grupos de edades diferentes. Inoculando 16 DP_{50} adulto, Muntiu *et al.* (1971) mostraron que la caída al 50% de la inmunidad en el grupo requiere: 14 meses para los adultos, 4 meses para los de 12 meses, 2 meses para los de 6 meses, mientras que en el grupo de un mes de edad la inmunidad dura sólo un mes.

La siguiente serie de experiencias (1972) estaba dirigida a estudiar la posibilidad de superar este problema mediante la aplicación de dosis divididas de antígeno. Se seleccionaron dos dosis, para ser aplicadas a un intervalo de 15 días. Con una determinada vacuna, la inoculación de 16 DP_{50} proporcionó 8 meses de inmunidad. En los animales de un año de edad esta misma dosis proporcionó sólo dos meses de inmunidad pero cuando se inocularon 2 dosis, cada una de 8 DP_{50} a intervalos de 15 días en animales de un año de edad, la inmunidad duró 4 meses. Animales de 6 meses de edad permanecieron inmunes durante 2 meses después de la inoculación de 32 DP_{50} ; con 2 dosis de 16 DP_{50} cada una, la inmunidad se prolongó hasta 8 meses. En nuestra experiencia el intervalo entre las dos dosis es algo corto para obtener los mejores resultados de la revacunación. Si este intervalo se hubiera extendido hasta un mes es posible que los resultados habrían sido mejores aún. Estas observaciones sugieren que, si el problema de la administración en el campo puede ser resuelto, la inmunización de animales jóvenes en un nivel satisfactorio es bien posible.

Nuestra propia experiencia en Pirbright con vacunación de terneros ha sido, en general, bastante similar a la del Dr. Muntiu y sus colaboradores, pero nosotros no llevamos a cabo una observación tan detallada y por consiguiente los resultados no tienen el mismo valor cuantitativo. Sin embargo, concordaremos con que el esquema de dosis dividida parece ser la manera más eficaz de mejorar la inmunidad proporcionada a los animales jóvenes.

Un aspecto adicional que también estudiamos en terneros fue la rapidez de la respuesta que es posible obtener con una dosis de vacuna para adulto. Se emplearon grupos de terneros que estaban siendo usados en el estudio del valor inmunizante del material de ARN de doble cadena y el grupo control, que recibió vacuna 7 días antes de la comprobación por contacto, resistió completamente el contacto con virus virulento aunque los animales tenían un título de anticuerpos de sólo 1:16. Después de la comprobación por contacto, este título de anticuerpos aumentó sólo hasta 1:200 comparado con 1:800 en los controles (R.F.Sellers, información no publicada).

McKercher y Morgan (1969) inocularon cerdos de 26 días de edad con una vacuna con adyuvante oleoso. Estos animales estaban protegidos cuando fueron comprobados 65 días después. En esta fase, la revacunación no aumentó la respuesta de anticuerpos pero a los 172 días de edad la respuesta fue buena y los animales se encontraban todavía inmunes en la prueba hecha a los 380 días de edad. Se puede esperar que la respuesta inmunitaria resultante de vacunas con adyuvante oleoso sea diferente de la proporcionada por anteriores adyuvantes, especialmente en lo que se refiere a la revacunación, cuya respuesta será más eficaz en una fase más adelantada.

Wittmann y Mussgay (1970) fueron sorprendidos por la facilidad con que obtuvieron una buena respuesta a su vacuna con DEAE-dextrano en cerdos de 6-8 semanas de edad; sin embargo, afirmaron que la respuesta no fue

tan buena como en los animales adultos. Dieron énfasis a la variabilidad de la respuesta y también al hecho de que hallaron escasa correlación entre el resultado de los ensayos de comprobación y de los títulos de anticuerpos registrados.

Por consiguiente, aún cuando parece no haber ningún estudio en cerdos comparable con el de Muntiu *et al.* en bovinos, parecería que es posible estimular una buena inmunidad en cerdos de seis semanas de edad con vacunas de adyuvantes adecuados. La revacunación, ya sea con vacuna similar o bien con una vacuna de hidróxido de aluminio saponada (Anderson, 1969) proporcionará una buena respuesta anamnésica, que será mejor a los tres meses que a un mes.

Por lo tanto, de las indicaciones existentes en la literatura surge que se puede inmunizar terneros contra la fiebre aftosa si se les aplica una buena vacuna antiaftosa en dosis suficiente. La edad en la cual la inmunización es factible es de 3-4 meses para los terneros provenientes de madres inmunes. Se obtendrán resultados mejores si la dosis de vacuna es dividida en dos partes inoculadas a un cierto intervalo, de preferencia 1-2 meses. Lechones provenientes de madres inmunes pueden ser inmunizados a las 6-8 semanas de edad empleando vacunas con adyuvantes DEAE u oleoso, y la aplicación de una segunda dosis de vacuna puede ser hecha 3 meses después en el caso de que el cerdo esté destinado a un establecimiento de cría.

La factibilidad de tales recomendaciones depende de los métodos de manejo en uso. Hay urgente necesidad de nuevas investigaciones en este campo para determinar resultados que se obtienen con diferentes regímenes de vacunación en condiciones diferentes de manejo y en condiciones naturales en el campo. Estas serán ahora factibles con los métodos más simples de que se dispone actualmente para determinar la inmunidad.

REFERENCIAS

- ANDERSON, E.C. (1969). Report Res. Group, Europ. Comm. Control F.M.D., September 1969. F.A.O., Rome.
- GAGLIARDI, G., ZOLETTO, R. (1967). *Atti soc. Ital. Sc. Vet.* 21, 805.
- GIRAUD, M., GUILLOTEAU, B., PERROT, A., DEBROCH, C., PRUNET, P. (1969). *Bull. Off. int. Épizoot.* 71, 285.
- HONIGMAN, M.N., GOMES, I., ABREU MARTINS, I., LOMBARDO, R.A. (1971). *Bltn Centro Panamericano Fiebre Aftosa*, 2, 12.
- McKERCHER, P.D., MORGAN, D.O. (1969). Report Res. Group, Europ. Comm. Control F.M.D., September 1969. Rome. F.A.O.
- MACKOWIAK, C., FONTAINE, J., LANG, R., CAMAND, R., PETERMANN, H.G. (1962). *Bull. Off. int. Épizoot.* 57, 937.
- MUNTIU, N., DOHOTARU, V., BERCAN, A., MIRCESCU, G., TOMESCU, A., STIRBU, C. (1969). Rep. Res. Group, Europ. Comm. Control F.M.D., September 1969. Rome, F.A.O.
- MUNTIU, N., DOHOTARU, V., BERCAN, A., MIRCESCU, G., STIRBU, C., TOMESCU, A. (1971). Rep. Res. Group, Europ. Comm. Control F.M.D., September 1969. Rome, F.A.O.
- MUNTIU, N., DUMITRESCU, A., DOHOTARU, V., NEGRUTIU, T., BERCAN, A., MIRCESCU, G., STIRBU, C., TOMESCU, A. (1972). XIII Conf. Perm. Comm. F.M.D. of O.I.E., Paris, O.I.E.
- NATHANS, I. (1965). Immunization of pigs against foot-and-mouth disease with a vaccine containing inactivated virus. Thesis, University of Utrecht, Netherlands.
- WISNIEWSKI, J., JANKOWSKA, J. (1972). XIII Conf. Perm. Comm. F.M.D. of O.I.E., Paris, O.I.E.
- WITTMANN, G., MUSSGAY, M. (1970). Rep. Res. Group, Europ. Comm. Control F.M.D., October 1971. Rome, F.A.O.

RELACIONES ENTRE EL VIRUS DEL LEON MARINO DE CALIFORNIA
Y EL VIRUS DEL EXANTEMA VESICULAR

Dr. J. J. Callis*

En 1932 se informó sobre una enfermedad vesicular en porcinos, en un criadero de cerdos en California, que era indistinguible de la fiebre aftosa. Todos los animales directa o indirectamente implicados en el brote fueron sacrificados y enterrados, los locales lavados con solución de cal viva, y no se introdujo ganado nuevo por un período de 90 días. Estos eran los procedimientos que estaban en vigor para la fiebre aftosa en aquella época (1).

El virus del brote de 1932 no produjo lesiones cuando fue inoculado en cobayos, terneros y novillos, en una vaca adulta, y en dos caballos. Sobre la base de estas pruebas se hizo el diagnóstico de fiebre aftosa aunque se admitió que era bastante atípico. Todo el virus de aquel brote fue destruido (2, 3).

En 1933, apareció una enfermedad en California, también limitada a porcinos, y clínicamente semejante al brote de 1932. El virus recolectado de este brote se probó en una variedad de animales. Enfermaron todos los cerdos y 4 de 9 caballos, pero no ocurrió lo mismo con los 7 bovinos y los 37 cobayos utilizados en la prueba. Los que tenían experiencia con la fiebre aftosa, tampoco esta vez hallaron ninguna diferencia clínica entre aquella enfermedad de los porcinos y la fiebre aftosa que ellos conocían y, por consiguiente, todos los animales fueron sacrificados y se aplicaron medidas de cuarentena. Sin embargo, posteriormente se concluyó, mediante pruebas de inmunidad cruzada con la estomatitis vesicular y la fiebre aftosa, que

existía una nueva enfermedad de los porcinos y fue denominada exantema vesicular del cerdo (3).

Esta enfermedad volvió a presentarse en los años 1934, 1935 y 1936 en California, pero no fue nuevamente identificada hasta 1939 y desde entonces hasta 1955 fue diagnosticada todos los años en California (4).

En 1952 la enfermedad apareció en Nebraska en una planta de producción de materiales biológicos. Se investigó la fuente de infección, determinándose que tuvo origen en cerdos que habían sido alimentados con desechos de comida provenientes de un tren transcontinental que procedía de California. Se supuso que los desechos de carne de cerdo fueron la fuente de la enfermedad. Aun cuando ésta se mantuvo dentro de las fronteras del estado de California durante 20 años, en esta oportunidad salió de ese estado e invadió Nebraska. Durante los 15 meses que siguieron, la enfermedad se diseminó en 42 de los 48 estados existentes en aquella época (4).

En 1946 y 1947 la enfermedad fue diagnosticada en cerdos provenientes de California y en tránsito a Honolulu. Las medidas de cuarentena y sacrificio inmediato, previnieron que la enfermedad alcanzara Hawai (4). En 1955 se diagnosticó en Islandia y el origen fue rastreado hasta una hacienda local que para alimento de los cerdos usó residuos crudos provenientes de una base militar local de los Estados Unidos. La enfermedad fue erradicada sin demora mediante el sacrificio de todos los animales infectados o

* Director del Centro de Enfermedades de Animales de Plum Island, Departamento de Agricultura de los E.U.A. P.O. Box 848, Greenport, Long Island, New York 11944, E.U.A.

expuestos (5). Estas fueron las únicas ocurrencias de la enfermedad conocidas fuera de los Estados Unidos.

El Departamento de Agricultura de los Estados Unidos decidió implementar en 1952 un programa de erradicación que fue concluido finalmente en 1956, después que cada uno de los 48 estados aprobaron leyes prohibiendo la alimentación de cerdos con desechos crudos (6). Esta medida, junto con el sacrificio y la eliminación de animales infectados, y con la decontaminación y cuarentena de los predios, tuvo éxito en la erradicación de la enfermedad en Estados Unidos y puesto que era el único país donde la enfermedad se había presentado, se concluyó que este era el primer caso de eliminación de una enfermedad (7).

En el otoño de 1972, científicos de la Universidad de California, en Berkeley, aislaron varios virus en dos especies de mamíferos marinos. Estos virus se propagaron bien en sistemas de cultivo de tejidos de origen porcino. Microfotografías electrónicas de cultivos de tejidos infectados contenían partículas virales semejantes al virus del exantema vesicular del cerdo. Actualmente se hicieron 6 aislamientos de virus de mamíferos marinos (leones marinos de California y focas) provenientes de varios lugares costeros de California, de la Isla San Miguel, fuera de la costa californiana y las islas Pribilof, en la cadena de las islas Aleutianas próximas a la costa de Alaska (8).

Los seis virus mencionados fueron enviados al Centro de Enfermedades de Animales de Plum Island para su estudio, identificación adicional y comparación con los otros virus del exantema vesicular (serotipos A a K) mantenidos en el cepario. En el cerdo, los seis virus produjeron vesículas indistinguibles de aquellas producidas por el exantema vesicular. Inoculando el virus por vía intradérmica en el hocico, labios y patas, se desarrollan vesículas en el punto de inoculación en un lapso de 48 horas. Se produce un aumento de la temperatura casi simultáneo

con la aparición de las vesículas. La recuperación se inicia a los pocos días, a no ser que surjan infecciones secundarias que retarden el proceso de curación. Los animales convalecientes desarrollan anticuerpos neutralizantes, precipitantes y fijadores del complemento para el virus homólogo. No hay reacciones cruzadas de tales sueros con los antígenos de la fiebre aftosa, estomatitis vesicular y con la enfermedad vesicular europea de los porcinos (9).

Entre los seis virus aislados, por lo menos 2 serotipos parecen estar representados; sin embargo, prosiguen los estudios comparativos entre los virus de mamíferos marinos y los 12 serotipos diferentes del virus del exantema vesicular (9).

Cuatro de los virus aislados provocan pequeñas lesiones vesiculares dentro de 48 horas después de la inoculación por vía intradérmica en las lenguas de caballos. Los sueros provenientes de estos animales contienen anticuerpos para el virus homólogo 14 días después de la recuperación (9).

Los virus de mamíferos marinos fueron examinados por métodos bioquímicos y comparados con los virus del exantema vesicular y con virus picorna felino. Los 3 virus están estrechamente relacionados. Ellos sedimentan en igual forma en gradientes de densidad de sacarosa y es posible aislar de cada uno de ellos el ARN infeccioso. Los cápsides de cada uno de estos tres virus constan de una única proteína principal con un peso molecular de cerca de 60.000 daltons. Esta propiedad común es una evidencia convincente de la estrecha relación entre estos 3 virus y también para su subclasificación como calicivirus. Hasta ahora, se halló que todos los miembros de la familia picorna virus poseen 4 proteínas principales en los cápsides (10).

Smith *et al.* formularon la teoría de que el virus del exantema vesicular pudo haber penetrado en los cerdos en California en 1932 por la alimentación de éstos con mamíferos marinos. Aparentemente, en aquella época este era un procedimiento bastante común, que

se supone que no ocurre en la actualidad por lo menos normalmente, debido a cambios producidos en el área, a la disminución general del número de tales animales y a los cambios operados en la industria porcina (8). Puesto que los aislamientos de virus de mamíferos marinos son semejantes a los de la enfermedad de porcinos actualmente extinguida: el exantema vesicular del cerdo, podrá resolverse la cuestión del origen del brote de esta enfermedad ocurrido en 1932 en California, pero se nos plantean otros interrogantes serios. El interrogante más inmediato podría ser ¿cual es la conducta a adoptar con la práctica de permitir la introducción de tales especies en los parques zoológicos? ¿Deben tales animales estar libres de estos virus antes de su entrada? y, ¿qué hacer con los que ya están en los zoológicos? ¿Cual es el significado de estos virus para el mamífero ma-

rino? ¿Será que provocan una enfermedad o que hacen parte integrante de la flora viral normal de estas especies? ¿Será que este virus está asociado con la alta incidencia de abortos en los animales de los cuales se aisló el virus? Mientras no podamos responder a estos interrogantes, nuestra responsabilidad es, por lo menos, evitar la posibilidad de contacto entre estas especies y el porcino, hasta que se aclaren algunas de esas dudas.

Los mamíferos marinos pueblan las costas de muchos países del mundo. Es de esperar que en el futuro los científicos que estudian la fauna marina y aquellos de nosotros dedicados a las enfermedades de los animales domésticos o a la producción de alimentos de origen animal habrán de trabajar en estrecha colaboración con evidentes ventajas para ambos grupos.

BIBLIOGRAFIA

1. MOHLER, J.R., SNYDER, R. The 1932 outbreak of foot-and-mouth disease in Southern California. U.S.D.A., Miscellaneous publication No. 163, p.l., 1933.
2. TRAUM, J. Foot-and-mouth disease differential diagnosis. Proc. 5th Pacific Sci. Congress, Canada 4: 2907, 1933.
3. TRAUM, J. Foot-and-mouth disease: Specific treatment eradication and differential diagnosis. Proc. 12th Internat. Vet. Cong. 2: 87, 1934.
4. MADIN, S.H. Chapter 10, Vesicular Exanthema, Diseases of Swine. 3rd Edition edited by H.W. Dunne, pp. 270-291, 1970.
5. PALSSON, P.A., EINARSSON, A. Nýr svínasjukdómur Blöarupot. Vasahandbok baenda, Búnaearfélag., p.l., 1956.
6. SIMMS, B.T. Progress made in Eradication of Vesicular Exanthema, Report Chief, Bur. Anim. Ind. 1-2: 118, 1953.
7. MYERS, L.P. Vesicular Exanthema control program. Bull. Calif. Dept. Agr. 45: 73, 1955.
8. SMITH, A.W., AKERS, T.G., MADIN, S.H., VEDROS, N.A. San Miguel Sea Lion Virus Isolation. Preliminary Characterization and Relationship to Vesicular Exanthema of Swine Virus. Nature, Vol. 244, No. 5411 pp. 108-109, 1973.
9. DARDIRI, A.H. Personal communications. Plum Island Animal Disease Laboratory, 1973.
10. BACHRACH, H.L., HESS, W.R. Animal Picornaviruses with single major capsid protein. Biochem. and Biophys. Res. Communications (in press).

FIEBRE AFTOSA EN BOVINOS.
ALGUNAS RELACIONES ENTRE LA PATOGENICIDAD Y LA EPIZOOTIOLOGIA

Dr. J. J. Callis*

Definición

La fiebre aftosa es una de las más contagiosas enfermedades de los animales. Es de origen viral y afecta principalmente a los bovinos, porcinos, ovinos, caprinos y a otros animales de pezuña hendida domésticos y salvajes. Fue descrita por la primera vez en Italia en 1546. Aislado el agente causante, se determinó que es un virus y posteriormente se comprobó que mide cerca de 23 milimicrones de diámetro. Su elevada infecciosidad para algunas especies, la habilidad del virus de diseminarse con velocidad, su amplia distribución y su pluralidad de serotipos, constituyen algunas de las características que dificultan el control de la fiebre aftosa (1).

Distribución geográfica

Esta enfermedad ocurre en todas las grandes áreas terrestres del mundo con la excepción de Norte América, América Central, Panamá, Australia y Nueva Zelandia. En Norte América no ocurre desde 1953 en que fue erradicada en México. El último brote ocurrió en Canadá en 1952, en E.U.A. en 1929 y en Australia en 1872 (1).

Consideraciones económicas

En todos los países donde ha existido, la enfermedad interfirió con el comercio de importación y exportación de animales y de productos de origen animal. La entrada a los países libres de fiebre aftosa de productos

provenientes de áreas enzoóticas está sometida a prohibiciones o restricciones severas que estas medidas influyen notablemente en el precio de los mismos. Debido a la interferencia de la fiebre aftosa en el comercio internacional, ocasionalmente la enfermedad fue denominada como una enfermedad política; sin embargo, los problemas resultantes del control de la fiebre aftosa son tan políticos como reales. Se da amplia publicidad a cada nueva epizootia y, frecuentemente, los responsables por su erradicación son criticados. A pesar de que la enfermedad tiene una larga historia del interés público por la misma, y de las medidas de cuarentena aplicadas por muchos países en todo el mundo, el control efectivo está todavía en un futuro remoto (1).

Gama de huéspedes

Mientras que la infección natural se limita a animales de pezuña hendida, domésticos y salvajes, experimentalmente se puede propagar el virus en otras especies que incluyen: perros, gatos, gallinas, ratas, ratones, conejos y cobayos. El caballo nunca fue infectado natural o experimentalmente. La enfermedad existe en una amplia variedad de animales salvajes como ser: ciervos, antílopes, jabalíes y búfalos -durante una epizootia cualquiera de ellos puede constituir una amenaza para el control de la infección. El hombre es raramente afectado por lo que la enfermedad no es considerada un problema de salud pública (1).

* Director del Centro de Enfermedades de Animales de Plum Island, Departamento de Agricultura de los E.U.A. P.O. Box 848, Greenport, Long Island, New York 11944, E.U.A.

Patogenia

Sobre el desarrollo de la enfermedad así como sobre los signos clínicos, durante décadas y hasta hace siglos se fue acumulando abundante información y repetida en manuales sin referencia de la fuente original. Hasta hace poco tiempo se pensaba, y así figura en la literatura, que la infección natural de los bovinos se efectuaba por vía oral. Aun cuando ésta es considerada una de las vías de infección, en los últimos 15 a 20 años se va acrecentando el número de investigadores que acumulan evidencias que nos llevan a admitir que el modo más importante de transmisión del virus aftoso es por aerosol que provoca una infección inicial en el tracto respiratorio superior (2,3,4,5). Resultados obtenidos con la instilación intranasal del virus aftoso, utilizada en nuestro laboratorio, nos llevan a concordar con la sugestión de que ésta es la vía más común o natural de infección (6). Durante los últimos 25 años han habido ocasiones en que se sabía que el virus aftoso se diseminaba por aerosol, de locales infectados a lotes cercanos donde se mantenían bovinos normales. En una oportunidad el virus escapó de un local infectado y produjo la infección en bovinos que estaban a cerca de tres kilómetros de distancia. No hubo ningún contacto directo entre uno y otro lugar. En las instalaciones de nuestro laboratorio se demostró la transmisión por aerosol a una distancia de hasta casi 70 m (7). El virus introducido por este medio, estableció infección en la región faríngea de bovinos y pudo ser recuperado de estas áreas ya a las 12 horas postinfección (8). En la garganta de estos animales el virus se multiplicó en los tejidos del paladar blando, tonsilas, narinas posteriores y esófago.

Aun cuando actualmente existe abundante evidencia de que la transmisión por aerosol es probablemente la vía de transmisión más natural, no se debe olvidar que el virus aftoso puede ser transmitido por muchas otras vías incluyendo la ingestión, la vía conjuntival (9), a través del tejido mamario tal como

puede ocurrir con máquinas de ordeño contaminadas, a través de la vagina (inseminación natural o artificial), y por inoculación en casi cualquier parte de la superficie del cuerpo. Existe amplia evidencia de que el virus puede penetrar en el cuerpo del animal por cualquiera de las vías mencionadas.

El virus después de replicarse en los tejidos de la región nasofaríngea, es transferido hacia los ganglios linfáticos faríngeos o submaxilares donde vuelve a multiplicarse y una vez que ha penetrado en el sistema linfático puede diseminarse por todo el cuerpo del animal. Después de una nueva multiplicación en el sistema linfático, el virus es transportado por la sangre hasta los puntos de su predilección, tales como la lengua y otras áreas de la cavidad bucal, las patas y cualquiera de los órganos o áreas del cuerpo en los que el virus puede multiplicarse, tales como el músculo cardíaco, los pilares del rumen, el tejido mamario y la piel. Cottral estudió la viremia en bovinos inoculados con virus aftoso en la lengua. En estas condiciones encontró viremia ya a las 2 horas, pero pudo también encontrarla a las 14 horas. Las diferencias dependen de la dosis, de la virulencia y de la influencia del huésped. Sin duda si él hubiera investigado la instilación intranasal habría obtenido otros resultados. Concluyó también que el plazo en que la viremia precede a los signos clínicos y a las lesiones puede variar de 8 a 40 horas. Si la dosis de virus es elevada, la viremia inicial puede estar compuesta predominantemente de partículas del virus inoculado. Cuando se inoculan dosis más bajas de virus, probablemente la mayor parte de los componentes de la viremia son las partículas de virus replicadas en el huésped. Los niveles de virus empleados también pueden influir en el título máximo de viremia. Sin embargo, cuando todos los datos fueron considerados, concluyó que el punto máximo de la viremia ocurrió entre 40-42 horas postinoculación. Las variaciones en los títulos de viremia probablemente son más influenciadas por las variaciones

de la respuesta del huésped, que por las diferencias entre las cepas de virus. En lo que se refiere a la duración de la viremia, Cottral halló que la más corta viremia en bovinos fue como de tres días y la más prolongada de 5 días. Independientemente de la dosis de virus o de la vía de inoculación, la viremia no persistió más que cinco días.

Cuando se inocularon bovinos por vía intramuscular o por aerosol, el tiempo de iniciación de la viremia fue retardado uno o más días pero la duración aún no excedió cinco días. En el momento en que el virus está presente en todos los líquidos y tejidos del cuerpo, la totalidad de las lesiones en los sitios de predilección están probablemente en su apogeo. La infección en estas áreas generalmente se inicia en una pequeña área blanca en el epitelio, que se llena posteriormente de líquido formando una vesícula. La vesícula puede agrandarse y unirse con otras. Las vesículas pueden reventar y el líquido escurre por las escoriaciones de cubierta epitelial. En este período el epitelio puede desprenderse dejando una úlcera o área erosionada. Una capa fibrinosa de color gris se forma sobre las lesiones. Esta capa cambia de color tornándose amarilla, marrón o verde. En seguida el epitelio se restituye pero se desarrollan líneas de demarcación a causa de las diferencias de color entre los tejidos viejo y nuevo. Gradualmente las líneas de demarcación desaparecen de manera que en algunos casos no quedan cicatrices permanentes. El período desde el comienzo hasta el fin de una lesión de fiebre aftosa está influenciado por varios factores tales como: salud general del animal, alimentación y especialmente contaminación bacteriana o infección secundaria en el sitio de la lesión primaria. Sin embargo, el término medio es de 15 a 30 días antes que el nuevo epitelio se genere para cubrir el área erosionada que queda cuando la vesícula revienta o cuando se desprende el epitelio (3).

Durante el período en que las lesiones están presentes, el animal presenta abundan-

te salivación y la saliva frecuentemente cae colgando de los extremos de la boca como un material en forma de filamentos viscosos. En esta fase de la infección la saliva está cargada de virus. Además el animal lagrimea abundantemente y hay escurrimiento nasal. Si las lesiones se desarrollan en las patas, el animal camina con dificultad y generalmente cojea. Está propenso a echarse y cuando se le obliga a ponerse en pie, coloca las cuatro patas debajo de su cuerpo para mejor distribuir su peso. Durante este período los animales se mueven con gran dificultad. Casi al mismo tiempo que las vesículas revientan termina el período febril. Esto es seguido por el fin de la viremia y es en esta fase en que comienzan a aparecer anticuerpos neutralizantes y de otros tipos. A medida que los anticuerpos se desarrollan, hay una caída del título de virus en los tejidos y otros líquidos. Al producirse la cicatrización de las lesiones el animal empieza de nuevo a comer. Hay una desaparición gradual del virus en los tejidos y otros líquidos del cuerpo y una eventual curación de las lesiones. Desde el comienzo hasta el fin, los signos clínicos durarán de 15 a 30 días dependiendo de los varios factores mencionados.

Portadores

Por muchos años los ganaderos, los investigadores y los funcionarios oficiales encargados del control estuvieron convencidos de que una vez que el bovino se había recuperado de fiebre aftosa, resultaba ser un importante factor en la epizootiología de la enfermedad. En la literatura existen varios informes del papel que tales animales desempeñan en la diseminación de la infección. Otros investigadores tuvieron éxito al recuperar virus de animales que habían pasado la enfermedad. No fue sino hasta que van Bekkum y sus colaboradores, en Holanda, publicaron su trabajo sobre portadores que contiene una valiosa información sobre el problema. Estos

investigadores hallaron que un gran porcentaje de animales portaba el virus en sus gargantas por diversos períodos de tiempo subsiguientes a la infección (10).

Actualmente, tanto los investigadores de los laboratorios de todo el mundo como los funcionarios responsables por el control, están bien enterados de que el ganado que está infectado con fiebre aftosa puede tornarse portador de virus por largos períodos de tiempo. Es también de conocimiento común que los animales que ya fueron vacunados y que posteriormente fueron expuestos al virus pueden tornarse también portadores y no presentan evidencia de enfermedad. Mientras que los portadores pueden ser fácilmente detectados, el verdadero papel de tales portadores en la diseminación de la enfermedad, no se conoce todavía debido a que nadie ha demostrado aún que tales portadores son responsables de la infección de otros bovinos. Sin embargo, muchos investigadores concluyen que eso ocurre sólo porque el portador no fue estimulado para eliminar bastante virus durante determinados períodos de "stress" o que el animal susceptible por alguna razón, no tuvo contacto adecuado con el virus liberado por el portador o una combinación de estas circunstancias (11,12). Mientras no ha sido demostrada la diseminación mediante portadores, la mayoría de los investigadores los consideran como un riesgo en potencia y, consecuentemente, se hace un esfuerzo para excluir tales animales del tráfico internacional de ganado de países donde existe fiebre aftosa a aquellos que están libres de la enfermedad y de países donde un tipo de virus puede existir, a otro donde tal tipo de virus no es conocido, tal como ocurrió cuando ganado cebú fue remitido de Brasil para Venezuela.

Después de haber superado la infección, los animales recuperados generalmente son inmunes al tipo de virus que los afectó. Se pueden detectar anticuerpos neutralizantes ya a los cuatro días postinfección y el nivel máximo de anticuerpos generalmente se desarrolla por lo menos a los 21 días después de

la infección (13).

La forma descrita es la común o típica de la fiebre aftosa. Sin embargo, debe recordarse que existen otras varias formas de la enfermedad que los funcionarios responsables de la sanidad del ganado deben conocer. Esto incluye la forma de la enfermedad en la que el virus se replica, con desarrollo de lesiones o sin ellas pero que si existen, se localizan en lugares donde no pueden ser observadas.

La otra forma es la que resulta cuando el animal es inoculado por vía intranasal. En resumen, debe recordarse que en el ganado, la fiebre aftosa o los signos o la patogenia de la enfermedad pueden variar dependiendo de varios factores incluyendo el tipo y subtipo de virus inoculado, cantidad de virus inoculado, especies, condición, edad y salud del receptor con especial referencia a las infecciones inaparentes (14).

Transmisión

Como ya se ha indicado, después de la inoculación el virus comienza a reproducirse algunas veces ya a las dos horas. En otros casos la reproducción no se detecta por días.

Burrows ha estudiado la excreción del virus tipo O previa al desarrollo de lesiones. En su estudio fueron colocados grupos de bovinos, ovinos y porcinos en un recinto de aislamiento con ganado infectado por inoculación. Se recogieron muestras diariamente de los animales de prueba, para evidencia de virus en la sangre, leche, faringe, recto y prepucio. El virus fue recuperado de las muestras faríngeas de la mayoría de los animales y se recuperó también virus de la sangre, leche, recto, prepucio y vagina varios días antes que los signos clínicos de la enfermedad aparecieran. En este estudio se mostró que algunos bovinos y ovinos eliminaban virus por períodos de hasta 5 días y porcinos 10 días antes de que la enfermedad fuera diagnosticada (4).

Sellers y Parker estudiaron la excreción aérea del virus de la fiebre aftosa de bovinos, ovinos y porcinos infectados (15). La excreción más alta por volumen de aire exhalado fue en cerdos. La recuperación máxima ocurrió 41 horas después de la infección en porcinos y bovinos, cuando las lesiones se habían generalizado, y 17 horas después de la infección en ovinos cuando las lesiones aún no habían aparecido. Estos investigadores sugirieron que el sitio de producción del virus excretado como aerosol es el tracto respiratorio superior. Además afirmaron que en condiciones de baja temperatura y 70% de humedad relativa hay posibilidad de sobrevivencia del virus a distancias de 100 km. En el brote de 1967/68 en Gran Bretaña hubo evidencias que refuerzan esta teoría y se atribuyó la diseminación mediante el aire. Por otro lado, investigadores en áreas endémicas cálidas y secas tienden a dar poca importancia a la transmisión del virus por medio del aire, probablemente con fundadas razones.

Cottral *et al.* investigaron el virus aftoso en el semen de bovinos experimentalmente infectados con 6 de los 7 tipos inmunológicos conocidos y demostraron su presencia en el semen a las 12 horas postinoculación y varias horas antes de la aparición de los signos de la enfermedad. Se halló virus en 58 de 71 muestras de semen de 16 bovinos durante 10 días. Novillos artificialmente inseminados con semen de bovinos infectados desarrollaron fiebre aftosa. De este estudio se desprende que el semen de bovinos puede contener virus aftoso antes que aparezcan los síntomas de la enfermedad y que ésta puede transmitirse mediante inseminación artificial (16).

En Brasil, Pustiglioni Neto, estudió el virus aftoso en semen bovino e informó sobre el aislamiento del virus en 7 de 22 ampollas de semen para inseminación artificial seleccionadas al azar. Obtuvo 5 aislados de virus de tipo C y 2 de tipo O (17).

El hecho de que la leche proveniente de vacas enfermas con fiebre aftosa puede contener virus aftoso es conocido hace muchas

décadas (18). LeBailey en 1920 llamó la atención sobre el hecho de que el virus aftoso puede estar en la leche antes del apareamiento de signos de la enfermedad (19). Sin embargo, hasta el brote de Gran Bretaña de 1967/68 no se comprobó que la leche infectante fuera un factor en la diseminación de la enfermedad (20). Además se encontraron niveles de virus en la leche antes de diagnosticar la enfermedad lo que presentó un problema para el control. Los investigadores concluyeron que la leche infecciosa fue indudablemente responsable de una cantidad de brotes durante la epizootia.

Basándose en estas observaciones, en 1971 Burrows estudió la excreción del virus aftoso en la leche de vacas experimentalmente infectadas por exposición en contacto y por inoculación del virus en la ubre (21). Encontró virus en la leche algunas horas antes de la aparición de los signos de la enfermedad cuando los animales fueron expuestos por contacto y por inoculación en la ubre; sorprendentemente un animal continuó liberando virus durante 23 días postinoculación y los animales convalecientes fueron susceptibles a reinfección por inoculación en la ubre.

La evidencia disponible sobre la implicación de la leche en la diseminación de la enfermedad, inducirá a los funcionarios oficiales encargados de la sanidad de los animales a reexaminar las medidas de control para incluir una mejor vigilancia sobre la leche, proveniente de animales del área donde la enfermedad está presente. Puesto que ahora es evidente que los bovinos liberan virus en la leche, a veces de 2 a 3 días antes de la aparición de los signos clínicos, es obvio que el área que circunda al brote en donde se aplican medidas de control de la leche deberá ampliarse.

Después del brote de 1967/68 de Gran Bretaña, Sellers investigó la tasa de inactivación del virus aftoso en la leche a varias temperaturas y diferentes pH, hallando que ambos factores influyen marcadamente los

resultados (22). A un pH de 6,7 el 99,99% del virus fue inactivado después de 6 minutos a 56° C; 1 minuto a 63° C; 17 segundos a 72° C y menos de 5 segundos a 80 y 85° C. Cuando el pH de la leche era de 7,6 el tiempo de inactivación hasta una sobrevivencia del 0,001% fue de 30 minutos a 56° C, 2 minutos a 63° C; 55 segundos a 72° C y menos de 5 segundos a 80° C. Después de estos plazos fueron detectados vestigios de virus.

En la práctica el contenido de virus y el pH de la leche infectada serían afectados en la medida en que la leche es diluida con leche no infectada ya sea en el restablecimiento o durante procedimientos de manejo a granel. El virus en la leche infecciosa puede estar en forma de virus libre o en las células en cuyo caso el virus sobrevivirá más tiempo. Poco es lo que se ha investigado respecto a la sobrevivencia del virus en leche infecciosa sometida a la deshidratación como se hace en la industria. La mayor parte de la leche deshidratada es previamente pasteurizada y el volumen es posteriormente reducido a la mitad por evaporación y en seguida la leche es desecada sobre un secador cilíndrico o proyectada en forma de gotitas pulverizadas en un ambiente caliente. La sobrevivencia del virus en esos procesos industriales debe recibir la debida atención, porque tales productos pueden ser peligrosos, especialmente si son usados para alimentación de animales en las áreas libres.

Cottral *et al.* realizaron pruebas para estudiar la sobrevivencia del virus aftoso en carnes tratadas y no tratadas (23). En sus estudios se analizaron muestras de músculo, sangre y nódulos linfáticos y fue comprobada la presencia de virus en todas las muestras frescas como también en las mantenidas durante 16, 30 y 50 días a 4° C. Las carcasas almacenadas a 4° C contenían virus demostrable en la médula ósea de las costillas a 14, 60 y 73 días y en los nódulos linfáticos, sangre y músculos a los 60 días.

Los cambios químicos que se producen durante la maduración de la carne inactivan el

virus en el tejido muscular pero no afectan mucho al virus contenido en los nódulos linfáticos, en los grandes coágulos de sangre o en la médula ósea. Como resultado de estos y otros estudios y observaciones, algunos países libres de fiebre aftosa, que en la actualidad importan carne de países infectados, exigen que la carne enviada sea previamente deshuesada y no hay ninguna duda que este procedimiento disminuye el riesgo de tales importaciones.

En un estudio conjunto realizado por funcionarios de los gobiernos de la Argentina y de los Estados Unidos se ha demostrado claramente que la vacunación redujo notablemente las probabilidades de recuperar virus de nódulos linfáticos y de otros tejidos de animales faenados que 32 horas antes habían sido expuestos al virus. Esto es otro ejemplo de que a medida que la inmunidad se desarrolla en las poblaciones de ganado, disminuye el riesgo de la diseminación de la enfermedad incluyendo la carne entre los varios medios de diseminación (24).

Gallinas y Cottral investigaron la presencia y persistencia del virus aftoso en el cuero bovino y mostraron que los 7 tipos antigénicos del virus poseen la misma afinidad para todas las áreas de la piel. Cantidades considerables de virus estaban presentes en el cuero de 13 áreas diferentes del cuerpo, fueran estas áreas con pelo o sin pelo. En los cueros de algunos animales el virus aftoso persistió hasta 5 días después de cesar la viremia. Esta observación tiene también importancia epizootiológica en el comercio internacional de cueros por que la inactivación del virus intracutáneo es más difícil que la del virus adherido a la superficie de los cueros (25).

En estudios adicionales sobre la sobrevivencia de virus aftoso en cueros de bovinos mantenidos a bajas temperaturas se verificó que el virus persiste durante meses a temperaturas bajas, complicando aún más el impacto epizootiológico de tales productos.

Scott *et al.* investigaron el contenido de virus aftoso en la hipófisis y en el sistema nervioso de bovinos infectados y hallaron en estos órganos títulos elevados durante las fases pre-clínica, clínica y en el inicio de la convalecencia de la enfermedad. Esta información sobre la patogenicidad del virus en estos 2 tejidos es una indicación adicional de que el virus aftoso pasa por el torrente circulatorio o que puede replicarse en casi todos los tejidos y órganos del cuerpo. En el caso en que tales productos sean utilizados en la elaboración de especialidades farmacéuticas para uso pecuario deben ser observados cuidados especiales. En la literatura se mencionan casos en que extractos hipofisarios importados de países afectados por fiebre aftosa a un país libre de ella, fueron responsables de una epizootia de la enfermedad. El proceso de extracción de hormonas de ésta y de otras glándulas no inactivan el virus aftoso y de este modo, cuando tales productos derivan de órganos de animales infectados y posteriormente son empleados en la industria pecuaria, constituyen un riesgo de introducir la enfermedad (26).

Resumen

El virus aftoso puede ser transmitido por varios medios, pero se considera que las dos

vías más comunes son por aerosol y por ingestión. La penetración del virus en las células se realiza rápidamente y los puntos principales de replicación viral probablemente son las células del área naso faríngea. Desde ahí el virus penetra los sistemas circulatorios linfático y sanguíneo y su multiplicación se realiza primero en los puntos de predilección y luego en muchas otras áreas del cuerpo del animal. Los factores que influyen en este proceso comprenden: las características del virus que infecta al animal, el medio ambiente y el huésped. Los animales infectados son capaces de transmitir la enfermedad a otros animales mediante el aire exhalado, la saliva, la orina, las heces y la leche. La mayoría de los tejidos puede contener virus y de este modo constituyen una amenaza para la diseminación de la enfermedad. El ganado recuperado podrá ser portador de virus; sin embargo, tales animales no provocaron la transmisión del virus a contactos susceptibles de laboratorio. Por el contrario, hay evidencia circunstancial que esto ya ocurrió en el campo. Debido a la existencia de portadores y a la amenaza que representan los productos provenientes de animales infectados para los países libres de fiebre aftosa que son importadores de carne, la presencia o ausencia de la fiebre aftosa en el país exportador influye sobre los precios ofrecidos en el mercado mundial para los animales y productos de origen animal.

BIBLIOGRAFIA

1. CALLIS, J.J., McKERCHER, P.D., GRAVES, J.H. Foot-and-Mouth Disease-A Review. Journal of the American Veterinary Medical Association, Vol. 153, No. 12, pp 1798-1802 (1968).
2. POTEI, K. Recent Results in the Area of the Experimental Pathology of Foot-and-Mouth Disease. Monatshefte fuer Veterinaer Medizin, No. 13, pp 401-405 (1958).
3. COTTRAL, G.E. Diagnosis of Bovine Vesicular Diseases. Journal of the American Veterinary Medical Association, Vol. 161, No. 11, pp 1293-1298 (1972).

4. BURROWS, R. Excretion of Foot-and-Mouth Disease Virus Prior to the Development of Lesions. *The Veterinary Record*, Vol. 82, pp 387-388 (1968).
5. McVICAR, J.W., GRAVES, J.H., SUTMOLLER, P. Growth of Foot-and-Mouth Disease Virus in the Bovine Pharynx. *Proc. 74th Annual Meeting, U.S.A.H.A.*, pp 230-234 (1970).
6. McVICAR, J.W., SUTMOLLER, P. Foot-and-Mouth Disease in Sheep and Goats: Early Virus Growth in the Pharynx and Udder. *Proc. 75th Annual Meeting, U.S.A.H.A.*, pp 194-199 (1971).
7. McKERCHER, P.D., DELLERS, R.W., GIORDANO, A.R. Foot-and-Mouth Disease Infection in Cattle Housed in an Isolation Unit. *Cornell Veterinarian*, Vol. LVI: No. 3 (1966).
8. COTTRAL, G.E., BACHRACH, H.L. Foot-and-Mouth Disease Viremia. *Proc. 72nd Annual Meeting, U.S.A.H.A.*, pp 383-399 (1968).
9. SUTMOLLER, P., McVICAR, J.W. Foot-and-Mouth Disease: Early Virus Growth After Conjunctival Exposure of Cattle. *Archiv. fur Gesamte Virusforschung* (in press).
10. van BEKKUM, J.G., FRANKEL, H.S., FREDERIKS, H.H.J., FRENKEL, S. Observations on the Carrier State of Cattle Exposed to Foot-and-Mouth Disease Virus. *T. Diergeneesk.*, 84, pp 1159-1164 (1959).
11. SUTMOLLER, P., COTTRAL, G.E., McVICAR, J.W. A Review of the Carrier State in Foot-and-Mouth Disease. *Proc. 71st Annual Meeting, U.S.A.H.A.*, pp 386-395 (1967).
12. AUGÉ DE MELLO, P., HONIGMAN, M.N., FERNANDES, M.V. Supervivencia en Bovinos del Virus Modificado de la Fiebre Aftosa. Presented at the 5th Pan American Congress of Veterinary Medicine and Zootechnics, Caracas, Venezuela, 1, pp 58-68 (1966).
13. GOMES, I., FERNANDEZ, A.A., AUGÉ DE MELLO, P. Foot-and-Mouth Disease Circulating Antibodies in Convalescent Cattle. *Bull. Off. Int. Épiz.* 77, pp 731-741 (1972).
14. GRAVES, J.H., McVICAR, J.W., SUTMOLLER, P. Spectrum of Clinical Foot-and-Mouth Disease in Steers. *Proc. 74th Annual Meeting, U.S.A.H.A.*, pp 199-207 (1970).
15. SELLERS, R.F., PARKER, J. Airborne Excretion of Foot-and-Mouth Disease Virus. *Journal of Hygiene* 67, pg. 671 (1969).
16. COTTRAL, G.E., GAILUNAS, P., COX, B.F. Foot-and-Mouth Disease Virus in Semen of Bulls and its Transmission by Artificial Insemination. *Archiv. fur Gesamte Virusforschung*, 23 pg. 362 (1968).
17. PUSTIGLIONE NETTO, L. Isolation of Foot-and-Mouth Disease Virus from Bovine Semen. *Arq. Inst. Biol. (São Paulo)* 38 (1) pp 27-29 (1971). English translation of Isolamento de virus aftoso de semen bovino.
18. TERBRUGGEN, F. The Survival of the Virus of Foot-and-Mouth Disease in Milk and Dairy Products, Part I; and Part II - Cheese and Whey. *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.* Vol. 40 (9) pp 129-134 and Vol. 40 (34) pp 529-533 (1932).
19. LeBAILLEY, C. La virulence du lait dans la fièvre aphteuse. *Compte rendu de l'Académie des Sciences. Paris* 171, pg 373 (1920).
20. HEDGER, R.S., DAWSON, P.S. Foot-and-Mouth Disease Virus in Milk: An Epidemiological Study. *The Veterinary Record*, 87, pp 186-188 and 213 (1970).
21. BURROWS, R., MANN, J.A., GREIG, A., CHAPMAN, W.G., GOODRIDGE, D. The Growth and Persistence of Foot-and-Mouth Disease Virus in the Bovine Mammary Gland. *Journal of Hygiene* 69 (2) pp 307-321 (1971).
22. SELLERS, R.F. Inactivation of Foot-and-Mouth Disease Virus in Milk. *British Veterinary Journal* 125 pg 163 (1969).
23. COTTRAL, G.E., COX, B.F., BALDWIN, D.E. The Survival of Foot-and-Mouth Disease Virus in Cured and Uncured Meat. *Amer. Journal Vet. Res.*, 21 pp 288-297 (1960).

-
24. Publication No. 1343, National Academy of Sciences: Studies on FMD: Report-Argentine-United States Joint Commission on Foot-and-Mouth Disease. Library of Congress Catalog Number 65.62098 (1966).
 25. GAILIUNAS, P., COTTRAL, G.E. Presence and Persistence of Foot-and-Mouth Disease Virus in Bovine Skin. *Journal of Bacteriology*, Vol. 91, No. 6, pp 2333-2338 (1966).
 26. SCOTT, F.W., COTTRAL, G.E., GAILIUNAS, P. Presence of Foot-and-Mouth Disease in the Pituitary and Central Nervous System of Experimentally Infected Cattle. *Proc. United States Livestock Sanitary Association*, 69th Annual Meeting, pp 87-93 (1965).

INVESTIGACIONES BASICAS SOBRE LAS
CARACTERISTICAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA

Prof. Dr. Anton Mayr*

El virus de la fiebre aftosa es, indudablemente, uno de los virus animales más ampliamente estudiados. Sabemos bastante sobre su morfología, estructura, composición fisicoquímica y funciones biológicas. El conocimiento de todas estas características, no solo resulta ser de gran utilidad para estudios comparativos o teóricos sino que sirve de base para la mejor forma de controlar esta enfermedad, tan perjudicial para la agricultura y la economía, especialmente en lo que se refiere al diagnóstico y a la inmunoprofilaxis. Probablemente, el mejor indicador de este estado del conocimiento lo constituye el hecho de que se pueden producir vacunas purificadas, seguras y muy efectivas.

El virus de la fiebre aftosa es un representante de la familia *Picornaviridae*. Estos virus son pequeños, desprovistos de membrana de cubierta, y contienen ácido ribonucleico (ARN de cadena simple). Están formados de un cápside cúbico con 32 capsómeros y son resistentes a los detergentes, el cloroformo y el éter. Pueden ser clasificados en 6 géneros o subgéneros de acuerdo con su isodensidad (CICs g/ml), estabilidad al pH, tasa de sedimentación y comportamiento biológico y serológico (Cuadro 1). El virus aftoso con sus 7 serotipos representa un género por sí mismo. Las características más importantes que lo diferencian de los otros picornavirus son la isodensidad de 1,43, la tasa de sedimentación de 146 S y la gran inestabilidad

al pH. El virus aftoso pierde su infecciosidad cuando el pH desciende por debajo de 7,0.

Desde los puntos de vista estructural y funcional, en el virus aftoso se pueden distinguir 4 diferentes unidades: 1. el virión (146 S), 2. el cápside vacío (75 S), 3. los capsómeros aislados (12 S), y 4. el ácido ribonucleico viral de cadena única (37 S). Las 4 unidades o subunidades toman parte en la reproducción del virus y por lo tanto, están presentes en los tejidos infectados por la fiebre aftosa. Con excepción del ARN ellas actúan como antígeno o alérgeno, o sea que los organismos infectados producen anticuerpos o inmunocélulas contra ellos. Puesto que el virión, el cápside y los capsómeros difieren en su estructura antigénica, los anticuerpos que se desarrollan en un organismo infectado por la fiebre aftosa son también funcionalmente diferentes. También existen diferencias con respecto a la inmunogenicidad aun cuando se comportan uniformemente en su actividad alérgica.

Las 4 unidades estructurales pueden ser aisladas de tejidos infectados por la fiebre aftosa por varios métodos (centrifugación fraccionada, ultrafiltración, centrifugación en cloruro de cesio, precipitación con polietilenglicol y centrifugación zonal en gradiente de sacarosa, etc.) y demostradas en el microscopio electrónico (5, 8, 9, 16, 17) como puede verse en las figuras 1 a 4**.

* Director del Instituto de Microbiología y Enfermedades Infecciosas de los Animales, Universidad Ludwig-Maximilian, Munich, República Federal de Alemania.

** Agradezco al Dr. Strohmaier por haberme cedido las ilustraciones, que pertenecen al trabajo nº 16 de la bibliografía que se anexa.

1. El virión

El virión, de 23 nm de tamaño, sedimentación constante de 146 S, isodensidad 1,43, peso molecular $6,9 \times 10^6$, representa la unidad del virus de la fiebre aftosa que es capaz de reproducirse y de infectar. En él, el cápside con sus capsómeros y el ARN viral se combinan de manera significativa conforme el sistema cúbico con la configuración de un icosaedro truncado. El virión consiste de 31% de ARN y 69% de proteína. Es sensible a la tripsina e inestable al pH inferior a 6,5, en que se divide en unidades menores, que todavía pueden ser identificadas serológicamente como proteínas virales específicas. A 56° C, se inactiva en 30 minutos. Por último, el virión posee todas las características inmunológicas conocidas: es inmunogénico, antigénico y alergénico.

El principio inmunizante del virión conduce a la formación de anticuerpos serotipo específicos neutralizantes, así como de inmunocélulas que protegen contra la enfermedad en caso de reinfección. Esta actividad se conserva aun cuando la capacidad de reproducción del virión es anulada por medio de una cuidadosa inactivación. Este principio constituye la base de las vacunas antiaftosas en uso, preparadas a partir de virus inactivado. Las vacunas antiaftosas modernas, en la forma inactivada, contienen partículas 146 S purificadas y concentradas, cuya actividad inmunizante se aumenta con el agregado de adsorbentes y adyuvantes.

Parece ser que la actividad inmunizante del virión se debe a una fracción proteínica del cápside, sensible a la tripsina, asociada con el polipéptido VP₁. Si las partículas 146 S son tratadas con tripsina, su actividad inmunizante se reduce considerablemente. La tripsina provoca la ruptura de la fracción proteínica VP₁ liberándose una pequeña unidad de peso molecular 19×10^3 . Los otros polipéptidos no son afectados por la tripsina. La proteína inmunogénica, sensible a la tripsina, conduce a la formación de los anticuerpos IgG e IgM. Los anticuerpos IgM, en la

prueba de neutralización, no reaccionan con el virus tratado con tripsina, a la inversa de lo que ocurre con los anticuerpos IgG. Esto indica que tienen una especificidad superior a la de los anticuerpos IgG (5). Ambos tipos de anticuerpos son altamente tipo-específicos.

De acuerdo con su constitución, la estructura antigénica del virión es compleja. No solo forma anticuerpos neutralizantes sino que también da origen a anticuerpos precipitantes y fijadores del complemento.

Los anticuerpos neutralizantes se clasifican en 2 grupos. Uno reacciona con el principio inmunizante del cápside de la partícula viral. Parece prevenir la adsorción del virus a la superficie de la célula. El segundo grupo de anticuerpos neutralizantes corresponde a los puntos de la superficie del virus estables a la tripsina. Si el principio inmunizante del cápside es removido por medio de la tripsina, no se evita la formación de estos anticuerpos. Pueden ser absorbidos por las partículas tratadas con tripsina, mientras que la actividad neutralizante de sueros inmunes obtenida por la aplicación de partículas virales intactas no es absorbida por partículas tratadas con tripsina. El antígeno inmunizante y sensible a la tripsina y el antígeno superficial estable a la tripsina de la partícula 146 S también provocan la formación de anticuerpos fijadores del complemento y precipitantes. Por otra parte, la multiplicación de las partículas 146 S o su aplicación artificial inducen un segundo grupo de anticuerpos fijadores del complemento y precipitantes que pueden ser absorbidos por la unidad 12 S y reaccionan con los capsómeros. No tienen capacidad inmunizante ni neutralizan la reproducción del virus.

En la compleja estructura antigénica de un virión del virus aftoso se pueden distinguir 3 antígenos virales específicos importantes: 1. el antígeno inmunizante del cápside, sensible a la tripsina, 2. el antígeno del cápside, estable a la tripsina y 3. el antígeno del

capsómero. El Cuadro 2 muestra un resumen de estos antígenos y sus propiedades estructurales y funcionales.

El virión completo, apto para reproducirse, también posee una leve capacidad alergógena (Cuadro 3), además de su infecciosidad, sus propiedades inmunizantes y otras propiedades antigénicas. En el curso de la infección - y también con repetidas vacunaciones en animales predispuestos - esto puede provocar alergias de tipo tardío (11). Estas alergias son asociadas a las células, corresponden a los linfocitos T y se transfieren por las células. El efecto alérgico del virus aftoso parece que se debe al antígeno del capsómero. El ARN del virus obtenido por la división del virus no era alergénico. Sin embargo, la proteína del virus obtenida reaccionó de forma positiva en bovinos sensibilizados y en cobayos (12).

La capacidad alergénica del virus aftoso tiene importancia en la patogenicidad por cuanto es causante del fenómeno de hipersensibilidad de tipo tardío de las células inmunes. Además, toma parte en la vacunación activa contra la fiebre aftosa.

Las alergias en las vacunaciones con virus aftoso sólo son relativamente raras debido a que el alérgeno aftoso tiene poco efecto. Sin embargo, la tasa alérgica se eleva si en un animal predispuesto se crea, simultáneamente por otros componentes de la vacuna, una cierta situación alérgica, especialmente de tipo tardío y se produce una fuerte reacción al alérgeno aftoso. Esto se refiere particularmente a las alergias específicas celulares que pueden desarrollarse por la aplicación de vacunas no purificadas que contienen extractos celulares heterólogos, por ejemplo, vacunas de BHK no purificadas (10, 11, 12). Los extractos celulares de BHK poseen un fuerte efecto alergénico. Es más pronunciada la hipersensibilización del ganado vacunado con los componentes de las células BHK que con el virus aftoso. En este punto, parece ser que por lo menos dos componentes se com-

portan como alérgenos de BHK, uno de los cuales obviamente contiene lípidos (3).

El conocimiento actual de la causa de las alergias de tipo tardío debidas a la vacunación antiaftosa es suficiente para prevenir un elevado número de estas complicaciones durante una campaña general de vacunación por la apropiada elaboración de las vacunas. Ante todo, las vacunas antiaftosas deben estar libres de proteínas no asociadas con el virión aftoso. Este requisito se aplica especialmente a todas aquellas vacunas que son producidas con sistemas celulares que son heterólogos para el bovino.

Las alergias postvacunales de tipo tardío en que intervienen los alérgenos aftoso, se caracterizan clínicamente por un eczema húmedo y proliferativo que se presenta varios días después de la vacunación, ocasionalmente 21 días. Además del eczema, a veces aparecen reacciones sistémicas generales tardías con fiebre, edema, poliartritis, linfopenia y hasta "shock". La prueba intracutánea ha probado ser el mejor método para determinar la alergia aftosa del tipo tardío. La figura 5 muestra un eczema postvacunal típico, del tipo tardío, después de vacunación repetida con vacunas BHK no purificadas y la figura 6 muestra una reacción positiva con alérgeno aftoso en un bovino sensibilizado.

Con respecto a las actividades biológicas del virus aftoso aún hay varios problemas que no han sido resueltos y que son de importancia para su aplicación práctica. Sea como fuera, la integridad de las partículas 146 S parece ser necesaria para el desenvolvimiento de todas las funciones biológicas del virus aftoso. Sin embargo, se desconoce cuáles son los factores que aseguran la estabilidad del virus. Probablemente, existen conexiones entre el ARN del virus y los polipéptidos por un lado, e interacciones entre los polipéptidos por otro. Es importante para la práctica de la vacunación que el polipéptido VP₁ juega un papel importante en el desarrollo de la

inmunidad antiaftosa y que la actividad inmunizante de esta proteína está asociada al cápside estructuralmente entero. La actividad inmunizante se pierde por la desintegración del cápside en sus subunidades. Finalmente, en vacunaciones antiaftosas repetidas regularmente, la potencia alergénica del virus aftoso debe ser tenida en cuenta, especialmente si se usan vacunas no purificadas cuyas proteínas heterólogas potencian la reacción alérgica del virus.

2. El cápside vacío

Además de partículas virales completas (146 S) son encontrados cápsides vacíos en tejidos infectados con virus aftoso. Estos cápsides pueden ser aislados y enriquecidos después de tratamiento apropiado del tejido por medio de ultrafiltración y centrifugación fraccionada y purificado después de prolongada diálisis y centrifugación por gradiente de densidad de sacarosa (16). Tienen un diámetro de 21-22 nm y una tasa de sedimentación de 75 S. Su peso molecular es de aproximadamente $4,7 \times 10^6$ y su isodensidad es 1,31. Además son muy inestables y durante su manipulación se desintegran fácilmente en capsómeros.

El cápside vacío solamente está compuesto de proteína viral específica y no contiene ARN viral. Carece de capacidad reproductora e infectividad.

Con respecto a la inmunogenicidad, antigenicidad y capacidad alérgica el cápside vacío estable e intacto se comporta como la partícula 146 S. Después de fijación por formalina los cápsides vacíos en un huésped susceptible estimulan la formación de anticuerpos neutralizantes, precipitantes y fijadores del complemento casi en la misma medida que las partículas 146 S. Como ocurre en el virión completo, los cápsides vacíos están formados por los 3 complejos antigénicos (el antígeno tripsino-sensible del cápside, el antígeno tripsino-estable del cápside y el antígeno del capsómero) (2, 5, 17).

Los cápsides vacíos purificados e enriquecidos darían una vacuna antiaftosa ideal. Lamentablemente, todavía no existen las facilidades técnicas para producir cápsides vacíos intactos en cantidad suficiente y para mantener su estabilidad. Si las partículas 146 S purificadas y concentradas son divididas artificialmente en ARN viral y proteína, los cápsides, cuando tratados por los métodos disponibles, se desintegran en capsómeros y de esa forma pierden su actividad inmunizante.

3. Los capsómeros

Las subunidades 12 S que se encuentran en cultivos de virus no fraccionados tienen las mismas características de las partículas proteicas obtenidas por cuidadosa división de las unidades 146 S ó 75 S. Son obtenidas de tejidos infectados con virus aftoso por ultracentrifugación, ultracentrifugación fraccionada, electroforesis y centrifugación por gradiente de densidad.

Estas subunidades aparecen en el microscopio electrónico como partículas en forma de coma y son idénticas a los capsómeros de la partícula viral (16). Los capsómeros forman el cápside del virus y consisten en 5-6 unidades estructurales. Su combinación en el cápside es responsable por su estabilidad y esto parece ocurrir debido a que una unidad estructural puede ser un componente de varios capsómeros (9).

Los capsómeros tienen un diámetro de 7-8 nm y un peso molecular de $2,7 \times 10^5$. Su densidad es de 1,5; son estables a valores de pH entre 5,25 y 10,5 y tienen una buena termoresistencia (56° C durante 30'). Químicamente están constituidos de 4 polipéptidos con pesos moleculares de $10^3 \times 34$ (VP₁), 30 (VP₂), 26 (VP₃) y 13,5 (VP₄). Carecen del componente proteico tripsino-inestable, responsable por la inmunización, que en la partícula intacta del virus está asociada con el VP₁ (5).

Los capsómeros no tienen aptitud para reproducirse, no son infecciosos y no tienen

actividad inmunizante. En su condición de proteína son antigénicos y alergénicos.

Serológicamente, los capsómeros representan el ampliamente conocido antígeno viral soluble, llamado antígeno S. Estimula la formación de anticuerpos precipitantes y fijadores de complemento pero no de anticuerpos neutralizantes (2). Químicamente los anticuerpos correspondientes al antígeno S pertenecen a las globulinas IgG (2, 5).

En contraste con el antígeno inmunizante de las partículas 146 S y 75 S el antígeno del capsómero no es de tipo específico exclusivamente. Reacciona específicamente frente a homo y hétérotipos pero con predominancia de la parte homotípica (2). El antígeno S se comporta en forma similar con respecto a la potencia alergénica (12).

En la inmunización activa contra la fiebre aftosa el antígeno del capsómero no tiene importancia. Tiene mucha importancia para la patogenicidad y sobre todo en el diagnóstico serológico. Pero en el diagnóstico de tipo de virus debe tenerse en cuenta su actividad heterotípica.

4. El ácido nucleico del virus

El ácido nucleico del virus posee todas las características genéticas del virus aftoso. Contiene la información para la formación de la proteína y la construcción del cápside nuclear. Cuando se rompe la envoltura de la proteína es liberado en forma biológicamente activa. Hay varios métodos para dividir el virus con el propósito de liberar el ácido nucleico (2, 4, 9, 15, 16, 17).

El ácido nucleico del virus aftoso es un ácido ribonucleico (ARN) con una tasa de sedimentación de 37 S. Es de cadena simple y tiene un peso molecular de $2,2 \times 10^6$. Su densidad es 1,67. Es estable a valores de pH entre 3,5 y 11,5 en un medio libre de ribonucleasas celulares.

En el microscopio electrónico aparece con un aspecto filiforme. Los filamentos varían en tamaño, de 0,1 a 5,0 μ . El tamaño proba-

ble del ARN nativo es de cerca de 2 μ . Las informaciones acerca del tamaño, forma y aspecto del ARN difieren un poco debido a los diferentes métodos para aislarlo del virión, por ejemplo, ligera acidulación, incubación con 8 M de urea, extracción con fenol, etc. (15).

Se ha demostrado por medio de hibridación que las secuencias de polinucleótidos de los virus de tipos O, A y C se combinan a grandes distancias (6). El ARN del virus aislado artificialmente puede reproducirse por si mismo, bajo ciertas condiciones de laboratorio, en sistemas celulares adecuados y crear partículas de virus completas. Sin embargo, no es infeccioso bajo condiciones naturales. En el estado aislado no es inmunogénico, ni antigénico, ni alergénico.

En la práctica, los estudios con ARN aislado dan información sobre todo acerca de las estrechas relaciones entre subtipos y mutantes del virus aftoso. La clasificación serológica de los subtipos del virus aftoso no siempre coincide con la clasificación basada en las características inmunológicas. Con la ayuda de las experiencias de hibridación es posible obtener más información acerca de las relaciones genéticas entre los subtipos del virus aftoso. A este respecto, son importantes los estudios hechos con ARN aislado para la producción de vacunas y para la subtipificación.

Resumen

El virus aftoso, con sus 7 serotipos, representa un género separado de la familia de los *Picornaviridae*. Las diferencias más importantes de los otros virus Picorna se refieren a su isodensidad de 1,43, la tasa de sedimentación de 146 S y su marcada inestabilidad al medio ácido.

Desde el punto de vista estructural y funcional, en el virus aftoso se pueden distinguir 4 unidades: 1. el virión (146 S), 2. el cápside vacío (75 S), 3. los capsómeros (12 S) y 4. el ARN viral de cadena simple (37 S).

Se discuten las características morfológicas, físico-químicas y biológicas de las 4 unidades estructurales y se explican resultados de importancia en cuanto a su aplicación práctica, especialmente con respecto a la patogenicidad, el diagnóstico y la inmunoprofilaxis. †

CUADRO 1. Clasificación de la familia Picornaviridae

Propiedades comunes:		Diferenciación de los géneros por:
ARN (cadena simple)		Densidad (CsCl g/ml)
Cápside cúbico sin envoltura		Estabilidad ácida
32 capsómeros		Coficiente de sedimentación (S)
Resistente al cloroformo		Biología
Diámetro del virión: 24 - 30 nm		
(excepto los calcivirus: 35 - 40 nm)		

Género	Especie/Subgénero	Propiedades
Enterovirus	Polio (humano, porcino, ratón)	Densidad: 1,34
	Coxsackie A y B	Estable al pH 3
	Virus huérfanos (humanos y animal)	Cofic. sedimentación 160 S
Cardiovirus	Columbia SK; ME; MM;	Densidad: 1,34
	Mengovirus	Inestable al pH 3 Cofic. sedimentación 160 S
Calicivirus	Picornavirus de los felinos	Densidad: 1,37
	Exantema vesicular del cerdo A, D, E	Inestable al pH 3 Cofic. sedimentación 154 S
Rinovirus	Rinovirus (humano, bovino, felino)	Densidad: 1,40 Inestable al pH 5 Cofic. sedimentación 156 S Resistente a la tripsina
	Rinovirus equino	Densidad: 1,45 Inestable al pH 5 Cofic. sedimentación 150 S Resistente a la tripsina
Virus aftoso	Virus aftoso (7 serotipos)	Densidad: 1,43 Inestable al pH 6,5 Cofic. sedimentación 146 S Sensible a la tripsina

CUADRO 2. *Estructura y funciones de los 3 antígenos específicos más importantes del virus aftoso*

Tipo de antígeno	Asociado con	Actividad inmunizante	Anticuerpos correspondientes		
			Neutralizantes	Fijación complemento	Precipitantes
Antígeno tripsino-sensible del cápside	Unidades 146 S y 75 S	+	+	+	+
Antígeno tripsino-estable del cápside	Unidades 146 S y 75 S	-	+	+	+
Antígenos de los capsómeros	Unidades 12 S	-	-	+	+

CUADRO 3. *Propiedades físicas, químicas y biológicas del virión aftoso, del cápside vacío, de los capsómeros y del ARN*

Parámetro, unidades	Virión	Cápside vacío	Capsómeros	ARN
Coefficiente de sedimentación S	146	75	12	37
Diámetro, configuración (nm)	23 ± 2	21 - 22	7 - 8	cadena simple tamaño de la cadena 0,1-5 u
Peso molecular	6,9 x 10 ⁶	ca. 4,7 x 10 ⁶	2,7 x 10 ⁵	2,2 x 10 ⁶
Densidad (CsCl g/ml)	1,43	1,31	1,5	1,67
Estabilidad al pH	< 7 inestable	< 6 inestable	5,25 - 10,5 estable	3,5 - 11,5 estable
Resistencia térmica	30' 56° C estable	?	30' 56° C sensible	5' 100° C table parcialmente
Composición química	31% ARN 69% proteína	4 poli-péptidos	4 poli-péptidos ^{a)}	Composición 22 U 28 C 26 A 24 G
Replicación	+	0	0	+
Infectividad	+	0	0	0
Inmunogenicidad	+	+ (fijada por formaldehido)	0	0
Alergenicidad	+	+	+	0

a) Sin unidad proteica inmunogénica tripsino-sensible.

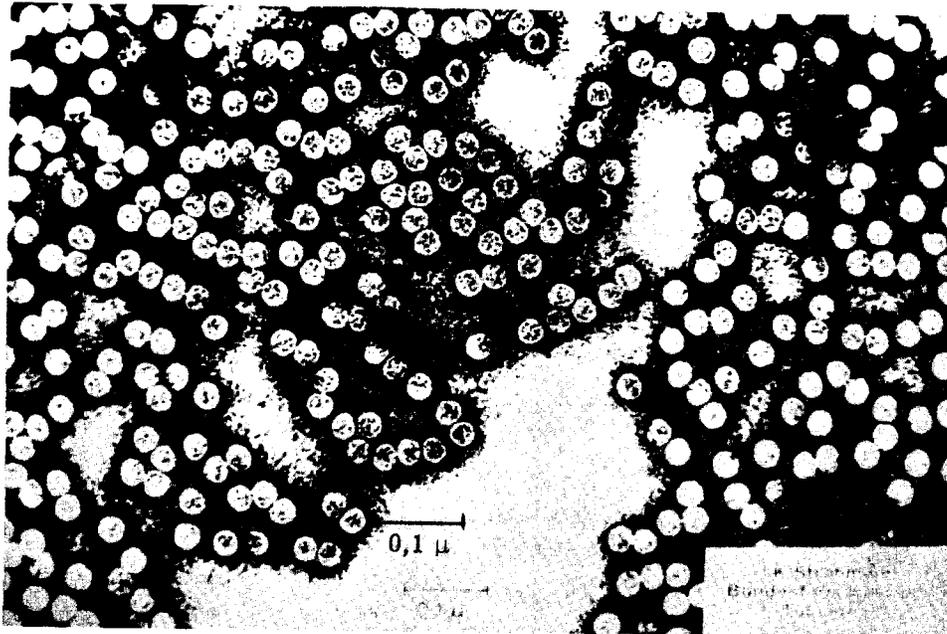


FIGURA 1. Partículas de virus aftoso purificadas, completas e infecciosas (partículas 146 S)

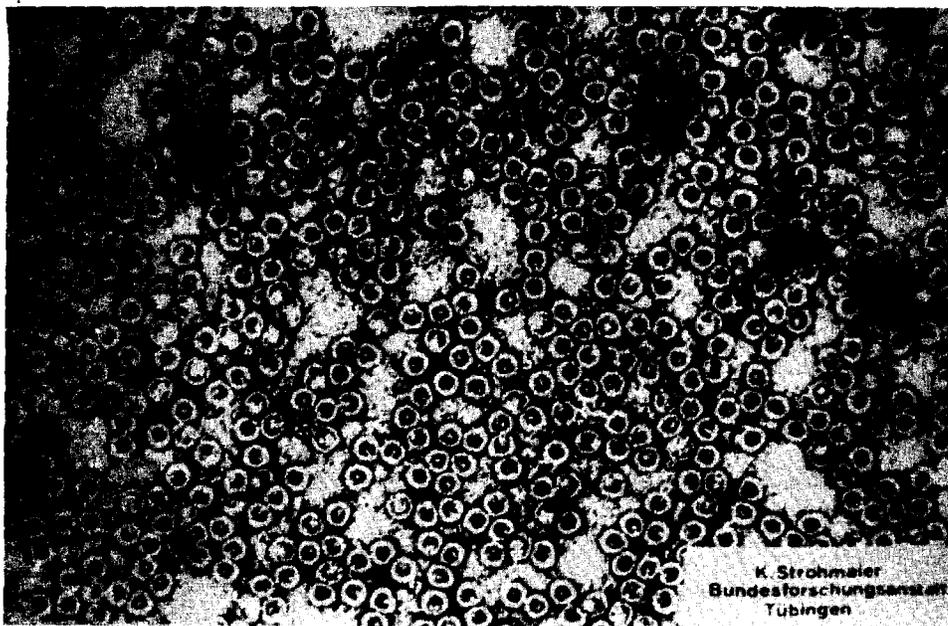


FIGURA 2. Cápsides vacíos del virus aftoso (partículas 75 S)

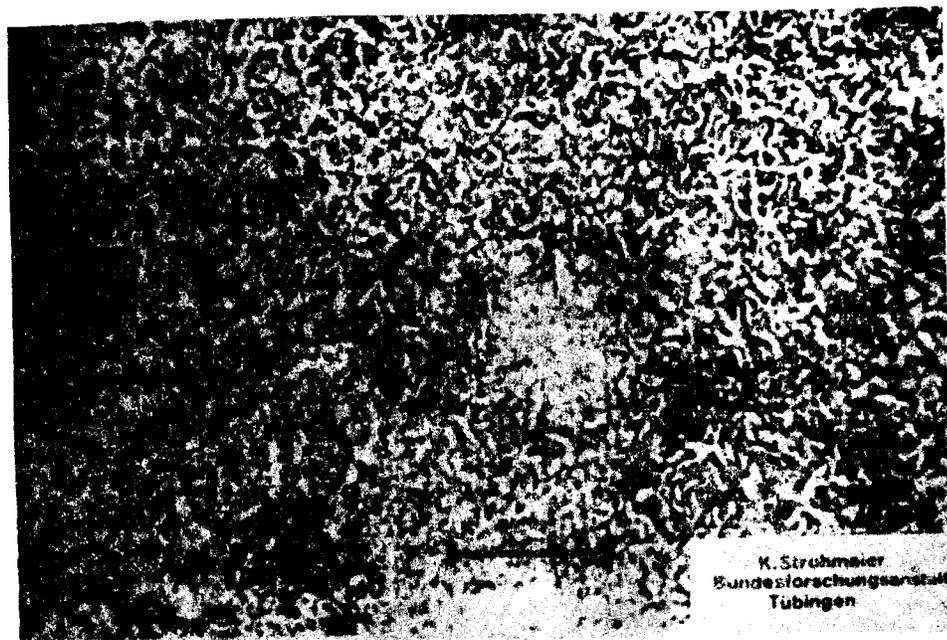


FIGURA 3. Capsómeros purificados del cápside del virus aftoso (partículas 12 S)

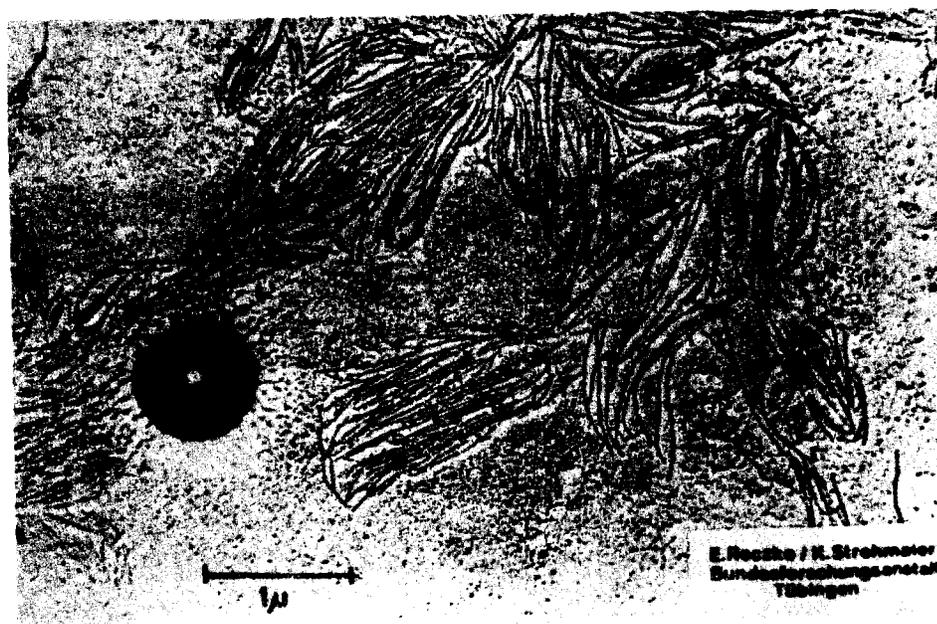


FIGURA 4. Filamentos del ácido ribonucleico después de disolver el virión en 4 M de urea



FIGURA 5. Eczema alérgica postvacunal de tipo tardío en bovino después de repetida vacunación con vacunas antiaftosas no purificadas



FIGURA 6. Reacción positiva de la prueba intracutánea al alérgeno aftoso en bovinos sensibles

BIBLIOGRAFIA

1. AHL, R., 1970: Temperature-dependent interferon of foot-and-mouth disease virus. *Arch. ges. Virusforsch.* 32, 163.
2. BACHRACH, H.L., 1968: Foot-and-Mouth Disease. *Ann. Rev. Microbiol.* 22, 201.
3. BAUER, K., KAADEN, O.R., MUSSGAY, M., 1970: Experimentelle Untersuchungen über Allergien vom Spättyp nach der Schutzimpfung von Rindern mit Maul-und-Klauenseuche-Vaccinen. *Berl. Münch. Tierarztl. Wschr.* 83, 292.
4. BROWN, F., HULL, R., 1973: Comparative virology of the small RNA virus. *J. gen. Virol.* 20, 43.
5. BROWN, F., SMALE, C.J., 1970: Demonstration of three specific sites on the surface of foot-and-mouth disease virus by antibody complexing. *J. gen. Virol.* 7, 115.
6. DIETZSCHOLD, B., KAADEN, O.R., TOKIU, T., BÖHM, H.O., 1971: Polynucleotide sequence homologies among the RNAs of foot-and-mouth disease virus types A, C and O. *J. gen. Virol.* 13, 1.
7. JOUBERT, L., MACKOWJAK, C., 1968: La fièvre aphteuse: le virus aphteux. V. Fondation Mérieux, Expansion Scientifique Française.
8. KAADEN, O.R., DIETZSCHOLD, B., MATHEKA, H.D., TOKUI, T., 1971: Konzentrierung und Reinigung von Maul-und Klauenseuche (MKS)-Virus durch Polyäthylenglykol. *Arch. ges. Virusforsch.* 3, 104.
9. LIEBERMANN, Ht., SCHULZE, P., 1971: Struktur des Maul-und Klauenseuche-Virus. *Arch. exp. Vet.Med.* 25, 171.
10. MAYR, A., MUSSGAY, M., 1970: Investigations on complications observed after vaccination of cattle against foot-and-mouth disease. *European Comm. control of FMD*, Rome 1970, 200.
11. MAYR, A., RINGSEISEN, J.I., BALJER, G., BIBRACK, B., WALLNER, J., ZIMMER, H., 1969: Untersuchungen über Art, Umfang und Ursachen von Impfschäden nach der Maul-und Klauenseuche-Schutzimpfung in Bayern in den Jahren 1967-68. *Zbl. Vet.Med. B.*, 16, 487.
12. MAYR, A., THEIN, P., BALJER, G., 1970: Weitere Untersuchungen über die Maul-und Klauenseuche Allergie vom Spättyp. *Zbl. Vet.Med. B.*, 17, 905.
13. McFERRAN, J.B., CLARKE, J.K., CONNOR, T.J., 1971: The size of some mammalian Picornaviruses. *J. gen. Virol.* 10, 279.
14. NEWMAN, F.E., ROWLANDS, D.J., BROWN, F., 1973: A psycho-chemical subgrouping of mammalian Picornaviruses. *J. gen. Virol.* 18, 171.
15. RECZKO, E., STROHMAIER, K., 1970: Electron microscopy of the RNA of foot-and-mouth disease virus. *J. gen. Virol.* 7, 65.
16. STROHMAIER, K., RECZKO, E., 1969: Neue Ergebnisse zur Protein-struktur des MKS-Virus. *Zbl. Bakt. I. Orig.* 212, 435.
17. TALBOT, P., BROWN, F., 1972: A model for foot-and-mouth disease virus. *J. gen. Virol.* 15, 163.
18. WILD, T.F., BURROUGHS, J.N., BROWN, F., 1969: Surface structure of foot and mouth disease virus. *J. gen. Virol.* 4, 313.

ALGUNOS ENSAYOS SOBRE PRODUCCION DE VACUNAS ANTIAFTOSAS INACTIVADAS,
A PARTIR DE VIRUS MULTIPLICADO EN CONEJOS NEONATOS

Dr. Daniel Abaracón*

1. INTRODUCCION

El uso de virus aftoso multiplicado en gazapos lactantes para la producción de vacunas inactivadas fue referido por varios autores (1) a (7) algunos años atrás. A pesar del tiempo transcurrido desde entonces, la bibliografía sobre el tema es particularmente escasa, incompleta y a veces reticente y contradictoria.

En el Brasil, durante los últimos años estas técnicas tomaron un desarrollo industrial de gran importancia, llegando en el año 1970 a cubrir un 70% de la producción nacional de vacunas. Las técnicas de producción seguidas por los distintos laboratorios industriales eran un tanto empíricas, adoptadas en general por analogía con otros métodos de producción, Frenkel, Waldmann, etc.

La falta de información sobre la verdadera eficacia inmunogénica de los virus multiplicados en gazapos lactantes era casi total. Solamente el Instituto Biológico de São Paulo había realizado alguna prueba con vacunas experimentales, sobre pocos bovinos, con resultado alentador. El comportamiento de las vacunas en el campo no era satisfactorio frente a los virus actuantes en ese momento.

Frente a esa situación, se decidió realizar en el Centro Panamericano de Fiebre Aftosa algunas experiencias, buscando obtener respuestas prácticas para las principales interrogantes planteadas en torno a este tipo de vacunas.

2. MATERIAL Y METODOS

Gazapos

Se utilizaron gazapos de 3 a 5 días de edad producidos en el Centro. En algunos ensayos se usaron varios centenares de gazapos que fueron facilitados por el Instituto de Pesquisas Veterinarias "Desidério Finamor".

Los gazapos fueron inoculados por vía intramuscular o intraperitoneal y luego conservados a temperatura próxima a 26° C, separados de sus madres. Cuando las cepas de virus están adaptadas, las muertes de los gazapos ocurren entre 20 y 30 horas. A medida que mueren se pasan a un congelador a -20° C donde son conservados hasta el momento del proceso del material.

Cepas de virus

Se utilizaron las cepas de virus A₂₄ (cepa Cruzeiro), O₁ (cepas Campos y Brasil 70), C₃ (cepa Resende) y C₂ (cepa Pando). La adaptación se comenzó a partir de virus cultivado en BHK de muy bajo número de pases. En general se logró buena adaptación al conejo entre el tercero y sexto pase en esta especie. Los primeros pases de los virus A₂₄ y O₁ Brasil 70 fueron facilitados por inoculación previa de los gazapos con 1 ml de metilcortelona Schering (25 g de acetato de prednisolona) por vía subcutánea.

Suspensión virulenta

Se preparó a partir de la carcasa de los gazapos, desprovistos de vísceras abdominales,

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

cuero y cabeza. En un ensayo se usó todo el cuerpo del gazapo eliminando únicamente las vísceras abdominales y extremos de las patas.

Como diluyente se usó solución salina bufferada con buffer de fosfato 0,04 M a pH 7,6 o agua destilada con 0,25% de buffer glicocola, elaborado de acuerdo con la siguiente fórmula: hidróxido de sodio - 50,5 g; cloruro de sodio - 100,4 g; glicocola - 158,0 g, y agua destilada c.s.p. 1.000 ml, pH 9,8 a 10,2.

Luego de algunos ensayos preliminares se estableció como técnica provisoria para los ensayos de vacunas el siguiente procedimiento:

Suspensión del material virulento del 15 al 20% en uno de los diluyentes anteriores, adición de cloroformo al 5% y trituración en un aparato Waring Blendor, centrifugación por 30 minutos a 2.500 revoluciones por minuto (aproximadamente 1.300 g). Nuevo tratamiento del sobrenadante por 2,0% de cloroformo en el Waring Blendor y nueva centrifugación igual a la anterior.

Inactivantes

La inactivación fue efectuada por tratamiento con formalina MERCK (37% de formaldehído) al 0,08%, a 26° C durante 48 horas, sobre la mezcla suspensión virulenta/hidróxido de aluminio, o por acetilileneimina al 0,05%, a 37° C durante 24 horas, sobre la suspensión virulenta.

Prueba de inocuidad

La prueba de no infectividad se realizó en todos los casos en no menos de 100 ratones lactantes por inoculación intramuscular con 0,05 ml de mezcla virus/hidróxido en el caso de inactivación por formalina, o de suspensión vírica inactivada en el caso de inactivación por AEI.

También con las suspensiones víricas inactivadas con AEI se inocularon 4 cultivos de células BHK en botellas de Roux, con 5 ml de virus inactivado y se realizaron tres

pases sucesivos con 48 horas de intervalo. El líquido del último pase fue sometido a prueba de fijación del complemento e inoculación en 2 grupos de 8 ratones lactantes.

Los resultados fueron en todos los casos: vacuna inocua.

Adyuvantes

Se usó hidróxido de aluminio con una concentración de 2,0% expresado en Al_2O_3 , en los volúmenes indicados en cada experimento.

Se usó saponina de Food Industries Ltd., partida PQ7-7/7/69. Esta partida ya fue experimentada anteriormente en cuanto a su eficacia como adyuvante.

Pruebas de adsorción del hidróxido de aluminio

Cada partida de hidróxido de aluminio producida, es sometida a ensayo en cuanto a su poder adsorbente sobre el virus contenido en una suspensión vírica preparada como las suspensiones víricas para usar en vacunas. La prueba consiste en mezclar una cantidad de hidróxido de aluminio a pH 8,0 con la suspensión vírica sin inactivar. El volumen de hidróxido de aluminio en esta mezcla es de 20 a 40% del total. Se deja en contacto bajo agitación a temperatura ambiente durante 2 horas. Cumplido ese plazo se toma una muestra de esa mezcla y se guarda a 4° C durante el tiempo necesario para que otra muestra igual sea sometida a una centrifugación en centrífuga refrigerada por 30 minutos a 2.500 revoluciones por minuto (aproximadamente 1.300 g). Luego se corren dos titulaciones simultáneas de la mezcla total (muestra 1) y del líquido sobrenadante de la muestra centrifugada (muestra 2). Se acepta en general que un buen hidróxido de aluminio debe dar una diferencia entre ambos títulos de por lo menos 3 unidades logarítmicas.

Bovinos

Se usaron 194 bovinos de raza Hereford, nunca vacunados ni expuestos a contacto con fiebre aftosa, de edad entre 15 y 20 meses en

el momento del comienzo de las pruebas y con un peso de aproximadamente 250 kg. Los bovinos constituían un grupo homogéneo, criados en un establecimiento libre de fiebre aftosa por más de 9 años y en ese mismo establecimiento fueron mantenidos durante las pruebas. La integración de los grupos de bovinos adjudicados a cada vacuna se hizo en todos los casos por un riguroso sistema de distribución al azar por sorteo. Cada grupo tenía desde un mínimo de 8 bovinos hasta un máximo de 16. Los bovinos fueron sangrados antes de vacunar y varias veces después de la vacunación o revacunación, según la frecuencia indicada en cada experiencia. La estimación de inmunidad se hizo por medición de anticuerpos circulantes por la técnica del Índice de Seroprotección, de R. CUNHA *et al.* (8).

Ensayos de conservación de las vacunas y del material vírico

Para estos ensayos las vacunas envasadas fueron conservadas en cámara fría a temperatura de 4° C y el virus (pasta de conejo) fue conservado en congelación a temperatura de -20° C en congeladoras del mismo tipo de las usadas por la industria.

3. RESULTADOS

ENSAYOS PRELIMINARES

Adaptación de las cepas de virus

La adaptación de los virus a conejos lactantes se logró fácilmente y en pocos pases. Una vez que las cepas se han adaptado, e inoculando los gazapos por vía intramuscular o intraperitoneal, se produce la muerte entre las 20 y 36 horas, luego de presentar los síntomas característicos. Los títulos infectantes obtenidos, ya sea en titulación en ratones lactantes o en cultivos celulares en tubos o por formación de placas fueron, en todas las cepas de virus estudiadas, consistentemente elevados. Los títulos de fijación del

complemento también fueron consistentemente elevados. El Cuadro 1 muestra algunos ejemplos de adaptación.

Condición general de los gazapos en el momento de la inoculación

Se encontraron grandes diferencias entre los títulos de los virus obtenidos cuando fueron multiplicados en gazapos en excelente estado nutritivo y con buena vitalidad y cuando los mismos virus fueron inoculados a gazapos en mal estado nutritivo (Cuadro 2).

En algunos ensayos en los que se inoculó simultáneamente una mitad de la camada y se dejó separada de la madre, y la otra mitad se dejó con la madre, no se observó diferencia en el tiempo necesario para producir la muerte, ni en el título de los virus obtenidos en ambos grupos.

Distribución del virus en los diferentes órganos

No se hicieron estudios sistemáticos de la distribución del virus en los diferentes órganos, pero en algunos ensayos se encontró que la carcasa y los órganos torácicos, presentan los mayores títulos infectantes y fijadores del complemento.

PREPARACION DE LA SUSPENSION VIRICA

Cloroformo

Para obtener una suspensión límpida es esencial hacer algún tratamiento con cloroformo. Se observó que cuando el tratamiento con cloroformo se realiza simultáneamente con la trituration del material en molino coloidal, se logra una emulsificación del cloroformo en gotas más pequeñas, y con ello la suspensión final de virus resulta más límpida que cuando la trituration y tratamiento con cloroformo se realizan en un triturador Waring Blender.

Diluyente

Como diluyente para el virus se empleó:

a) solución salina bufferada con tampón de fosfatos 0,04 M, o, b) agua destilada con buffer glicocola al 0,25%. Ambos son apropiados para realizar la suspensión y mantener un pH adecuado. Si se desea congelar la suspensión para ser usada como virus de inoculación o para titulaciones posteriores, no se podrá usar el buffer de fosfatos porque el título del virus cae mucho (Cuadro 3), debido a la inestabilidad de ese sistema buffer durante el proceso de congelación.

Contenido proteico

En las suspensiones para vacunas preparadas de acuerdo con la técnica descrita en MATERIAL Y METODOS, se encontraron los valores de contenido proteico que se presentan en forma comparativa con los valores de suspensiones de virus Frenkel y BHK en el Cuadro 4.

Adsorción del virus por el hidróxido de aluminio

El hidróxido de aluminio, además de ser usado en la producción de vacunas por su acción adyuvante, es también muy usado como elemento de concentración del virus. En el primer caso, el poder adsorbente es fundamental porque la acción adyuvante del hidróxido de aluminio reposa en gran parte en su lenta elución de virus cuando la vacuna es inoculada. En el segundo caso es también fundamental porque la concentración se basa en adsorción del virus por el hidróxido de aluminio, seguida de sedimentación y ulterior eliminación del líquido sobrenadante que debe estar casi totalmente desprovisto de virus.

Se hicieron algunos ensayos de adsorción de virus, preparando la suspensión vírica como se hace en muchos laboratorios industriales, es decir, suspensión de pasta de conejo

CUADRO 1. Adaptación de virus a conejo lactante

Cepa virus	Pase	F.C'	T.R.L. b)	T.C.T. c)
		90' y 3 u C'a) (Susp. 1/10)	(Susp. 1/10)	(Susp. 1/10)
O ₁ (Brasil 70) En los primeros pases se usó metilcortelona 5 mg/gazapo	1	1/3	10 ^{5,1} /ml	
	2	1/8	10 ^{8,3} /ml	
	3	1/15	10 ^{8,8} /ml	10 ^{8,3} /ml
	4	1/6	10 ^{7,96} /ml	10 ^{7,8} /ml
	5	1/20	10 ^{7,9} /ml	10 ^{7,9} /ml
	6	1/16	10 ^{7,8} /ml	10 ^{8,0} /ml
C ₂ (cepa Pando)	1	1/9	10 ^{6,6} /ml	
	2	1/30	10 ^{7,7} /ml	
	3	1/45	10 ^{8,0} /ml	

- a) F.C': Los títulos de fijación del complemento se refieren a la suspensión de virus al 1:10. En las técnicas de fijación del complemento se realiza el contacto suero/virus durante 90 minutos y se usan 3 unidades de complemento 50%.
- b) T.R.L.: Dosis infectantes 50% por ml de suspensión vírica, sobre ratones lactantes de 6 a 8 días de edad.
- c) T.C.T.: Dosis infectantes 50% por ml de suspensión vírica, evaluada por efecto citopático en cultivos celulares de células BHK-21 en tubos.

CUADRO 2. *Condición general de los gazapos*

Virus (susp. 1/10)	Pase	Gazapos/Edad	F.C'	T.R.L.	T.C.T.
O ₁	5	débiles - 4 días	1/2	10 ^{7,3}	10 ^{6,56}
		fuertes - 4 días	1/20	10 ^{7,9}	10 ^{7,95}
C ₃	3	débiles - 4 días	1/32	10 ^{7,5}	10 ^{7,0}
		fuertes - 4 días	1/50	10 ^{8,9}	10 ^{8,1}
O ₁	4	débiles - 5 días	Neg.	10 ^{6,3}	10 ^{5,8}
		fuertes - 4 días	1/6	10 ^{7,9}	10 ^{7,6}

CUADRO 3. *Líquido de extracción. Conservación de la suspensión vírica en buffer glicocola o en salina bufferada 0,04 m. Virus C Resende integral, suspensión al 20%. Doble tratamiento con cloroformo.*

Conservación	Solución			
	Salina bufferada 0,04 M - pH 7,6		Buffer glicocola 0,25%	
	T.C.T.	T.R.L.	T.C.T.	T.R.L.
18 horas a 4° C	10 ^{7,5} /ml	10 ^{7,3} /ml	10 ^{7,6} /ml	10 ^{7,8} /ml
4 días a 4° C	10 ^{6,7} /ml	10 ^{7,7} /ml	10 ^{7,6} /ml	10 ^{6,9} /ml
8 días a 4° C	-	10 ^{6,6} /ml	-	10 ^{6,6} /ml
4 días a -20° C	10 ^{3,7} /ml	10 ^{3,2} /ml	10 ^{7,7} /ml	10 ^{7,8} /ml

al 20% en buffer fosfatado 0,04 M o agua destilada, y un tratamiento por cloroformo a una concentración del 4% del peso del material vírico. En estos casos la adsorción fue totalmente deficiente. El mismo hidróxido de aluminio frente a una suspensión de virus de Frenkel funcionó normalmente (Cuadro 5).

En otros ensayos, usando suspensiones víricas mejor purificadas se encontró que la adsorción se realiza en la misma forma que cuando se utilizaron suspensiones víricas de otras fuentes (Cuadro 6).

También en esos ensayos se vio claramente que cuando la suspensión vírica se hace en solución salina bufferada con buffer de fosfatos 0,04 M, este diluyente interfiere la adsorción del virus (Cuadro 7).

ENSAYOS CON VACUNAS

Primera serie

Este ensayo se realizó para obtener una información preliminar y de orientación para las pruebas posteriores.

Vacuna bivalente A₂₄ - O₁. Cantidades para 1 litro

		F.C' 90' y 3 u C'	T.R.L. DI ₅₀ /ml
Virus A - suspensión al 20%	250 ml	1/10	10 ^{8,3} /ml
Virus O - suspensión al 20%	250 ml	1/6	10 ^{7,8} /ml
Hidróxido de aluminio (2,0% en Al ₂ O ₃)	500 ml		
Glicerina	50 ml		
Saponina (sol. al 5% a pH 8,9)	20 ml		
pH final de la vacuna	8,2		

CUADRO 4. *Contenido proteico (g x 100 ml suspensión)*

Virus	Colorimetría	Mét. Kjeldahl ^{a)}
O Conejo Susp. 15% tratado con cloroformo	0,45	0,51
A Conejo Susp. 15% tratado con cloroformo	0,55	0,55
C Conejo Susp. 15% tratado con cloroformo	0,45	0,55
Frenkel Susp. 20% tratado con cloroformo	0,40	0,49
Frenkel Susp. 20% no tratado con cloroformo	0,57	0,65
BHK no tratado con cloroformo	0,35	0,32

- a) Las determinaciones por el método de Kjeldahl fueron realizadas por el Dr. Pedro Carlos Mancuso, del Instituto de Pesquisas Veterinarias "Desidério Finamor", Porto Alegre, RS, Brasil.

CUADRO 5. Adsorción sobre hidróxido de aluminio

		T.R.L.	
		H i d r ó x i d o	
		Partida A	Partida B
Susp. virus conejo 20% (C Resende) en salina bufferada 0,04 M (1 trat. cloroformo 4%)	Mezcla virus 60%		
	hidróxido 40%	$10^{5,9}/\text{ml}$	$10^{6,3}/\text{ml}$
	Sobrenadante	$10^{5,3}/\text{ml}$	$10^{5,3}/\text{ml}$
		$\Delta = 0,6$	1,0
Susp. virus Frenkel	Mezcla virus 60%		
	hidróxido 40%	$10^{7,9}/\text{ml}$	$10^{7,55}/\text{ml}$
	Sobrenadante	$10^{3,9}/\text{ml}$	$10^{2,55}/\text{ml}$
		$\Delta = 4,0$	5,0

CUADRO 6. Adsorción sobre hidróxido de aluminio

		T.R.L.
Susp. virus conejo cepa C ₃ al 15% en agua con buffer glicocola 0,25%	Susp. vírica	$10^{8,3}/\text{ml}$
	Mezcla virus 60%	
	hidróxido 40%	$10^{7,8}/\text{ml}$
	Sobrenadante	$10^{2,8}/\text{ml}$
		$\Delta = 5,0$
Susp. virus conejo cepa O ₁ al 15% en agua con buffer glicocola 0,25%	Susp. vírica	$10^{7,9}/\text{ml}$
	Mezcla virus 60%	
	hidróxido 40%	$10^{7,3}/\text{ml}$
	Sobrenadante	$10^{2,8}/\text{ml}$
		$\Delta = 4,5$

CUADRO 7. Adsorción sobre hidróxido de aluminio

		T.R.L.	
		Suspensión en buffer de fosfatos 0,05 M	glicocola 0,25%
Susp. virus conejo A ₂₄ al 30%	Susp. vírica	10 ^{7,06} /ml	10 ^{7,04} /ml
	Mezcla virus 60% Hidróxido 40%	10 ^{6,86} /ml	10 ^{6,80} /ml
	Sobrenadante	10 ^{5,8} /ml	10 ^{4,05} /ml
	$\Delta =$	1,06	2,75
Susp. virus conejo C ₃ al 15%	Susp. vírica	10 ^{7,46} /ml	10 ^{7,13} /ml
	Mezcla virus 75% hidróxido 25%	10 ^{6,96} /ml	10 ^{6,86} /ml
	Sobrenadante	10 ^{5,86} /ml	10 ^{3,85} /ml
	$\Delta =$	1,1	3,0

Los virus usados fueron suministrados por los técnicos del Grupo Ejecutivo Estadual de Combate a la Fiebre Aftosa (GECOFA) de Rio Grande do Sul, y proceden de un laboratorio industrial, estando constituidos por pasta de conejo "integral", es decir, conteniendo la carcasa, el cuero y la cabeza de los gazapos. La inactivación fue realizada por acción de AEI al 0,05%, a la temperatura de 37° C durante 24 horas. La vacuna fue usada a la dosis de 4 v 16 ml, por vía subcutánea, en sendos grupos de 8 bovinos.

Como referencia se vacunó otro grupo de 8 bovinos con una vacuna producida con virus desarrollado en células BHK en cultivos en monocamadas. Esta vacuna ya había sido anteriormente probada en cuanto a su poder inmunogénico en bovinos, con resultados satisfactorios.

El Gráfico 1 muestra los valores de los índices de seroprotección obtenidos con las

tres vacunas, en el momento de la vacunación (0 días), a los 21 y 90 días postvacunación.

Segunda serie

En este ensayo se produjo una mezcla tri-valente de suspensiones víricas, que luego fue dividida en 2 partes, cada una de las cuales fue sometida a diferentes procesos de inactivación, siendo una de ellas inactivada con formalina y la otra con AEI.

Las vacunas de cada grupo fueron probadas a dos niveles de dosis: 5 y 10 ml. Cuando se usó la dosis de 10 ml, el contenido antigénico y la cantidad de hidróxido de aluminio fue doble que cuando la dosis fue de 5 ml. La concentración de saponina en cambio, se graduó de tal forma que en una dosis de 10 ml la cantidad de saponina fue de 5 mg, es decir, la misma cantidad que en la dosis de 5 ml.

Como referencia se utilizaron 2 vacunas: una bivalente de BHK ya usada en la prueba anterior, y otra trivalente producida por el método de Frenkel, de acuerdo con la técnica seguida por el CPFA (9).

El detalle de las vacunas experimentales es el siguiente:

Virus (susp. al 15%)	F.C' 90' y 30 u C'	T.R.L. DI ₅₀ /ml	T.C.T. DI ₅₀ /ml	pH
O ₁	1/25	10 ^{7,9}	10 ^{8,1}	7,8
A ₂₄	1/15	10 ^{8,0}	10 ^{7,8}	7,8
C ₃	1/14	10 ^{8,3}	10 ^{7,7}	8,0

b) Vacuna inactivada con formol. Cantidades para 1 litro. Dosis 5 ml.

Virus O - suspensión al 15%	200 ml
Virus A - suspensión al 15%	200 ml
Virus C - suspensión al 15%	200 ml
Al(OH) ₃	400 ml
luego de dos horas de contacto,	
Formalina "Fisher"	0,08%
Inactivación a 26° C durante 72 horas	
Glicerina neutra	50 ml
Saponina Food Industries (20 ml sol. al 5%, a pH 8,0)	0,1%
pH final de la vacuna	8,3

La vacuna a ser usada en la dosis de 10 ml es esta misma vacuna, pero la concentración de saponina es de solamente 0,05%.

c) Vacuna inactivada con AEI. La vacuna AEI es en un todo igual a la Vacuna Formol, con la única excepción del proceso de inactivación, que fue efectuado por adición de 0,05% de acetiltileneimina sobre la suspensión vírica y mantenida a 37° C durante 24 horas. El hidróxido de aluminio fue agregado posteriormente.

Con cada una de las vacunas se vacunó un lote de 10 bovinos. El Gráfico 2 muestra la respuesta expresada en índice de seroprotección a los 25 días postvacunación.

a) Vacunas trivalentes O₁ - A₂₄ - C₃.

Suspensión vírica. Producida a partir de pasta de carcasa de conejos, elaborada en escala industrial. Este virus fue facilitado al CPFA por intermedio de los técnicos del GECOFA, de Rio Grande do Sul, Brasil.

A los efectos de seguir la curva de anticuerpos, se hicieron sangrías de todos los grupos, vacunados con las vacunas experimentales y el grupo vacunado con la vacuna usada como referencia, el día de la vacunación, 0 día y a los 25, 90 y 135 días postvacunación. En ese momento fueron revacunados con la misma vacuna y dosis que en la primera vez y las sangrías fueron repetidas a los 21, 90 y 135 días postvacunación (Gráfico 3).

Tercera serie

En este ensayo se produjeron 2 vacunas trivalentes con virus de conejo, a partir de las mismas suspensiones víricas. La única diferencia consistió en la concentración antigénica, que fue doble en la vacuna Exp 3/72 concentrada, que en la Exp 3/72, siendo el volumen de la dosis y los adyuvantes exactamente iguales. Tanto la adaptación de las cepas de virus a conejo lactante como la producción del virus fueron hechas en esta oportunidad en el Centro Panamericano de Fiebre Aftosa. Como vacuna de referencia, se produjo una vacuna de tipo Frenkel inactivada con AEI.

Suspensión vírica al 15% para las vacunas Exp 3/72 y Exp 3/72 concentrada

Virus	F.C' 90' y 3 u C'	T.R.L. DI ₅₀ /ml	T.C.T. DI ₅₀ /ml	pH
O ₁	1/30	10 ^{7,9}	10 ^{8,4}	7,5
A ₂₄	1/28	10 ^{8,3}	10 ^{8,5}	7,3
C ₃	1/20	10 ^{7,9}	10 ^{8,3}	7,7

a) Vacuna Exp 3/72. Cantidades para 1 litro. Dosis 5 ml.

Virus O - suspensión al 15% 200 ml
 Virus A - suspensión al 15% 200 ml
 Virus C - suspensión al 15% 200 ml
 Inactivación 0,05% AEI durante 24 horas a 37° C.

Hidróxido de aluminio pH 8,3 400 ml
 Glicerina neutra 50 ml
 Saponina pH 8,0 0,1%
 pH final de la vacuna 8,3

b) Vacuna Exp 3/72 concentrada. Dosis 5 ml.

Todo igual a la vacuna Exp 3/72 pero se usó doble cantidad de suspensión vírica y luego de dos días de contacto con el hidróxido de aluminio y sedimentación del mismo, se eliminó un volumen de líquido sobrenadante igual al 50% de la suspensión vírica usada.

Suspensión vírica para la vacuna Exp 4/72. Virus Frenkel

Virus	F.C' 90' y 3 u C'	T.R.L. DI ₅₀ /ml	T.C.T. DI ₅₀ /ml
O ₁	1/12	10 ^{7,3} /ml	10 ^{7,5} /ml
A ₂₄	1/14	10 ^{7,3} /ml	10 ^{7,1} /ml
C ₃	1/22	10 ^{7,96} /ml	10 ^{7,8} /ml

c) Vacuna Exp 4/72 (Virus Frenkel). Cantidades para 1,2 litros. Dosis 5 ml.

Virus O₁ 400 ml
 Virus A₂₄ 400 ml
 Virus C₃ 400 ml

Inactivación con AEI a 37° C durante 24 horas
 Hidróxido de aluminio pH 8,3 800 ml

La mezcla se deja sedimentar en cámara fría durante 48 horas. Luego se elimina 800 ml de líquido sobrenadante. Así cada 1 ml de vacuna contiene el equivalente a 1 ml de suspensión vírica. Luego se adiciona:

Glicerina 60 ml
 Saponina pH 8,0 0,1%
 pH final de la vacuna 8,2

El Gráfico 4 muestra los resultados obtenidos a 0, 21, 90 y 135 días de la primera vacunación y a los 21 días después de la revacunación con estas 3 vacunas, aplicadas en sendos grupos de 16 bovinos, con una edad de 18 a 20 meses en el momento de la primera vacunación.

CONSERVACION DE LAS VACUNAS A 4° C, DURANTE PERIODOS PROLONGADOS

La vida útil de las vacunas conservadas a 4° C ofrece obvio interés y se ensayó con vacunas de la primera y segunda serie. Para ello se vacunó sendos grupos de 8 bovinos al 8° y 13° mes después de la elaboración, con las siguientes vacunas: virus conejo 4 ml de la primera serie; vacuna control BHK de la primera serie, y vacuna inactivada con formol, dosis 5 ml de la segunda serie.

El Gráfico 5 muestra los resultados expresados en ISP a los 21 días después de la vacunación.

En las vacunas de la primera serie vemos que, mientras la vacuna BHK mostró muy poca caída de su poder inmunogénico en sus dos valencias durante los 13 meses de su conservación a 4° C, la vacuna de virus conejo mostró una excelente conservación de su componente A₂₄ y una caída pronunciada de su componente O₁ desde el 8° mes.

En la vacuna de la segunda serie observamos una conservación normal de las tres valencias inclusive del componente O. En ambos casos el componente O era del subtipo O₁, pero no la misma cepa.

CONSERVACION DE LA EFICACIA INMUNOGENICA DE LOS VIRUS DE CONEJO MANTENIDOS EN CONGELACION A -20° C

La forma habitual de conservar los virus producidos en conejo para su utilización en vacunas es en congelación a -20° C. Los Cuadros 8 y 9 muestran que los títulos infectantes y fijadores del complemento sufrieron muy poca variación en períodos de aproximadamente 1 año.

Para evaluar la eficiencia inmunogénica de esos virus, se produjo vacunas reproduciendo exactamente el protocolo de elaboración usado en la primera vez. El componente A de las vacunas de la primera serie mantuvo su poder inmunogénico inalterado, mientras

que el componente O ya había caído al 8° mes de conservación. En los virus de las vacunas de la segunda serie no hubo caída de ninguno de los tres virus (Gráfico 6).

4. DISCUSION

En los ensayos preliminares se encontró que la adaptación del virus a conejos lactantes es fácil y se logra en pocos pases, lo que disminuye el riesgo de modificaciones indeseables del virus destinado a producción de vacunas inactivadas.

Las instalaciones y equipos necesarios para producción de vacunas por este método son mínimos.

La tecnología de la producción de vacunas por este método debe ser establecida por trabajos experimentales que abarquen todos los aspectos de la producción, desde los conejos lactantes y el virus de inoculación, hasta la vacuna final. El proceso de producción no puede ser simplemente copiado de técnicas de producción de vacunas que usan otras fuentes de antígeno. En los ensayos preliminares llevados a cabo en el CPFA se observaron grandes diferencias de resultados con pequeñas modificaciones de técnica.

Para los ensayos con vacunas se adoptó una técnica provisoria de producción de vacunas, adecuada para obtener la información preliminar sobre la eficacia inmunogénica de este tipo de antígenos, que es la meta de este trabajo. Es indudable que esta técnica puede y debe ser perfeccionada.

En algunas experiencias se usaron virus producidos en gran escala por firmas industriales, para que las vacunas fueran más representativas de este tipo de producción.

En la primera serie de experiencias se ve que la respuesta inmunitaria medida por anticuerpos circulantes, sube rápidamente después de vacunación, y decae también rápidamente. El mismo comportamiento se observa en la vacuna BHK usada como referencia.

En la segunda serie de ensayos, las vacunas elaboradas con las mismas suspensiones víricas e inactivadas con formalina y con AEI producen en general respuestas similares entre sí, y con las respuestas obtenidas con las vacunas de referencia. Los títulos más elevados obtenidos a los 21 días con la vacuna inactivada con formol y usada a la dosis de 10 ml, no mantuvieron la diferencia en la sangría de los 90 días postvacunación.

Es muy marcada la diferencia en la respuesta a los 21 días después de la primovacunación y después de la revacunación. La respuesta a la revacunación (efecto booster) es muy superior. Los índices previos inmediatos a ambas vacunaciones (0 días y 135 días) eran en muchos casos similares. Esta observación es una clara advertencia contra la norma de seleccionar bovinos para pruebas de vacunas en base solamente a su bajo

CUADRO 8. *Virus de conejo integral triturado usado en las vacunas de la primera serie*

Virus (susp. al 20%)	F.C' 90' y 3 u C'	T.R.L. DI ₅₀ /ml
Tipo A ₂₄		
1 mes	1/10	10 ^{8,3} /ml
8 meses	1/11	10 ^{8,1} /ml
13 meses	1/10	10 ^{8,1} /ml
Tipo O ₁		
1 mes	1/6	10 ^{7,8} /ml
8 meses	1/7	10 ^{7,5} /ml
13 meses	1/10	10 ^{7,5} /ml

CUADRO 9. *Virus de carcasa triturada usado en las vacunas de la segunda serie*

Virus (susp. al 15%)	F.C' 90' y 3 u C'	T.R.L. DI ₅₀ /ml	T.C.T. DI ₅₀ /ml
Tipo A ₂₄			
1 mes	1/15	10 ^{8,0} /ml	10 ^{7,8} /ml
12 meses	1/15	10 ^{7,9} /ml	10 ^{7,8} /ml
Tipo O ₁			
1 mes	1/25	10 ^{7,9} /ml	10 ^{8,1} /ml
12 meses	1/25	10 ^{7,1} /ml	10 ^{8,0} /ml
Tipo C ₃			
1 mes	1/14	10 ^{7,7} /ml	10 ^{8,3} /ml
12 meses	1/20	10 ^{7,6} /ml	10 ^{8,1} /ml

tenor de anticuerpos, sin conocer bien sus antecedentes.

En la tercera serie de experiencias se confirman los resultados de las series anteriores. Una de estas vacunas, la Exp 3/72 concentrada, fue probada en la Unidad de Control de Rio Grande do Sul, por descarga directa de virus en bovinos, con resultados coincidentes con los obtenidos de seroprotección.

En las pruebas de conservación tanto de vacunas a 4° C, como de virus congelados, se observó que la misma es satisfactoria cuando se parte de antígenos de buena calidad. La labilidad del virus O usado en las pruebas de la primera serie tal vez se deba a una deficiencia específica de esa cepa, que demostró ser un antígeno sólo mediocre desde el primer momento. La mayor debilidad de algunas cepas de virus para su conservación luego de convertidas en vacunas es un hecho ya observado con algunas cepas de virus producidas por los métodos de Frenkel y en cultivos BHK.

Debido a que los estudios sobre la verdadera calidad inmunogénica de estos antígenos son recientes, las vacunas deben ser probadas sobre bovinos como los usados en estas experiencias. Las técnicas que usan otras especies animales o aquellas basadas en medición de fracciones de virus, sólo tendrán verdadera validez cuando sean padronizadas y establecidas sus relaciones con las técnicas que usan al bovino. Por otra parte, esas correlaciones deberán establecerse para cada cepa de virus, y tendrán validez mientras las técnicas de producción, tanto del virus como de las vacunas, no sean modificadas.

5. RESUMEN Y CONCLUSIONES

Se hicieron algunos ensayos preliminares de producción de virus en conejos lactantes, para ser usados como antígeno para vacunas. La adaptación del virus es fácil y se logra en pocos pasajes.

El virus multiplicado en conejo tiene bue-

nos títulos infectantes para ratones lactantes y cultivo de tejidos. El título fijador del complemento es en general excelente. Para obtener un buen virus es muy importante que los conejos hayan sido recientemente separados de sus madres y estar en óptimas condiciones físicas en el momento de su inoculación.

La suspensión vírica debe ser bien purificada por tratamiento con cloroformo u otro procedimiento similar y debidamente centrifugada.

Las suspensiones de virus multiplicado en conejos lactantes, al igual que las suspensiones víricas de Frenkel y BHK, se pueden inactivar bien, por la acción de la formalina o la AEI a las temperaturas habituales. En un ensayo sobre bovinos no se observó diferencia en la respuesta inmunitaria producida por las vacunas inactivadas con formalina o con AEI.

Las vacunas producidas fueron ensayadas en 20 grupos de bovinos vírgenes entre 15 y 20 meses de edad (194 bovinos en total), por vacunación primaria y revacunación, usando siempre vacunas de referencia producidas por otros métodos.

Vacunas producidas con concentraciones razonables de virus, y adyuvadas con $Al(OH)_3$ y saponina producen una inmunidad (evaluada por respuesta de anticuerpos circulantes en bovinos vírgenes), que se puede considerar satisfactoria de acuerdo con las exigencias que establecen los reglamentos de control de vacuna.

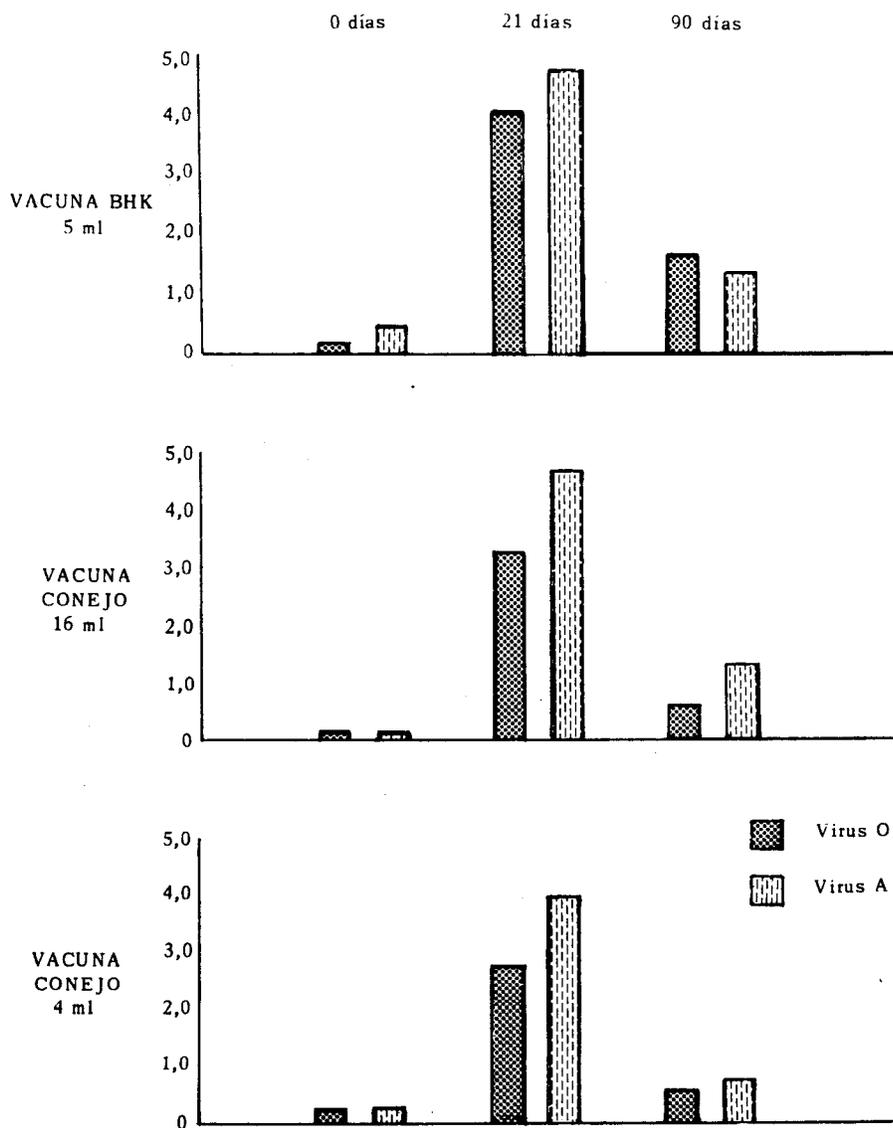
La vacuna Exp 3/72 concentrada fue probada en un ensayo posterior, por descarga directa de virus, en la Unidad de Control de GECOFA en Rio Grande do Sul, con resultados coincidentes con las pruebas serológicas realizadas anteriormente.

La evolución de la curva de anticuerpos y el efecto de las revacunaciones con vacunas producidas con virus de conejos, coinciden en general con los resultados obtenidos con vacunas de tipo Frenkel o BHK usadas como referencia.

La conservación de las vacunas a 4° C fue buena durante 12 meses para una vacuna trivalente. Otra vacuna bivalente mantuvo su eficacia inalterada para la valencia A, no siendo así para la valencia O que cayó antes de los 8 meses.

La conservación del poder inmunogénico del virus congelado fue excelente durante 12 meses para 4 cepas de virus, siendo deficiente para una cepa de virus O, que se mostró débil desde el principio.

GRAFICO 1. *Medias de índices de seroprotección**



* Primera serie. Ensayo preliminar con vacunas conejo. Pasta integral (carcasa, cuero, cabeza). Se usa una vacuna BHK como referencia.

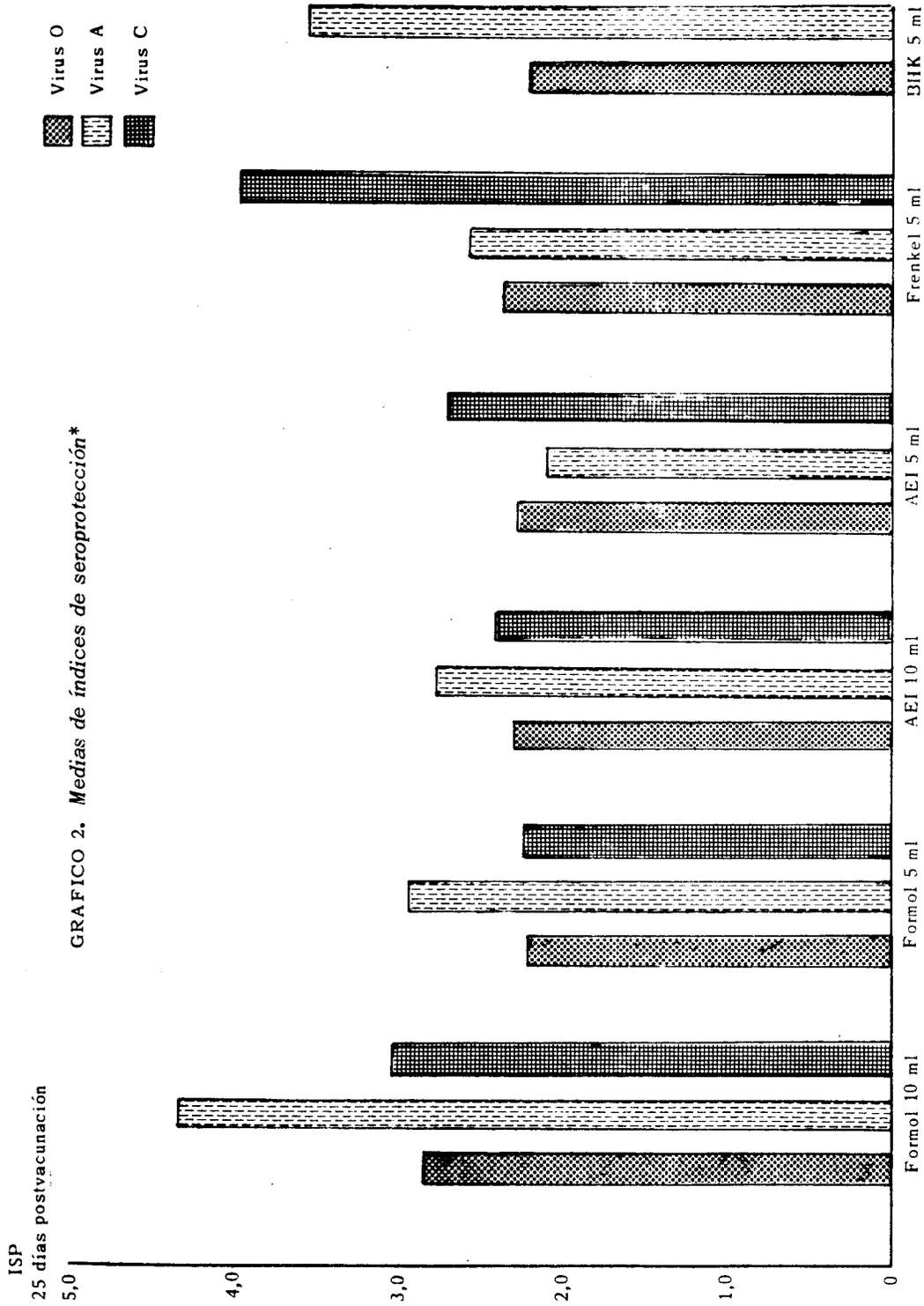
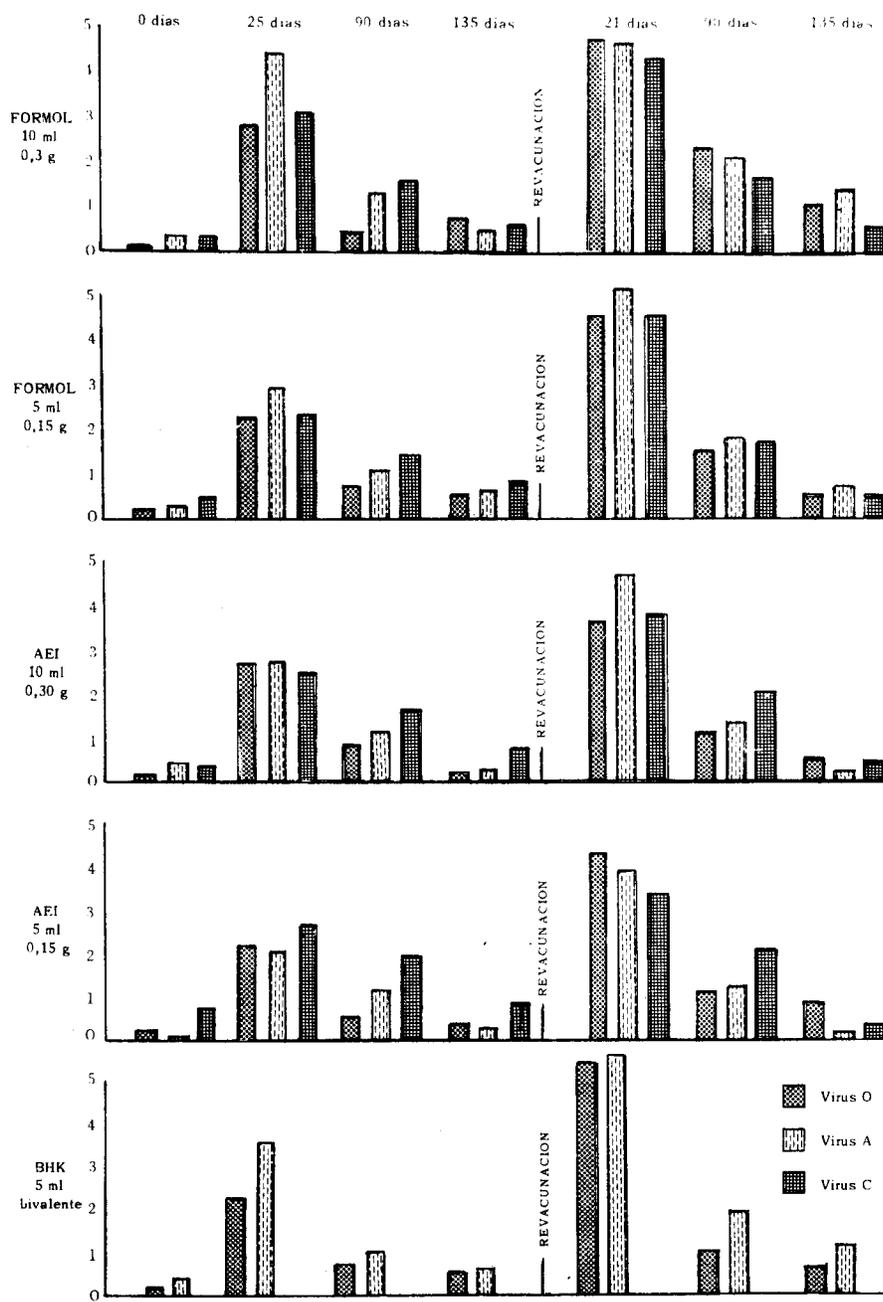


GRAFICO 2. Medias de índices de seroprotección*

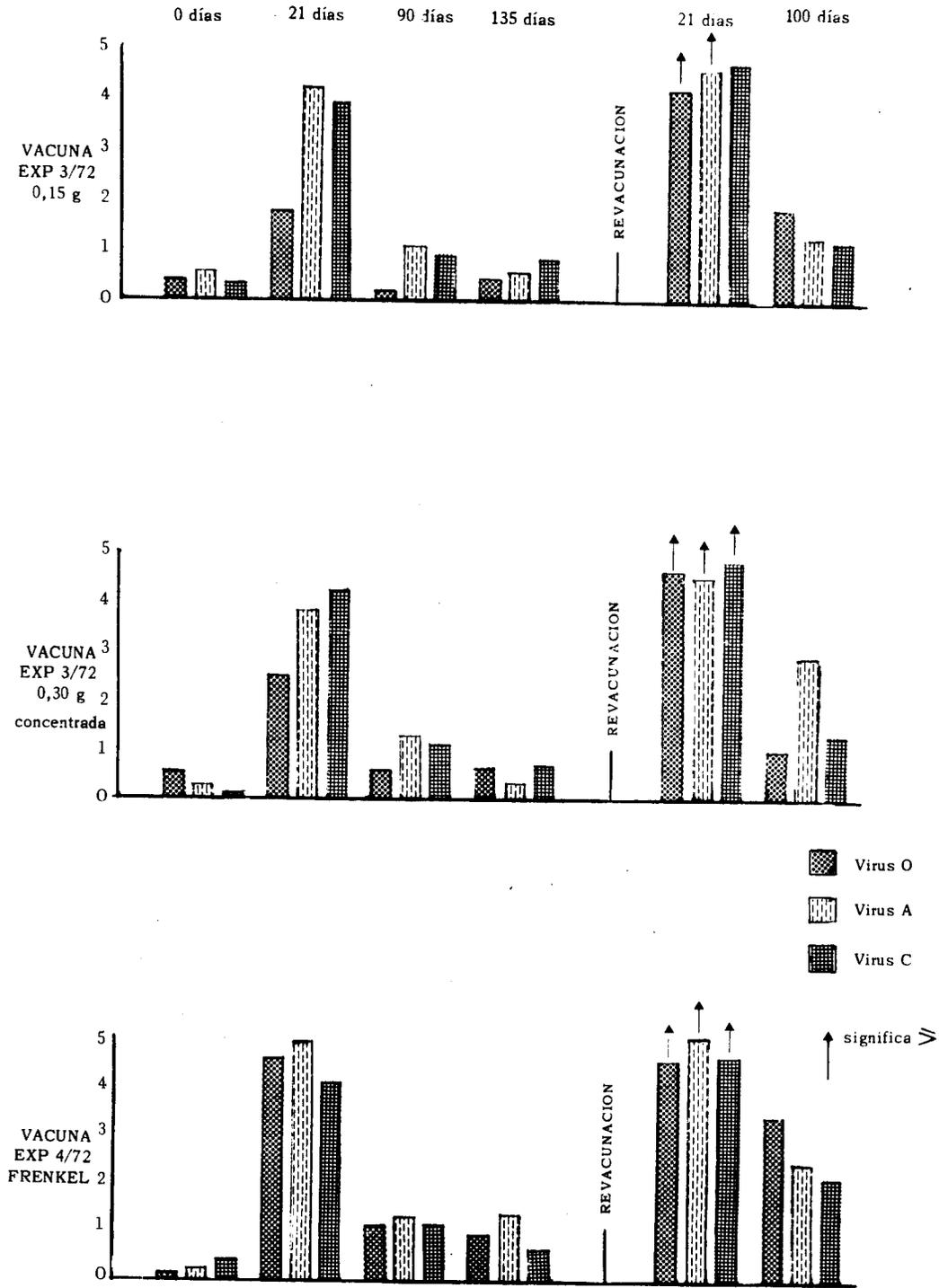
* Segunda serie. Inmunidad producida por vacunas de virus conejo inactivadas con formol y con AEI a corto plazo. Se incluyen grupos vacunados con vacuna Frenkel y BHK como referencia.

GRAFICO 3. Medias de índices de seroprotección*



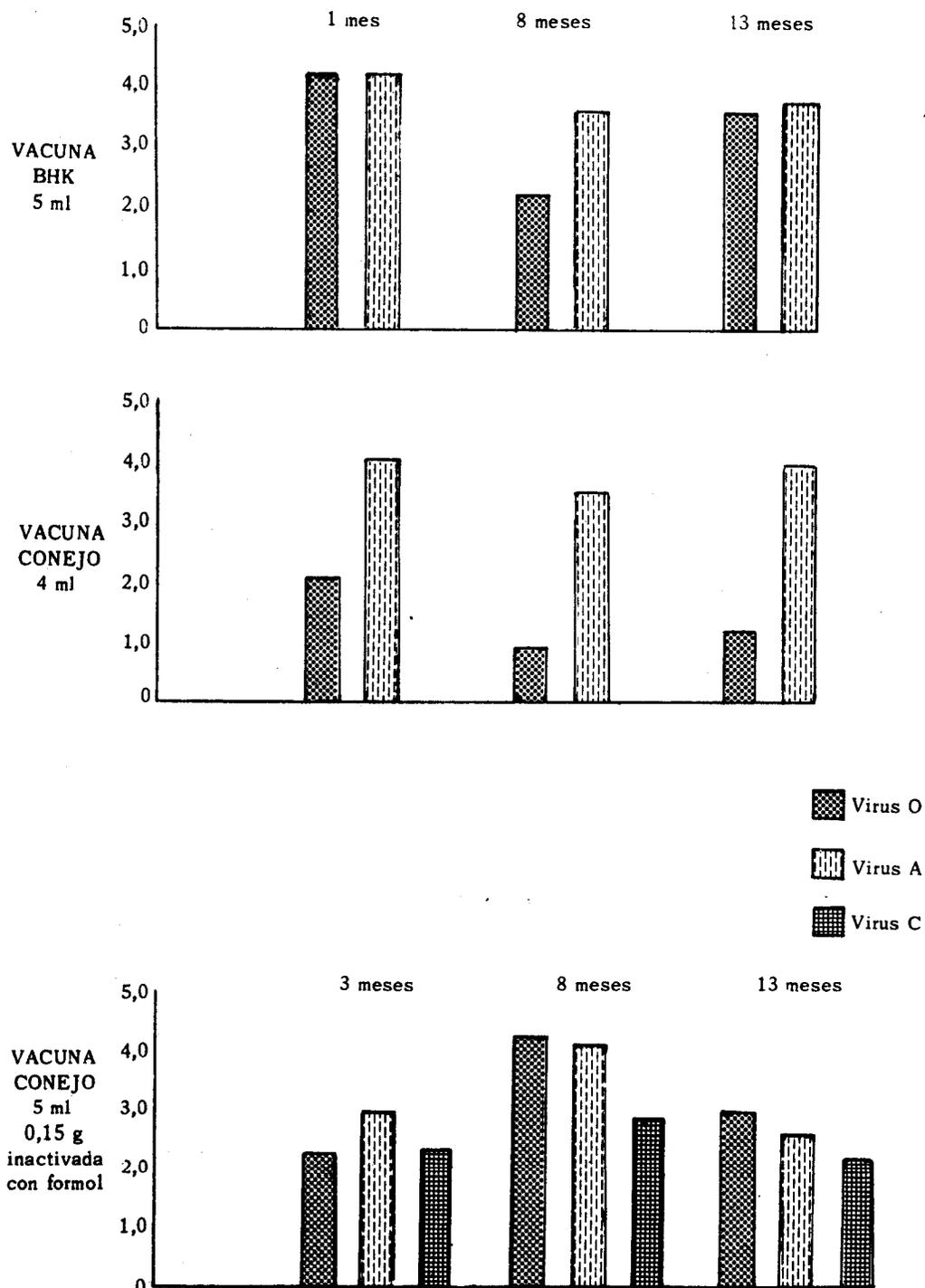
* Segunda serie. Vacunas de conejo inactivadas con formol y con AEI. Duración de inmunidad y revacunación. Se usa una vacuna BHK como referencia.

GRAFICO 4. Medias de índices de seroprotección*

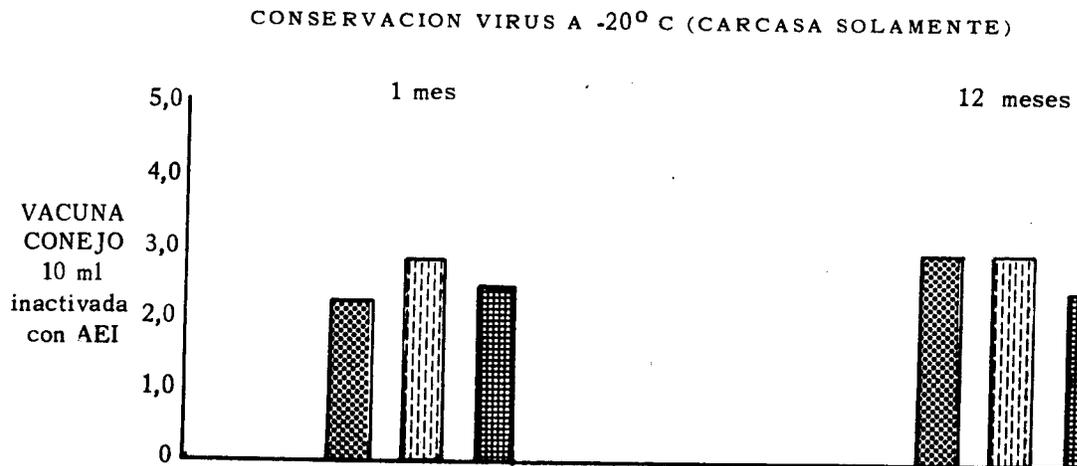
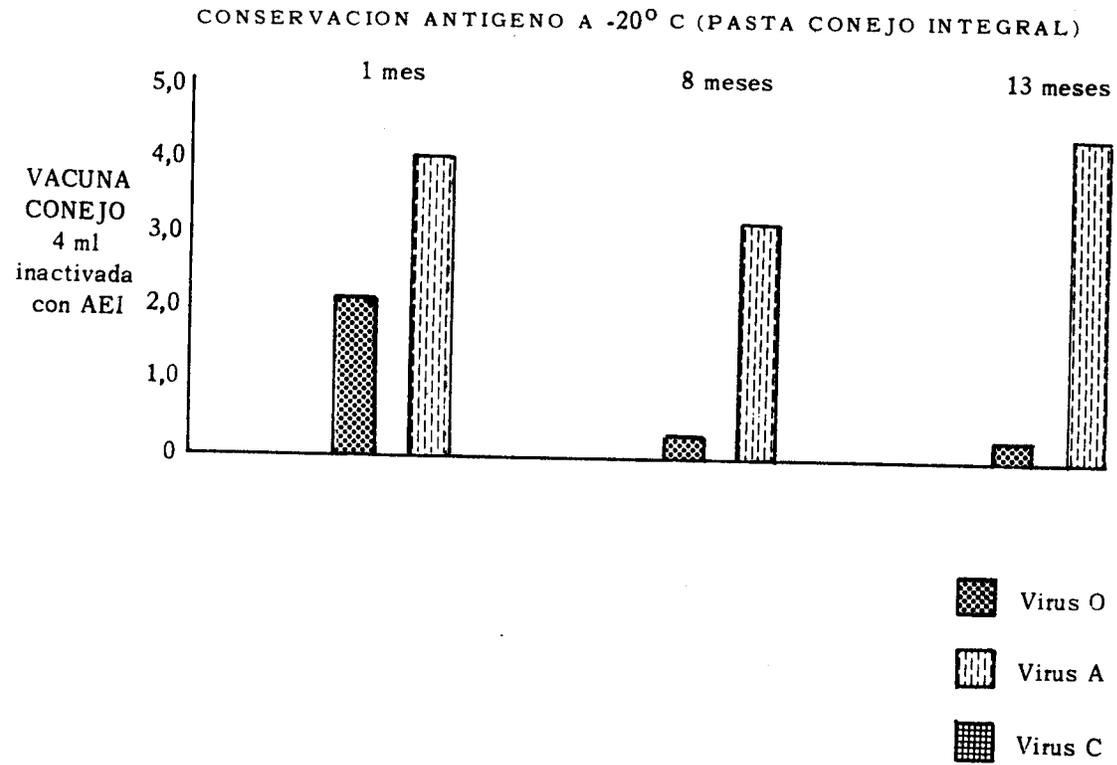


* Vacuna conejo tercera serie. Duración de inmunidad y revacunación. Vacuna Frenkel como referencia.

GRAFICO 5. Medias de índices de seroprotección a los 21 días postvacunación*



* Conservación de vacunas BHK y virus conejo a 4° C.

GRAFICO 6. *Medias de índices de seroprotección a los 21 días postvacunación*

6. BIBLIOGRAFIA

1. BOIKO, A.A. (Comparison of the immunogenic properties of foot-and-mouth disease vaccines). Texto en ruso. *Trudy naucho-kontrol. Inst. vet. Preparatov* 9: 39-42, 1961. (*Vet. Bull.* 32: 1081, 1962).
2. DNEPROV, S.R., GOROKHAVA, M.P. (Experiences of the preparation and testing of lapinized foot-and-mouth disease vaccine between 1958 and 1961). Texto en ruso. *Trudy naucho-kontrol. Inst. vet. Preparatov* 10: 86-89, 1962. (*Vet. Bull.* 33: 2743, 1963).
3. KLIMOV, N.M., MALAKOHV, A.G., GRIBANOV, V.N. (Chemical purification of lapinized foot-and-mouth disease virus and trials of its antigenic and immunogenic properties). Texto en ruso. *Trudy vses. Inst. eksp. vet.* 24: 208-214, 1961. (*Vet. Bull.* 32: 418, 1962).
4. LUTSEVICH, F.F. (Field trials of VIEV experimental lapinized foot-and-mouth disease vaccine). Texto en ruso. *Trudy vses. Inst. eksp. vet.* 25: 99-102, 1961. (*Vet. Bull.* 32: 1083, 1962).
5. SCHANG, P.J. *et al.* Utilización de los virus aftosos lapinizados como material antigénico para vacunas. *Gac. vet., B. Aires* 23: 370-374, 1961.
6. VERGÉ, J. *et al.* Culture de virus aphteux sur le lapin nouveau-né. Modification des pouvoirs pathogène et antigène. *Bull. Acad. vét. France* 30: 291-298, 1957.
7. VERGÉ, J. *et al.* Adaptation du virus aphteux au lapin nouveau-né. Essai de vaccination avec du tissu de lapin virulent. *Bull. Off. int. Épizoot.* 49: 93, 1958.
8. CUNHA, R.G. *et al.* 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.
9. ABREU MARTINS, I. de. Vacunas antiaftosas hidróxido-saponinadas inactivadas por el formol. *Bltm Centro Panamericano Fiebre Aftosa* 1: 1-19, 1971.

PORTADORES DE VIRUS AFTOSO.
¿PROCESO TERMINAL DE LA INFECCION O ESLABON INTERMEDIO
EN LA CADENA EPIDEMIOLOGICA DE LA ENFERMEDAD?

Drs. Félix J. Rosenberg* y Paulo Augé de Mello**

El problema de los portadores de virus en la fiebre aftosa ha merecido una destacada atención desde principios del presente siglo. Es sin embargo en los últimos 15 años que una larga serie de experiencias son realizadas en varios laboratorios del mundo con el fin de esclarecer diversos aspectos del problema.

De tales experiencias pueden extraerse dos conclusiones, hoy generalmente aceptadas: 1) El desenlace del equilibrio virus-huésped en un individuo enfermo de fiebre aftosa es imprevisible, y 2) toda población afectada mantiene el virus en algunos de sus individuos durante períodos variables que pueden llegar hasta 2 años o más postinfección.

Sin embargo, la pregunta sobre si un animal portador puede constituirse en una fuente de infección de aftosa aún no ha recibido una respuesta satisfactoria.

La caracterización del papel de los portadores sanos del virus de la fiebre aftosa en la cadena epidemiológica de la enfermedad constituye, por lo tanto, uno de los problemas epidemiológicos cuya solución ocupa un lugar prioritario para la aplicación de medidas de prevención y erradicación de la fiebre aftosa en Sudamérica.

La finalidad del presente trabajo fue la de establecer una serie de modelos alternativos teóricos para la transmisión del virus de portadores, destacándose aquellas evidencias experimentales o circunstanciales que apoyan

o rechazan las distintas hipótesis, así como las investigaciones futuras que permitan esclarecer las incógnitas críticas para el conocimiento del problema.

Globalmente podemos establecer tres hipótesis alternativas: I. Todo convaleciente portador es potencialmente capaz de transmitir la infección, II. El animal enfermo de fiebre aftosa sólo puede transmitir la infección durante la fase aguda de la enfermedad, y III. El animal portador de virus aftoso puede actuar ocasionalmente como fuente de infección siempre y cuando coexistan ciertos factores condicionantes indispensables (transmisión condicionada).

I. TODO CONVALECIENTE PORTADOR ES
POTENCIALMENTE CAPAZ DE
TRANSMITIR LA INFECCION

1.1 Mecanismo

Como un portador clásico (tifoidea, polio, etc.) el huésped infectado alberga y elimina el virus en cantidad suficiente para infectar todo susceptible con el cual entre en contacto.

1.2 Evidencias a favor y en contra

Las posibilidades de transmisión de virus tienen que ser mucho menores para el portador que para el enfermo agudo, dada la caída brusca de los títulos del virus aislado a partir de los 7 a 10 días postinfección (7, 13, 32, 34). Por otro lado, no existe ninguna evidencia que permita postular que esa menor

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

cantidad de virus excretado sea suficiente para establecer una infección en un contacto. Por el contrario, el hecho de que las limitadas pruebas realizadas de transmisión por contacto entre bovinos convalecientes y susceptibles después del 8º día postinoculación (13) y entre portadores y susceptibles (3, 4, 10, 41, 45) no han logrado demostrar en ningún caso el pasaje de virus, descarta automáticamente la posibilidad de considerar al individuo recuperado de aftosa como un portador clásico (fuente de infección permanente).

II. EL ANIMAL ENFERMO DE FIEBRE AFTOSA SOLO PUEDE TRANSMITIR LA INFECCION DURANTE LA FASE AGUDA DE LA ENFERMEDAD

II.1 Mecanismo

El mecanismo por el cual el animal estaría incapacitado para transmitir el virus puede estar dado por una o más de las siguientes condiciones:

a) Una vez iniciada la infección comienza la síntesis de anticuerpos humorales y locales, que al cabo de unos 7 días neutraliza por completo todo virus extracelular. Aquellas partículas que pudieron mantenerse libres de anticuerpos en las vías digestivas superiores, incluyendo saliva, serían rápidamente inactivadas por el pH y la temperatura. Es decir que el virus del portador sólo se mantiene íntegro a nivel intracelular siendo rápidamente neutralizado o inactivado apenas es excretado al medio interno o externo.

b) Las cantidades de virus que pudieran ser eliminadas junto con restos (debris) celulares son tan escasas que no permiten al establecimiento de la infección en un susceptible en contacto.

c) El virus en su estado de equilibrio con la célula pierde cierto grado de su infecciosidad por lo cual las dosis necesarias para

infectar a un susceptible debieran ser aún mayores que las requeridas por el virus común de campo.

II.2 Evidencia a favor y en contra de la hipótesis

La presencia de anticuerpos neutralizantes en la saliva o material esofágico-faríngeo de bovinos portadores fue señalada por Hyslop (17) y Kaaden y col. (20, 21). Estos anticuerpos serían los responsables, según Burrows, por la caída del título infeccioso del virus del portador cuando es mantenido en frío por 24-48 horas (4). Suttmoller y Cottral (37) hallaron títulos infecciosos significativamente mayores en muestras esofágico-faríngeas (E/F) tratadas con tricloro trifluoroetano (TTE) en relación a muestras control. Este tratamiento reactiva el virus aftoso neutralizado por anticuerpos, según lo demostró Tessler en 1966 (43).

Por lo tanto, las cantidades de virus libre (no neutralizado) eliminado deben ser muy pequeñas y particularmente asociadas a la presencia de restos celulares en el vaso del probang usado para la colecta. Las pocas estimaciones cuantitativas realizadas por varios autores son casi siempre bien menores a 10^2 unidades formadoras de placas por ml de material (UFP/ml) en muestras de portadores no tratadas con fluorocarbonos y en muchos casos aun en presencia del TTE (4, 22, 37, 46). ¿Sería esta cantidad de virus suficiente para establecer una infección en un contacto? Si tomamos en cuenta que inoculando experimentalmente 10^2 DI_{50} por vía intranasal o faríngea, Suttmoller y col. (42) sólo consiguen infectar 12 de 28 bovinos vírgenes, consideramos muy poco probable que la cantidad de virus eliminada por un portador consiga establecer una infección en un contacto, sobre todo si se tiene en cuenta que para hallar títulos máximos ocasionales de un portador de aproximadamente 10^3 UFP (37, 46) se deben tomar todo tipo de precauciones como ser, la colecta del material en medios especiales, en condiciones de temperatura ideales, el

tratamiento de la muestra con TTE, inoculación con la menor demora posible, etc.

Esta posibilidad sería aún más reducida si se confirmaran los resultados de Sutmoller y col. (36) y de Kaaden y col. (20) según los cuales el virus aislado de portadores tendría menor infecciosidad y patogenicidad que la muestra original de campo. Sin embargo, trabajos de Burrows (5) y de Straver y col. (35) parecieran demostrar que este hecho no es constante.

En contra de la hipótesis sobre la no transmisión del virus aftoso una vez superado el estado agudo de la infección se deben señalar las numerosas observaciones circunstanciales desde comienzos de siglo que implicarían a los portadores como única fuente posible de infección, tal como lo resumen Ramón, en 1961 (27) y Sutmoller y col., en 1967 (38) y como lo hemos observado ocasionalmente en Sudamérica (6) y más recientemente Hedger y col. (16) en un brote de búfalos.

Otras observaciones circunstanciales en favor de la posible transmisión de virus de un portador está dada por el hallazgo de evidencia de infección en terneros en ausencia de enfermedad clínica. Este hecho fue observado en Botswana (15) y en Brasil (6) mediante el aislamiento de virus (E/F) y recientemente en Paraguay (30) mediante la detección de anticuerpos contra el antígeno VIA.

También las observaciones de Augé y col. (1, 2) sobre transmisión de virus vivo modificado (VVM) indicarían la posibilidad de transmisión de virus al menos en ausencia de enfermedad aguda, aunque en este caso el fenómeno de equilibrio virus-célula posiblemente sea distinto del existente en el portador.

II.3 Conclusiones

Si bien las observaciones circunstanciales en contra de esta hipótesis no son extremadamente firmes puesto que la mayor parte de ellas podría también explicarse por la persistencia del virus en otros sistemas, ya sean animales o físicos, la posibilidad de

que efectivamente el estado de equilibrio virus-huésped definido como portador sea un proceso terminal en la cadena epidemiológica de la fiebre aftosa, no puede ser descartada.

Sin embargo, todas las evidencias presentadas, tanto a favor como en contra de esta alternativa, nos inclinan a postular la tercera hipótesis como la más probable.

III. EL ANIMAL PORTADOR DE VIRUS AFTOSO PUEDE ACTUAR OCASIONALMENTE COMO FUENTE DE INFECCION SIEMPRE Y CUANDO COEXISTAN CIERTOS FACTORES CONDICIONANTES INDISPENSABLES (TRANSMISION CONDICIONADA).

III.1 Mecanismo

Los factores condicionantes pueden ser agrupados en dos clases: 1) una clase en la que se incluyen estímulos que determinan un aumento de la replicación viral en el portador y 2) la otra requeriría factores ambientales o del huésped que aumenten la posibilidad de transmisión sin que sea preciso modificar la cantidad de virus excretado.

Mecanismo 1

El virus mantendría su condición de equilibrio intracelular debido, sobre todo, a la actividad inhibitoria de anticuerpos humorales y/o locales. Por lo tanto, se puede postular que cualquier disminución de la inmunidad del huésped portador, específica o no, inducirá el aumento de la replicación viral y, por lo tanto, la excreción y transmisión del mismo.

Los factores condicionantes responsables por la disminución de la resistencia pueden incidir sobre el huésped o sobre el virus.

1.1 Factores condicionantes que inciden sobre el huésped:

1.1.1 disminución de los anticuerpos de convalecencia hasta un grado tal que ya no sea capaz de neutralizar la totalidad de las partículas volcadas al medio interno (humorales) o externo (locales);

1.1.2 caída de la resistencia no específica por fenómenos de tensión.

1.2 Factores condicionantes que inciden sobre el virus, o sea que modifican sus características antigénicas. Esta modificación puede ser por:

1.2.1 recombinación con otros tipos del virus de fiebre aftosa o con otros virus similares;

1.2.2 mutación y selección inducida por anticuerpos.

1.3 Factores que modifican sus características de infecciosidad y/o patogenicidad:

1.3.1 mutación y selección (independiente del proceso inmunitario).

Cualquiera de estos factores tendría como consecuencia una mayor multiplicación y, por lo tanto, excreción de virus o bien la excreción en pequeñas cantidades de un virus con mayor poder de infecciosidad y/o patogenicidad.

Este mecanismo implicaría, por lo tanto, un cambio repentino en la condición de equilibrio de latencia virus-huésped convirtiéndose el proceso en uno de transmisión normal semejante al existente en la enfermedad aguda. Evidentemente el primer individuo a manifestar signos de enfermedad puede ser tanto el propio portador como el contacto susceptible a excepción del portador sometidos a tensión "stress" (1.1.2) quien posiblemente demostraría signos precoces de enfermedad.

Mecanismo 2

Tal como se discutió con respecto a la hipótesis II, las evidencias acumuladas hasta el presente implican que la transmisión de virus de un portador es, sino imposible, por lo menos poco probable. Sin embargo, podrían haber factores condicionantes que actuando sobre el ambiente o sobre el huésped susceptible aumentarían la probabilidad de transmisión.

Dos mecanismos alternativos son hipotéticamente factibles:

2.1 En presencia de condiciones ambientales favorables (temperatura, humedad, etc.) y una densidad de población suficiente para garantizar contactos frecuentes, el virus del portador en cantidades pequeñas podría estar sometido a pasajes continuos dentro del rebaño convaliente (portadores de corta duración) sin producir respuestas manifiestas en la población (salvo la circulación continua del virus). En determinado momento ese virus podría encontrar un huésped que reuniera las condiciones necesarias para volcar el equilibrio virus-huésped a favor del primero, iniciándose así un nuevo ciclo de la enfermedad.

2.2 Una hipótesis alternativa postula que la permanencia del virus en una población convaliente no se realiza a través de la circulación continua del virus en la misma, sino más bien a través de algunos pocos individuos que mantienen su condición de portador durante períodos prolongados con eliminaciones de virus en forma cíclica o intermitente (portadores de larga duración). Para que hubiera transmisión de la infección deberían ocurrir una serie de circunstancias en un momento preciso, entre las cuales se pueden citar: a) presencia de uno o más individuos portadores; b) condiciones ambientales óptimas para la transmisión del virus; c) presencia de bovinos susceptibles a pequeñas dosis de virus, y d) contacto íntimo entre el individuo "muy susceptible" en el momento en que el primero se halla en una fase de eliminación máxima del virus.

En ambos casos el fenómeno de transmisión constituiría un problema probabilístico. En el primero, el virus "golpea" continuamente a varios huéspedes hasta hallar el apropiado. En el segundo, el virus sólo puede pasar de un portador apropiado a un susceptible "ideal" en un momento óptimo.

Los modelos alternativos sobre transmisión condicionada se esquematizan en la Tabla 1.

III.2 Evidencias a favor y en contra de los diversos modelos

Modelo 1.1.1

Para que este modelo sea válido se debería poder encontrar algún tipo de relación entre el estado de portador y el nivel de los anticuerpos. En relación a la inmunidad humoral las evidencias demuestran claramente que, por el contrario, la existencia, la duración, así como el título del virus obtenido de portadores, es independiente de los niveles de anticuerpos circulantes (2, 5, 15, 20, 25, 39, 42). Este modelo se ve aún más debilitado por el hallazgo de Hedger en Botswana (15) y de técnicos del CPFA en Brasil (6) de terneros portadores subclínicos con ausencia de anticuerpos sistémicos detectables. Las observaciones circunstanciales de campo tampoco avalan esta hipótesis. Sin embargo, el mecanismo de infección e inmunidad local como responsable por un equilibrio inestable de latencia entre el virus y la célula requiere ser investigado.

Modelo 1.1.2

Se ha hallado que los fenómenos de tensión constituyen una importante causa contribuyente al desarrollo de enfermedad respiratoria de origen viral en varias especies incluyendo los bovinos (28). Rosenberg y col. (31) hallaron que la simulación experimental de los efectos del "stress" disminuían los títulos de anticuerpos inducidos por el virus de parainfluenza canina. En relación a la fiebre aftosa, a excepción del reciente trabajo de Suttmoller y McVicar (38), quienes sometieron a diversos estímulos "stresantes" tanto a bovinos portadores como a porcinos susceptibles puestos en contacto y una experiencia de Hedger citada por esos mismos autores, ambas sin resultados positivos, no existen trabajos concluyentes con respecto a este modelo. Sin embargo, frecuentes observaciones a campo asocian el arreo de animales portadores con el inicio de eventos de la enfermedad (6). Pasturino¹ asoció la tensión "psí-

quica" en bovinos (modificación del habitat natural) con la ocurrencia de eventos agudos de fiebre aftosa y sugirió una experiencia de marcación y seguimiento de presuntos portadores con el fin de acumular información de campo al respecto.

Fenómenos de tensión "psíquica" en especies inferiores parecen inducir cambios severos no sólo en su comportamiento como también en la agudización de infecciones latentes² tal como ocurre frecuentemente en las infecciones herpéticas en el ser humano.

Creemos que la reproducción experimental de estímulos de tensión es extremadamente difícil y en todo caso sólo resultados positivos serían válidos.

Sin embargo, un estricto sistema de seguimiento de portadores a campo tal como fue seguido por Pasturino, podrá llegar a constituir un elemento valioso para la comprobación de este modelo.

Modelo 1.2.1

Este modelo está basado en las experiencias de Pringle (24) demostrando la posibilidad de formación de recombinantes de virus aftoso *in vitro* y del grupo de Plum Island (40, 44) demostrando la formación de partículas mixtas entre el virus aftoso y enterovirus. Este hecho ha sido utilizado por Graves y col. (14) para explicar la presunta infección latente observada en bovinos expuestos al virus de la fiebre aftosa. Por su parte Fellowes y Suttmoller (12) sugirieron la posibilidad de recombinación entre cepas de distinto tipo del virus aftoso (O y A) para explicar cierta modificación antigénica del virus tipo O aislado de portadores.

Sin embargo, si fuera necesaria una recombinación genética para que un virus aftoso de portador pudiera quebrar una presunta barrera

¹ PASTURINO, C. DILFA, Uruguay (comunicación personal).

² KOPROWSKI, H. (comunicación personal).

inmunitaria y replicar para, posteriormente, transmitir la infección, deberían ser frecuentes los hallazgos de virus de campo que tuvieran características antigénicas acordes con esta posibilidad de recombinación, cosa que hasta el presente no se ha demostrado que ocurra.

Modelo 1.2.2

Varios autores han demostrado la variación antigénica del virus aftoso forzada por anticuerpos específicos, tanto en animales parcialmente inmunes (9, 11, 19, 26) como en cultivo de tejidos en presencia de anticuerpos (18). En el caso del portador, este proceso podría ser factible teniéndose en cuenta la alta tasa de mutación del virus y los niveles decrecientes de anticuerpos que existen a medida que transcurren los meses postinfección. De hecho, variaciones antigénicas han sido observadas por Burrows (5) en una cepa de virus A aislado de un bovino portador entre 14 y 17 semanas postinoculación y por Hedger (15) en el virus SAT₃ aislado de portadores en Botswana, además de las variaciones halladas por Fellowes y Suttmoller (12) mencionadas anteriormente.

Sin embargo, al igual que para el modelo 1.2.1, si esto ocurriera como norma debería ser mucho más frecuente la aparición de subtipos nuevos con diferencias inmunológicas significativas con respecto a los virus de campo típicos.

Modelo 1.2.3

En este caso se postula que el equilibrio portador implica, como se dijo, una disminución o pérdida de algunas de las propiedades del virus (infecciosidad, patogenicidad, virulencia, etc.). Una mutación o selección que significará la recuperación de esas características induciría la quiebra de ese estado de equilibrio a favor del virus con el consiguiente aumento en la replicación y transmisión.

Con respecto a la primera parte del modelo, es decir el establecimiento del equilibrio de latencia, como consecuencia de modificaciones en el virus, Straver y col. (35) y

Fellowes y Suttmoller (12) demostraron la menor resistencia a la temperatura y pH de algunas cepas aisladas de portadores. Por su parte, Kaaden y col. (20) y Straver y col. (35) hallaron que el virus del portador producía placas de menor tamaño en cultivo de tejidos. Este hecho también fue hallado por varios autores en cultivos de células crónicamente infectados con virus aftoso (8, 23, 33), siendo postulado que la selección de mutantes formadoras de pequeñas placas o no formadoras de placas como consecuencia de una sobrevivencia prolongada en células, determina una población viral apatogénica o de patogenicidad reducida (8).

En cambio no existe ninguna evidencia de que el fenómeno opuesto ocurra como iniciante de un ciclo de transmisión de un portador aunque teóricamente esto no puede ser descartado.

Modelo 2.1

Tanto este modelo como el siguiente (2.2) se basan en las características de la excreción de virus por parte de un portador, cuya intermitencia ha sido comprobada repetidamente³. En base a los resultados de sus experiencias, Augé y col. (2) postularon la existencia de animales "receptores" de virus que expuestos a pequeñas dosis de virus desarrollarían infecciones abortivas de corta duración y sin estimulación de anticuerpos. Este mecanismo explicaría la eliminación intermitente de virus por parte de estos "portadores de corta duración" quienes estarían expuestos a reinfecciones permanentes. Por otro lado también ha sido comprobada frecuentemente la gran variación existente en cuanto a la susceptibilidad de los bovinos al virus aftoso (30, 42). Sería posible por lo tanto, que siendo uno de esos animales "receptores" un individuo extremadamente sensible, sea éste el que inicia un nuevo ciclo de infección.

³ AUGÉ DE MELLO, P. (Datos no publicados).

Para que este modelo mantenga validez se deberá comprobar experimentalmente el pasaje de virus de animales portadores a otros bovinos, sean estos susceptibles o no.

Modelo 2.2

En este caso la intermitencia no estaría dada por bovinos "receptores" de eliminación breve de virus que pueden ser ocasionalmente infectados, sino más bien por la propia intermitencia en la excreción de virus por parte de los portadores de larga duración.

En este caso la transmisión se debería exclusivamente a un problema de chance no sólo de contacto con un individuo "muy susceptible", sino de presencia de títulos de virus relativamente altos durante un período de máxima excreción de virus, un contacto sensible y condiciones ambientales que favorezcan esa transmisión.

Salvo la conocida intermitencia en la excreción de virus y el hecho de ser muy pocos los individuos de un lote que excretan virus durante períodos prolongados (35, 2, 45), no

existe otro tipo de evidencia ni a favor ni en contra de este modelo, salvo las siguientes observaciones circunstanciales:

1) El fracaso en reproducir experimentalmente la transmisión de virus.

2) Las aparentes transmisiones ocurridas ocasionalmente a campo sin consecuencias clínicas (medio ciclo de transmisión) (ver II.2).

3) La mayor frecuencia de brotes presuntamente iniciados por portadores en tropas en movimiento. En este caso, a la concentración forzada de portadores y susceptibles se debe sumar el posible fenómeno de tensión operante (ver modelo 1.1.2), que sería un factor contribuyente indispensable para que el virus de parainfluenza bovino (SF-4) induzca el desarrollo de la sintomatología típica de la "fiebre del transporte" (28).

Este modelo difícilmente puede ser reproducido experimentalmente. Pero, posiblemente un modelo matemático probabilístico pueda ayudar grandemente a afianzar esta hipótesis que, creemos, la más cercana a la realidad.

TABLA 1

Modelos para la transmisión condicionada de la fiebre aftosa entre portadores y susceptibles

Modelo*	Sujeto de la condición	Factor condicionante	Efecto directo	Consecuencia	Huésped afectado
1.1.1	Huésped-portador	- Tiempo - Ausencia de estímulos antigénicos secundarios	- Descenso de la tasa de anticuerpos de convaleciente	- Aumento de la multiplicación y excreción de virus	- Portador - Susceptible
1.1.2	Huésped-portador	- Tensión	- Disminución de la inmunidad específica y/o resistencia inespecífica	- Aumento de la multiplicación y excreción de virus - Aumento de la susceptibilidad celular	- Portador
1.2.1	Virus del portador	- Presencia de otro virus aftoso o de otro grupo (picornavirus) - Recombinación entre ambos	- Modificación de las características antigénicas	- Aumento de la multiplicación y excreción de virus	- Portador - Contacto susceptible
1.2.2	Virus del portador	- Mutación a nivel de los determinantes antigénicos - Selección por anticuerpos	- Modificación de las características antigénicas	- Aumento de la multiplicación y excreción de virus	- Portador - Contacto susceptible
1.2.3	Virus del portador	- Mutación a nivel de otras características	- Aumento de la infecciosidad y/o patogenicidad	- Aumento de la "agresividad del virus"	- Contacto susceptible
2.1	Huésped susceptible	- Presencia de un individuo muy susceptible como integrante de un ciclo continuo de pasaje de virus	- "Magnificación de la susceptibilidad"	- Desarrollo de un proceso infeccioso con una dosis mínima de virus	- Contacto susceptible
2.2	Virus	- Condiciones climáticas óptimas para la viabilidad viral	- "Magnificación de la transmisibilidad"	- Desarrollo de un proceso infeccioso	- Contacto susceptible
	Ambiente	- Alta tasa de contacto			
	Huésped portador	- Presencia simultánea del portador y de un individuo muy susceptible durante un período de máxima excreción de virus			

* Ver texto.

REFERENCIAS

- 1) AUGÉ DE MELLO, P.; HONIGMAN, M.N., FERNANDES, M.V. Supervivencia en bovinos del virus modificado de la fiebre aftosa. *Bull. Off. int. Épizoot.* 65: 2091-2106, 1966.
- 2) AUGÉ DE MELLO, P.; HONIGMAN, M.N.; FERNANDES, M.V.; GOMES, I. Further information on the survival of modified foot-and-mouth-disease in cattle. *Bull. Off. int. Épizoot.* 73: 489-505, 1970.
- 3) BROOKSBY, J.B. Observations on the carrier state in foot-and-mouth disease. Proc. Meet. Res. Group of the European Comm. for the control of Foot-and-Mouth Disease-FAO, Plum Island, U.S.A., 1967.
- 4) BURROWS, R. Studies on the carrier state of cattle exposed to foot-and-mouth disease virus. *J. Hyg. Camb.* 64: 81-90, 1966.
- 5) BURROWS, R. Observations on the carrier state following exposure to foot-and-mouth disease virus. Presented at the An. Met. of the Europ. Com. for the Control of Foot-and-Mouth Disease (Standing. Tech. Com.) held at the Animal Virus Research Institute, Pirbright (14-16 Sept. 1966).
- 6) CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA. Informes de trabajo (no publicados).
- 7) COTTRAL, G.R.; GAILIUNAS, P.; COX, B.F. Foot-and-mouth disease virus in semen of bulls and its transmission by artificial insemination. *Arch. ges. Virusforsch.* 23: 362-377, 1968.
- 8) DOUGHERTY, E.; SEIBOLD, H.R.; PATTY, R.E. Effects of chronic residence on size and size-distribution of plaques of type A foot-and-mouth disease virus in primary calf kidney cell cultures. *Am. J. vet. Res.* 29: 693-701, 1968.
- 9) FAGG, R.H.; HYSLOP, N. St. G. Isolation of a variant strain of foot-and-mouth disease virus during passage in partly immunized cattle. *J. Hyg. Camb.* 64 (4): 397-404, 1966.
- 10) FALCONER, J. The epizootiology and control of foot-and-mouth disease in Botswana. *Vet. Rec.* 91: 354-359, 1972.
- 11) FEDERER, K.E.; ALONSO F., A.; PUSTIGLIONE NETTO, L.; PINTO, A.A. Developpement d'un Nouveau Sous-type du virus de la fièvre aphteuse par passages en series sur bovine partiellement immuns. *Symp. Series Immunobiol. Standard.* 8: 65-72, 1968.
- 12) FELLOWES, R.; SUTMOLLER, P. Foot-and-mouth disease virus: Biological characteristics of virus from bovine carriers. *Arch. ges. Virusforsch.* 30: 173-180, 1970.
- 13) GRAVES, J.H.; McVICAR, J.W.; SUTMOLLER, P., TRAUMANT, R. Contact transmission of foot-and-mouth disease from infected to susceptible cattle. *J. Infect. Dis.* 123: 386-391, 1971.
- 14) GRAVES, J.H.; McVICAR, J.W.; SUTMOLLER, P.; TRAUMANT, R., WAGNER, G.G. Latent virus infection in contact transmission of foot-and-mouth disease from infected to susceptible cattle. *J. Inf. Dis.* in press.
- 15) HEDGER, R.S. The isolation and characterization of foot-and-mouth disease from clinically normal herds of cattle in Botswana. *J. Hyg. Camb.* 66: 27-36, 1968.
- 16) HEDGER, R.S.; CONDY, J.B.; GOLDING, S. Infection of some species of African wild life with foot-and-mouth disease virus. *J. Comp. Path.* 82: 455-461, 1972.
- 17) HYSLOP, N. St. G. Secretion of foot-and-mouth disease virus and antibody in the saliva of infected and immunized cattle. *J. Comp. Path.* 75: 111-117, 1965.
- 18) HYSLOP, N. St. G. Isolation of variant strains from foot-and-mouth disease virus propagated in cell cultures containing antiviral sera. *J. Gen. Microbiol.* 41: 135, 1965.
- 19) HYSLOP, N. St. G.; FAGG, R.H. Isolation of variants during passage of a strain of foot-and-mouth disease virus in partly immunized cattle. *J. Hyg. Camb.* 63: 357, 1965.

- 20) KAADEN, O.R.; EISSNER, G.; BOHM, H.O. Untersuchungen über Maul-und Klauenseuche (MKS) - Virusdauer ausscheider bei vakzinieren und experimentell infizierten Rindern. *Zentbl. Vet. Med. B* 17: 485-496, 1970.
- 21) KAADEN, O.R.; EISSNER, G.; DIETSCHOLD, B.; BOHM, H.O. Further studies on the foot-and-mouth disease virus carrier state in cattle, including investigations in the field. Report of the Met. of the Res. Group of the Stand. Tech. Com. for the Control of Foot-and-Mouth Disease. Tübingen, Germany, October 23-24, 1971 (Appendix XVI).
- 22) McVICAR, J.W.; SUTMOLLER, P. The epizootiological importance of foot-and-mouth disease carrier. II - The carrier state of cattle exposed to foot-and-mouth disease following vaccination with an oil adjuvant inactivated virus vaccine. *Arch. ges. Virusforsch.* 26: 217-224, 1969.
- 23) PHILIPSON, L.; DINTER, Z. The role of interferon in persistent infection with foot-and-mouth disease virus. *J. gen. Microbiol.* 32: 277-285, 1963.
- 24) PRINGLE, C.R. Evidence of genetic reconstruction in foot-and-mouth disease virus. *Virology* 25: 48-54, 1965.
- 25) PUSTIGLIONE NETTO, L.; BELEM, R.M.; SUGA, O.; YIDA, O. Pesquisa de animais portadores de virus da febre aftosa a partir de bovinos normais destinados ao abate. *Arg. Inst. Biol. S. Paulo* 39: 125-130, 1972.
- 26) RAMON, G. Foot-and-mouth disease. *Bull. Off. int. Épizoot.* 37 (11-12): 625-662, 1952.
- 27) RAMON, G. A propos de fièvre aphteuse et de la contagion par les animaux apparemment guéris. *Bull. soc. vet. Pratique France*, pp. 1-16, 1961.
- 28) REISINGER, R.C.; HEDDLESTON, K.L.; MANTHEI, C.A. A mixovirus (SF-4) associated with shipping fever of cattle. *J. Amer. Vet. Med. Assoc.* 135: 147-152, 1959.
- 29) ROSENBERG, F.J.; ALONSO F., A.; FERNANDES, N. The detection of antibodies to the foot-and-mouth disease virus-infection-associated antigen in field research. II. Prevalence of antibodies in selected cattle populations of Paraguay. Manuscript in preparation.
- 30) ROSENBERG, F.J.; AUGÉ DE MELLO, P.; GOMES, I.; ALONSO F., A. The detection of antibodies to the foot-and-mouth disease virus infection associated antigen in field research. I. Epidemiological studies in a natural outbreak of foot-and-mouth disease in cattle in confinement. Enviado a publicación.
- 31) ROSENBERG, F.J.; LIEF, F.S.; TODD, J.D.; REIF, J.S. Studies of canine respiratory viruses. I. Experimental infection of dogs with an SV5-like canine parainfluenza agent. *Am. J. Epidem.* 94: 147-165, 1971.
- 32) SCOTT, F.W.; COTTRAL, G.E.; GAILIUNAS, P. Persistence of foot-and-mouth disease virus in external lesions and saliva of experimentally infected cattle. *Am. J. vet. Res.* 27: 1531-1536, 1966.
- 33) SEIBOLD, H.R.; COTTRAL, G.E.; PATTY, R.E.; GAILIUNAS, P. Apparent modification of foot-and-mouth disease virus after prolonged residence in surviving cells. *Am. J. vet. Res.* 25: 806-814, 1964.
- 34) SELLERS, R.F.; PARKER, J. Airborne excretion of foot-and-mouth disease virus. *J. Hyg. Camb.* 67: 671-677, 1969.
- 35) STRAVER, P.J.; BOOL, P.H.; CLAESSENS, A.M.S.M.; VAN BEKKUM, J.G. Some properties of carrier strains of foot-and-mouth disease virus. *Arch. ges. Virusforsch.* 29: 114-126, 1969.
- 36) SUTMOLLER, P.; AUGÉ DE MELLO, P.; HONIGMAN, M.N.; FEDERER, K.E. Infectivity for cattle and pigs of three strains of foot-and-mouth disease virus isolated from carrier cattle. *Amer. J. Vet. Res.* 28: 101-105, 1967.

-
- 37) SUTMOLLER, P.; COTTRAL, G.E. Improved techniques for the detection of foot-and-mouth disease virus in carrier cattle. *Arch. ges. Virusforsch.* 21: 170-177, 1967.
 - 38) SUTMOLLER, P.; COTTRAL, G.E.; McVICAR, J. A review of the carrier state in foot-and-mouth disease. *Proc. An. Mtg. U.S. Livestock Sanit. Assn.* 71: 386-395, 1967.
 - 39) SUTMOLLER, P.; GAGGERO, A. Foot-and-mouth disease carriers. *Vet. Rec.* 77: 968-969, 1965.
 - 40) SUTMOLLER, P.; McVICAR, J.W. Influence of enterovirus on foot-and-mouth disease virus infection: a hypothesis. *Proc. of the 74th An.Met. U.S. Animal Health Assoc.*, 1970.
 - 41) SUTMOLLER, P.; McVICAR, J.W. The epizootiological importance of foot-and-mouth disease carriers. III - Exposure of pigs to bovine carriers. *Arch. ges. Virusforsch.* 31: 78-84, 1972.
 - 42) SUTMOLLER, P.; McVICAR, J.W.; COTTRAL, E. The epizootiological importance of foot-and-mouth disease carriers. I - Experimentally produced foot-and-mouth disease carriers in susceptible and immune cattle. *Arch. ges. Virusforsch.* 23: 227-235, 1968.
 - 43) TESSLER, J. Reactivation of antibody-neutralized foot-and-mouth disease virus by organic chemicals and inhibition by 1-butanol. *Am. J. Vet. Res.* 27: 917-922, 1966.
 - 44) TRAUTMAN, R.; SUTMOLLER, P. Detection and properties of a genomic masked viral particle consisting of foot-and-mouth disease virus nucleic acid in bovine enterovirus protein capsid. *Virology.* 44: 537-543, 1971.
 - 45) VAN BEKKUM, J.G.; FRENKEL, H.S.; FREDERIKS, H.H.J.; FRENKEL, S. Observations on the carrier state of cattle exposed to foot-and-mouth disease virus. *T. Diergeneesk.* 84: 1159-1164, 1959.
 - 46) VAN BEKKUM, J.G.; STRAVER, P.J.; BOOL, P.H.; FRENKEL, S. Further information on the persistence of infective foot-and-mouth disease virus in cattle exposed to virulent virus strains. *Bull. Off. int. Épizoot.* 65: 1949-1965, 1966.