

---

# BOLETIN

## del centro panamericano de fiebre aftosa

---

Nº 43-44, julio-diciembre 1981

No. 43-44, July-December 1981

### contenido contents

	p.
Examen histológico en cerdos vacunados con vacuna antiaftosa con adyuvante oleoso . . . . .	3
Histological examination of pigs vaccinated with oil adjuvanted foot-and-mouth disease vaccine . . . . .	13
– <i>C.A. Mebus &amp; P. Augé de Mello</i>	
Los virus de fiebre aftosa usados en la producción y control de vacunas en América del Sur . . . . .	21
Foot-and-mouth disease viruses used in vaccine production and control in South America . . . . .	29
– <i>A. Alonso Fernández, Y.L. Vianna Filho, L.A.E. Durini, P. Suttmöller</i>	
El problema de la validez de una prueba diagnóstica para uso masivo como procedimiento estadístico de clasificación . . . . .	37
The problem of validity of a diagnostic test for massive use as statistical screening procedures. . . . .	45
– <i>Vicente M. Astudillo &amp; Isabel N. Kantor</i>	
Resúmenes – Abstracts . . . . .	53
Bibliografía sobre enfermedades vesiculares → Vesicular diseases bibliography . . . . .	65

**CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA**  
**Caixa Postal 589, 20000 Rio de Janeiro-RJ, Brasil**

## EXAMEN HISTOLOGICO EN CERDOS VACUNADOS CON VACUNA ANTIAFTOSA CON ADYUVANTE OLEOSO

C. A. Mebus<sup>1</sup> & P. Augé de Mello<sup>2</sup>

### RESUMEN

Se estudiaron las reacciones tisulares macroscópicas y microscópicas producidas por vacunas de emulsión primaria (agua-en-aceite) y de emulsión doble (agua-en-aceite-en-agua), aplicadas por las vías subcutánea (SC), intramuscular (IM) o intraperitoneal (IP). Las gotículas de aceite de la emulsión primaria encontradas en los puntos de inoculación vía SC o IM fueron mayores que las encontradas en los puntos de aplicación de vacuna de emulsión doble. La inoculación de vacuna de emulsión primaria por vía IP produjo granulomas en la cavidad peritoneal, lo que no ocurrió con la vacuna de emulsión doble. De las dos formulaciones y las tres vías de inoculación utilizadas, la vacuna de emulsión doble y la vía IP no causaron reacciones tisulares indeseables.

### INTRODUCCION

Las vacunas contra la fiebre aftosa de tipo agua-en-aceite (emulsión primaria - EP) inducen un alto grado de protección en cerdos (1, 5, 6, 7, 8, 9). Sin embargo, la aplicación de esta vacuna en gran escala no es recomendable debido a las reacciones indeseables que aparecen en el punto de inoculación y en la región de los ganglios linfáticos (8). Estudios macroscópicos y microscópicos en cerdos tras inoculación por vía intramuscular (IM) y subcutánea (SC) de vacuna antiaftosa de EP ya fueron publicados (10).

Las vacunas de emulsión doble (ED) de tipo agua-en-aceite-en-agua, descritas por Herbert (4),

inoculadas en cerdos por vía intraperitoneal (IP) no produjeron lesiones macroscópicas significativas. Los animales tenían un alto grado de protección hasta por lo menos 4 meses después de la primovacunación (2, 3).

Este trabajo describe los resultados de exámenes histológicos de muestras colectadas de cerdos inoculados por las vías SC, IM o IP con vacuna antiaftosa de EP o de ED.

### MATERIALES Y METODOS

#### Vacunas

Las vacunas de EP y de ED fueron preparadas como ya fue descrito (2, 3). En resumen, la vacuna de EP fue elaborada usando aceite mineral<sup>3</sup> y 10% de mono-oleato de manitol<sup>4</sup> emulsificado en partes iguales con una suspensión de antígeno trivalente de la fiebre aftosa. La ED (4) consistió en la vacuna de EP reemulsificada con un volumen igual de solución buffer fosfato (SBF), pH 7,4 y 2% de polioxietileno de mono-oleato de sorbitán<sup>5</sup>.

#### Cerdos

Se utilizaron cerdos Landrace recién destetados, con un peso aproximado de 20 kg. Los animales fueron vacunados con vacuna de EP o de ED por las vías SC, IM (músculo masetero) o IP. En el experimento 1, los cerdos fueron sacrificados 30 días posinoculación (DPI) para realizar los exámenes macroscópico e histológico. El Cuadro 1 muestra el número del cerdo, el tipo y la dosis de vacuna usada, la vía de inoculación y el promedio del tamaño mayor de la gotícula. Las vacunas de EP y de ED fueron probadas por vía SC en los mismos cerdos, inoculando una dosis de cada vacuna en cada oreja.

<sup>1</sup>Plum Island Animal Disease Laboratory - USDA, P.O. Box 848, Greenport, New York 11944, U.S.A.

<sup>2</sup>Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (OPS/OMS), Caixa Postal 589, 20000 Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

<sup>3</sup>Marcol 52 - Exxon Corporation, U.S.A.

<sup>4</sup>Arlacel A - ICI American Inc. Atlas Chemical Division.

<sup>5</sup>Tween 80 - ICI American Inc. Atlas Chemical Division.

CUADRO 1. Resumen del tipo de vacuna, vía de inoculación y promedio del tamaño de las gotículas mayores de aceite en el punto de inoculación y en los ganglios linfáticos regionales en los animales del experimento 1

Animal	Tipo de vacuna	Vía	Dosis (ml)	Tejido	Promedio del tamaño mayor de la gotícula ( $\mu$ )	
					EP	ED
533	EP	SC <sup>a</sup>	1,5	Sitio	610	
				GL	450	
533	ED	SC <sup>b</sup>	3	Sitio		130
				GL		270
535	EP	SC <sup>a</sup>	1,5	Sitio	500	
				GL	150	
535	ED	SC <sup>b</sup>	3	Sitio		160
				GL		180
538	EP	IM	1,5	Sitio	120	
				GL	70	
539	ED	IM	1,5	Sitio	180	
				GL	130	
536	EP	IP	1,5	Varios	300	
534	ED	IP	3	Varios		40

<sup>a</sup>Oreja izquierda.

<sup>b</sup>Oreja derecha.

EP Emulsión primaria  
 ED Emulsión doble  
 IM Intramuscular  
 IP Intraperitoneal  
 SC Subcutánea  
 GL Ganglio linfático regional  
 Sitio Sitio de inoculación

En el experimento 2, los cerdos fueron divididos en cuatro grupos de 10 animales cada uno. Cada grupo fue vacunado por vía SC con vacuna de EP o por vía SC, IM o IP con vacuna de ED respectivamente. La resistencia al virus de la fiebre aftosa fue comprobada a los 110 DPI por exposición por contacto en 4 cerdos sin vacunar, inoculados por vía intraplantar con  $10^{4,6}$  DL<sub>50</sub>% ratón lactante de virus O<sub>1</sub> Campos y fueron sacrificados a los 140 DPI. Todos los cerdos fueron examinados en el sitio de inoculación para constatar la existencia de macrolesiones. De cada grupo se seleccionaron dos cerdos al azar y se tomaron muestras para realizar estudios aná-

tomo-patológicos. El Cuadro 2 resume el tipo y la dosis de vacuna e incluye el número del cerdo, la vía de inoculación y el promedio del tamaño mayor de la gotícula. Las pruebas serológicas y de desafío se informaron en otro trabajo (2).

#### Colecta de muestras y examen histológico

En ambos experimentos se colectaron muestras en los puntos de inoculación y de los ganglios linfáticos regionales de los cerdos inoculados por vía SC o IM. En el experimento 1, de los cerdos inoculados por vía IP fueron colectadas todas las lesiones y varios ganglios linfáticos de la cavidad

CUADRO 2. Resumen del tipo de vacuna, vía de inoculación y promedio del tamaño de las gotículas mayores de aceite en el punto de inoculación y en los ganglios linfáticos regionales de animales seleccionados en el experimento 2 para evaluación histológica

Animal	Tipo de vacuna	Vía	Dosis (ml)	Tejido	Promedio del tamaño mayor de la gotícula ( $\mu$ )	
					EP	ED
1	EP	SC	1,5	Sitio	ND	
				GL	80	
2	EP	SC	1,5	Sitio	430	
				GL	350	
11	ED	SC	3	Sitio		134
				GL		39
12	ED	SC	3	Sitio		90
				GL		40
28	ED	IM	3	Sitio		220
				GL		68
29	ED	IM	3	Sitio		120
				GL		46
37	ED	IP	3	Varios		0
38	ED	IP	3	Varios		0

EP Emulsión primaria  
 ED Emulsión doble  
 IM Intramuscular  
 IP Intraperitoneal  
 SC Subcutánea  
 GL Ganglio linfático regional  
 ND No disponible  
 Sitio Sitio de inoculación

peritoneal y del bazo. En el experimento 2, de los cerdos inoculados por vía IP se tomaron muestras de los ganglios linfáticos mesentéricos, bazo, páncreas, riñón e hígado. Previa fijación en solución buffer de formalina al 10% e inclusión en parafina, los tejidos fueron cortados en secciones de  $6\mu$  y coloreados con solución Mayer de hematoxilina-eosina phylloxine B.

Las lesiones en cortes de los tejidos fueron fotografiadas y en cada foto se midieron los 5 espacios claros correspondientes a las gotículas de aceite. Si se tomó más de una diapositiva o foto de una muestra, el promedio del tamaño de las gotículas mayores de aceite de todas las fotografías fue considerado.

## RESULTADOS

### Experimento 1

#### *Pruebas preliminares de vacunas oleosas de EP o de ED para cerdos*

El Cuadro 1 resume los resultados. Los resultados histológicos en el cerdo 533 en los sitios de inoculación vía SC de 1,5 ml de vacuna de EP o de 3 ml de ED, y en los respectivos ganglios linfáticos fueron similares, con excepción del tamaño de las gotículas de aceite. El promedio del tamaño de las gotículas mayores de aceite de la vacuna de EP fue cuatro veces mayor que el promedio de las gotículas de vacuna de ED. El punto de inoculación de vacuna de EP estaba formado por granulomas separados por tabiques de tejido conjuntivo. Los

granulomas menores tenían una gotícula de aceite en el centro rodeada de células gigantes, después macrófagos y luego una capa de fibroblastos. Los granulomas mayores tenían un área de linfocitos entre los macrófagos y el tejido conjuntivo. Las lesiones en los ganglios linfáticos correspondientes a los sitios de inoculación de vacunas de EP y de ED tenían numerosas figuras mitóticas. Las áreas subcapsular y paratrabecular de los nódulos tenían una gran reacción granulomatosa -macrófagos y células gigantes- y numerosas gotículas de aceite. Las gotículas mayores en los nódulos linfáticos correspondientes al punto de inoculación de vacuna de EP estaban rodeadas de células gigantes y algunos leucocitos neutrófilos.

En el cerdo 535, los resultados de los estudios histológicos de los puntos de inoculación por vía SC de 1,5 ml y de 3 ml de vacunas de EP y de ED, respectivamente, fueron diferentes del animal anterior. En el cerdo 535 los puntos de inoculación estaban rodeados por tejido conjuntivo denso en el cual se encontraban pequeños granulomas. El centro de ambos puntos contenía tejido granulomatoso necrosado y gotículas de aceite. El punto de inoculación de vacuna de ED también presentaba 2 pequeñas rosetas. El tamaño medio de las gotículas mayores de aceite en el punto de EP fue cerca de 3 veces mayor que en el punto de ED. El aspecto histopatológico de las lesiones de los ganglios linfáticos fue similar al del cerdo 533.

Estudios histológicos del punto de inoculación vía IM de 1,5 ml de vacuna de EP en el cerdo 538 revelaron numerosos granulomas pequeños, muchos de los cuales contenían una pequeña gotícula de aceite. En el ganglio linfático regional de este animal, las células reticulares en las áreas subcapsular y paratrabecular eran hiperplásticas y estas áreas contenían numerosos granulomas diseminados y pequeñas gotículas de aceite. En el cerdo 539, el punto de inoculación de 1,5 ml de vacuna de EP consistió de una masa de tejido conjuntivo granulomatoso encapsulado y gotículas de aceite. Las 5 gotículas de aceite mayores en el punto de inoculación tenían un promedio de 180  $\mu$ . Los ganglios linfáticos regionales de este cerdo presentaban granulomas, 3 de los cuales tenían leucocitos neutrófilos alrededor de las gotículas de aceite y varios granulomas tenían centros necróticos.

El cerdo 536 inoculado por vía IP con 1,5 ml de vacuna de EP tenía granulomas bien desarrollados en la cápsula del bazo y mesenterio del intestino delgado y colon. Histológicamente los granulomas del bazo fueron típicos a los encontrados en otras superficies serosas. De afuera hacia adentro, los granulomas tenían una cápsula de tejido conjuntivo; una capa de células epitelioideas en la cual habían algunos policariocitos pequeños y gotículas de aceite; una capa de células inflamatorias, siendo la mayoría leucocitos neutrófilos, muchos de los cuales eran necróticos, y el centro estaba formado por células epitelioideas azuladas-purpúreo (necróticas) y gotículas de aceite (Fig. 1). El promedio del tamaño de las gotículas mayores en los granulomas de la cavidad peritoneal fue de 300  $\mu$ .

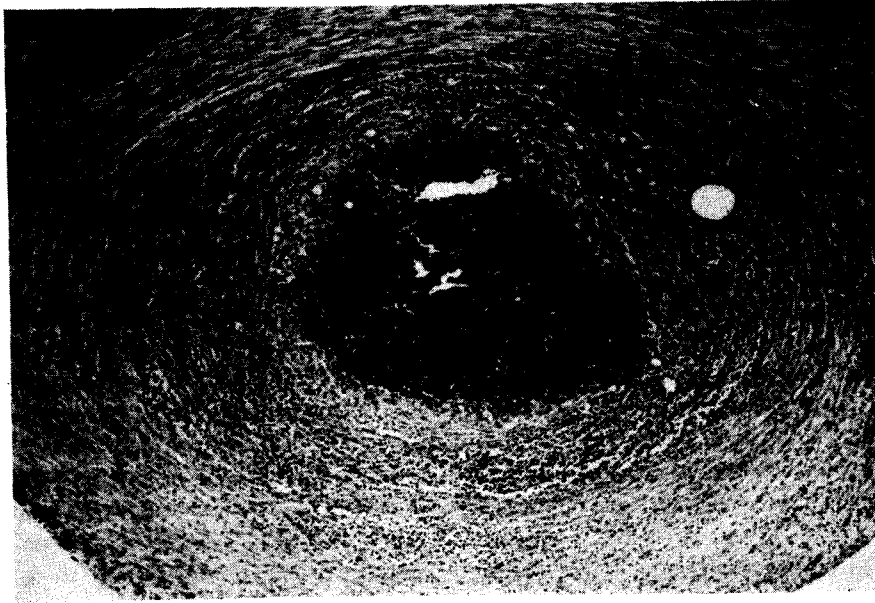
El cerdo 534 inoculado por vía IP con 3 ml de vacuna de ED tenía una pequeña área granulomatosa en el mesenterio colónico que contenía pequeñas gotículas de aceite. El promedio del tamaño de las gotículas mayores fue de 40  $\mu$ .

## Experimento 2

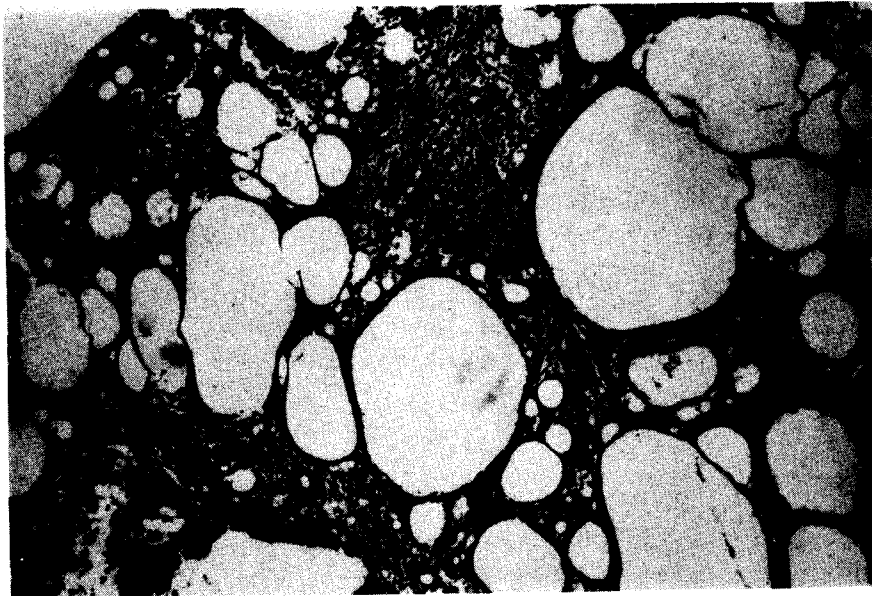
### *Comparación de las vacunas de EP y de ED para cerdos*

La dosis de 1,5 ml de vacuna de EP inoculada por vía SC en el cerdo N° 1 aparentemente se depositó en el ganglio linfático, y por esta razón fue el único punto que presentó reacción. El estudio histopatológico reveló que el ganglio linfático regional contenía una gran área necrosada, nódulos granulomatosos, algunos de los cuales tenían un centro necrótico, y moderada hiperplasia subcapsular y paratrabecular de células reticulares. El promedio del tamaño de la gotícula mayor de aceite en el ganglio linfático fue de 80  $\mu$ .

El punto de inoculación del cerdo N° 2, que recibió 1,5 ml de vacuna de EP por vía SC presentaba el siguiente resultado histológico de afuera hacia adentro: una cápsula de tejido conjuntivo, tejido granulomatoso, y un centro necrótico que contenía gotículas grandes de aceite. El promedio del tamaño de las gotículas mayores fue de 430  $\mu$  (Fig. 2). Un corte del tejido del ganglio linfático regional presentaba granulomas en el cortex. Un nódulo granulomatoso contenía una gotícula grande de aceite y otros , pequeñas gotículas. El



**FIGURA 1.** *Granuloma en la cápsula del bazo del cerdo 536 inoculado por vía intraperitoneal con 1,5 ml de vacuna de emulsión primaria. H + E aumentado 70 veces.*



**FIGURA 2.** *Gotículas grandes de aceite en el punto de inoculación vía subcutánea de 1,5 ml de vacuna de emulsión primaria en el cerdo 2. H + E aumentado 58 veces.*

promedio del tamaño de las gotículas mayores fue de 350  $\mu$ .

Los puntos de inoculación de los cerdos 11 y 12, inoculados por vía SC con 3 ml de vacuna de ED tenían numerosos nódulos granulomatosos separados por tejido conjuntivo. Los nódulos granulomatosos tenían pequeñas gotículas de aceite (Fig. 3). Los promedios de los tamaños de las gotículas mayores fueron de 134 y 90  $\mu$ , respectivamente. El ganglio linfático regional en el cerdo 11 tenía hiperplasia subcapsular y paratrabeccular de células reticulares, pequeñas gotículas de aceite y un nódulo granulomatoso subcapsular. El promedio de las gotículas mayores fue de 39  $\mu$ . En el cerdo 12, el ganglio linfático regional tenía hiperplasia subcapsular y paratrabeccular de células reticulares y en el corte fueron encontradas 2 gotículas de aceite.

El cerdo 28 tenía en el punto de inoculación, vía IM de 3 ml de vacuna de ED, una gran área granulomatosa conteniendo varias gotículas de aceite en el tejido conjuntivo adyacente al músculo. El perimisiso fue infiltrado por tejido conjuntivo difu-

fuso y tejido nodular granulomatoso que contenía varias gotículas pequeñas de aceite (Fig. 4). El promedio del tamaño de las gotículas mayores de aceite fue de 220  $\mu$ . El punto de inoculación vía IM de 3 ml de vacuna de ED en el cerdo 29 tenía el perimisiso infiltrado por tejido conjuntivo difuso y tejido nodular granulomatoso que contenía numerosas gotículas de aceite. El centro de una gran área granulomatosa estaba necrosado. El promedio del tamaño de las gotículas mayores de aceite fue de 120  $\mu$ . El ganglio linfático regional en ambos cerdos tenía hiperplasia subcapsular y paratrabeccular de células reticulares, nódulos granulomatosos diseminados, y gotículas de aceite (Fig. 5). El promedio del tamaño de las gotículas mayores de aceite en el ganglio linfático regional de los dos cerdos fue de 60 y 46  $\mu$ , respectivamente.

Los cerdos 37 y 38 inoculados por vía IP con 3 ml de vacuna de ED tenían en la cápsula del bazo algunas pequeñas saliencias de tejido conjuntivo con apariencia vellosa. Un corte del ganglio linfático mesentérico del cerdo 38 mostró hiperplasia en las células reticulares.

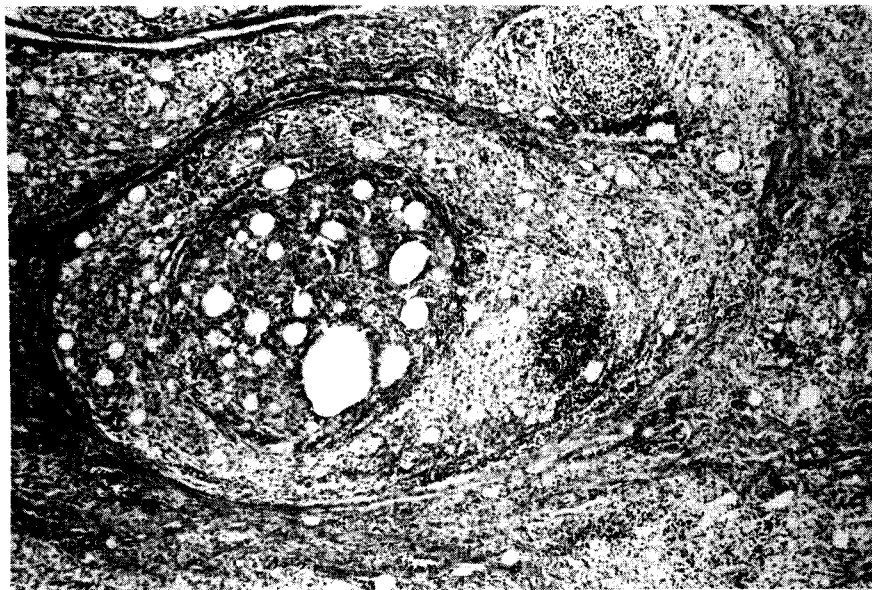


FIGURA 3. Nódulos granulomatosos y pequeñas gotículas de aceite en el punto de inoculación vía subcutánea de 3 ml de vacuna de emulsión doble en el cerdo 11. H + E aumentado 70 veces.





FIGURA 4. *Reacción granulomatosa y pequeñas gotículas de aceite en el punto de inoculación vía intramuscular de 3 ml de vacuna de emulsión doble en el cerdo 28. H + E aumentado 80 veces.*

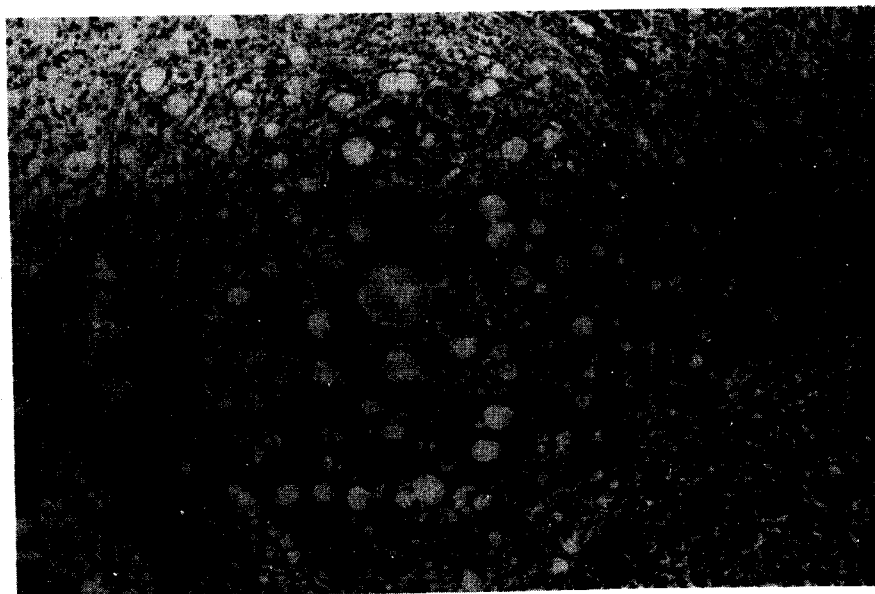


FIGURA 5. *Reacción granulomatosa y pequeñas gotículas de aceite en el ganglio linfático regional del cerdo 28 inoculado por vía intramuscular con 3 ml de vacuna de emulsión doble. H + E aumentado 158 veces.*

## DISCUSION

En el experimento preliminar, el promedio del tamaño de las gotículas mayores de aceite en los puntos de inoculación de vacuna de EP fue mayor que en los puntos de inoculación de vacuna de ED. La necrosis en los puntos de inoculación vía SC de vacuna de EP y de ED en el cerdo 535 podría haber resultado tanto por el acúmulo de gotículas de aceite en las áreas de inoculación vía SC como por una reacción desfavorable del animal. La reacción granulomatosa en los puntos de inoculación vía IM de vacuna de EP, aunque satisfactoria desde el punto de vista de producción de antígeno fue estéticamente indeseable en animales destinados al consumo, y probablemente podría ser confundida con un granuloma resultante de una infección. La diferencia más pronunciada en la reacción de vacuna de EP y de ED ocurrió con la vía de inoculación IP. Los grandes granulomas en la cavidad peritoneal de los cerdos inoculados con vacuna de EP fueron estéticamente indeseables y podrían ser confundidos con infecciones. Al contrario, la vacuna de ED provocó un pequeño granuloma en uno o dos cerdos inoculados por vía IP.

La reacción tisular estéticamente más aceptable de la vacuna de ED en el experimento preliminar resultó de estudios más extensos que consistieron en un mayor número de cerdos, comparación de los títulos de seroneutralización, eficacia de protección y examen histológico de los puntos de inoculación. Como se informó previamente, los títulos de seroneutralización y los resultados a la protección de las vacunas de EP y de ED y las vías de inoculación fueron similares. La mayoría de los animales vacunados desarrolló lesiones vesiculares, pero muchas de ellas fueron leves, y los animales no aparentaron sufrir y se movían con facilidad. Cualquier pérdida económica podría haber sido mínima (2). La necrosis también apareció en los puntos de inoculación vía SC de vacuna de EP pero no de vacuna de ED. Puesto que hubo una diferencia significativa en el promedio del tamaño de la gotícula mayor de aceite entre las dos vacunas, se sospechó que gotículas mayores de aceite en el punto de inoculación vía SC podrían ocasionar necrosis. En el experimento 2, la ausencia total de reacciones macro o microscópicas en los cerdos

inoculados por vía IP fue similar a la observada en el experimento preliminar.

De las dos formulaciones y de las tres vías de inoculación ensayadas, la inoculación vía IP de vacuna de ED probó ser más satisfactoria porque indujo protección y produjo lesiones macro y microscópicamente insignificantes. Estudios posteriores de este método de vacunación confirmaron estos resultados (3). Por tanto, la vacuna de ED aplicada por vía IP demostró ser el mejor método para inmunizar cerdos contra la fiebre aftosa.

## REFERENCIAS

1. ANDERSON, E.C. Some observations on the serological response of pigs to emulsified foot-and-mouth disease vaccine. Report of the meeting of the Research Group on the Standing Technical Committee, European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease, held in Brescia, Italy, Sep. 24-26, 177-190, 1969.
2. AUGE DE MELLO, P. & GOMES, I. Vacuna anti-aftosa con adyuvante oleoso para cerdos. I. Vacuna de emulsión doble aplicada por diferentes vías. (Foot-and-mouth disease oil adjuvanted vaccine for pigs. I. Double emulsion vaccine applied by different routes). *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa* 31-32: 1-6, 7-12, 1978.
3. AUGE DE MELLO, P., GOMES, I., ALONSO FERNANDEZ, A., MASCARENHAS, J.C. Vacuna anti-aftosa con adyuvante oleoso para cerdos. II. Vacunación intraperitoneal de cerdos jóvenes con emulsión doble. (Foot-and-mouth disease oil adjuvanted vaccine for pigs. II. Intraperitoneal vaccination of young pigs with double emulsion vaccine). *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa* 31-32: 13-19, 21-28, 1978.
4. HERBERT, W.J. Multiple emulsions. A new form of mineral-oil antigen adjuvant. *Lancet* (2): 771, 1965. *Foot-and-mouth Dis. Bull.* 8 (3): 1969.
5. McKERCHER, P.D. & GIORDANO, A.R. Foot-and-mouth disease in swine. I. The immune response of swine to chemically-treated and nontreated foot-and-mouth disease virus. *Arch. ges. Virusforsch.* 20: 39-53, 1967.
6. McKERCHER, P.D. & GAILIUNAS, P. Response of swine to inactivated foot-and-mouth disease vaccine. *Arch. ges. Virusforsch.* 28: 165-176, 1969.
7. McKERCHER, P.D. & MORGAN, D.O. Immune

- 
- response of swine to revaccination with an oil adjuvant foot-and-mouth disease virus vaccine. Meeting of the Research Group of the Standing Technical Committee held at the Istituto Zooprofilattico Sperimentale, Brescia, Italy, 1969.
8. McKERCHER, P.D., GRAVES, J.H. *et al.* Foot-and-mouth disease vaccines. II. Studies on the duration of immunity in cattle and pigs. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa* 19-20: 24-30, 1975.
  9. McKERCHER, P.D. & BACHRACH, H.L. A foot-and-mouth disease vaccine for swine. *Can. J. comp. Med.* 40 (1): 67-74, 1976.
  10. McKERCHER, P.D., GAILIUNAS, P., BURROWS, R., CAPSTICK, P.B. Reaction of swine to oil-adjuvanted inactivated foot-and-mouth disease virus vaccine inoculated by intramuscular and subcutaneous routes. *Arch. ges. Virusforsch.* 35, 364-377, 1971.

## HISTOLOGICAL EXAMINATION OF PIGS VACCINATED WITH OIL ADJUVANTED FOOT-AND-MOUTH DISEASE VACCINE

C. A. Mebus<sup>1</sup> & P. Auge de Mello<sup>2</sup>

### SUMMARY

The gross and microscopic tissue reactions induced by water-in-oil primary (PE) and water-in-oil-in-water double emulsion (DE) types of foot-and-mouth disease vaccine administered by the subcutaneous, intramuscular or intraperitoneal route were evaluated. Oil droplets in the subcutaneous and intramuscular inoculation sites of the PE vaccine were larger than those in the sites of the DE vaccine. Intraperitoneal inoculation of the PE vaccine caused granulomas in the peritoneal cavity; the DE vaccine did not. Of the 2 preparations and 3 routes of inoculation tested, the intraperitoneal inoculation of the DE vaccine caused no aesthetically objectionable tissue reaction.

### INTRODUCTION

Water-in-oil foot-and-mouth disease (FMD) vaccines, primary emulsion (PE) type, induce a high degree of protection in pigs (1, 5, 6, 7, 8, 9). However, the aesthetically objectionable extensive tissue reaction at the site of inoculation and in the regional lymph nodes prevents large-scale application of this vaccine (8). Gross and microscopic examinations of swine to PE FMD vaccine inoculated by intramuscular (IM) and subcutaneous (SC) routes have already been reported (10).

Water-in-oil-in-water double emulsion (DE) vaccines as described by Herbert (4) inoculated intraperitoneally into pigs produced no significant

gross lesion. The animals had a high degree of protection for at least 4 months after the first vaccination (2, 3).

The present paper describes the histological examination of samples collected from pigs vaccinated with PE or DE FMD vaccine inoculated by SC, IM or intraperitoneal (IP) routes.

### MATERIALS AND METHODS

#### Vaccines

Primary and DE vaccines were prepared as described (2, 3). Briefly, the PE was prepared using mineral oil<sup>3</sup> containing 10% of mannide monooleate<sup>4</sup> emulsified with equal parts of a trivalent antigen suspension. The DE (4) consisted of the PE vaccine re-emulsified with an equal volume of phosphate buffer solution (PBS), pH 7.4, containing 2% polyoxethylene 20 sorbitan monooleate<sup>5</sup>.

#### Pigs

Mixed Landrace pigs recently weaned and of approximately 20 kg were used. Pigs were vaccinated with PE or with DE FMD vaccine using the SC, IM (masseter m.), or IP route. In experiment 1, the pigs were killed 30 days post inoculation (DPI) for gross and histologic examination; the pig number, type and amount of vaccine, route of inoculation and average of largest droplet size are shown in Table 1. The PE and DE vaccines were evaluated via the SC route in the same pigs by injecting one preparation into each ear.

In experiment 2, four groups of 10 pigs each were vaccinated either SC with PE vaccine or SC,

<sup>1</sup> Plum Island Animal Disease Laboratory - USDA, P.O. Box 848, Greenport, New York 11944, U.S.A.

<sup>2</sup> Pan American Foot-and-Mouth Disease Center. (PAHO/WHO), Caixa Postal 589, 20000 Rio de Janeiro-RJ, Brazil.

<sup>3</sup> Marcol 52 - Exxon Corporation, U.S.A.

<sup>4</sup> Arlacel A - ICI American Inc. Atlas Chemical Division.

<sup>5</sup> Tween 80 - ICI American Inc. Atlas Chemical Division.

TABLE 1. Summation of the type of vaccine, route of inoculation and average size of the largest oil droplets at the site of inoculation and in the regional lymph node for the animals in experiment 1

Animal	Type of vaccine	Route	Dose (ml)	Tissue	Average largest droplet size ( $\mu$ )	
					PE	DE
533	PE	SC <sup>a</sup>	1.5	Site	610	
				LN	450	
533	DE	SC <sup>b</sup>	3	Site		130
				LN		270
535	PE	SC <sup>a</sup>	1.5	Site	500	
				LN	150	
535	DE	SC <sup>b</sup>	3	Site		160
				LN		180
538	PE	IM	1.5	Site	120	
				LN	70	
539	DE	IM	1.5	Site	180	
				LN	130	
536	PE	IP	1.5	Composit	300	
534	DE	IP	3	Composit		40

<sup>a</sup> Left ear

<sup>b</sup> Right ear

PE Primary emulsion  
 DE Double emulsion  
 IM Intramuscular  
 IP Intraperitoneal  
 SC Subcutaneous  
 LN Regional lymph node  
 Site Site of inoculation

IM, or IP with DE vaccine, respectively. Resistance to FMD was challenged by contact exposure to 4 non-vaccinated pigs inoculated interplantarily with  $10^{4.6}$  mouse  $LD_{50\%}$  of O<sub>1</sub> Campos virus at 110 DPI and killed 140 DPI. Site of inoculation in all pigs was examined for gross lesions, and tissues from two pigs randomly selected from each group were collected for gross histologic examination; Table 2 shows the pig number, type and amount of vaccine, route of inoculation and average of largest droplet size. Serological and challenge inoculation procedures have been reported (2).

#### Collection of samples for histologic examination

In both experiments, the sites of inoculation

and regional lymph nodes were collected from pigs inoculated SC or IM. In experiment 1, all lesions, several lymph nodes in the peritoneal cavity, and spleen were collected from pigs inoculated IP. In experiment 2, sections of mesenteric lymph node, spleen, pancreas, kidney and liver were collected from pigs inoculated IP. Tissues were fixed in buffered 10% formalin; a cross section was trimmed to include any grossly visible lesions, embedded in paraffin, sectioned at 6  $\mu$  and stained with Mayer's hematoxylin eosin-phloxine B.

Lesions in tissue sections were photographed and the 5 largest clear spaces (oil droplets) in each photograph were measured. If more than 1

TABLE 2. Summation of the type of vaccine, route of inoculation and average size of the largest oil droplets at the site of inoculation and in the regional lymph node for animals selected in experiment 2 for histological evaluation

Animal	Type of vaccine	Route	Dose (ml)	Tissue	Average largest droplet size ( $\mu$ )	
					PE	DE
1	PE	SC	1.5	Site	NA	
				LN	80	
2	PE	SC	1.5	Site	430	
				LN	350	
11	DE	SC	3	Site		134
				LN		39
12	DE	SC	3	Site		90
				LN		40
28	DE	IM	3	Site		220
				LN		68
29	DE	IM	3	Site		120
				LN		46
37	DE	IP	3	Composit		0
38	DE	IP	3	Composit		0

PE Primary emulsion  
 DE Double emulsion  
 IM Intramuscular  
 IP Intraperitoneal  
 SC Subcutaneous  
 LN Regional lymph node  
 NA Note available  
 Site Site of inoculation

slide or photograph was made of a specimen, the average largest oil droplet size was based on all photographs for the specimen.

## RESULTS

### Experiment 1

#### *Preliminary tests of primary and double emulsion oil vaccines for pigs*

Results are summarized in Table 1. Histologic findings in pig 533 at the sites of SC inoculation of 1.5 ml of PE or 3 ml of DE vaccine and in the lymph nodes draining the respective sites were similar except for the size of the oil droplets. The average size of the largest oil droplets associated with inoculation of the PE vaccine was

about 4 times larger than the average largest droplet associated with the DE vaccine. The DE inoculation site was composed of granulomas separated by connective tissue septa. Small granulomas had an oil droplet in the center surrounded by giant cells, then macrophages and then a layer of fibroblasts. Larger granulomas had a lymphocytic area between the macrophages and connective tissue. Lymph nodules in nodes draining the PE and DE inoculation sites had numerous mitotic figures. The subcapsular and paratrabeular areas of the nodes had a marked granulomatous reaction - macrophages and giant cells - and numerous oil droplets. Large oil droplets in the node draining the PE site were surrounded by giant cells and a few neutrophilic leukocytes.

Histologic findings at the sites of SC inoculation of 1.5 ml of PE and 3 ml of DE vaccine in pig 535 differed from the preceding pig. The sites in pig 535 were surrounded by dense connective tissue in which were embedded small granulomas; the center of both sites contained necrotic granulomatous tissue and oil droplets. The site of DE vaccine inoculation also contained 2 small rosettes. The average size of the largest oil droplets in PE site was about 3 times larger than in the DE site. The histologic appearance of the lymph nodes draining the sites were similar to those in pig 533.

The IM inoculation site of 1.5 ml of PE vaccine in pig 538 histologically consisted of numerous small granulomas many of which contained a small oil droplet. In the regional lymph node from this pig, the reticular cells in the subcapsular and paratrabeular areas were hyperplastic and these areas contained numerous scattered granulomas and small oil droplets. The IM inoculation site of 1.5 ml of PE vaccine in pig 539 consisted of a connective tissue encapsulated granulomatous mass and oil droplets. The 5 largest oil droplets in the inoculation site averaged  $180\ \mu$ . The regional lymph nodes from this pig contained granulomas; 3 of the granulomas had neutrophilic leukocytes around oil droplets and several granulomas had necrotic centers.

Pig 536 inoculated IP with 1.5 ml of PE vaccine had well developed granulomas on the capsule of the spleen and mesentery of the small intestine and colon. Histologically the granulomas on the spleen were typical of those on other serosal surfaces. From the outside in, the granulomas had a connective tissue capsule; a layer of epithelioid cells in which there were occasional small polykaryocytes and oil droplets; a layer of inflammatory cells, mostly neutrophilic leukocytes, many of which were necrotic; and a center composed of bluish-purple (necrotic) epithelioid cells and oil droplets (*Fig. 1*). The average size of the largest oil droplets in granulomas in the peritoneal cavity was  $300\ \mu$ .

Pig 534 inoculated IP with 3 ml of the DE vaccine had one small granulomatous area containing small oil droplets on the colonic mesentery. The average size of the largest oil droplets was  $40\ \mu$ .

## Experiment 2

### *Comparison of primary and double oil emulsion vaccines for pigs*

The 1.5 ml of PE vaccine inoculated SC in pig 1 was apparently deposited in the lymph node for this was the only site of reaction. Histologically, the regional node contained a large necrotic area, granulomatous nodules some of which had a necrotic center, and moderate subcapsular and paratrabeular reticular cell hyperplasia. The largest average oil droplet size in the lymph node was  $80\ \mu$ .

The inoculation site in pig 2 which received 1.5 ml of PE vaccine subcutaneously had histologically the following structure from outside in: a connective tissue capsule, granulomatous tissue, and a necrotic center which contained large oil droplets. The average size of the largest oil droplets was  $430\ \mu$  (*Fig. 2*). The tissue section from the regional lymph node had granulomatous nodules in the cortex. One granulomatous nodule contained a large oil droplet and the others small droplets. The average size of the largest oil droplets was  $350\ \mu$ .

Sites of inoculation in pigs 11 and 12 which received 3 ml of DE vaccine SC had numerous granulomatous nodules separated by connective tissue. The granulomatous nodules contained small oil droplets (*Fig. 3*). The average sizes of the largest oil droplets were  $134$  and  $90\ \mu$ , respectively. The regional lymph node in pig 11 had subcapsular and paratrabeular reticular cell hyperplasia, small oil droplets and a subcapsular granulomatous nodule. The average size of the largest oil droplets was  $39\ \mu$ . In pig 12, the regional lymph node had subcapsular and paratrabeular reticular cell hyperplasia; 2 small oil droplets were in the section.

At the site of IM inoculation of 3 ml of DE vaccine, pig 28 had a large granulomatous area containing numerous oil droplets in the connective tissue adjacent to the muscle. The perimysium was widened by connective tissue and diffuse and nodular granulomatous tissue in which were numerous small oil droplets (*Fig. 4*). The average size of the largest droplets was  $220\ \mu$ . The site of IM inoculation of 3 ml of DE vaccine in pig 29 had the perimysium widened by connective tissue

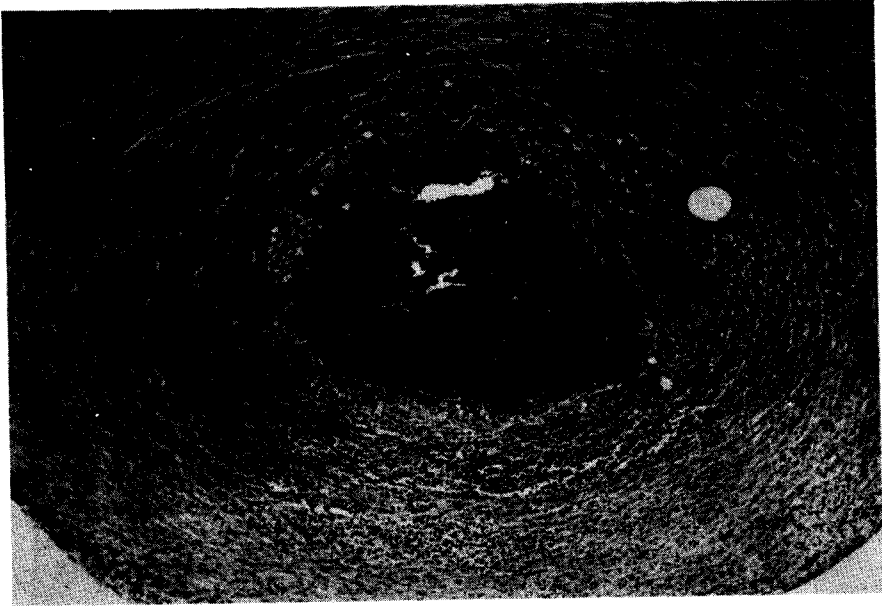


FIGURE 1. *Granuloma on the capsule of the spleen from pig 536 inoculated intraperitoneally with 1.5 ml of PE vaccine. H + E x 70.*

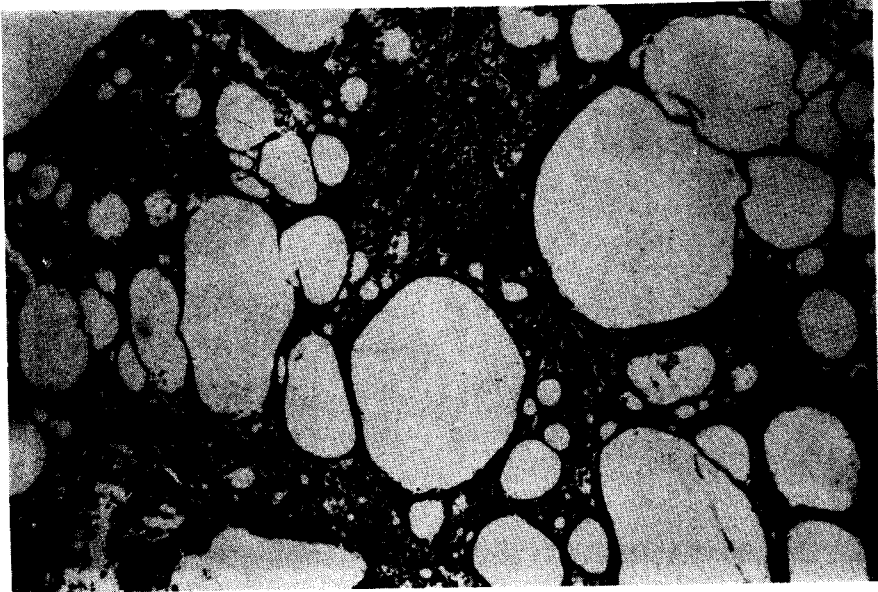
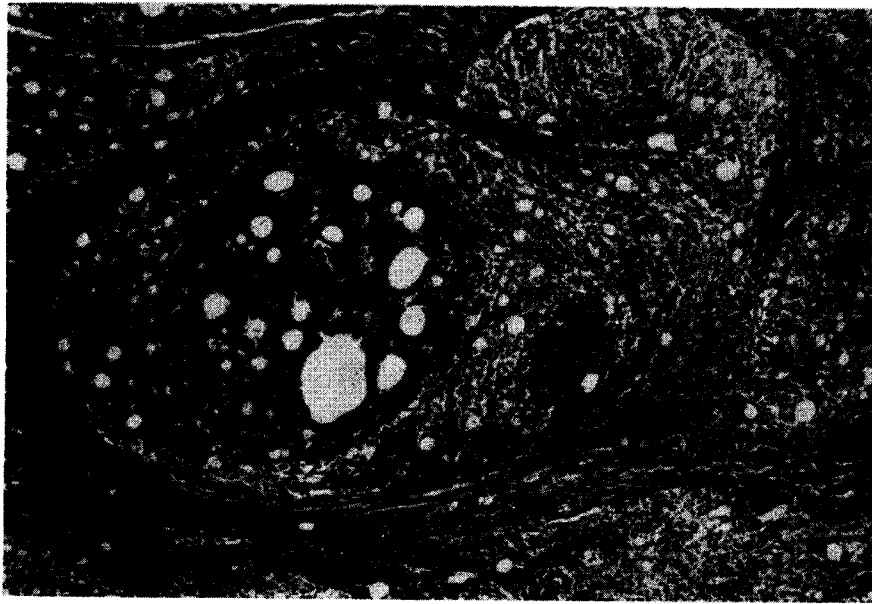
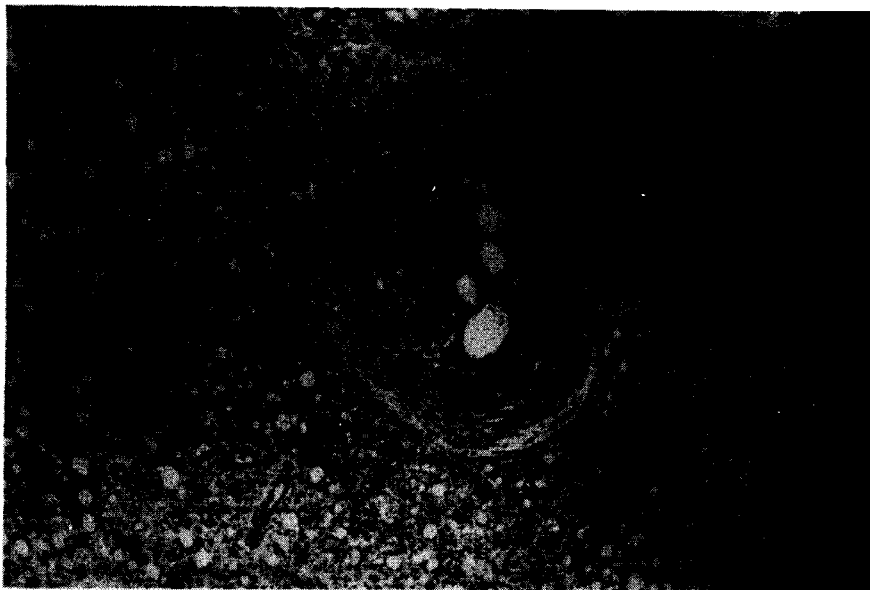


FIGURE 2. *Large oil droplets at the site of subcutaneous inoculation of 1.5 ml of PE vaccine in pig 2. H + E x 58.*





**FIGURE 3.** *Granulomatous nodules and small oil droplets at the site of subcutaneous inoculation of 3 ml DE vaccine in pig 11. H + E x 70.*



**FIGURE 4.** *Granulomatous reaction and small oil droplets at the site of intramuscular inoculation of 3 ml DE vaccine in pig 28. H + E x 80.*

and diffuse and nodular granulomatous tissue which contained numerous oil droplets. The center of one large granulomatous area was necrotic. The average size of the largest oil droplets was 120  $\mu$ . The regional lymph node in both pigs had subcapsular and paratrabeular reticular cell hyperplasia, scattered granulomatous nodules, and oil droplets (Fig. 5). The average size of the

largest oil droplets in the regional lymph node of the 2 pigs were 60 and 46  $\mu$ , respectively.

Pigs 37 and 38 inoculated IP with 3 ml of DE vaccine, had a few small connective tissue villous-like projections from the capsule of the spleen. A section of mesenteric lymph node from pig 38 had reticular cell hyperplasia.

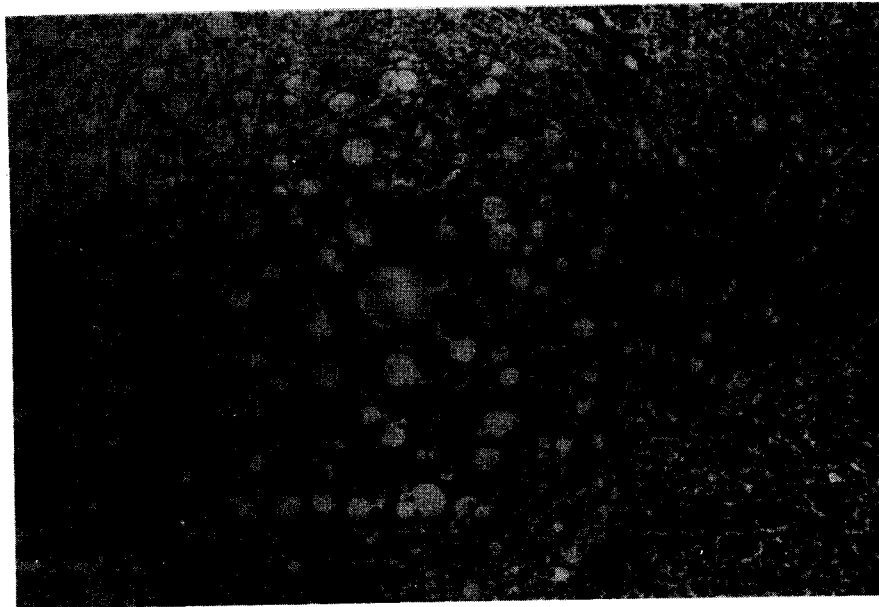


FIGURE 5. Granulomatous reaction and small oil droplets in the regional lymph node of pig 28 inoculated intramuscularly with 3 ml of DE vaccine. H + E  $\times$  158.

#### DISCUSSION

In the preliminary experiment, the average size of the largest oil droplets at the sites of PE vaccine inoculation was larger than at the sites of DE vaccine inoculation. The necrosis at the sites of SC inoculation of PE and DE vaccine in pig 535 could have resulted from either the large oil droplets in the SC areas or an unfavorable reaction of the animal. The granulomatous reaction at the sites of IM inoculation of the PE vaccine while desirable for processing the antigen was aesthetically undesirable in meat producing

animals and could possibly be confused with a granuloma resulting from infection. The most pronounced difference in the reaction to PE and DE vaccine occurred with the IP route of inoculation. The large granulomas in the peritoneal cavity of the pigs inoculated with PE vaccine was aesthetically undesirable and could be confused with infection. In contrast, the DE vaccine caused one small granuloma in 1 or 2 pigs inoculated IP.

The aesthetically more desirable tissue reaction of the DE vaccine in the preliminary experiment resulted in more extensive testing which

consisted of a larger number of pigs, comparison of serum microneutralization titers, protection efficacy and histologic examination of the sites of inoculation. As previously reported, the serum neutralization titers and protection results for the PE and DE vaccines and the 3 routes of inoculation were similar. Most of the vaccinated animals developed vesicular lesions but many were mild; the animals did not appear to suffer and moved about easily. Any economic loss would have been minimal (2). Necrosis was again present at the sites of subcutaneous inoculation of PE but not DE vaccine. Since there was a marked difference in average largest oil droplet size between the 2 vaccines, the suspicion was strengthened that large oil droplets in the SC location could cause necrosis. In experiment 2, the essential absence of detectable gross or microscopic reaction in the IP inoculated pigs was similar to those observed in the preliminary experiment.

Of the 2 preparations and 3 routes of inoculation tested, the IP inoculation of DE vaccine was the most desirable combination for it resulted in protection and produced no significant detectable gross or histologic lesion. Additional limited studies of this method of vaccination have confirmed these results (3). Thus, the DE vaccine administered IP appears to be a desirable method for immunizing pigs to FMD.

#### REFERENCES

1. ANDERSON, E.C. Some observations on the serological response of pigs to emulsified foot-and-mouth disease vaccine. Report of the meeting of the Research Group on the Standing Technical Committee, European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease, held in Brescia, Italy, Sep. 24-26, 177-190, 1969.
2. AUGE DE MELLO, P. & GOMES, I. Vacuna anti-aftosa con adyuvante oleoso para cerdos. I. Vacuna de emulsión doble aplicada por diferentes vías. (Foot-and-mouth disease oil adjuvanted vaccine for pigs. I. Double emulsion vaccine applied by different routes). *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa* 31-32: 1-6, 7-12, 1978.
3. AUGE DE MELLO, P., GOMES, I., ALONSO FERNANDEZ, A., MASCARENHAS, J.C. Vacuna anti-aftosa con adyuvante oleoso para cerdos. II. Vacunación intraperitoneal de cerdos jóvenes con emulsión doble. (Foot-and-mouth disease oil adjuvanted vaccine for pigs. II. Intraperitoneal vaccination of young pigs with double emulsion vaccine). *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa* 31-32: 13-19, 21-28, 1978.
4. HERBERT, W.J. Multiple emulsions. A new form of mineral-oil antigen adjuvant. *Lancet* (2): 771, 1965. *Foot-and-mouth Dis. Bull.* 8 (3): 1969.
5. McKERCHER, P.D. & GIORDANO, A.R. Foot-and-mouth disease in swine. I. The immune response of swine to chemically-treated and nontreated foot-and-mouth disease virus. *Arch. ges. Virusforsch.* 20: 39-53, 1967.
6. McKERCHER, P.D. & GAILIUNAS, P. Response of swine to inactivated foot-and-mouth disease vaccine. *Arch. ges. Virusforsch.* 28: 165-176, 1969.
7. McKERCHER, P.D. & MORGAN, D.O. Immune response of swine to revaccination with an oil adjuvant foot-and-mouth disease virus vaccine. Meeting of the Research Group of the Standing Technical Committee held at the Instituto Zooprofilattico Sperimentale, Brescia, Italy, 1969.
8. McKERCHER, P.D., GRAVES, J.H. *et al.* Foot-and-mouth disease vaccines. II. Studies on the duration of immunity in cattle and pigs. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa* 19-20: 24-30, 1975.
9. McKERCHER, P.D. & BACHRACH, H.L. A foot-and-mouth disease vaccine for swine. *Can. J. comp. Med.* 40 (1): 67-74, 1976.
10. McKERCHER, P.D., GAILIUNAS, P., BURROWS, R., CAPSTICK, P.B. Reaction of swine to oil-adjuvanted inactivated foot-and-mouth disease virus vaccine inoculated by intramuscular and subcutaneous routes. *Arch. ges. Virusforsch.* 35, 364-377, 1971.

## LOS VIRUS DE FIEBRE AFTOSA USADOS EN LA PRODUCCION Y CONTROL DE VACUNAS EN AMERICA DEL SUR

A. Alonso Fernández<sup>1</sup>, Y.L. Vianna Filho<sup>2</sup>, L.A.E. Durini<sup>3</sup>, P. Suttmöller<sup>1</sup>

### RESUMEN

Se analizan los virus de la fiebre aftosa de los tipos O, A y C utilizados en América del Sur para la producción y el control de la vacuna antiaftosa. También se estudian las cepas que recientemente han tenido alguna significación epidemiológica en el campo. Salvo pocas excepciones, el control de las vacunas es realizado con las mismas muestras utilizadas en la producción.

Todas las cepas del tipo O usadas en América del Sur para la producción de las vacunas se encuadran dentro del subtipo O<sub>1</sub>. Los virus del tipo A analizados por seroneutralización pueden dividirse en dos grupos, uno constituido por el A<sub>24</sub> Cruzeiro, A<sub>24</sub> Argentina/68 y A<sub>27</sub> Cundinamarca y otro compuesto por el A Venceslau, A Argentina/79 y A Brasil/79. Dentro del tipo C todas las cepas estudiadas son muy parecidas. Las cepas C<sub>2</sub> Pando y C<sub>3</sub> Resende se destacan por su mayor antigenicidad.

### INTRODUCCION

La gran capacidad de mutación del virus de la fiebre aftosa (4, 6, 7) induce a la constante aparición de nuevas cepas en el campo, por lo que en 1958 fue creado el Laboratorio Mundial de Referencia (LMR), en Pirbright, Inglaterra, con la finalidad de clasificar los virus de la fiebre aftosa. A su vez, la Organización de los Estados Americanos

fundó en 1951 el Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (CPFA) asignándole, entre otras, la tarea de Referencia para las Américas en diagnóstico, actividad que fue reconocida por el LMR, la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Oficina Internacional de Epizootias (OIE) en su Sesión General XXVIII, de mayo de 1960.

Por otro lado, la amplia plasticidad de este virus también obliga a que los laboratorios produzcan la vacuna antiaftosa con distintas cepas, lo que hace que una vacuna que es adecuada para un área, no lo sea para otra, debido a la mayor o menor correlación entre las cepas actuantes en el campo y las incluidas en la vacuna. Por este motivo, es necesario conocer las características antigénicas e inmunogénicas de las cepas de virus usadas en la formulación de las vacunas, en los diferentes países, para determinar cual es la más adecuada para ser utilizada en una determinada área.

El presente trabajo describe las características antigénicas e inmunogénicas de las cepas usadas en la producción y control de vacunas en América del Sur. A la vez, describe aquellas que fueron importantes epidemiológicamente en esta región.

### MATERIALES Y METODOS

#### Cepas de virus estudiadas

*O<sub>1</sub> Campos—Brasil/58*: Virus aislado en 1958 en el estado de Rio de Janeiro, Brasil, de bovinos no vacunados. Es la cepa de referencia para las Américas. La mayoría de los virus del tipo O identificados en América del Sur tienen características antigénicas similares a éste.

*O<sub>1</sub> Caseros—Argentina/67*: Cepa aislada de un foco de fiebre aftosa en bovinos vacunados con O<sub>1</sub> Campos, de la provincia de Santa Fe, Argentina, en 1967. Tiene un comportamiento antigénico semejante a la anterior.

<sup>1</sup>Centro Panamericano de Fiebre Aftosa, (OPS/OMS), Caixa Postal 589, 20000 Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

<sup>2</sup>LARA/RS - Laboratorio Regional de Apoio Animal, Estrada da Ponta Grossa, 3036, 90000 Porto Alegre-RS, Brasil.

<sup>3</sup>SELAB - Servicio de Laboratorios, Chorroarín 134, Buenos Aires, Argentina.

*O<sub>1</sub> Urubamba-Perú/63*: Aislado en 1963 en Perú, de bovinos no vacunados. Es bastante similar a las dos cepas anteriores.

*O<sub>1</sub> Cura-Venezuela/71*: Identificado en Venezuela en 1971 en bovinos enfermos de fiebre aftosa que habrían sido sistemáticamente vacunados con vacuna de virus vivo atenuado *O<sub>1</sub> Campos*.

*O<sub>1</sub> Magdalena-Colombia/78*: Fue colectado en Colombia de un brote de fiebre aftosa en bovinos vacunados. Desde 1964, en Colombia han sido identificadas cepas con características antigénicas similares a ésta.

*O Rio Grande do Sul (RS)-Brasil/80*: Esta cepa provocó una onda epidémica en bovinos en Rio Grande do Sul, Brasil, que abarcó desde octubre de 1979 a febrero de 1981, presentando una tasa de morbilidad del 3,5%. No ha vuelto a ser identificada en años siguientes.

*A<sub>5</sub> Westerwald/47*: Subtipo representativo de Europa.

*A<sub>24</sub> Cruzeiro-Brasil/55*: Aislado en 1955 en el estado de São Paulo, Brasil, de bovinos no vacunados. Hasta 1976, la mayoría de las muestras de campo de los países del Cono Sur tenían una aceptable relación con el subtipo *A<sub>24</sub>*. En la actualidad únicamente muestras del pantanal matogrosense (Brasil), Ecuador, Perú, Colombia y Venezuela mantienen las características antigénicas del *A<sub>24</sub>*.

*A<sub>24</sub> Argentina/68*: Fue aislada en Argentina en 1968 de bovinos vacunados. Predominó en este país hasta 1976.

*A<sub>27</sub> Cundinamarca-Colombia/76*: Se aisló de bovinos vacunados. Es la cepa representativa de Colombia desde 1967. Está muy relacionada con el subtipo *A<sub>5</sub>*. Esta característica era más marcada en la cepa *A<sub>27</sub> Colombia/67*.

*A<sub>32</sub> Venezuela/70*: Cepa predominante en Venezuela desde 1969 a 1980.

*A Venceslau-Brasil/76*: Fue colectada de bovinos vacunados con *A<sub>24</sub> Cruzeiro*. Esta cepa predominó en Brasil, excepto en Rio Grande do Sul, desde 1976 a 1980.

*A Bagé-Brasil/76*: Aislado de bovinos vacunados con *A<sub>24</sub> Cruzeiro* en Rio Grande do Sul en 1976. La mayoría de los virus identificados desde 1967 hasta 1981 en el campo, en Rio Grande do Sul, Uruguay y Argentina presentan características

antigénicas similares a esta cepa.

*A Argentina/79*: Fue aislada en 1979 de bovinos vacunados con *A<sub>24</sub> Argentina/68* en la provincia de Santa Fe. Tiene un comportamiento antigénico similar al *A-Brasil/79* y también es muy parecida al *A Bagé*.

*A-Brasil/79*: Identificada en bovinos vacunados en Rio Grande do Sul en 1979. Está muy relacionada al *A Bagé* y al *A-Argentina/79*. Es la cepa predominante en Brasil desde 1980.

*A RS-Brasil/81*: Fue aislada de un brote en bovinos vacunados en Rio Grande do Sul en 1981.

*C<sub>1</sub> GC*: Cepa aislada en Holanda en la onda epidémica de 1962.

*C<sub>2</sub> Pando-Uruguay/44*: Fue aislado en el departamento de Colonia en 1944. Causó una onda epidémica en Rio Grande do Sul, Brasil, Uruguay y Argentina de 1943 a 1945.

*C<sub>2</sub> 997*: Cepa responsable por los brotes de 1953 y 1965 en Gran Bretaña.

*C<sub>3</sub> Resende-Brasil/55*: Cepa identificada en 1955 en el estado de Rio de Janeiro en bovinos no vacunados. Es el subtipo representativo de los países afectados por el virus tipo C de América del Sur.

*C<sub>3</sub> Indaial-Brasil/71*: Virus aislado de bovinos vacunados en el estado de Santa Catarina en 1971 y tiene una aceptable relación con la cepa *C<sub>3</sub> Resende*.

*C<sub>4</sub> Tierra del Fuego-Argentina/66*: Virus causante de un foco, en 1966, en bovinos no vacunados en Tierra del Fuego.

*C<sub>5</sub> Argentina/69*: Predominó en Argentina desde 1969 a 1974. A partir de ese año no ha vuelto a ser identificado.

*C Chaco-Paraguay/74*: Aislado de bovinos vacunados en el Chaco paraguayo en 1974. Se caracteriza por estar muy relacionado con todas las cepas del tipo C estudiadas en este experimento.

#### Relaciones serológicas

Fueron obtenidas según metodología descrita (2), aplicando las normas propuestas por el LMR (8). Es decir, los sueros hiperinmunes fueron titulados frente a 2,5 unidades fijadoras del complemento 50% (UFC<sub>50</sub>) de cada uno de los antígenos, utilizando 4 unidades hemolíticas de complemento 50% y con tiempos de incubación

y hemólisis de 30 minutos. Las relaciones serológicas fueron calculadas dividiendo la recíproca del título de cada suero frente a los antígenos heterólogos por el homólogo.

$$\text{Es decir: Relación } r = \frac{\text{recíproca título sueros hiperinmunes frente antígeno heterólogo}}{\text{recíproca título sueros hiperinmunes frente antígeno homólogo}}$$

Los antígenos utilizados para determinar las relaciones serológicas fueron las mismas suspensiones virulentas usadas para preparar las vacunas y realizar la seroneutralización y seroprotección, las que fueron obtenidas pasando dos o tres veces el virus de origen bovino en células BHK<sub>21</sub>, clon 13, cultivadas en frascos rolantes, a excepción de las cepas C<sub>1</sub> GC y C<sub>2</sub> 997 que se utilizó virus de cobayo para los pasajes, por no disponer de bovino.

Los sueros hiperinmunes fueron producidos en cobayos utilizando suspensiones virulentas adaptadas a esta especie. A las seis semanas después de infectados los cobayos fueron hiperinmunizados dos veces, con intervalo de una semana, por inoculación intraplantar con 0,2 ml de una suspensión

virulenta de virus adaptado a cobayo, al que fue agregado 0,1% de saponina. Siete días después de la última hiperinmunización todos los cobayos fueron sangrados por punción intracardíaca. El suero fue inactivado a 56°C durante 30 minutos y conservado a -20°C.

#### Seroneutralización

Fue realizada por la técnica de microneutralización ya descrita (5) utilizando sueros de bovinos de 30 días después de vacunados con vacunas trivalentes inactivadas hidróxido-saponinadas, preparadas según procedimiento descrito (7).

#### Seroprotección

Fue realizada en ratones lactantes con los sueros de bovinos indicados anteriormente, empleando técnica descrita (3).

## RESULTADOS

En el Cuadro 1 están indicadas las distintas cepas de virus de la fiebre aftosa utilizadas actualmente en la producción de vacunas en América del Sur. Merece destacar que los virus más utilizados son el O<sub>1</sub> Campos, el A<sub>24</sub> Cruzeiro y el C<sub>3</sub> Resende.

CUADRO 1. Cepas utilizadas en la producción de la vacuna antiaftosa en América del Sur

Países	Cepas		
	O	A	C
Argentina	O <sub>1</sub> Caseros <sup>a</sup> O <sub>1</sub> Campos	A <sub>24</sub> Argentina/68 A Argentina/79 <sup>a</sup>	C <sub>3</sub> Resende <sup>a</sup>
Brasil	O <sub>1</sub> Campos <sup>a</sup>	A Venceslau <sup>a</sup> A <sub>24</sub> Cruzeiro A <sub>27</sub> Cundinamarca <sup>a</sup>	C <sub>3</sub> Indaial <sup>a</sup> —
Colombia	O <sub>1</sub> Magdalena <sup>a</sup>	A <sub>24</sub> Cruzeiro <sup>a</sup>	—
Ecuador	O <sub>1</sub> Urubamba <sup>a</sup>	A <sub>24</sub> Cruzeiro <sup>a</sup>	C <sub>3</sub> Resende <sup>a</sup>
Paraguay	O <sub>1</sub> Campos <sup>a</sup>	A <sub>24</sub> Cruzeiro <sup>a</sup>	C <sub>3</sub> Resende <sup>a</sup>
Perú	O <sub>1</sub> Urubamba <sup>a</sup>	A <sub>24</sub> Cruzeiro <sup>a</sup>	C <sub>3</sub> Resende <sup>a</sup>
Uruguay	O <sub>1</sub> Campos <sup>a</sup>	A <sub>24</sub> Cruzeiro <sup>a</sup>	C <sub>3</sub> Resende <sup>a</sup> C <sub>2</sub> Pando <sup>a</sup>
Venezuela	O <sub>1</sub> Campos <sup>b</sup> O <sub>1</sub> Campos	A <sub>32</sub> Venezuela/70 <sup>b</sup> A <sub>24</sub> Cruzeiro	

<sup>a</sup>Cepas usadas en el control. En Venezuela el control es realizado con las cepas O<sub>1</sub> Cura y A<sub>32</sub> Venezuela.

<sup>b</sup>Cepas usadas para producir la vacuna de virus vivo atenuado.

Los Cuadros 2, 4 y 6 muestran las relaciones serológicas obtenidas con las cepas de virus de la fiebre aftosa de los tipos O, A y C respectivamente. Además de los virus utilizados en la producción y control se incluyen cepas de campo de América del Sur y las europeas A<sub>5</sub> Westerwald, C<sub>1</sub> GC y C<sub>2</sub> 997.

Las filas ( $r_1$ ) indican la capacidad fijadora del complemento de cada uno de los sueros hiperinmunes frente a los distintos antígenos. Las hileras ( $r_2$ ) muestran la capacidad con que cada antígeno

es fijado por los diferentes sueros hiperinmunes.

Según esto, la amplitud del suero hiperinmune está determinada por los  $r_1$ . Por tanto, las cepas de virus que dieron origen a sueros hiperinmunes con valores de  $r_1$  más elevados son las que tienen mayor cobertura antigénica.

Los Cuadros 3, 5 y 7 muestran la media de los títulos de microneutralización de 5 sueros de bovinos sangrados 30 días después de vacunados (DPV), enfrentados a los virus tipo O, A y C respectivamente.

CUADRO 2. Relaciones serológicas de las cepas del virus de la fiebre aftosa del tipo O.

Cepas de virus ( $r_2$ )	Sueros hiperinmunes ( $r_1$ )					
	O <sub>1</sub> Camp.	O <sub>1</sub> Cas.	O <sub>1</sub> Urub.	O <sub>1</sub> Cura	O Mag.	O RS
O <sub>1</sub> Campos-Brasil/58	1,00	0,96	0,67	0,81	0,44	0,37
O <sub>1</sub> Caseros-Argentina/67	0,87	1,00	0,73	0,92	0,67	0,35
O <sub>1</sub> Urubamba-Perú/63	0,77	0,88	1,00	0,78	0,48	0,26
O <sub>1</sub> Cura-Venezuela/71	0,80	0,88	0,65	1,00	0,56	0,29
O <sub>1</sub> Magdalena-Colombia/78	0,51	0,45	0,54	0,37	1,00	0,28
O RS-Brasil/80	0,34	0,27	0,24	0,31	0,27	1,00

CUADRO 3. Títulos medios de seroneutralización para virus de la fiebre aftosa tipo O obtenidos con sueros de bovinos sangrados a los 30 días después de vacunados

Cepas de virus	Sueros de bovinos vacunados					
	O <sub>1</sub> Camp.	O <sub>1</sub> Cas.	O <sub>1</sub> Urub.	O <sub>1</sub> Cura	O Mag.	O RS
O <sub>1</sub> Campos-Brasil/58	2,50	2,60	2,46	2,25	1,65	≤ 1,35
O <sub>1</sub> Caseros-Argentina/67	3,12	3,15	3,00	2,76	1,89	1,86
O <sub>1</sub> Urubamba-Perú/63	2,85	3,18	3,34	2,67	2,01	1,92
O <sub>1</sub> Cura-Venezuela/71	2,63	2,73	2,64	2,42	1,80	≤ 1,35
O <sub>1</sub> Magdalena-Colombia/78	1,98	1,97	≤ 1,50	≤ 1,50	2,43	≤ 1,35
O RS-Brasil/80	≤ 1,44	≤ 1,47	≤ 1,35	1,63	≤ 1,41	3,12

CUADRO 4. Relaciones serológicas de las cepas de virus de fiebre aftosa del tipo A.

Cepas de virus (r <sub>2</sub> )	Sueros hiperinmunes (r <sub>1</sub> )									
	A <sub>5</sub> West.	A <sub>24</sub> Cruz.	A <sub>24</sub> Arg.	A <sub>27</sub> Cund.	A <sub>32</sub> Ven.	A Venc.	A Bagé	A Arg/79	A Br/79	A RS/81
A <sub>5</sub> Westerswald/47	1,00	0,51	0,53	0,54	0,23	0,24	0,26	0,60	0,55	0,07
A <sub>24</sub> Cruzeiro-Br/55	0,29	1,00	0,48	0,27	0,15	0,08	0,14	0,49	0,32	0,05
A <sub>24</sub> Argentina/68	0,46	0,61	1,00	0,45	0,27	0,24	0,32	0,76	0,61	0,14
A <sub>27</sub> Cundinamarca-Col/76	0,50	0,37	0,48	1,00	0,14	0,20	0,18	0,52	0,37	0,05
A <sub>32</sub> Venezuela/70	0,30	0,19	0,39	0,16	1,00	0,14	0,27	0,52	0,68	0,28
A Venceslau-Br/76	0,13	0,22	0,30	0,15	0,15	1,00	0,44	0,60	0,37	0,05
A Bagé-Br/76	0,18	0,28	0,40	0,25	0,23	0,37	1,00	0,92	0,61	0,06
A Argentina/79	0,12	0,21	0,28	0,16	0,15	0,30	0,51	1,00	0,95	0,06
A Brasil/79	0,16	0,24	0,30	0,18	0,23	0,44	0,58	0,93	1,00	0,05
A RS-Brasil/81	0,09	0,05	0,12	0,05	0,16	0,06	0,10	0,15	0,21	1,00

CUADRO 5. Títulos medios de seroneutralización para virus de la fiebre aftosa tipo A obtenidos con sueros de bovinos sangrados a los 30 días después de vacunados

Cepas de virus	Sueros de bovinos vacunados					
	A <sub>24</sub> Cruz.	A <sub>24</sub> Arg.	A Cund.	A Venc.	A Arg/79	A Br/79
A <sub>24</sub> Cruzeiro-Brasil/55	2,68	2,28	1,71	≤ 1,35	≤ 1,53	≤ 1,35
A <sub>24</sub> Argentina/68	2,42	2,97	2,07	≤ 1,43	1,83	≤ 1,50
A <sub>27</sub> Cundinamarca-Col/76	2,05	2,52	2,85	≤ 1,50	≤ 1,43	≤ 1,35
A Venceslau-Brasil/76	≤ 1,59	2,16	≤ 1,43	2,94	2,40	2,34
A Argentina/79	≤ 1,53	1,98	≤ 1,35	2,13	2,31	2,22
A Brasil/79	≤ 1,50	1,96	≤ 1,43	2,25	2,40	2,22

CUADRO 6. Relaciones serológicas de las cepas de virus de la fiebre aftosa del tipo C

Cepas de virus (r <sub>2</sub> )	Sueros hiperinmunes (r <sub>1</sub> )							
	C <sub>1</sub> GC	C <sub>2</sub> 997	C <sub>3</sub> Res.	C <sub>4</sub> TF	C <sub>5</sub> Arg.	C <sub>3</sub> Ind.	C <sub>2</sub> Pando	C Chaco
C <sub>1</sub> GC Holanda/62	1,00	0,42	0,28	0,20	0,44	0,32	0,47	0,79
C <sub>2</sub> 997 Gran Bretaña/53	0,80	1,00	0,38	0,37	0,30	0,47	0,97	0,76
C <sub>3</sub> Resende-Brasil/55	0,54	0,46	1,00	0,17	0,30	0,54	0,27	0,65
C <sub>4</sub> Tierra del Fuego-Arg/66	0,37	0,49	0,14	1,00	0,29	0,27	0,28	0,59
C <sub>5</sub> Argentina/69	0,42	0,34	0,30	0,34	1,00	0,40	0,17	0,63
C <sub>3</sub> Indaial-Brasil/71	0,67	0,49	0,44	0,25	0,29	1,00	0,38	0,85
C <sub>2</sub> Pando-Uruguay/44	0,64	0,74	0,16	0,29	0,21	0,42	1,00	0,72
C Chaco-Paraguay/74	0,63	0,45	0,31	0,41	0,49	0,44	0,46	1,00



CUADRO 7. *Títulos medios de seroneutralización para virus de la fiebre aftosa tipo C obtenidos con sueros de bovinos sangrados 30 días después de vacunados*

Cepas de virus	Sueros de bovinos vacunados			
	C <sub>3</sub> Res.	C <sub>3</sub> Ind.	C <sub>2</sub> Pando	C Chaco
C <sub>3</sub> Resende-Brasil/55	2,50	1,70	2,30	1,80
C <sub>3</sub> Indaial-Brasil/71	1,60	2,20	1,80	≤ 1,40
C <sub>2</sub> Pando-Uruguay/44	2,10	2,10	2,80	2,10
C Chaco-Paraguay/74	2,10	1,70	2,30	2,40

El Cuadro 8 muestra la protección alcanzada en bovinos revacunados a los 21 DPV con una vacuna O<sub>1</sub> Campos y comprobados a los 35 días después de la revacunación (DPR). Los valores de seroprotección para los virus O<sub>1</sub> Campos y O RS-Brasil/80 son la media de los sueros de los 32 bovinos usados en el estudio.

CUADRO 8. *Protección a la generalización podal e índices de seroprotección (ISP) en bovinos revacunados con O<sub>1</sub> Campos y comprobados con este virus y el O RS-Brasil/81*

Virus de comprobación	Nº bov. proteg/ usados	Media ISP
O <sub>1</sub> Campos-Brasil/58	16/16	3,84
O RS-Brasil/80	6/16	2,99

El Cuadro 9 indica la protección a la generalización podal en bovinos revacunados a los 30 DPV con una vacuna A Venceslau y comprobados a los 30 DPR. Los índices de seroprotección (ISP) para los virus A Venceslau y A RS-Brasil/81 representan la media de los valores de los sueros de los 18 bovinos utilizados.

El Cuadro 10 muestra los resultados de una prueba de dosis protectoras 50% realizada en bovinos (DPB<sub>50</sub>) a los 21 DPV. La comprobación fue hecha con las cepas A Argentina/68 y A Argentina/79.

CUADRO 9. *Protección a la generalización podal e índices de seroprotección (ISP) de bovinos revacunados con A Venceslau y comprobados con este virus y el A RS-Brasil/81*

Virus de comprobación	Nº bov. proteg/ usados	Media ISP
A Venceslau	9/9	4,75
A RS-Brasil/81	5/9	1,44

## DISCUSION

Las vacunas antiaftosas en América del Sur son habitualmente elaboradas con las cepas O<sub>1</sub> Campos, A<sub>24</sub> Cruzeiro y C<sub>3</sub> Resende, salvo algunas excepciones. El control de potencia es realizado casi siempre con los virus homólogos a los usados en la producción (Cuadro 1). Venezuela es el único país que utiliza vacunas de virus vivo modificado.

En las cepas del tipo O se observa que las muestras O<sub>1</sub> Campos, O<sub>1</sub> Caseros, O<sub>1</sub> Urubamba y O<sub>1</sub> Cura son antigénica (Cuadro 2) e inmunogénicamente (Cuadro 3) muy similares, proporcionando una buena cobertura entre sí. Los datos de esos cuadros también muestran que las cepas O Magdalena y O RS son diferentes de las anteriores. Sin embargo, inmunológicamente se observa que la revacunación con la cepa O<sub>1</sub> Campos proporciona una aceptable protección frente a la muestra O RS (Cuadro 8). El conjunto de los datos de fijación

CUADRO 10. Prueba cruzada de dosis protectora bovino 50% (DPB<sub>50</sub>) entre las cepas A Argentina/68 y A Argentina/79

Dilución de la vacuna	Vac. A <sub>24</sub> Argentina/68		Vac. A Argentina/79	
	Virus		Virus	
	A Arg/68	A Arg/79	A Arg/79	A Arg/68
1/1	5/5	4/5	5/5	4/5
1/3	5/5	1/5	5/5	2/5
1/9	4/5	1/5	1/5	0/5
DPB <sub>50</sub>	> 12,5	2,2	6,5	2,2
Relación inmunológica =	$\frac{2,2}{> 12,5}$	= < 0,18	$\frac{2,2}{6,5}$	= 0,34

La comprobación fue realizada a los 21 días después de la vacunación.

del complemento (Cuadro 2) y de seroneutralización (Cuadro 3) permite encuadrar la cepa O Magdalena dentro del subtipo O<sub>1</sub>.

Para los virus del tipo A se aprecia que las cepas identificadas entre 1976 y 1979 en Argentina, Brasil y Uruguay están antigénicamente muy relacionadas entre sí (Cuadro 4). Esta observación es confirmada por las pruebas de microneutralización realizadas con sueros de bovinos primovacunados (Cuadro 5). En esta prueba también se aprecia que las cepas estudiadas pueden separarse en dos grupos, uno integrado por el A<sub>24</sub> Cruzeiro, A<sub>24</sub> Argentina y A<sub>27</sub> Cundinamarca, y el otro estaría formado por el A Venceslau, A Argentina/79 y A Brasil/79. Estos datos sugieren que las vacunas deberían ser formuladas con una cepa del primer grupo y otra del segundo, con lo que se conseguiría una cobertura más amplia que la obtenida con una o dos cepas del mismo grupo.

Merece destacar la buena relación de la muestra A<sub>27</sub> Cundinamarca con el A<sub>5</sub> Westerwald. Además, esa relación es mayor con la cepa A<sub>27</sub> Colombia/67.

La muestra A RS-Brasil/81 identificada en 1981 en un brote de bovinos en Rio Grande do Sul (Brasil) es antigénicamente muy diferente de todas las incluidas en este estudio. Fue eliminada con vacunación estratégica y control de movimiento de animales. Las pruebas de inmunidad realizadas con bovinos revacunados con A Venceslau vuelven a

indicar la escasa protección de esa cepa para el virus de campo (Cuadro 9).

Los estudios de la cobertura inmunogénica de las cepas A<sub>24</sub> Argentina/68 y A Argentina/79 por la DPB<sub>50</sub> muestran que esta última cepa es dominante, ya que proporciona una relación inmunológica de 0,34, contra  $\leq 0,18$  del A<sub>24</sub> Argentina/68 (Cuadro 10).

Las cepas del tipo C son las que presentan menos diferencias antigénicas cuando son comparadas con los otros tipos (Cuadro 6). Los estudios de microneutralización del Cuadro 7 confirman lo expuesto anteriormente e indican que las cepas C<sub>2</sub> Pando y C<sub>3</sub> Resende son las de mayor cobertura antigénica.

El comportamiento de estos mismos virus en bovinos revacunados será analizado en un trabajo posterior.

## REFERENCIAS

1. ABARACON, D., GOMES, I. Respuesta inmunitaria en bovinos vacunados con vacunas antiaftosa inactivadas y producidas con 5 cepas del subtipo O<sub>1</sub>. (Immune response of cattle after vaccination with inactivated foot-and-mouth disease vaccine of 5 strains of subtype O<sub>1</sub>). *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa* 23-24: 3-10, 1976.
2. ALONSO FERNANDEZ, A., FEDERER, K.E., GOMES, I., VIEIRA, A., Comparación inmunológica y serológica de dos subtipos del virus aftoso tipo

- C Waldmann. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa* 4: 9-20, 1971.
3. CUNHA, R.G., BAPTISTA Jr., J.A., SERRÃO, U.M., TORTURELLA, I. El uso de los ratones lactantes en la evaluación de los anticuerpos contra el virus de la fiebre aftosa y su significación inmunológica. *Gac. vet. B.Aires*, 19 (110): 243-267, 1957.
  4. FEDERER, K.E., ALONSO FERNANDEZ, A. Développement d'un nouveau soustype du virus de la fièvre aphteuse par passages en séries sur bovins partiellement immuns. *Int. Symp. on FMD Variants and Immunity*, Lyon, 1967, Symp. Series Imm. Stand., 8: 65-72 (Karger, B./N.Y., 1968).
  5. FERREIRA, M.E.V. Prueba de microneutralización para estudio de anticuerpos de la fiebre aftosa. (Micro-titer neutralization test for the study of foot-and-mouth disease antibodies). *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa* 21-22: 17-20, 21-24, 1976.
  6. HYSLOP, N.St.G., FAGG, R.H. Isolation of variants during passage of strain of foot-and-mouth disease virus in partly immunized cattle. *J.Hyg., Camb.* 63: 357-368, 1965.
  7. PRINGLE, C.R. Genetic aspects of the thermal inactivation properties of foot-and-mouth disease virus strains. *Bull. Off. Int. Épizoot.* 61 (7-8): 619-628, 1964.
  8. Resolutions. *Int. Symp. on FMD Variants and Immunity*, Lyon 1967, Symp. Series Imm. Stand. 8: 169-170 (Karger, B./N.Y., 1968).

## FOOT-AND-MOUTH DISEASE VIRUSES USED IN VACCINE PRODUCTION AND CONTROL IN SOUTH AMERICA

A. Alonso Fernandez<sup>1</sup>; Y.L. Vianna Filho<sup>2</sup>; L.A.E. Durini<sup>3</sup>; P. Suttmöller<sup>1</sup>

### SUMMARY

The O, A and C viruses used in South America for foot-and-mouth disease vaccine production and control are examined. Strains that have recently shown some epidemiological significance in the field are also studied. With few exceptions, the control of vaccines is performed with the same samples utilized in the production.

All of the type O strains used for vaccine production in South America belong to the O<sub>1</sub> sub-type. The type A viruses examined by the serum neutralization test can be divided into two groups, one group comprising A<sub>24</sub> Cruzeiro, A<sub>24</sub> Argentina/68 and A<sub>27</sub> Cundinamarca, and the other group composed of A Venceslau, A Argentina/79 and A Brazil/79. All the C types studied are very similar with strains C<sub>2</sub> Pando and C<sub>3</sub> Resende having the higher antigenicity.

### INTRODUCTION

The foot-and-mouth disease (FMD) virus' great capacity for mutation (4, 6, 7) leads to the constant appearance of new field strains. The World Reference Laboratory (WRL) was therefore organized in 1958 in Pirbright, England, with the major goal of classifying FMD viruses. And in 1951, when the Organization of American States (OAS) founded the Pan American Foot-and-Mouth Disease Center (PAFMDC), one of the Center's

assigned tasks was to act as the diagnostic reference laboratory for the Americas. This activity was also acknowledged by the WRL, the United Nations Food and Agriculture Organization (FAO) and the International Bureau of Epizootics at its 28th General Meeting held in May, 1960.

Moreover because of the FMD virus variability, laboratories must produce vaccines from these varying strains. Thus, a vaccine that is suitable in one area may not be effective in another, due to the greater or lesser correlation between the strains active in the field and those used in vaccine production. It therefore becomes necessary to know the antigenic and immunogenic characteristics of the virus strains used in the formulation of the vaccines in the different countries, in order to determine which virus strain is most suitable for application in a given area.

This paper describes the antigenic and immunogenic characteristics of the virus strains utilized in the production and control of vaccines in South America. Strains that have been epidemiologically important in the region are also described.

### MATERIALS AND METHODS

#### Virus strains studied

*O<sub>1</sub> Campos—Brazil/58*: Virus isolated in 1958 in the state of Rio de Janeiro, Brazil, in unvaccinated cattle. This virus is the reference strain for the Americas. The majority of the type O viruses identified in South America have antigenic characteristics similar to this virus.

*O<sub>1</sub> Caseros—Argentina/67*: Strain isolated from an FMD outbreak in cattle vaccinated with O<sub>1</sub> Campos, from the province of Santa Fe, in Argentina, in 1967. Its antigenic behavior is similar to the preceding strain.

<sup>1</sup>Pan American Foot-and-Mouth Disease Center. (PAHO/WHO), Caixa Postal 589, 20000 Rio de Janeiro-RJ, Brazil.

<sup>2</sup>LARA/RS - Laboratorio Regional de Apoio Animal, Estrada da Ponta Grossa, 3036, 90000 Porto Alegre-RS, Brazil.

<sup>3</sup>SELAB - Servicio de Laboratorios, Chorroarín 134, Buenos Aires, Argentina.

*O<sub>1</sub> Urubamba-Peru/63*: Isolated in unvaccinated cattle in Peru, in 1963, this strain is similar to the two strains mentioned above.

*O<sub>1</sub> Cura-Venezuela/71*: Collected in Venezuela in 1971 from FMD-diseased cattle that had been systematically inoculated with *O<sub>1</sub> Campos* modified live virus vaccine.

*O<sub>1</sub> Magdalena-Colombia/78*: This virus was collected from an outbreak of FMD in vaccinated cattle. Strains with antigenic characteristics similar to this one have been identified in Colombia since 1964.

*O Rio Grande do Sul (RS)-Brazil/80*: This strain caused an epidemic among cattle in Rio Grande do Sul, Brazil, which persisted from October 1979 to February 1981 and reached a 3.5% morbidity rate. It has not been identified again in subsequent years.

*A<sub>5</sub> Westerwald/47*: Subtype representative of Europe.

*A<sub>24</sub> Cruzeiro-Brazil/55*: Isolated in 1955 in the state of São Paulo, Brazil, in unvaccinated cattle. The majority of the field strains in the countries of the Southern Cone had close relationship with *A<sub>24</sub>* up to 1976. At the present time, only strains from the pantanal lowlands in Brazil's state of Mato Grosso, Ecuador, Peru, Colombia and Venezuela retain the antigenic characteristics of *A<sub>24</sub>*.

*A<sub>24</sub> Argentina/68*: This strain was isolated in 1968 from vaccinated cattle in Argentina, where it predominated until 1976.

*A<sub>27</sub> Cundinamarca-Colombia/76*: Isolated from vaccinated cattle, this virus strain has been representative for the strains acting in Colombia since 1967. It is closely related to the *A<sub>5</sub>* subtype. This characteristic was greater in the *A<sub>27</sub>* Colombia/67 strain.

*A<sub>32</sub> Venezuela/70*: The predominant strain in Venezuela from 1969 to 1980.

*A Venceslau-Brazil/76*: Collected from cattle vaccinated with *A<sub>24</sub> Cruzeiro*, predominated in Brazil, except in Rio Grande do Sul, from 1976 to 1980.

*A Bage-Brazil/76*: Isolated from cattle vaccinated with *A<sub>24</sub> Cruzeiro* in Rio Grande do Sul in 1976. The majority of the viruses identified from 1967 to 1981 in the field in Rio Grande do Sul, Uru-

guay and Argentina exhibit antigenic characteristics similar to this strain.

*A Argentina/79*: This strain was isolated in 1979 from cattle vaccinated with *A<sub>24</sub> Argentina/68* in the province of Santa Fe. Its antigenic behavior is similar to that of *A Brazil/79* and it is also very similar to *A Bage*.

*A Brazil/79*: Identified in vaccinated cattle in Rio Grande do Sul in 1979, is closely related to *A Bage* and *A Argentina/79*. It has been the predominant strain in Brazil since 1980.

*A RS-Brazil/81*: This strain was isolated from an outbreak in vaccinated cattle in Rio Grande do Sul in 1981.

*C<sub>1</sub> GC*: Strain isolated in Holland during the 1962 epidemic.

*C<sub>2</sub> Pando-Uruguay/44*: Isolated in the department of Colonia in 1944, caused an epidemic outbreak in Rio Grande do Sul (Brazil), Uruguay, and Argentina from 1943 to 1945.

*C<sub>2</sub> 997*: Was responsible for the outbreaks in Great Britain in 1953 and 1965.

*C<sub>3</sub> Resende-Brazil/55*: Identified in unvaccinated cattle in the state of Rio de Janeiro in 1955, and is the representative subtype of the countries affected by type C virus in South America.

*C<sub>3</sub> Indaial-Brazil/71*: This virus was isolated from vaccinated cattle in 1971 in the state of Santa Catarina and is closely related to *C<sub>3</sub> Resende*.

*C<sub>4</sub> Tierra del Fuego-Argentina/66*: This virus caused an outbreak in 1966 in cattle in Tierra del Fuego.

*C<sub>5</sub> Argentina/69*: Predominated in Argentina from 1969 to 1974, the last year it was identified.

*C Chaco-Paraguay/74*: Isolated in the Chaco region of Paraguay in vaccinated cattle in 1974. This strain is closely related to all the type C strains studied in this experiment.

#### Serological relationships

The serological relationships were obtained by the methods described in (2) using the WRL-proposed standards (8); i.e., the hyperimmune sera were titrated against 2.5 50% complement fixing units (CFU<sub>50</sub>) of each of the antigens, using four hemolytic CFU<sub>50</sub> and incubation times of 30 minutes. The serological

relationships were calculated by dividing the reciprocal of the titer of each serum against the heterologous antigen by the homologous antigen.

$$\text{That is: Relationship } r = \frac{\text{reciprocal titer of hyper-immune sera against heterologous antigen}}{\text{reciprocal titer of hyper-immune sera against homologous antigen}}$$

The antigens to determine the serological relationships were the same suspensions of virulent virus used to prepare the vaccine and conduct the serum neutralization and mouse protection tests. The suspensions were obtained by passaging virus obtained from cattle two or three times in BHK<sub>21</sub> cells, clone 13, grown in roller bottles. For the C<sub>1</sub> GC and C<sub>2</sub> 997 strains, however, guinea pig virus was used because of the unavailability of virus passed in cattle.

The hyperimmune sera were produced in guinea pigs utilizing suspensions of virulent virus adapted to the species. Six weeks after infection, the guinea pigs were hyperimmunized by two foot-pad inoculations of 0.2 ml of a suspension of

virulent virus adapted to guinea pigs, a week apart. The suspension contained 0.1% of saponin. Seven days after the last hyperimmunization the guinea pigs were bled by cardiac puncture and the serum inactivated at 56° C for 30 minutes and stored at -20° C.

#### Serum neutralization

The test was conducted by the described microneutralization technique (5) using sera from cattle collected at 30 days post vaccination with a trivalent inactivated vaccine adjuvanted with aluminum hydroxide and saponin as described in (1).

#### Mouse protection

The test was performed in suckling mice with the cattle sera previously described using the technique indicated in (3).

## RESULTS

Table 1 shows the different FMD virus strains presently utilized for vaccine production in South America. The viruses used most are O<sub>1</sub> Campos, A<sub>24</sub> Cruzeiro, and C<sub>3</sub> Resende.

TABLE 1. Strains used in South America for FMD vaccine production

Countries	Strains		
	O	A	C
Argentina	O <sub>1</sub> Caseros <sup>a</sup> O <sub>1</sub> Campos	A <sub>24</sub> Argentina/68 A Argentina/79 <sup>a</sup>	C <sub>3</sub> Resende <sup>a</sup>
Brazil	O <sub>1</sub> Campos <sup>a</sup>	A Venceslau <sup>a</sup> A <sub>24</sub> Cruzeiro	C <sub>3</sub> Indaial <sup>a</sup>
Colombia	O <sub>1</sub> Magdalena <sup>a</sup>	A <sub>27</sub> Cundinamarca <sup>a</sup>	—
Ecuador	O <sub>1</sub> Urubamba <sup>a</sup>	A <sub>24</sub> Cruzeiro <sup>a</sup>	—
Paraguay	O <sub>1</sub> Campos <sup>a</sup>	A <sub>24</sub> Cruzeiro <sup>a</sup>	C <sub>3</sub> Resende <sup>a</sup>
Peru	O <sub>1</sub> Urubamba <sup>a</sup>	A <sub>24</sub> Cruzeiro <sup>a</sup>	C <sub>3</sub> Resende <sup>a</sup>
Uruguay	O <sub>1</sub> Campos <sup>a</sup>	A <sub>24</sub> Cruzeiro <sup>a</sup>	C <sub>3</sub> Resende C <sub>2</sub> Pando <sup>a</sup>
Venezuela	O <sub>1</sub> Campos <sup>b</sup> O <sub>1</sub> Campos	A <sub>32</sub> Venezuela/70 <sup>b</sup> A <sub>24</sub> Cruzeiro	

<sup>a</sup>Strains used for control. In Venezuela O<sub>1</sub> Cura and A<sub>32</sub> Venezuela strains are used for vaccine control.

<sup>b</sup>Strains used to produce attenuated live virus vaccine.

Tables 2, 4 and 6 show the serological relationships obtained with type O, A and C of the FMD virus strains, respectively. In addition to the viruses used in vaccine production, South American field strains and the European strains A<sub>5</sub> Westerwald, C<sub>1</sub> GC and C<sub>2</sub> 997 were used.

Columns ( $r_1$ ) indicate the complement fixing capacity of each one of the hyperimmune sera with the various antigens. Rows  $r_2$  show the capacity with which each antigen is fixed by the different hyperimmune sera.

Accordingly, the amplitude of the hyperimmune serum is determined by  $r_1$ . Hence, the virus strains that induced hyperimmune sera with higher  $r_1$  values are those that provide broader antigenic coverage.

Tables 3, 5 and 7 show the mean titers of the micro-neutralization of 5 sera from cattle taken at 30 days post vaccination (DPV), challenged with type O, A and C virus strains, respectively.

TABLE 2. Serological relationships of FMD virus type O strains

Virus strains ( $r_2$ )	Hyperimmune sera ( $r_1$ )					
	O <sub>1</sub> Camp.	O <sub>1</sub> Cas.	O <sub>1</sub> Urub.	O <sub>1</sub> Cura	O Mag.	O RS
O <sub>1</sub> Campos-Brazil/58	1.00	0.96	0.67	0.81	0.44	0.37
O <sub>1</sub> Caseros-Argentina/67	0.87	1.00	0.73	0.92	0.67	0.35
O <sub>1</sub> Urubamba-Peru/63	0.77	0.88	1.00	0.78	0.48	0.26
O <sub>1</sub> Cura-Venezuela/71	0.80	0.88	0.65	1.00	0.56	0.29
O <sub>1</sub> Magdalena-Colombia/78	0.51	0.45	0.54	0.37	1.00	0.28
O RS-Brazil/80	0.34	0.27	0.24	0.31	0.27	1.00

TABLE 3. Mean cross neutralization titers of FMD virus type O of sera from cattle bled 30 days after vaccination

Virus strains	Sera from vaccinated cattle					
	O <sub>1</sub> Camp.	O <sub>1</sub> Cas.	O <sub>1</sub> Urub.	O <sub>1</sub> Cura	O Mag.	O RS
O <sub>1</sub> Campos-Brazil/58	2.50	2.60	2.46	2.25	1.65	≤ 1.35
O <sub>1</sub> Caseros-Argentina/67	3.12	3.15	3.00	2.76	1.89	1.86
O <sub>1</sub> Urubamba-Peru/63	2.85	3.18	3.34	2.67	2.01	1.92
O <sub>1</sub> Cura-Venezuela/71	2.63	2.73	2.64	2.42	1.80	≤ 1.35
O <sub>1</sub> Magdalena-Colombia/78	1.98	1.97	≤ 1.50	≤ 1.50	2.43	≤ 1.35
O RS-Brazil/80	≤ 1.44	≤ 1.47	≤ 1.35	1.63	≤ 1.41	3.12

TABLE 4. Serological relationships of FMD virus type A strains

Virus strains ( $r_2$ )	Hyperimmune sera ( $r_1$ )									
	A <sub>5</sub> West.	A <sub>24</sub> Cruz.	A <sub>24</sub> Arg.	A <sub>27</sub> Cund.	A <sub>32</sub> Ven.	A Venc.	A Bage	A Arg/79	A Br/79	A RS/81
A <sub>5</sub> Westerswald/47	1.00	0.51	0.53	0.54	0.23	0.24	0.26	0.60	0.55	0.07
A <sub>24</sub> Cruzeiro-Br/55	0.29	1.00	0.48	0.27	0.15	0.08	0.14	0.49	0.32	0.05
A <sub>24</sub> Argentina/68	0.46	0.61	1.00	0.45	0.27	0.24	0.32	0.76	0.61	0.14
A <sub>27</sub> Cundinamarca-Col/76	0.50	0.37	0.48	1.00	0.14	0.20	0.18	0.52	0.37	0.05
A <sub>32</sub> Venezuela/70	0.30	0.19	0.39	0.16	1.00	0.14	0.27	0.52	0.68	0.28
A Venceslau-Br/76	0.13	0.22	0.30	0.15	0.15	1.00	0.44	0.60	0.37	0.05
A Bage-Br/76	0.18	0.28	0.40	0.25	0.23	0.37	1.00	0.92	0.61	0.06
A Argentina/79	0.12	0.21	0.28	0.16	0.15	0.30	0.51	1.00	0.95	0.06
A Brazil/79	0.16	0.24	0.30	0.18	0.23	0.44	0.58	0.93	1.00	0.05
A RS-Brazil/81	0.09	0.05	0.12	0.05	0.16	0.06	0.10	0.15	0.21	1.00

TABLE 5. Mean cross neutralization titers of FMD virus type A or sera from cattle bled 30 days after vaccination

Virus strains	Sera from vaccinated cattle					
	A <sub>24</sub> Cruz.	A <sub>24</sub> Arg.	A Cund.	A Venc.	A Arg/79	A Br/79
A <sub>24</sub> Cruzeiro-Brazil/55	2.68	2.28	1.71	< 1.35	≤ 1.53	≤ 1.35
A <sub>24</sub> Argentina/68	2.42	2.97	2.07	< 1.43	1.83	≤ 1.50
A <sub>27</sub> Cundinamarca-Col/76	2.05	2.52	2.85	< 1.50	≤ 1.43	≤ 1.35
A Venceslau-Brazil/76	< 1.59	2.16	< 1.43	2.94	2.40	2.34
A Argentina/79	< 1.53	1.98	< 1.35	2.13	2.31	2.22
A Brazil/79	< 1.50	1.96	< 1.43	2.25	2.40	2.22

TABLE 6. Serological relationships of FMD virus type C

Virus strains ( $r_2$ )	Hyperimmune sera ( $r_1$ )							
	C <sub>1</sub> GC	C <sub>2</sub> 997	C <sub>3</sub> Res.	C <sub>4</sub> TF	C <sub>5</sub> Arg.	C <sub>3</sub> Ind.	C <sub>2</sub> Pando	C Chaco
C <sub>1</sub> GC Holland/62	1.00	0.42	0.28	0.20	0.44	0.32	0.47	0.79
C <sub>2</sub> 997 Great Britain/53	0.80	1.00	0.38	0.37	0.30	0.47	0.97	0.76
C <sub>3</sub> Resende-Brazil/55	0.54	0.46	1.00	0.17	0.30	0.54	0.27	0.65
C <sub>4</sub> Tierra del Fuego-Arg/66	0.37	0.49	0.14	1.00	0.29	0.27	0.28	0.59
C <sub>5</sub> Argentina/69	0.42	0.34	0.30	0.34	1.00	0.40	0.17	0.63
C <sub>3</sub> Indaial-Brazil/71	0.67	0.49	0.44	0.25	0.29	1.00	0.38	0.85
C <sub>2</sub> Pando-Uruguay/44	0.64	0.74	0.16	0.29	0.21	0.42	1.00	0.72
C Chaco-Paraguay/74	0.63	0.45	0.31	0.41	0.49	0.44	0.46	1.00



TABLE 7. Mean cross neutralization titers of FMD virus type C of sera from cattle bled 30 days after vaccination

Virus strains	Sera from vaccinated cattle			
	C <sub>3</sub> Res.	C <sub>3</sub> Ind.	C <sub>2</sub> Pando	C Chaco
C <sub>3</sub> Resende-Brazil/55	2.50	1.70	2.30	1.80
C <sub>3</sub> Indaial-Brazil/71	1.60	2.20	1.80	≤ 1.40
C <sub>2</sub> Pando-Uruguay/44	2.10	2.10	2.80	2.10
C Chaco-Paraguay/74	2.10	1.70	2.30	2.40

Table 8 shows the protection reached in cattle revaccinated 21 DPV with O<sub>1</sub> Campos and challenged 35 days after the revaccination (DPR). The serum protection values for the O<sub>1</sub> Campos and the O RS-Brazil/80 viruses are the mean of the sera from the 32 cattle used in the study.

TABLE 8. Protection against foot lesions and mouse protection indexes (MPI) in cattle revaccinated with O<sub>1</sub> Campos and challenged with same virus and O RS-Brazil/81

Challenge virus	No. of cattle protected/used	Mean MPI
O <sub>1</sub> Campos-Brazil/58	16/16	3.84
O RS-Brazil/80	6/16	2.99

Table 9 indicates the protection against development of foot lesions in cattle revaccinated 30 DPV with A Venceslau vaccine and challenged 30 DPR. The mouse protection indexes (MPI) for the A Venceslau and A RS-Brazil/81 viruses represent the mean of the value of the sera from the 18 cattle utilized.

Table 10 summarizes the results of a PBD<sub>50</sub> protection test in cattle at 21 DPV. The challenge was done with A Argentina/68 and A Argentina/79 strains.

TABLE 9. Protection against foot lesions and mouse protection indexes (MPI) in cattle revaccinated with A Venceslau and challenged with same virus and A RS-Brazil/81

Challenge virus	No. of cattle protected/used	Mean MPI
A Venceslau	9/9	4.75
A RS-Brazil/81	5/9	1.44

## DISCUSSION

With few exceptions, the FMD vaccines in South America are customarily prepared with the O<sub>1</sub> Campos, A<sub>24</sub> Cruzeiro and C<sub>3</sub> Resende strains. The potency control is almost always done with viruses homologous to those used in the production (Table 1). Venezuela is the only country that uses modified live-virus vaccines.

Among the O strains, it has been observed that the O<sub>1</sub> Campos, O<sub>1</sub> Caseros, O<sub>1</sub> Urubamba and O<sub>1</sub> Cura are antigenically (Table 2) and immunogenically (Table 3) closely related and provide good cross protection. The data shown in these Tables also indicate that the O Magdalena and O RS strains differ from the foregoing O strains. Immunologically, however, it is observed that revaccination with the O<sub>1</sub> Campos strain affords acceptable protection against the O RS sample (Table 8). The complement fixation

TABLE 10. Cross protection test of 50% protective bovine dose ( $PBD_{50}$ ) between A Argentina/68 and A Argentina/79 strains

Vaccine dilution	Vac. A <sub>24</sub> Argentina/68		Vac. A Argentina/79		
	Virus		Virus		
	A Arg/68	A Arg/79	A Arg/79	A Arg/68	
1/1	5/5	4/5	5/5	4/5	
1/3	5/5	1/5	5/5	2/5	
1/9	4/5	1/5	1/5	0/5	
$PBD_{50}$	$\geq 12.5$	2.2	6.5	2.2	
Immunological relationship =	$\frac{2.2}{\geq 12.5}$	=	$\frac{2.2}{6.5}$	=	0.34

Challenge was done 21 days after vaccination.

data (Table 2) and the serum neutralization data (Table 3) jointly enable the O Magdalena strain to be fitted into the pattern of subtype O<sub>1</sub>.

The A strains identified from 1976 to 1979 in Argentina, Brazil and Uruguay are seen to be closely related antigenically (Table 4). This observation is confirmed by microneutralization tests performed with sera from cattle vaccinated for the first time (Table 5). This test also shows that the strains studied can be divided into two groups, one comprising A<sub>24</sub> Cruzeiro, A<sub>24</sub> Argentina and A<sub>27</sub> Cundinamarca, and the second composed of A Venceslau, A Argentina/79 and A Brazil/79. These data suggest that the vaccines should be formulated with a strain from the first group and another from the second group, thus providing wider coverage than what is obtained with one or two strains from the same group.

It is important to note that A<sub>27</sub> Cundinamarca is closely related to A<sub>5</sub> Westerwald, and has an even stronger relationship with A<sub>27</sub> Colombia/67.

The A RS—Brazil/81 strain identified during an outbreak among cattle in Rio Grande do Sul (Brazil) in 1981 is serologically quite different from all the strains discussed in this study. It was eliminated by means of strategic vaccination and control of animal movement. The im-

munity tests conducted with cattle revaccinated with A Venceslau again indicate this strain's poor protection against field virus (Table 9).

Studies of the immunogenic coverage of the A<sub>24</sub> Argentina/68 and A Argentina/79 strains with  $PBD_{50}$  show that the latter strain is dominant, since it provides an immunological relationship of 0.34 in comparison to  $\leq 0.18$  for A<sub>24</sub> Argentina/68 (Table 10).

The type C strains exhibit the least antigenic differences when compared with the other types (Table 6). The microneutralization studies in Table 7 confirm the foregoing and likewise indicate that the C<sub>2</sub> Pando and C<sub>3</sub> Resende strains provide the widest antigenic coverage.

A subsequent study will assess the behavior of these virus strains in revaccinated cattle.

## REFERENCES

1. ABARACON, D., GOMES, I. Respuesta inmunitaria en bovinos vacunados con vacunas antiaftosa inactivadas y producidas con 5 cepas del subtipo O<sub>1</sub>. (Immune response of cattle after vaccination with inactivated foot-and-mouth disease vaccine of 5 strains of subtype O<sub>1</sub>). *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa* 23-24: 3-10, 1976.
2. ALONSO FERNANDEZ, A., FEDERER, K.E., GOMES, I., VIEIRA, A., Comparación inmunológica y serológica de dos subtipos del virus aftoso tipo

- C Waldmann. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa* 4: 9-20, 1971.
3. CUNHA, R.G., BAPTISTA Jr., J.A., SERRÃO, U.M., TORTURELLA, I. El uso de los ratones lactantes en la evaluación de los anticuerpos contra el virus de la fiebre aftosa y su significación inmunológica. *Gac. vet. B.Aires*, 19 (110): 243-267, 1957.
  4. FEDERER, K.E., ALONSO FERNANDEZ, A. Développement d'un nouveau soustype du virus de la fièvre aphteuse par passages en séries sur bovins partiellement immuns. *Int. Symp. on FMD Variants and Immunity*, Lyon, 1967, Symp. Series Imm. Stand., 8: 65-72 (Karger, B./N.Y., 1968).
  5. FERREIRA, M.E.V. Prueba de microneutralización para estudio de anticuerpos de la fiebre aftosa. (Micro-titer neutralization test for the study of foot-and-mouth disease antibodies). *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa* 21-22: 17-20, 21-24, 1976.
  6. HYSLOP, N.St.G., FAGG, R.H. Isolation of variants during passage of strain of foot-and-mouth disease virus in partly immunized cattle. *J.Hyg., Camb.* 63: 357-368, 1965.
  7. PRINGLE, C.R. Genetic aspects of the thermal inactivation properties of foot-and-mouth disease virus strains. *Bull. Off. Int. Épizoot.* 61 (7-8): 619-628, 1964.
  8. Resolutions. *Int. Symp. on FMD Variants and Immunity*, Lyon 1967, Symp. Series Imm. Stand. 8: 169-170 (Karger, B./N.Y., 1968).

## EL PROBLEMA DE LA VALIDEZ DE UNA PRUEBA DIAGNOSTICA PARA USO MASIVO COMO PROCEDIMIENTO ESTADISTICO DE CLASIFICACION

Vicente M. Astudillo<sup>1</sup> & Isabel N. Kantor<sup>2</sup>

### RESUMEN

Se evalúa la efectividad de una prueba diagnóstica indirecta de uso masivo en procedimientos discriminantes a través de las probabilidades condicionales haciendo aplicación del teorema de Bayes. Se presentan ejemplos de estimaciones de los errores de diagnóstico y de la verdadera tasa de prevalencia.

Para estudios en poblaciones donde la presencia de animales positivos puede ser considerada un evento raro, se presenta la relación que existe entre el tamaño de la muestra y la probabilidad de fallar en detectar positivos.

### INTRODUCCION

Siempre que se utiliza una prueba indirecta para clasificar individuos de una población, en categorías de positivos y negativos con respecto a una enfermedad, es necesario evaluar la validez de la prueba. Es decir, saber si la prueba "mide" lo que se propone "medir". Por ejemplo, ¿la prueba de tuberculina en bovinos evalúa realmente la presencia o ausencia de tuberculosis? La respuesta a esta pregunta no es del tipo sí/no, sino que es dada en una escala proporcional o porcentual que indica su grado de validez.

Dos parámetros son utilizados para estudiar específicamente la validez de una prueba indirecta de clasificación diagnóstica aplicada a poblaciones: la sensibilidad y la especificidad. Estas pruebas casi nunca identifican exactamente todos los verdaderos positivos y negativos. Por ejemplo, la prueba de tuberculina produce positivos como

un resultado a la exposición al *Mycobacterium*. Ya que se toma el ejemplo de la tuberculosis conviene aclarar que, como respuesta inmunitaria, la reacción positiva del ganado bovino a la tuberculina PPD bovina es manifestación de una exposición anterior del animal al *Mycobacterium bovis* y, por tanto, significa infección y no necesariamente enfermedad. Aunque por la patogenicidad de este germen y la susceptibilidad de los bovinos a él, la infección va seguida por lesiones propias de la enfermedad en un plazo no muy largo. En otras ocasiones puede haber reacciones tuberculínicas positivas por infecciones debidas a otras micobacterias diferentes del *M. bovis*, por la existencia de antígenos comunes, que no van seguidas necesariamente de enfermedad en el bovino. Prácticamente esas reacciones para-específicas son las que adquieren mayor importancia relativa en las etapas de prevalencia muy baja de tuberculosis en bovinos (falsos positivos). En cambio, el error de diagnóstico opuesto, falsos negativos, puede ocurrir en los bovinos en las primeras fases de la infección (período pre-alérgico), durante otras infecciones intercurrentes (virosis), o en animales en estado caquéctico.

Los resultados falsos, llamados errores de clasificación, señalan el nivel de falibilidad de la prueba indirecta y además producen tanto dificultades en la estimación de la prevalencia de la tuberculosis, como en la toma de decisiones para la aplicación de medidas sanitarias tendientes a la erradicación de la enfermedad.

### EVALUACION DE LA VALIDEZ DE LA PRUEBA INDIRECTA

El desempeño de la prueba indirecta (tuberculización en este ejemplo) se puede evaluar a través de la sensibilidad y especificidad. En la práctica esto se puede hacer mediante un estudio de los datos de los animales de una región o país

<sup>1</sup>Centro Panamericano de Fiebre Aftosa, (OPS/OMS), Caixa Postal 589, 20000 Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

<sup>2</sup>Centro Panamericano de Zoonosis, (OPS/OMS), Casilla 3092 - Correo Central, 1000 Buenos Aires, Argentina.

dado (R), donde existe un programa de control de la tuberculosis bovina. Para ello es necesario contar con la siguiente información: i) resultados de pruebas de tuberculinización para un cierto período (I), y ii) resultados de las inspecciones macroscópicas post-mortem en mataderos, exámenes histopatológicos y/o de pruebas de aislamiento en cultivos en el laboratorio (D).

En el pasado, en la región R hubo animales positivos a la prueba de tuberculina que fueron sacrificados en mataderos sanitarios, se inspeccionaron, se obtuvieron muestras y se analizaron en el laboratorio para aislar el agente. Por otro lado, animales que siempre fueron negativos a la prueba de tuberculina, en la región R, al llegar a cierta edad son descartados y enviados a matadero. Tales datos pueden servir ya que hay registro individual en el matadero con identificación del origen. Estos datos retrospectivos de la población-objeto de la región R permiten confeccionar la distribución de frecuencias (5) presentada en el Cuadro 1 y en la Figura 1.

La validez de una prueba diagnóstica debe reflejar su capacidad de proporcionar resultados verdaderos de aquello que se está evaluando. Para medir la validez de una prueba es necesario estimar su sensibilidad y su especificidad.

En el ejemplo de tuberculosis bovina que se ha dado, la sensibilidad (U) sería la capacidad de la prueba tuberculínica de indentificar como positivo a todo animal del rebaño que verdaderamente está infectado por *M. bovis*. Igualmente, la especificidad (V) sería la capacidad de la prueba tuberculí-

nica de identificar como negativo a todo bovino del rebaño que realmente no está infectado por *M. bovis*. Por las características de la especificidad, ella puede ser evaluada en áreas con rebaños libres de tuberculosis bovina.

CUADRO 1. Clasificación cruzada de las pruebas directas e indirectas. Denominación de las frecuencias celulares y marginales

Situación prueba indirecta	Situación real (directa)		
	D+	D-	Total
I+	a	b	(a+b)
I-	c	d	(c+d)
Total	(a+c)	(b+d)	(n)

donde:

- a = Número de animales considerados positivos por la prueba tuberculínica y que se hallan infectados, son los verdaderos positivos.
- b = Número de animales igualmente encontrados positivos a la prueba tuberculínica, en los que no se puede demostrar la infección por inspección post-mortem y cultivo de órganos. Se los denomina falsos positivos.
- c = Número de animales considerados negativos por la prueba tuberculínica, y que se hallan infectados. Se les denomina falsos negativos.
- d = Número de animales considerados negativos por la prueba tuberculínica, en los que no se puede demostrar infección, son los verdaderos negativos.
- a+c = Número total de animales infectados.
- b+d = Número total de animales no infectados.
- n = Número total de animales.

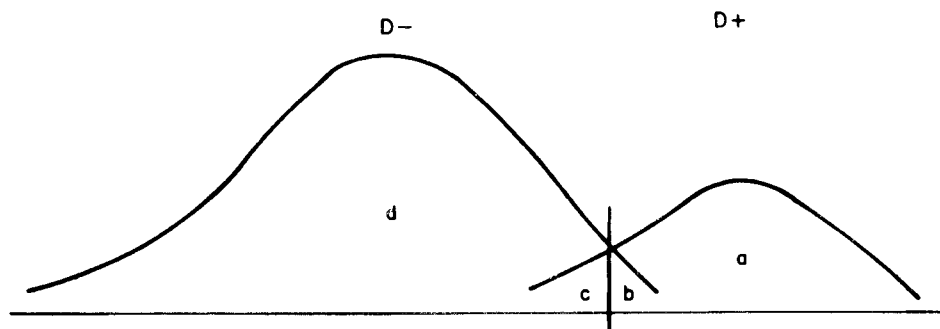


FIGURA 1. Distribuciones de frecuencias superpuestas de positivos y negativos. Zona de incertidumbre: errores de clasificación a través de prueba indirecta.

A partir de los datos del Cuadro 1 es posible estimar estos valores característicos:

$$U = a/(a+c)$$

$$V = d/(b+d)$$

La prueba tuberculínica simple en la tabla del cuello, utilizando tuberculina PPD bovina de gran potencia, llega a tener una sensibilidad óptima de 91% y una especificidad de 89% (3).

Al utilizar estos indicadores de validez es conveniente tener en cuenta que en regiones donde el porcentaje de infección por *M. bovis* es relativamente alto, puede haber animales con infección reciente, en que la prueba de tuberculina es positiva. Sin embargo, las pruebas directas pueden fallar en la confirmación, puesto que existe la posibilidad de que aún no se haya presentado lesión macroscópica. Por tal razón, la muestra de ganglios y órganos para cultivo puede no llegar a incluir tejido donde la primoinfección esté presente. En ese caso, la lesión aún sería sólo microscópica. En esa situación, la prueba directa, de confirmación de la validez de la prueba indirecta, está expuesta a no proporcionar seguridad total sobre la presencia de infección tuberculosa (4).

#### PROBABILIDAD QUE UN BOVINO POSITIVO A LA TUBERCULINA ESTE REALMENTE INFECTADO

A manera de ejemplo supóngase que en una región dada el servicio veterinario está sometiendo a prueba periódicamente una masa de 100.000 bovinos lecheros y se desea saber cuál es la proporción (P) de animales que siendo positivos a la prueba (I+) son realmente infectados (D+) con *M. bovis*, esto es

$$P^* (D+/I+)$$

o sea, se está preocupando con la eficacia diagnóstica de la prueba de tuberculina. Siguiendo con el ejemplo dado (Cuadro 2), y aplicando el teorema de Bayes (2):

$$P(D+/I+) = \frac{P(D+) P(I+/D+)}{P(D+) P(I+/D+) + P(D-) P(I+/D-)}$$

se puede evaluar la eficacia diagnóstica de la prueba de tuberculina, que para dicho ejemplo sería de

\* P = Probabilidad

$$P(D+/I+) = \frac{(0,01) (0,95)}{(0,01) (0,95) + (0,99) (0,1)} = 0,08756$$

CUADRO 2. Distribución de frecuencias para prevalencia de 1%, sensibilidad de 95% y especificidad de 90%

Situación prueba	Situación real (directa)		
	D+	D-	Total
I+	950	9.900	10.850
I-	50	89.100	89.150
Total	1.000	99.000	100.000

Resulta así que sólo el 8,8% de los positivos a la prueba, en este ejemplo, sería realmente ganado infectado de tuberculosis. No fue utilizada directamente la razón  $950/10.850 = 0,088$  porque, por regla general, no se conoce la cantidad de animales en la célula "a" del Cuadro 1, que es 950 de acuerdo con los datos del ejemplo. Debido a esto hay que utilizar los datos marginales para estimar la eficacia diagnóstica de una prueba indirecta como es la tuberculina (5).

Siendo la prevalencia de infección de 1% y el tamaño de la población de  $n = 100.000$  bovinos, entonces el número de animales positivos o infectados es de 1.000, que corresponde en el Cuadro 2 al total de la primera columna (a+c), o sea el total de verdaderamente positivos [(a+c) = 1%(n)]. Dado que la sensibilidad de la prueba indirecta es de 95%, a través de ella será posible detectar 950 animales de los 1.000 infectados [a = 95% (a+c)].

Este valor 950 corresponde en el Cuadro 2 a la célula "a" de animales realmente positivos detectados también por la prueba diagnóstica indirecta. La diferencia  $1.000 - 950 = 50$  constituye la célula "c" que corresponde a animales realmente positivos no detectados por la prueba indirecta [c = {(a+c) - a}]. Esta cantidad representa los falsos negativos. La segunda columna del Cuadro 2 corresponde a los realmente negativos, cuyo total (b+d) se obtiene por diferencia entre el tamaño de la población (n) y la cantidad total de individuos positivos (a+c), o sea [n - (a+c) = (b+d)]. La cantidad (b+d) es igual a  $100.000 - 1.000 = 99.000$  bovinos negativos.

Puesto que la especificidad de la prueba diagnóstica indirecta es de 90%, mediante ella es posible detectar 89.100 animales de los 99.000 negativos [ $d = 90\% (b+d)$ ]. Esa cantidad corresponde a la célula "d" del Cuadro 2, que representa los bovinos realmente negativos, identificados también como tales por la prueba indirecta. La diferencia  $99.000 - 89.100 = 9.900$  constituye la célula "b", que corresponde a los animales realmente negativos no identificados como tales por la prueba indirecta [ $b = \{(b+d) - d\}$ ]. Esta cantidad representa los falsos positivos.

El total de animales de la primera fila (a+b) corresponde al total de infectados, clasificados como tales por la prueba diagnóstica indirecta, al paso que el total de la segunda fila (c+d) representa el total de no infectados clasificados en esa categoría por la prueba diagnóstica indirecta. En estos últimos dos totales hay una cierta magnitud de errores de clasificación, porque el primer total (a+b) incluye falsos positivos y el segundo (c+d) total incluye falsos negativos.

#### VALOR PREDICTIVO DE LA PRUEBA DIAGNOSTICA

Para estudiar todos los elementos que pueden afectar los resultados de la aplicación de una prueba diagnóstica masiva es conveniente que se consideren algunas situaciones en que la sensibilidad y especificidad de una prueba se mantienen constantes, haciendo variar la prevalencia de infección. Supóngase que se aplica un test diagnóstico indirecto, como la prueba tuberculínica a tres poblaciones de 100.000 bovinos cada una.

La sensibilidad y la especificidad se toman como 91% y 89% respectivamente. La primera población tiene una prevalencia de 1%, la segunda de 10% y la tercera de 20%. Los resultados se muestran en los Cuadros 3, 4 y 5.

Existen dos indicadores de la capacidad predictiva de un test indirecto (6), el valor predictivo positivo (G) y el valor predictivo negativo (H), cuyas expresiones se elaboran a partir de las frecuencias del Cuadro 1.:

$$G = a/(a+b)$$

$$H = d/(c+d)$$

Para los datos del Cuadro 3 los indicadores alcanzan los siguientes valores:

$$G = \frac{910}{11.800} \times 100 = 7,8\%$$

$$H = \frac{88.110}{88.200} \times 100 = 99,9\%$$

CUADRO 3. Población bovina con prevalencia de 1%, sensibilidad 91% y especificidad 89%

	D+	D-	Total
I+	910	10.890	11.800
I-	90	88.110	88.200
Total	1.000	99.000	100.000

Para los datos del Cuadro 4 los indicadores de capacidad predictiva de la prueba tuberculínica alcanzan los siguientes valores:

$$G = \frac{9.100}{19.000} \times 100 = 47,9\%$$

$$H = \frac{80.100}{81.000} \times 100 = 98,9\%$$

CUADRO 4. Población bovina con prevalencia de 10%, sensibilidad 91% y especificidad 89%

	D+	D-	Total
I+	9.100	9.900	19.000
I-	900	80.100	81.000
Total	10.000	90.000	100.000

Como se puede observar, el cambio de prevalencia de +9 puntos porcentuales produjo una modificación de la capacidad predictiva positiva de +40 puntos porcentuales y -1 punto porcentual en la capacidad predictiva negativa. Este último aspecto prácticamente no se modificó cuando es comparado con el incremento experimentado por la capacidad predictiva positiva.

Para los datos del Cuadro 5 los indicadores presentan los siguientes valores:

$$G = \frac{18.200}{27.000} \times 100 = 67,4\%$$

$$H = \frac{71.200}{73.000} \times 100 = 97,5\%$$

CUADRO 5. Población bovina con prevalencia de 20%, sensibilidad 91% y especificidad 89%

	D+	D-	Total
I+	18.200	8.800	27.000
I-	1.800	71.200	73.000
Total	20.000	80.000	100.000

Nuevamente se observa que cuando ocurre un aumento marcado en la prevalencia, se produce también un incremento notable de la capacidad predictiva positiva (prácticamente 20 puntos porcentuales con relación a la situación cuando la prevalencia era 10%). Sin embargo, el crecimiento experimentado por este indicador no tuvo la magnitud del observado cuando la prevalencia pasó de 1% a 10%. Por otro lado, también nuevamente H disminuyó levemente, pero la magnitud de cambio fue en este caso algo mayor que cuando la prevalencia pasó de 1% a 10%.

Estos ejemplos permiten concluir que cuando se utiliza una prueba diagnóstica indirecta, su capacidad predictiva positiva es disminuida si la población bovina tiene un nivel de infección muy bajo.

De acuerdo con Ranney (4), la aplicación de estos resultados a un programa de control y erradicación de la tuberculosis bovina indicaría que en situaciones de baja prevalencia, ya sea por la propia historia natural de la enfermedad o por efecto de acciones de control, el empleo de la prueba tuberculínica como único método de detección de infección no es aconsejable. En estos casos debe haber una actividad de detección dinámica haciendo uso de procedimientos que permitan un rastreo desde el matadero (hallazgo de lesiones) hasta el rebaño, donde hay actividad del agente. Identificados los rebaños problemas, la prueba tuberculínica puede ser aplicada cada 6 meses hasta la limpieza del rebaño.

En situaciones epidemiológicas en las que la prevalencia es muy alta, el valor predictivo positivo de la prueba tuberculínica es también muy alto, de ahí que el método de prueba tuberculínica y eliminación de reactores positivos puede dar buenos resultados.

#### ESTIMACION DE LA PREVALENCIA REAL DE UNA ENFERMEDAD COMO LA TUBERCULOSIS A PARTIR DE LOS RESULTADOS DE LA PRUEBA INDIRECTA DE LA TUBERCULINA

En el Cuadro 6 aparece una posible situación de la tuberculosis en una región.

CUADRO 6. Rebaño bovino con prevalencia 1/1000, sensibilidad 91% y especificidad 89%

Situación prueba indirecta	Situación real (directa)		
	D+	D-	Total
I+	91	10.989	11.080
I-	9	88.911	88.920
Total	100	99.900	100.000

En este caso la prevalencia aparente (PAP) es:  $11.080/100.000 = 0,11080$ , es decir, un 11% aproximadamente. Sin embargo, de los 11.080 positivos a la prueba indirecta, 10.989 son falsos positivos. Este resultado debería ser interpretado con cuidado considerando las implicaciones económicas ocasionadas por el envío al matadero (sacrificados) de reactores positivos a la prueba indirecta, como es en el caso de la tuberculosis (5). El conocimiento que se tenga de los indicadores de sensibilidad y especificidad de la prueba ayuda a resolver este problema. De esta manera se puede llegar a conocer la verdadera tasa de prevalencia (VEP):

$$VEP = \frac{PAP + V - 1}{V + U - 1} = \frac{0,00080}{0,80000} = 0,001$$

Al observar los datos se confirma que la verdadera prevalencia es 1 por 1.000.

#### PROBABILIDAD DE FALLAR EN DETECTAR ANIMALES INFECTADOS, UTILIZANDO UNA PRUEBA INDIRECTA, COMO LA TUBERCULINA

Se desea llevar adelante una serie de diagnósticos para detectar la tuberculosis en un rebaño de animales con una prueba indirecta con sensibilidad y especificidad conocidas. Se quiere conocer la probabilidad de fallar en detectar animales



infectados por el *M. bovis*, es decir, se quiere conocer la probabilidad de obtener falsos negativos. Las variables que participan en este problema son:

U, V y VEP

Despejando la fórmula de la sección anterior se tiene:

$$VEP (V + U - 1) - V + 1 = PAP$$

cuya aplicación en el ejemplo dado últimamente es:

$$PAP = 0,001 (0,89 + 0,91 - 1) - 0,89 + 1 = 0,11080$$

$$PAP = p = 0,11080$$

$$(1 - PAP) = q = 1 - p = 1 - 0,11080 = 0,88920$$

En estas condiciones es posible aplicar la ecuación de la distribución geométrica para evaluar la probabilidad de fallar en la detección de positivos con la prueba indirecta, a la probabilidad de obtención de falsos negativos (7).

$$\left\{ \begin{array}{l} \text{Probabilidad fallar} \\ \text{detectar positivos} \end{array} \right\} = Pr(\text{Fallar} +) = \alpha$$

$$= P(\text{Fallar} +) = (1-p)^n = q^n = \alpha$$

$$\alpha = q^n$$

$$\log \alpha = n \log q \quad \text{donde } n = \frac{\log \alpha}{\log q}$$

Este es el número de individuos necesarios o tamaño mínimo de la muestra para tener una probabilidad igual o menor que " $\alpha$ " de fallar en la detección de positivos con la prueba indirecta, es decir, la probabilidad de obtener falsos negativos. Esta ecuación es aplicable cuando se desea hacer un estudio para detectar la presencia de individuos positivos y sólo es posible hacerlo por muestreo. En tal caso teniendo un " $p$ " hipotético muy bajo, " $q$ " se acerca a la unidad y en términos logarítmicos el denominador de la ecuación se aproxima a cero. Por otra parte, tratándose de verificar si una zona es "limpia" de una enfermedad, entonces " $\alpha$ " tendrá que ser muy pequeño, puesto que se trata de la probabilidad de fallar en detectar positivos, razón por la cual el numerador de la fórmula se tornará cada vez más pequeño en la escala logarítmica (-3, -5, -6, etc.) con la cual, el número mínimo de observaciones en la muestra irá siendo así mayor.

## DISCUSION

En salud animal es frecuente que la detección de infección o enfermedad en un animal no sea establecida con seguridad. Los procedimientos diagnósticos de alta confiabilidad si bien son deseables no es menos cierto que con frecuencia son impracticables, como en la tuberculosis, o son muy costosos o muy laboriosos para ser aplicados masivamente en poblaciones ganaderas.

Al estudiar la situación epidemiológica de una enfermedad en una población animal de cierta magnitud, es común tener que aplicar alguna prueba clasificatoria de positivos no muy sofisticada y que generalmente tiene un nivel de error de clasificación del estado epidemiológico de los individuos.

En cualquier caso, para facilitar la interpretación de los resultados, al aplicar una prueba indirecta tipo clasificatoria es necesario evaluar su validez tomando como referencia las respuestas dadas a una prueba directa. Los niveles de error, falsos positivos y falsos negativos pueden ser estimados específicamente cuando la prueba clasificatoria es aplicada a un grupo de animales cuyo estado epidemiológico verdadero es conocido.

La sensibilidad y la especificidad, relacionadas con los falsos negativos y los falsos positivos respectivamente, son valores característicos propios de una prueba, no dependiendo de la prevalencia de la enfermedad. Sin embargo, los valores predictivos no son estables y cambian de acuerdo con la prevalencia. Cuando baja la prevalencia de una enfermedad, el valor predictivo positivo también baja, lo que lo convierte en una medida no confiable.

En el caso de algunas enfermedades crónicas que afectan al ganado, como es el caso de la tuberculosis bovina, la aplicación de pruebas clasificatorias está obviamente siempre relacionada con su control y erradicación. De ahí que se deba dar atención a algunos aspectos señalados en este trabajo.

En los programas de combate a la tuberculosis, una preocupación puede ser prevenir su ingreso en regiones o grupos de rebaños libres del *M. bovis*. En este caso, una prueba de alta sensibilidad es

especialmente necesaria ya que interesa que no se "pase" ningún falso negativo. La especificidad en estas circunstancias juega un rol secundario.

Otra situación que se puede presentar en los programas de control de enfermedades como la tuberculosis bovina es la necesidad de eliminar animales infectados desde una región o desde un grupo de rebaños. También en esta circunstancia se requiere en forma primordial una prueba con alta sensibilidad, ya que de otra manera el programa estaría expuesto a que muchos animales infectados no fueran detectados, permaneciendo en los rebaños y difundiendo la enfermedad.

Otra situación diferente que podrían enfrentar los programas de combate a la tuberculosis es el acompañamiento de áreas libres de la enfermedad para detectar su presencia. En ese caso la especificidad tiene más importancia que la sensibilidad. Es común que en una región libre, bien protegida por el programa, cuando aparecen aisladamente animales reactivos se trate de falsos positivos.

En resumen, una buena prueba clasificatoria es aquella en que las distribuciones de frecuencias de positivos y negativos tienen la menor área de superposición posible. De esta manera, la prueba

tendrá una alta sensibilidad y especificidad simultáneamente. Definida el área de superposición de las distribuciones de frecuencia en una prueba indirecta, cualquier intento de aumentar su sensibilidad se hará en desmedro de la especificidad y vice versa.

#### REFERENCIAS

1. FELLER, W. An introduction to probability theory and its applications. Vol. 1. Wiley. New York. 1968.
2. FLEISS, J.L. Statistical Methods for Rates and Proportions. Wiley. New York. 1973.
3. FRANCIS, J., SEILER, R.J., WILKIE, I.W., O'BYLE, D., LUMSDEN, M.J., FROST, A.J. The sensitivity and specificity of various tuberculin tests using bovine PPD and other tuberculins. *Vet. Rec.* 103: 420-435, 1978.
4. RANNEY, A.F. Los servicios de inspección de carne como ayuda en la erradicación de la tuberculosis. I Seminario Internacional sobre Tuberculosis bovina para las Américas. Santiago, Chile. OPS, *Pub. Cient.* 258, 1972.
5. SCHWABE, C.W., RIEMANN, H.P., FRANTI, C.E. Epidemiology in Veterinary Practice. Lea & Febiger. Philadelphia, 1977.
6. TOMAN, K. Sensibilidad, especificidad y valor predictivo de los tests diagnósticos. Boletín Unión Internacional contra la Tuberculosis 56, No. 1-2, 1981.

## THE PROBLEM OF VALIDITY OF A DIAGNOSTIC TEST FOR MASSIVE USE AS STATISTICAL SCREENING PROCEDURES

Vicente M. Astudillo<sup>1</sup> & Isabel N. Kantor<sup>2</sup>

### ABSTRACT

The effectiveness of an indirect diagnostic test of massive use in discriminating procedures is assessed by means of conditional probabilities and application of the Bayes theorem. Examples are given of estimates of diagnostic errors and of the true prevalence rate.

For studies on populations where the presence of positive animals can be regarded as a rare event, the relationship existing between the size of the sampling and the probability of failure to detect positives is discussed.

### INTRODUCTION

Whenever an indirect test is utilized to screen the animals of a population into positives and negatives with respect to a disease, the validity of the test must be known. That is, does the test "measure" what it proposes to "measure"? For example: does the bovine tuberculin test actually evaluate the presence or absence of tuberculosis? This question cannot be answered by a simple 'yes' or 'no'. Rather, the answer lies on a proportional or percentage scale that indicates the test's degree of validity.

Two parameters are utilized to study specifically the validity of an indirect diagnostic classification test applied to populations: sensitivity and specificity. These tests almost never produce an exact identification of all the true positives and negatives. For example: the tuberculin test produces positives as a result of exposure to *Mycobacterium*. Whereas tuberculosis has been

taken as an example, it should be understood that immunologically, the positive reaction of bovines to the bovine PPD tuberculin is the manifestation of the animals previous exposure to *Mycobacterium bovis* and thus means infection, not necessarily disease. Although due to this germ's pathogenicity and the cattles' susceptibility to it, the infection is soon followed by lesions indicative of the disease. On other occasions, positive tuberculin reactions may occur through infections due to micobacteria other than *M. bovis* because of the existence of common antigens that are not necessarily followed by disease in the animal. In practical situations, these para-specific reactions take on major relative importance in the stages of very low prevalence of tuberculosis in cattle (false positives). On the other hand, the opposite diagnosis error -false negatives- may occur in bovines in the first phases of infection (preallergic period), during other intercurrent infections (virosis) or in animals in the cachectic state.

The false results, called classification errors, indicate the indirect test's fallibility level. They also produce difficulties in both the estimation of tuberculosis prevalence and in the decision-making relative to the application of sanitary measures for the eradication of tuberculosis.

### EVALUATION OF THE VALIDITY OF THE INDIRECT TEST

The performance of indirect tests (tuberculinization, in this example) can be assessed through sensitivity and specificity. In practice, this can be done by means of a study of the data relative to the animals in a given region or country (R) having a bovine tuberculosis control program. The following information is required for the assessment: i) tuberculosis test results for a given

<sup>1</sup>Pan American Foot-and-Mouth Disease Center. (PAHO/WHO), Caixa Postal 589, 20000 Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

<sup>2</sup>Pan American Zoonoses Center. (PAHO/WHO), Casilla 3092 - Correo Central, 1000 Buenos Aires, Argentina.

period (I); and ii) results of the post-mortem macroscopic examination in slaughterhouses, histopathological examination and/or laboratory culture isolation tests (D).

In the past, in Region R, animals positive to the tuberculin test were sacrificed in sanitary service slaughterhouses and then inspected, and samples were taken and analyzed in the laboratory in order to isolate the agent. On the other hand, animals that were always negative to the tuberculin test in Region R, upon reaching a certain age, are discarded and set off for slaughter. Such data can be used insofar as the slaughterhouse maintains an individual record with identification of the source. These retrospective data on the Region R subject population enable us to determine the frequency distribution shown (5) in Table 1 and Figure 1.

The validity of a diagnostic test should reflect its capability to provide true results about what is being evaluated. To measure a test's validity, its sensitivity and specificity must be estimated.

In the bovine tuberculosis example presented above, sensitivity (U) would be the tuberculin test's ability to identify as positive every animal in the herd that is actually infected by *M. bovis*. Likewise, specificity (V) would be the tuberculin test's ability to identify as negative every animal in the herd that is actually not infected

by *M. bovis*. The characteristics of specificity enable it to be assessed in areas with herds free of bovine tuberculosis.

TABLE 1. Cross classification of direct & indirect tests. Denomination of cellular and marginal frequencies

Indirect test situation	Real situation (direct)		
	D+	D-	Total
I+	a	b	(a+b)
I-	c	d	(c+d)
Total	(a+c)	(b+d)	(n)

where:

- a = Number of animals considered positive by the tuberculin test and which are found to be infected; these are the true positives.
- b = Number of animals also found positive to the tuberculin test, but in which infection is not substantiated by post-mortem inspection or by organ cultures; these are the false positives.
- c = Number of animals considered negative to the tuberculin test and found to be actually infected; these are the false negatives.
- d = Number of animals considered negative to the tuberculin test and in which no infection is found; these are the true negatives.
- a+b = Total number of infected animals.
- b+d = Total number of uninfected animals.
- n = Total animals.

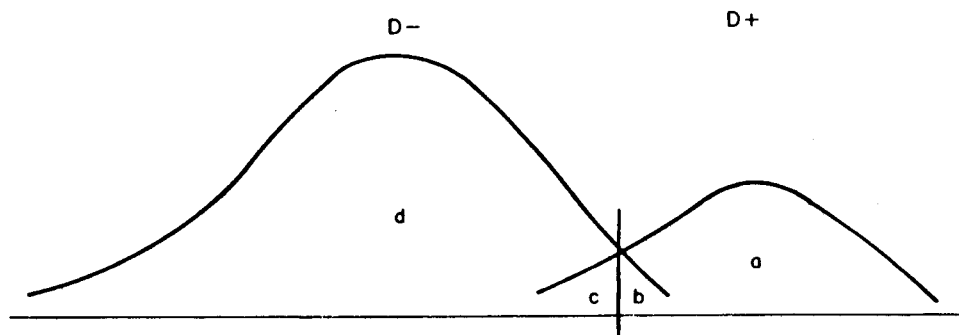


FIGURE 1. Distribution of overlapping frequencies of positive and negatives. Uncertainty zone: classification errors by indirect testing.

These characteristic values can be estimated from the data shown in Table 1:

$$U = a/(a+c)$$

$$V = d/(b+d)$$

The simple tuberculin test on the flat of the neck, using high-potency bovine PPD tuberculin, reaches optimum sensitivity of 91% and specificity of 89% (3).

When these indicators of validity are used, it should be remembered that in regions where the percentage of infection by *M. bovis* is relatively high, there may be cases of animals with recent infection for which the tuberculin test is positive. Nevertheless, the direct tests may fail in the confirmation due to the possibility that no macroscopic lesion may yet have developed. For this reason, the specimen of ganglia and organs for culture may not include tissue wherein the primary infection is present. In this case, the lesion will still be only microscopic. Consequently, the direct test for confirmation of the validity of the indirect test is liable not to provide total security about the presence of tuberculosis infection (4).

#### PROBABILITY THAT A BOVINE POSITIVE TO THE TUBERCULIN TEST IS REALLY INFECTED

By way of example, let us suppose that in a given region the veterinary service periodically tests a mass of 100,000 milk cows. If we want to know what percentage (P) of test-positive (I+) animals is actually infected (D+) with *M. bovis*, that is

$$P^*(D+/I+)$$

which means that we are concerned about the diagnostic efficacy of the tuberculin test. Proceeding with the example given, in Table 2, and applying the Bayes theorem (2):

$$P(D+/I+) = \frac{P(D+) P(I+/D+)}{P(D+) P(I+/D+) + P(D-) P(I+/D-)}$$

the diagnostic efficacy of the tuberculin test can be assessed. For the given example it would be

$$P(D+/I+) = \frac{(0.01) (0.95)}{(0.01) (0.95) + (0.99) (0.1)} = 0.08756.$$

\*P = Probability

TABLE 2. Distribution of frequencies for 1% prevalence, 95% sensitivity and 90% specificity

Indirect test situation	Real situation (direct)		
	D+	D-	Total
I+	950	9,900	10,850
I-	50	89,100	89,150
Total	1,000	99,000	100,000

Therefore, in this example, only 8.8% of the test-positive animals would be really affected with tuberculosis. The  $950/10,850 = 0.088$  rate was not utilized because, as a general rule, the number of animals in the "a" cell of Table 1 is unknown. According to the data in the example, it is 950. For this reason the marginal data must be utilized to estimate the diagnostic efficacy of an indirect test such as the tuberculin test (5).

Whereas the infection prevalence is 1% and the cattle population is  $n = 100,000$  head, the number of positive or infected animals is 1,000. In Table 2 this corresponds to the first column total (a+c), i.e., the total of true positives [(a+c) = 1%(n)]. Whereas the indirect test sensitivity is 95%, its application will detect 950 of the 1,000 infected animals [a = 95% (a+c)].

The value of 950 corresponds to "a" in Table 2, i.e., truly positive animals also detected by the indirect diagnostic test. The difference of  $1,000 - 950 = 50$  makes cell "c", which corresponds to actually positive animals not detected by the indirect test [c = (a+c) - a]. This quantity represents the false negatives. The second column of Table 2 corresponds to the real negatives, whose total (b+d) is the difference between the size of the population (n) and the total quantity of positive individuals (a+c), i.e., [n - (a+c) = (b+d)]. The quantity (b+d) is equal to  $100,000 - 1,000 = 99,000$  negative cattle.

Whereas the specificity of the indirect diagnostic test is 90%, then it is possible to detect 89,100 of the 99,000 negative animals [d = 90%(b+d)]. This quantity corresponds to cell "d" in Table 2, which represents the real negative cattle also

identified as such by the indirect test. The difference of  $99,000 - 89,100 = 9,900$  constitutes cell "b", which is the real negative animals not identified as such through the indirect test [ $b = \{(b+d) - d\}$ ]. This quantity represents the false positives.

The total of animals in the first row (a+b) corresponds to the total of infected animals classed as such by the indirect diagnostic test, whereas the total in the second row (c+d) represents the total of noninfected animals classed in this category by the indirect diagnostic test. In the last two totals there is a certain amount of misclassification because the first total (a+b) includes false positives and the second total (a+d) includes false negatives.

#### PREDICTIVE VALUE OF THE DIAGNOSTIC TEST

In order to study all the elements that may affect the results of applying a massive diagnostic test, it is desirable to consider some situations in which both the sensitivity and the specificity of a test remain constant, while prevalence of infection presents different values. Let us suppose that an indirect diagnostic test, like the tuberculin test, is applied to three bovine populations of 100,000 head each.

Sensitivity and specificity are taken as 91% and 89% respectively. The first population has a prevalence of 1%, the second is 10%, and the third is 20%. The results are in Tables 3, 4 and 5.

The predictive capability of an indirect test (6) can be indicated by two indicators: the positive predictive value (G) and the negative predictive value (H), both of which can be expressed from the frequencies shown in Table 1:

$$G = a/(a+b)$$

$$H = d/(c+d)$$

For the data in Table 3, the indicators attain the following values:

$$G = \frac{910}{11,800} \times 100 = 7.8\%$$

$$H = \frac{88,110}{88,200} \times 100 = 99.9\%$$

TABLE 3. Cattle population with 1% prevalence rate  
91% sensitivity and 89% specificity

	D+	D-	Total
I+	910	10,890	11,800
I-	90	88,110	88,200
Total	1,000	99,000	100,000

For the data in Table 4, the tuberculin test predictive capability indicators attain the following values:

$$G = \frac{9,100}{19,000} \times 100 = 47.9\%$$

$$H = \frac{80,100}{81,000} \times 100 = 98.9\%$$

TABLE 4. Cattle population with 10% prevalence rate  
91% sensitivity and 89% specificity

	D+	D-	Total
I+	9,100	9,900	19,000
I-	900	80,100	81,000
Total	10,000	90,000	100,000

It can be seen that the change of +9 percentage points in prevalence produces a change of +40 percentage points in the positive predictive capability and -1 percentage point in the negative predictive capability. This last aspect is practically unchanged when compared to the increase in the positive predictive capability.

For the data in Table 5, the indicators attain the following values:

$$G = \frac{18,200}{27,000} \times 100 = 67.4\%$$

$$H = \frac{71,200}{73,000} \times 100 = 97.5\%$$

A marked increase in prevalence is again seen to produce a noticeable increase in positive predictive capability (practically 20 percentage points in relation to the situation of 10% prevalence). However, the growth in this indicator did not

TABLE 5. Cattle population with 20% prevalence rate  
91% sensitivity and 89% specificity

	D+	D-	Total
I+	18,200	8,800	27,000
I-	1,800	71,200	73,000
Total	20,000	80,000	100,000

reach the magnitude observed when the prevalence went from 1% to 10%. On the other hand, H also declined slightly, but the magnitude of change was in this case somewhat greater than when prevalence rose from 1% to 10%.

These examples enable us to conclude that when an indirect diagnostic test is applied, its positive predictive capability declines if the bovine population has a very low level of infection.

According to Ranney (4), the application of these results to a bovine tuberculosis control and eradication program would indicate that in low prevalence situations -whether as a result of the natural history of the disease or because of the effect of control action- exclusive use of the tuberculin test as the sole method of detecting infection is not advisable. In these cases there should be a dynamic detection activity that uses procedures which permit tracing back from the slaughterhouse (discovery of lesions) to the herds where the agent is active. Once the problem herds are identified, the tuberculosis test can be applied every six months until the herd is declared 'clean'.

In epidemiological situations wherein the prevalence is very high, the positive predictive value of the tuberculin test is also very high. Therefore, the tuberculin test method and elimination of positive reactors can give good results.

#### ESTIMATING THE REAL PREVALENCE OF A DISEASE LIKE TUBERCULOSIS BASED ON THE RESULTS OF AN INDIRECT TUBERCULIN TEST

Table 6 illustrates a possible tuberculosis situation in a region:

TABLE 6. Cattle herd with prevalence of 1/1000  
91% sensitivity and 89% specificity

Indirect test situation	Real situation (direct)		
	D+	D-	Total
I+	91	10,989	11,080
I-	9	88,911	88,920
Total	100	99,900	100,000

In this case the apparent prevalence (PAP) is:  $11,080/100,000 = 0,11080$ , that is, approximately 11%. Nevertheless, of the 11,080 positives to the indirect test, 10,989 are false positives. This result should be interpreted carefully considering the economic implications occasioned by sending to the slaughterhouse (sacrificed) animals reacting positively to the indirect test, as is the case with tuberculosis (5). The available knowledge about the test's specificity and sensitivity indicators helps to resolve this problem. This way the true prevalence rate (VEP) can be determined:

$$VEP = \frac{PAP + V - 1}{V + U - 1} = \frac{0,00080}{0,80000} = 0,001$$

Observation of the data confirms that the true prevalence is 1 per 1000.

#### PROBABILITY OF FAILURE TO DETECT INFECTED ANIMALS WHEN USING AN INDIRECT TEST LIKE THE TUBERCULIN TEST

The purpose is to conduct a series of diagnoses to detect tuberculosis in a herd of animals with an indirect test having known sensitivity and specificity. The aim is to assess the probability of failure to detect animals infected by *M. bovis*, i.e., to ascertain the probability of yielding false negatives. The variables in this problem are:

U, V and VEP

Working through the formula in the preceding section, we get:

$$VEP (V + U - 1) - V + 1 = PAP$$

which can be applied to the last example above as follows:

$$PAP = 0,001 (0,89 + 0,91 - 1) - 0,89 + 1 = 0,11080$$

$$PAP = p = 0,11080$$

$$(1 - PAP) = q = 1 - p = 1 - 0,11080 = 0,88920$$

Under these conditions the geometric distribution equation for assessing the probability of failure to detect positives with the indirect test may be applied to the probability of obtaining false negatives (7).

$$\left. \begin{array}{l} \text{Probability of} \\ \text{failure to} \\ \text{detect positives} \end{array} \right\} = \text{Pr (Failure +)} = \alpha$$

$$= P(\text{Failure +}) = (1-p)^n = q^n = \alpha$$

$$\alpha = q^n$$

$$\log \alpha = n \log q \quad \text{where } n = \frac{\log \alpha}{\log q}$$

This is the number of individuals required, or minimum size of the sampling, to have a probability equal to or less than " $\alpha$ " of failure to detect positives through the indirect test, i.e., the probability of detecting false negatives. This equation is applicable when the purpose is to conduct a study to detect the presence of positive individuals and this can be done only by screening. In this case, when a hypothetical " $p$ " is very low, " $q$ " approaches to 1.00 and in logarithmic terms the denominator of the equation approaches zero. On the other hand, when the purpose is to ascertain if a zone is "clean" of a disease, then " $\alpha$ " will have to be very slight, insofar as it is a question of the probability of failure to detect positives. This is why the formula's numerator will become smaller and smaller on the logarithmic scale (-3, -5, -6, etc.) while the minimum number of observations in the sampling will become all the greater.

#### DISCUSSION

In animal health, the detection of infection or disease in an animal is frequently not ascertained with full certainty. The highly reliable diagnostic procedures, although desirable, are nonetheless frequently impracticable—as in the case of tuberculosis— or are either too costly or too cumbersome for massive application in cattle populations.

When the epidemiological situation of a disease in an animal population of a certain magnitude

is studied, it is common to have to apply some not very sophisticated screening type of diagnostic test usually having a level of error in classifying the epidemiological state of the individual animals.

In any case, to facilitate the interpretation of the results when a screening type indirect test is applied, its validity must be assessed taking as reference the responses to a direct test. The levels of error, false positives and false negatives can be specifically estimated when the screening test is applied on a group of animals whose true epidemiological state is known.

The sensitivity and specificity related to the false negatives and false positives, respectively, are characteristic values of a test and do not depend on the disease's prevalence. Nevertheless, the predictive values are not stable and change according to the prevalence. When the prevalence of a disease declines, the positive predictive value also declines; this situation makes it an unreliable measure.

In the case of some chronic cattle diseases such as bovine tuberculosis, the application of screening tests is obviously always related to its control and eradication. Attention should thus be directed to some of the aspects stressed in this paper.

In the tuberculosis control programs, one of the preoccupations may be to prevent the disease from entering regions or groups of herds free of *M. bovis*. In this case, a high-sensitivity test is especially necessary because it is important not to let any false negatives "pass". In these circumstances, the specificity plays a secondary role.

Another situation that may occur in programs to control diseases like bovine tuberculosis is the need to eliminate infected animals from a region or group of herds. This circumstance also primarily requires a high-sensitivity test; otherwise the program would run the risk of not detecting many infected animals that would then remain among the herds and spread the disease.

Another different situation that the tuberculosis control programs could confront involves monitoring areas free of the disease in order to detect its presence. Specificity is much more



important than sensitivity in this case. In a free area well protected by the control program, it commonly happens that the isolated cases of reactors involve false positives.

In summary, a good screening test is one in which the frequency distributions of positives and negatives have the smallest possible area of overlap. The test will then have both high sensitivity and high specificity. When the area of overlap of the frequency distributions in an indirect test is defined, any attempt to increase its sensitivity will be in detriment of the specificity and vice versa.

#### REFERENCES

1. FELLER, W. An introduction to probability theory and its applications. Vol. 1. Wiley. New York. 1968.
2. FLEISS, J.L. Statistical Methods for Rates and Proportions. Wiley. New York. 1973.
3. FRANCIS, J., SEILER, R.J., WILKIE, I.W. O'BYLE, D., LUMSDEN, M.J., FROST, A.J. The sensitivity and specificity of various tuberculin tests using bovine PPD and other tuberculins. *Vet. Rec.* 103: 420-435, 1978.
4. RANNEY, A.F. Los servicios de inspección de carne como ayuda en la erradicación de la tuberculosis. I. Seminario Internacional sobre Tuberculosis bovina para las Américas. Santiago, Chile. OPS, *Pub. Cient.* 258, 1972.
5. SCHWABE, C.W., RIEMANN, H.P., FRANTI, C.E. Epidemiology in Veterinary Practice. Lea & Febiger. Philadelphia, 1977.
6. TOMAN, K. Sensibilidad, especificidad y valor predictivo de los tests diagnósticos. Boletín Unión Internacional contra la Tuberculosis 56, No. 1-2, 1981.

## resúmenes

## abstracts

ANSELMO, F.P. & MOREIRA, E.C.

Texto en portugués. *Arq. Escola Vet. Univ. Fed. Minas Gerais* 31 (3): 486-488, 1979. (*FMD Bull. Wellcome* 20 (2): 81/10, 1981). [Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG, Caixa Postal 567, 30.000 Belo Horizonte, MG., Brasil]

**Aspectos epidemiológicos de la fiebre aftosa en bovinos, en la región del triángulo del Estado de Minas Gerais, Brasil**

Se analizaron las incidencias de fiebre aftosa en la región del Triángulo en el Estado de Minas Gerais, Brasil, ocurridas durante julio 1972 a junio 1973 y julio 1973 a junio 1974. Los subtipos de virus aislados durante las mencionadas épocas fueron O<sub>1</sub>, A<sub>2,4</sub> y C<sub>3</sub>. Durante el período de 1972-73, la incidencia de enfermedad por cada 10.000 bovinos fue de un 15,43 con relación al virus tipo O, 8,46 al tipo A y 13,54 al tipo C. Las cifras comparables para 1973-74 fueron 2,64, 6,77 y 3,19 respectivamente. Los índices totales por cada 10.000 bovinos fueron 99,67 en la época 1972-73 y 38,08 en 1973-74. Los índices de mortalidad por cada 100.000 bovinos fueron 5,81 para 1972-73 y 3,97 para 1973-74. Los índices más elevados de mortalidad se registraron en animales menores de 4 meses de edad (19,91 y 24,38 para 1972-73 y 1973-74 respectivamente) y en animales de 4 a 12 meses de edad (17,11 y 12,70 respectivamente). Durante 1972-73 la enfermedad ocurrió con mayor frecuencia en los meses de agosto, enero y junio. En el siguiente período se registró la mayor frecuencia en noviembre, diciembre y abril. El período normal entre la ocurrencia del primero y del último caso fue de 20 días en 289 granjas en 1972-73, y de 22 días en 134 granjas en 1973-74.

**Aspects of the epidemiology of foot-and-mouth disease in cattle in the Triangulo region of Minas Gerais State, Brazil**

The incidence of foot-and-mouth disease in the Triangulo region of the State of Minas Gerais, Brazil was analyzed for the periods July 1972 to June 1973 and July 1973 to June 1974. The virus subtypes isolated during these periods were O<sub>1</sub>, A<sub>2,4</sub> and C<sub>3</sub>. The incidence of disease per 10,000 cattle for the period 1972-73 was 15.43 for virus type O, 8.46 for type A and 13.54 for type C. Comparable figures for 1973-74 were 2.64, 6.77 and 3.19 respectively. The total rates per 10,000 cattle were 99.67 for 1972-73 and 38.08 for 1973-74. Mortality rates per 100,000 cattle were 5.81 for 1972-73 and 3.97 for 1973-74. The highest mortality rates were recorded in animals under 4 months of age (19.91 and 24.38 for 1972-73 and 1973-74 respectively) and in animals aged 4 to 12 months (17.11 and 12.70 respectively). During the 1972-73 period, the frequency of disease was highest during the months of August, January and June. In the following period, the highest frequency was recorded in November, December and April. The average period between the occurrence of the first and last cases of disease was 20 days on 289 farms in 1972-73 and 22 days on 134 farms in 1973-74.

ARBELAEZ, G., BUSTOS, M.Q. de, GERARDINO, A.G. de, LOBO, C.A., ESTUPIÑAN A., J., BARRERA, J.

Texto en español. *Rev. Inst. Colomb. Agropec.* (Bogotá) 14: 87-92, 1979. (*FMD Bull. Wellcome* 20 (4): 81/38, 1981). [Programa Enfermedades Vesiculares, LIMV-ICA, Apartado Aéreo 29743, Bogotá, Colombia]

**Estandarización de la técnica de microneutralización para anticuerpos del virus de fiebre aftosa**

En distintas partes de Colombia la prueba de microneutralización es utilizada rutinariamente para observar títulos de anticuerpos en sueros de bovinos inoculados contra la fiebre aftosa. La prueba es llevada a cabo en células BHK 21 desarrolladas en microplatos usando medio mínimo esencial y tricina como estabilizador del pH. Investigóse la reproducibilidad de la prueba probando suero seis veces bajo condiciones idénticas contra cepas de virus O y A (50  $DI_{50}$  de cada). El análisis de la varianza no indicó diferencias significativas ( $p=0,05$ ) entre los títulos obtenidos. Con el fin de encontrar el margen de dosis infectantes de virus que garantizaría reproducibilidad de la prueba, se probaron ocho sueros contra 10, 40, 50, 70, 80, 100 y 180  $DI_{50}$  de una cepa de virus O. El análisis de varianza no reveló diferencias significativas de los resultados ( $p=0,05$ ) y el coeficiente de regresión fue  $-0,67$ . Los resultados indicaron que la prueba de microneutralización era muy eficaz para el cálculo de niveles de anticuerpos en sueros de bovino.

**Standardization of the microneutralization technique for foot-and-mouth disease virus antibodies**

The microneutralization test is routinely used to monitor antibody titers in the sera of cattle vaccinated against foot-and-mouth disease in different parts of Colombia. The test is carried out in BHK 21 cells grown in microplates using minimum essential medium and tricine as a pH stabilizer. The reproducibility of the test was investigated by running sera six times under identical conditions against O and A strains of virus (50  $ID_{50}$  of each). Analysis of variance indicated no significant differences ( $p=0.05$ ) between titers obtained. In order to find the infective dose range of virus which would guarantee reproducibility of the test, eight sera were tested against 10, 40, 50, 70, 80, 100 and 180  $ID_{50}$  of an O virus strain. Analysis of variance revealed no significant differences between the results ( $p=0.05$ ) and the regression coefficient was  $-0.67$ . The result indicated that the microneutralization test was very efficient for the evaluation of antibody levels in cattle sera.

BARRERA, J. del C., TORRES-ANGEL, M.J., ESTUPIÑAN A., J.

Texto en español. *Rev. Inst. Colomb. Agropec.* (Bogotá) 13 (4): 681-690, 1978. (*FMD Bull. Wellcome* 20 (1). 81/5, 1981). [Programa de Enfermedades Vesiculares, LIMV-ICA, Apartado Aéreo 29743, Bogotá, Colombia]

**Ausencia de efectos significativos en la vacunación antiaftosa con respecto a la producción lechera**

Fue utilizada una computadora para analizar los antecedentes de la producción lechera de las vacas Holstein a los 15 días antes y los 16 días después de inoculación con una vacuna antiaftosa de tipo Frenkel. Los resultados demostraron ser marcadamente homogéneos al analizarse las medidas de tendencia central (inferior y mediana), así como de dispersión (desviación normal). Existía una

**Absence of significant effects of foot-and-mouth disease vaccination on milk production**

A computer was used to analyze the milk production records of Holstein cows at 15 days before and 16 days after vaccination with Frenkel-type foot-and-mouth disease vaccine. The records were found to be highly homogeneous when measures of central tendency (mean and median) as well as dispersion (standard deviation) were analyzed. There was a high correlation (87%)

elevada correlación (87%) entre la producción de leche antes y después de la inoculación. En general, el análisis no produjo evidencia de ninguna reducción en la producción de leche tras inoculación contra la fiebre aftosa.

between milk production before and after vaccination. In general, the analysis provided no evidence of any reduction in milk yield following vaccination against foot-and-mouth disease.

CAMPOS, R., ROSETTI, O., TORRES, R.A.de

Texto en español. *Rev. Latinamer. Microbiol.* 19: 166-170, 1977. (*FMD Bull. Wellcome* 20 (3): 81/28, 1981). [Orientación Microbiología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Junín 956, Buenos Aires, Argentina]

**Eventos tempranos en la replicación de virus aftoso. Localización subcelular de la síntesis del ARN viral**

Fue investigada la síntesis del ARN viral en células BHK 21 infectadas con virus aftoso de la cepa O<sub>1</sub> Caseros. La síntesis fue primeramente registrada de los 90 a los 135 minutos posinfección de las células y aumentada exponencialmente hasta 180 minutos. Fue asociada con el supernatante y fracciones de pelotes obtenidas por centrifugación a 15.000g por 30 minutos. Aproximadamente un 70% del ARN sintetizado se encontró en la fracción supernatante sobre centrifugación a 100.000g mientras que el 30% restante fue asociado con estructuras celulares sedimentables en parte a 15.000g y en parte a 100.000g.

**Early events in the replication of foot-and-mouth disease virus. Subcellular localization of viral RNA synthesis**

The synthesis of viral RNA was investigated in BHK 21 cells infected with foot-and-mouth disease virus of the O<sub>1</sub> Caseros strain. Synthesis was first recorded at 90 to 135 minutes post-infection of the cells and increased exponentially up to 180 minutes. It was associated with both the supernatant and pellet fractions obtained by centrifugation at 15,000g for 30 minutes. About 70% of the RNA synthesized was found in the supernatant fraction on centrifugation at 100,000g while the remaining 30% was associated with cellular structures sedimentable partly at 15,000g and partly at 100,000g.

DARDIRI, A.H. & HAMDY, F.M.

Texto en inglés. *Ann. Proc. Amer. Ass. Zoo. Vets.*, Tennessee, 1978: 52-64, 1979. (*FMD Bull. Wellcome* 20 (1): 81/3, 1981). [Plum Island Animal Disease Center, Greenport, Long Island, New York 11944, U.S.A.]

**Susceptibilidad a la fiebre aftosa y peste bovina de rumiantes para zoológicos y su examen antes de su importación a los Estados Unidos de América**

Reglamentos Federales determinan la introducción de rumiantes y porcinos en los parques zoológicos de los Estados Unidos. Es necesaria la obtención de un permiso para la importación, cuarentena y exhibición de dichos animales. Una vez obtenido el permiso, los animales deben retenerse en el país de origen por un período mínimo de 60 días en una estación de cuarentena aprobada, bajo supervisión veterinaria. Trás estas formalidades los animales pueden ser embarcados directamente

**Susceptibility of zoological ruminants to foot-and-mouth disease and rinderpest and their testing before importation to U.S.A.**

Introduction of ruminants and swine into zoological gardens in the United States is governed by Federal Regulations. A permit must be obtained for importation, quarantine and exhibition of such animals. After the permit is issued, the animals must be held for not less than 60 days under veterinary supervision in an approved quarantine station in the country of origin. The animals may then be shipped directly to the Port of New York and placed in quarantine for not less

hacia el puerto de Nueva York y puestos en cuarentena durante 30 días como mínimo. Al término de esta cuarentena los animales son inscritos en parques zoológicos aprobados, manteniéndose documentos apropiados para cada animal. Los Reglamentos del USDA especifican que deben ser obtenidas dos muestras de suero a intervalos de 30 días de los rumiantes destinados a parques zoológicos en los Estados Unidos. Los sueros deben ser negativos con relación a anticuerpos contra la fiebre aftosa y peste bovina antes de que los animales abandonen su país de origen. Es necesaria una tercera muestra de los animales en cuestión, una vez terminada su cuarentena en los Estados Unidos. En el caso de fiebre aftosa, los sueros son analizados con relación al anticuerpo VIA, utilizando antígeno VIA en la prueba de precipitación de difusión en gel de agar. Durante 1967-1978 fueron importados 1.723 rumiantes para zoológicos. Aunque las restricciones descritas son relativamente costosas, al mismo tiempo son sumamente eficaces ya que no se han registrado casos de fiebre aftosa o peste bovina en ningún parque zoológico de los Estados Unidos.

than 30 days. On release, the animals are listed as permanently quarantined in approved zoological gardens and records must be kept for each animal. USDA regulations specify that two serum samples be taken at 30 day intervals from ruminants intended for zoological gardens in the United States. The sera must be negative for foot-and-mouth disease and rinderpest antibodies before the animals are released from the country of origin. A third negative sample is required from animals once quarantined in the United States. In the case of foot-and-mouth disease, sera are tested for VIA antibody, using VIA antigen in the agar gel diffusion precipitation test. During 1967-1978, 1,723 zoological ruminants were imported. Although the restrictions described are relatively expensive, they have been successful in that no cases of foot-and-mouth disease or rinderpest have been reported in zoological gardens in the United States.

DHENNIN, L., FROVIN, A., GICQUEL, B., BIDARD, J.P., LABIE, J.

Texto en francés. *Bull. Acad. vet. Fr.* 53: 349-355, 1980. (*FMD Bull. Wellcome* 20 (4): 81/34, 1981). [Laboratoire Central de Recherches Veterinaires, 22 rue Pierre-Curie, 94703 Maisons-Alfort cedex, B.P. No. 67. France]

**Riesgo de propagación de la fiebre aftosa por los productos del cerdo. Supervivencia del virus aftoso en salchichas secas**

Fueron preparadas salchichas secas (salami) de distintas maneras con carne de cerdos infectados con fiebre aftosa. Durante el período de maduración fue inspeccionado el pH y la presencia o ausencia de virus infectivo en muestras de salchichas. Los resultados indicaron que el virus podría sobrevivir en la carne de salchicha (especialmente en el tejido graso) por períodos hasta de 56 días. De esta manera, el período de curación o secamiento comercial normal de un mes no sería suficiente para evitar todo riesgo de transmisión de la enfermedad por salchichas infectadas.

**Risk of spread of foot-and-mouth disease by pork products. Survival of foot-and-mouth disease virus in dry sausages**

Dry sausages (salami) were prepared in different ways from the meat of pigs infected with foot-and-mouth disease. During the maturation period, the pH and the presence or absence of infective virus was checked in samples of the sausages. The results indicated that virus could survive in sausage meat (especially in the fatty tissue) for periods up to 56 days. Thus, the normal commercial drying period of one month would not be sufficient to avoid all risk of transmission of disease by infected sausages.

DONALDSON, A.I. & FERRIS, N.P.

Texto en inglés. *Res. vet. Sci.* 29: 315-319, 1980. (*FMD Bull. Wellcome* 20 (1): 81/4, 1981). [Animal Virus Research Institute, Pirbright, Woking, Surrey, England]

**Emisión de virus aftoso transmitido por el aire procedente de cerdos infectados**

Fueron muestreados individualmente cerdos grandes Landrace cruzados blancos infectados con virus aftoso por distintas vías de exposición, primero como cerdos (I) "intactos" y luego como cerdos (T) "entubados" utilizándose un tubo endotraqueal. Durante las primeras etapas de la enfermedad fue recobrado más virus de los cerdos I que de los cerdos T, por cualquiera de las vías de exposición utilizadas. Al principio de la enfermedad y durante la incubación, la mayor parte del virus procedente de cerdos I fue asociado con partículas de tamaño mediano y grande. Cerdos T infectados mediante contacto directo o indirecto excretaron una gama de partículas de distintos tamaños en esta ocasión, pero los cerdos T infectados por inoculación sólo excretaron partículas pequeñas. Durante el estado avanzado de la enfermedad, fueron excretadas partículas de todos los tamaños por cerdos I y T. En esta ocasión recobróse más virus transportado por el aire de los cerdos I que de los cerdos T infectados mediante contacto directo, pero cerdos I infectados mediante inoculación intravenosa o intradérmica, excretaron menos infectividad que los cerdos T. Los resultados indicaron que el tracto respiratorio se encuentra implicado durante las primeras etapas de la enfermedad aftosa en cerdos infectados por vías de exposición naturales o experimentales.

**Sites of release of airborne foot-and-mouth disease virus from infected pigs**

Large white cross Landrace pigs infected with foot-and-mouth disease virus by different routes of exposure were air-sampled individually, first as "intact" (I-) pigs and then as "intubated" (T-) pigs using an endotracheal tube. During the early stages of disease, more virus was recovered from I-pigs than from T-pigs irrespective of the route of infection. Most of the virus from I-pigs during incubation and early disease was associated with large and medium sized particles. T-pigs infected by direct or indirect contact excreted a range of particle sizes at this time but T-pigs infected by inoculation only excreted small particles. During advanced disease, all sizes of particles were excreted by I- and T-pigs. Greater amounts of airborne virus were recovered at this time from I-pigs than from T-pigs infected by direct contact but I-pigs infected by intravenous or intradermal inoculation excreted less infectivity than T-pigs. Results indicated that the respiratory tract is involved during the early stages of foot-and-mouth disease in pigs infected by natural or experimental routes of exposure.

EISNER, R.J. & McVICAR, J.W.

Texto en inglés. *Bull. Off. int. Epiz.* 92 (1-2): 29-36, 1980. (*FMD Bull. Wellcome* 20 (3): 81/21, 1981). [Plum Island Animal Disease Center, Greenport, Long Island, New York 11944, U.S.A.]

**Virus aftoso en la lana de ovejas infectadas**

Grupos de ovejas fueron infectadas experimentalmente con virus aftoso. Tomáronse muestras de la lana, excrementos, sangre y líquidos esofágico-faríngeos (LEF), antes y a intervalos diarios después de la inoculación de virus. De 12 ovejas, 10 fueron infectadas. Fue aislado virus del LEF

**Foot-and-mouth disease virus on wool of infected sheep**

Groups of sheep were experimentally infected with foot-and-mouth disease virus. Samples of wool, faeces, blood and oesophageal-pharyngeal (OP) fluids were taken before and at daily intervals after virus inoculation. Ten of 12 sheep became infected. Virus was isolated from OP fluid of all

de todas las ovejas por un período de hasta 10 días después de exposición, pero no así de dos animales en contacto. Se aisló virus de un número de muestras de lana. Los títulos víricos en las muestras de lana eran muy bajos y no fue posible descubrir virus en las ovejas durante más de uno o dos días. El virus sobrevivió en la lana durante conservación a  $-80^{\circ}\text{C}$  por dos semanas aunque disminuyó la cantidad de virus. El virus no sobrevivió en la lana conservada siete días más a  $21^{\circ}\text{C}$ .

sheep for up to 10 days after exposure, but not from two in-contact animals. Virus was isolated from a number of wool samples. The virus titers in the wool samples were very low and virus could not be detected on the sheep for more than one or two days. The virus survived on wool during storage at  $-80^{\circ}\text{C}$  for two weeks although the amount of virus decreased. Virus did not survive on wool stored a further seven days at  $21^{\circ}\text{C}$ .

GENOV, I., TSUTSUMANSKI, V., DIMITROV, Kh.

Texto en búlgaro. *Vet. Sbirka* 78: 12-15, 1980. (*FMD Bull. Wellcome* 20 (5): 81/49, 1981).

**Alergias en bovinos tras inoculación contra la fiebre aftosa**

Es revisada la literatura sobre reacciones hipersensibles tras vacunación contra la fiebre aftosa. Son descritas reacciones alérgicas tras inoculación de bovinos en cuatro granjas especializadas en producción de leche, en la región de Sofía en Bulgaria. Las vacunas fueron inactivadas con formalina y se utilizó suero de terneros en medio de crecimiento celular. De los bovinos vacunados por tercera vez, reaccionaron del 1 al 10% de los animales. Los primeros signos clínicos incluyeron un exantema húmedo sobre el cuello, ubre, vulva, espalda, cuartos traseros y alrededor de los labios y ojos. En algunos casos, los primeros signos aparecieron a los 7 u 8 días posvacunación, y en otros no aparecieron hasta los 15 ó 20 días. Se notó una reducción en la producción de leche de 3 a 10%, que se normalizó después de 8 ó 10 días. No se registraron muertes.

**Allergies in cattle following vaccination against foot-and-mouth disease**

The literature on hypersensitivity reactions following vaccination against foot-and-mouth disease is reviewed. Allergic reactions following vaccination of cattle on four dairy farms in the Sofia region of Bulgaria are described. Vaccines were formalin-inactivated and calf serum was used in cell growth media. In cattle vaccinated for the third time, 1 to 10% of animals reacted. Early clinical signs included a moist exanthema on the neck, udder, vulva, shoulders, rear quarters and around the lips and eyes. In some cases, the first signs appeared at 7 to 8 days post-vaccination, in others not until the 15 to 20th day. A reduction in milk yield of 3 to 10% was noted but this returned to normal after 8 to 10 days. No deaths were recorded.

GLOSTER, J., BLACKALL, R.M., SELLERS, R.F., DONALDSON, A.I.

Texto en inglés. *Vet. Rec.* 108 (17): 370-374, 1981. (*FMD Bull. Wellcome* 20 (5): 81/44, 1981). [Meteorological Office, Bracknell, Berkshire, England]

**Pronosticando la propagación de la fiebre aftosa transmitida por el aire**

Existe evidencia, tanto de brotes pasados y de laboratorio, de que la fiebre aftosa puede propagarse por vía aérea. Se han revisado los factores que pueden influenciar la diseminación de la enfermedad transmitida por el aire, tales como emisión

**Forecasting the airborne spread of foot-and-mouth disease**

There is evidence both from past outbreaks and from the laboratory that foot-and-mouth disease can spread by an airborne route. The factors which may influence the airborne spread of disease, such as virus emission, deposition, virus

de virus, deposición, sobrevivencia de virus, precipitación etc., y se ha descrito un modelo numérico que podría ser utilizado para pronosticar las zonas terrestres en riesgo durante brotes en el Reino Unido. El modelo ha sido puesto a prueba utilizando datos sobre brotes de la enfermedad en Hampshire en 1967 y Northumberland en 1966. Los resultados pronosticados concordaron estrechamente con lo que realmente ocurrió durante los mencionados brotes. El modelo sugirió, para los dos brotes estudiados, que en cada granja donde la infección había sido atribuida a transmisión por el aire, existía en cada caso virus suficiente para causar infección mediante inhalación directa.

survival, precipitation etc. are reviewed and a numerical model which may be used to predict the likely areas at risk overland in outbreaks in the United Kingdom is described. The model has been tested using data on outbreaks of disease in Hampshire in 1967 and Northumberland in 1966. The predicted results were in very close agreement with what actually occurred during these outbreaks. The model suggested, for the two outbreaks studied, that on each farm where infection has been attributed to airborne spread there was, in each case, sufficient virus to cause infection by direct inhalation.

KOSEKI, I. & JULY, J.R.

Texto en portugués. *Arq. Inst. Biol. (S. Paulo)* 46 (1-2), 1979. (*FMD Bull. Wellcome* 20 (3): 81/30, 1981). [Instituto Biológico, Caixa Postal 7119, 01000 - São Paulo, Brasil]

**Tratamiento de células de riñón porcino con antibióticos. Efectos sobre cinética de crecimiento, susceptibilidad al virus aftoso y organismos semejantes a micoplasmas**

Fueron desarrolladas células de la línea IB-RS-2 en cultivo en presencia de "tylosin tartrate" y sulfato kanamicino. En las concentraciones utilizadas en el estudio, los antibióticos no afectaron la velocidad de crecimiento de las células ni la susceptibilidad de las células al virus aftoso de tipo A. Sin embargo, el tratamiento no eliminó formas intracitoplásmicas de organismos semejantes a micoplasmas que contaminaron las células.

**Treatment of pig kidney cell lines with antibiotics. Effects on the cell growth rate, susceptibility to foot-and-mouth disease virus and contaminating mycoplasma-like organisms**

Cells of the IB-RS-2 line were grown in culture in the presence of tylosin tartrate and kanamycin sulphate. In the concentrations used in the study, the antibiotics did not affect the growth rate of the cells nor the susceptibility of the cells to foot-and-mouth disease virus of type A. However, the treatment did not eliminate intracytoplasmic forms of mycoplasma-like organisms which contaminated the cells.

KÜPPER, H., KELLER, W., KURZ, C., FORSS, S., SCHALLER, H., FRANZE, R., STROHMAIER, K., MARQUARDT, O., ZASLAVSKY, V.G., HOFSCHEIDER, P.H.

Texto en inglés. *Nature* 289: 555-559, 1981. (*FMD Bull. Wellcome* 20 (3): 81/22, 1981). [Department of Microbiology, University of Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 230, 6900 Heidelberg, Federal Republic of Germany]

**Clonización del ADNc del antígeno principal de virus aftoso y expresión en *E. coli***

Copias del ADN de cadena doble del ARN genómico de una sola cadena de virus aftoso han sido clonizadas dentro del plasmido pBR 322 del *Escherichia coli*. Ha sido establecido un mapa de restricción del genoma viral y alineado con el mapa

**Cloning of cDNA of major antigen of foot-and-mouth disease virus and expression in *E. coli***

Double-stranded DNA copies of the single-stranded genomic RNA of foot-and-mouth disease virus have been cloned into the *Escherichia coli* plasmid pBR 322. A restriction map of the viral genome has been established and aligned with



bioquímico del virus. La secuencia de codificación para la proteína estructural VP<sub>1</sub> (el antígeno principal del virus) ha sido identificada e insertada en el vector plasmido donde la expresión de esta secuencia se halla bajo el control del promotor de fage P<sub>2</sub> λ. La síntesis de polipéptido antigénico pudo demostrarse mediante una prueba indirecta de inhibición de enzima ligada a un inmunosorbente utilizando suero anti-VP<sub>1</sub> de ratón. Los resultados sugirieron que VP<sub>1</sub> podía ser sintetizada en un estado antigénicamente activo en células bacterianas y de esta forma podría proporcionar una nueva forma de producir una vacuna.

the biochemical map of the virus. The coding sequence for the structural protein VP<sub>1</sub> (the major antigen of the virus) has been identified and inserted into a plasmid vector where the expression of this sequence is under the control of the phage λ P<sub>2</sub> promoter. The synthesis of antigenic polypeptide could be demonstrated by an indirect enzyme-linked immunosorbent inhibition assay using mouse anti-VP<sub>1</sub> serum. The results suggested that VP<sub>1</sub> could be synthesized in an antigenically active state in bacterial cells and may, thus, provide a new way of producing a vaccine.

LA TORRE, J.L., GRUBMAN, M.J., BAXT, B., BACHRACH, H.L.

Texto en inglés. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 77 (12): 7444-7447, 1980. (*FMD Bull. Wellcome* 20 (3): 81/26, 1981). [Centro de Virología Animal, Serrano 661, 1414 Capital Federal, Argentina]

#### Los polipéptidos estructurales del aftovirus son fosfoproteínas

El análisis de virus aftoso subtipo A<sub>12</sub> desarrollado en células BHK en presencia de <sup>32</sup>P inorgánico indicó que dos de los principales polipéptidos virales, VP<sub>4</sub> y la proteína VP<sub>3</sub> sensible a la tripsina, eran altamente fosforilados. Los otros polipéptidos, VP<sub>1</sub> y VP<sub>2</sub> también estaban fosforilados aunque en mucho menor escala. Los polipéptidos VP<sub>0</sub> y P<sub>56</sub> fueron también marcados con <sup>32</sup>P. Fosfoserina y fosfotreonina parecían ser los aminoácidos marcados con <sup>32</sup>P. No está muy claro el significado de la fosforilación de las proteínas estructurales del virus, pero es posible que la introducción o eliminación de grupos fosfáticos pudiera proporcionar señales específicas para división apropiada de los precursores o para interacciones de carga adecuadas o cambios conformacionales de las proteínas durante el montaje del caparazón tridimensional de virus.

#### The structural polypeptides of aphthovirus are phosphoproteins

Analyses of foot-and-mouth disease virus subtype A<sub>12</sub> grown in BHK cells in the presence of inorganic <sup>32</sup>P indicated that two of the major viral polypeptides, VP<sub>4</sub> and the trypsin-sensitive protein VP<sub>3</sub>, were highly phosphorylated. The other polypeptides, VP<sub>1</sub> and VP<sub>2</sub>, were also phosphorylated but to a much lower extent. The polypeptides VP<sub>0</sub> and P<sub>56</sub> were also labelled with <sup>32</sup>P. Phosphoserine and phosphothreonine appeared to be the amino acids labelled with <sup>32</sup>P. The significance of phosphorylation of the structural proteins of the virus is obscure but it is possible that the introduction or removal of phosphate groups could provide specific signals for proper cleavage of the precursors or for suitable charge interactions or conformational changes of the proteins during assembly of the three-dimensional shell of the virus.

MAYR, A.

Texto en alemán. *Proc. 11th Int. Congr. Dis. Cattle*, Tel Aviv.: 521-529, 1980. (*FMD Bull. Wellcome* 20 (2): 81/19, 1981). [Institute of Medical Microbiology, Infectious and Epizootic Disease, Faculty of Veterinary Medicine, University of Munich, Veterinarstrasse 13, D 8000 Munchen 22, West Germany]

#### Aborto como una complicación posvacunal de inmunización antiaftosa en bovinos

Los trastornos de gestación se encuentran entre

#### Abortion as a postvaccinal complication of foot-and-mouth disease immunization in cattle

Disturbances of pregnancy are amongst the

las complicaciones más serias tras inoculación contra la fiebre aftosa. En la República Federal de Alemania, desde que la inoculación se hizo obligatoria en 1967, la frecuencia en complicaciones posvacunales ha oscilado entre 0,012 y 0,086% en los animales inoculados. Aún no ha sido explicada satisfactoriamente la causa del aborto posvacunal. No ha sido demostrada ninguna relación entre la hipersensibilidad tipo retardado y el aborto. El número de gestaciones perturbadas tiende a aumentar al mismo tiempo que aumenta el número de reinoculaciones. El período de mayor riesgo es al parecer entre el sexto y noveno mes de gestación. Los trastornos que llevan al aborto o a un parto prematuro ocurren aproximadamente a las diez horas, como mínimo, después de inoculación. La incidencia alcanza su punto más alto de dos a cinco días posvacunación.

main complications following vaccination against foot-and-mouth disease. In the Federal Republic of Germany since compulsory vaccination began in 1967, the frequency of post-vaccinal complications has been between 0.012 and 0.086% of inoculated animals. The cause of post-vaccinal abortion has not yet been satisfactorily explained. No relationship between delayed-type hypersensitivity and abortion has been demonstrated. The number of disturbed pregnancies tends to rise as the number of revaccinations rises. The period between the 6th and 9th month of pregnancy appears to be that of greatest risk. Disturbances of pregnancy leading to abortion or premature delivery occur, at the earliest, some ten hours after vaccination. Peak incidence is at two to five days post-inoculation.

MELEON, R.H. & BRIAIRE, J.

Texto en inglés. *J. gen. Virol.* 51: 107-116, 1980. (*FMD Bull. Wellcome* 20 (1): 81/9, 1981). [Virology Department, Central Veterinary Institute, Houtribweg 39, 8221 RA Lelystad, Netherlands]

**Estudio de los antígenos de reacciones cruzadas sobre el virus aftoso intacto y sus subunidades 12S con antiseros contra las proteínas estructurales**

Se estudiaron las reacciones cruzadas entre dos cepas de virus aftoso pertenecientes a distintos serotipos (A & O), utilizando virus intacto y subunidades víricas y antiseros producidos contra las proteínas estructurales aisladas. Antisero a la proteína VP<sub>1</sub> de tipo O, indicó actividad neutralizante de reacción cruzada en contraste con los sueros cultivados contra virus intacto tipo O. Sin embargo, el antisero contra la VP<sub>1</sub> de tipo A sólo neutralizó virus homólogo. Suero cultivado contra las proteínas estructurales VP<sub>2</sub>, VP<sub>3</sub> y VP<sub>4</sub> no mostró actividad neutralizante. En la prueba inmunoradial y la prueba de inhibición de enzima ligada a un inmunosorbente, sueros contra VP<sub>1</sub>, VP<sub>2</sub> y VP<sub>3</sub> reaccionaron con las subunidades 12S de ambos serotipos. No fue observada ninguna actividad contra VP<sub>4</sub>. Experimentos de competencia con subunidades víricas de tipos O y A indicaron que el suero anti-VP<sub>1</sub> es el de tipo más específico. La reacción cruzada

**A study of the cross-reacting antigens on the intact foot-and-mouth disease virus and its 12S subunits with antisera against the structural proteins**

Cross-reactions between two strains of foot-and-mouth disease virus belonging to different serotypes (A & O) were studied using intact virus and virus subunits and antisera produced against the isolated structural proteins. Antiserum to the type O protein VP<sub>1</sub> showed cross-reactive neutralizing activity in contrast to the sera raised against intact type O virus. However, antiserum to type A VP<sub>1</sub> only neutralized homologous virus. Serum raised against the structural proteins VP<sub>2</sub>, VP<sub>3</sub> and VP<sub>4</sub> did not show neutralizing activity. In the enzyme-linked immunosorbent assay and radioimmunoassay, sera against VP<sub>1</sub>, VP<sub>2</sub> and VP<sub>3</sub> reacted with the 12S subunits of both serotypes. No activity against VP<sub>4</sub> was observed. Competition experiments with virus subunits of types O and A indicated that anti-VP<sub>1</sub> serum is the most type-specific. Anti-VP<sub>2</sub> serum is completely cross-reactive, while anti-VP<sub>3</sub> serum reacted in an intermediate way. The

es completa en el suero anti-VP<sub>2</sub>, mientras que el suero anti-VP<sub>3</sub> reaccionó de una forma intermedia. Las reacciones idénticas obtenidas con anti-VP<sub>2</sub> y las subunidades víricas homólogas y heterólogas sugieren que los antígenos expuestos a la VP<sub>2</sub> son idénticos.

identical reactions obtained with anti-VP<sub>2</sub> sera and the homologous and heterologous virus subunits suggests that the exposed VP<sub>2</sub> antigens are identical.

PIRES PRADO, J.A. & FERREIRA, L.F.C.

Texto en portugués. *Bol. Inst. Pesq. vet. "Desidério Finamor" 5: 17-22, 1978. (FMD Bull. Wellcome 20 (5): 81/52, 1981).* [Instituto de Pesquisas Veterinarias "Desiderio Finamor", Caixa Postal 2076, Porto Alegre, RS, Brasil]

**Caracterización serológica de cepas de fiebre aftosa tipo A procedentes de Rio Grande do Sul (Brasil) en 1976-77**

Fueron comparadas cepas de virus aftoso aisladas de brotes en el Estado de Rio Grande do Sul (A Alegrete 75, A Bagé 76, A Caçapava 76 y A Batovi 76) con aislamientos de campo anteriores procedentes de esta región (A<sub>24</sub> Cruzeiro y A Brasil 70/2) y con una cepa de campo del Estado de São Paulo (A Venceslau 76). Se investigaron las características antigénicas de los virus y su comportamiento inmunológico utilizando la prueba de fijación del complemento. Las cepas A Bagé, A Caçapava y A Batovi demostraron ser estrechamente relacionadas y distintas de la cepa Cruzeiro A<sub>24</sub>. El virus A Venceslau resultó marcadamente distinto de las otras cepas investigadas.

**Serological characterization of foot-and-mouth disease type A strains from Rio Grande do Sul (Brazil) in 1976-77**

Foot-and-mouth disease virus strains isolated from outbreaks in the State of Rio Grande do Sul (A Alegrete 75, A Bage 76, A Caçapava 76 and A Batovi 76) were compared with earlier field isolates from this area (A<sub>24</sub> Cruzeiro and A Brazil 70/2) and with a field strain from the State of São Paulo (A Venceslau 76). The antigenic characteristics of the viruses and their immunological behavior were investigated using the complement fixing test. The A Bage, A Caçapava and A Batovi strains were shown to be closely related and different from the A<sub>24</sub> Cruzeiro strain. The A Venceslau virus was significantly different from the other strains investigated.

SHARMA, S.K.

Texto en inglés. *Vet. Res. Bull. 1 (2): 157, 1978. (FMD Bull. Wellcome 20 (1): 81/2, 1981).* [College of Veterinary Science and Animal Husbandry, Mathura, Uttar Pradesh, India]

**Estudios sobre la fiebre aftosa en ovejas con referencia especial a la distribución de virus y estado portador**

Los signos clínicos de la enfermedad aftosa en ovejas variaban desde casi inadvertidos hasta muy severos. Se detectó virus en la sangre de ovejas inoculadas experimentalmente a las 24 horas post-infección. Durante las primeras etapas de la infección, se encontraron títulos elevados de virus en varios tejidos y órganos, pero tras 8 días, solamente podía detectarse virus en la faringe, amígdalas, paladar, y esófago. Se descubrieron títulos de virus

**Studies on foot-and-mouth disease in sheep with special reference to distribution of the virus and carrier status**

The clinical signs of foot-and-mouth disease in sheep ranged from almost unnoticeable to very severe. Virus was detectable in the blood of experimentally inoculated sheep by 24 hours post-infection. High titers of virus were present in various tissues and organs during the early stages of infection, but after 8 days virus could be detected only in pharynx, tonsils, soft palate and oesophagus. Maximum virus titers were

máximos en el líquido esófago-faríngeo durante el segundo o tercer día después de inoculación por vía intranasal. Se detectó virus por primera vez en secreciones nasales tras 12 a 16 horas y persistió un máximo de 6 días. Fue excretado virus en saliva por un período de cinco días después de inoculación y en excremento hasta cuatro días. No pudo detectarse virus en secreciones de orina o lagrimales de ovejas en contacto con ganado lanar infectado. Hasta un 70% de ovejas que excretaron virus no mostraron signos clínicos de la enfermedad. Aparecieron anticuerpos neutralizantes víricos en el suero de ovejas inoculadas después de 4 ó 6 días y alcanzaron niveles máximos después de 12 a 18 días. Mediante pruebas de inmunodifusión pudieron descubrirse anticuerpos al antígeno VIA a los 12 hasta 16 días y permanecieron perceptibles por espacio de 49 a 70 días. Utilizando la prueba de anticuerpo fluorescente indirecta, se detectaron anticuerpos VIA en los 8 primeros días, permaneciendo perceptibles durante 105 días. La reacción de anticuerpo de ovejas inoculadas fue parecida a la de las ovejas infectadas pero los anticuerpos aparecieron algo más tarde y alcanzaron niveles máximos algo más bajos. No pudo descubrirse anticuerpo al antígeno VIA en ovejas inoculadas. Revacunación resultó en un efecto de refuerzo y las ovejas resistieron al desafío a los 32 días después de la revacunación.

detected in oesophageal-pharyngeal fluid on the second or third day after inoculation by the intranasal route. Virus was first detected in nasal secretions after 12 to 16 hours and persisted for upto six days. Virus was excreted in saliva for upto five days after inoculation and in faeces for upto four days. Virus could not be detected in faeces urine or lacrymal secretions of sheep in contact with infected sheep. Upto 70% of sheep which excreted virus did not show clinical signs of disease. Virus neutralizing antibodies appeared in sera of inoculated sheep after 4 to 6 days and reached peak levels after 12 to 18 days. Antibodies to the VIA antigen could be detected by immunodiffusion tests at 12 to 16 days and remained detectable for 49 to 70 days. Using the indirect fluorescent antibody test, VIA antibodies were detected as early as eight days and remained detectable for 105 days. The antibody response of vaccinated sheep was similar to that for infected sheep but the antibodies appeared somewhat later and reached lower peak titres. Antibody to VIA antigen could not be detected in vaccinated sheep. Revaccination resulted in a booster effect and sheep were resistant to challenge at 32 days after revaccination.

## bibliografía sobre enfermedades vesiculares

## vesicular diseases bibliography

ABU ELZEIN, E.M.E. & CROWTHER, J.R.

Detección y cuantificación de IgM, IgA, IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>2</sub> de anticuerpos contra el virus de la fiebre aftosa provenientes de suero bovino utilizando una prueba de inhibición de enzima ligada a un inmunosorbente. *Texto en inglés.* (Detection and quantification of IgM, IgA, IgG<sub>1</sub> and IgG<sub>2</sub> antibodies against foot-and-mouth disease virus from bovine sera using an enzyme-linked immunosorbent assay). *J. Hyg. (Camb.)* 86: 79-85, 1981. (*FMD Bull. Wellcome* 20 (3): 81/23, 1981). [Animal Virus Research Institute, Pirbright, Woking, Surrey, England]

BOOTHROYD, J.C., HIGHFIELD, P.E., CROSS, E.A.M., ROWLANDS, D.J., LOWE, P.A., BROWN, F., HARRIS, T.J.R.

Clonaje molecular del genoma del virus aftoso y secuencias de los nucleótidos en los genes de las proteínas estructurales. *Texto en inglés.* (Molecular cloning of foot-and-mouth disease virus genome and nucleotide sequences in the structural protein genes). *Nature* 290: 800-802, 1981. (*FMD Bull. Wellcome* 20 (5): 81/50, 1981). [Department of Immunochemistry, Wellcome Research Laboratories, Langley Court, Beckenham, Kent, England]

CARTWRIGHT, B., CHAPMAN, W.G., BROWN, F.

Relaciones serológicas e inmunológicas entre las partículas 146S y 12S del virus aftoso. *Texto en inglés.* (Serological and immunological relationships between the 146S and 12S particles of foot-and-mouth disease virus). *J. gen. Virol.* 50: 369-375, 1980. (*FMD Bull. Wellcome* 20 (1): 81/6, 1981). [Animal Virus Research Institute, Pirbright, Woking, Surrey, England]

DOMINGO, E., DAVILLA, M., ORTIN, J.

Heterogeneidad de la secuencia nucleotídica del ARN de una población natural de virus aftoso. *Texto en inglés.* (Nucleotide sequence heterogeneity of the RNA from a natural population of foot-and-mouth disease virus). *Gene* 11: 333-346, 1980. (*FMD Bull. Wellcome* 20 (3): 81/27, 1981). [Centro de Biológico Molecular, Universidad Autónoma de Madrid, Canto Blanco, Madrid-34, España]

HARESNAPE, J.M.

Localización de sitios antigénicos en los polipéptidos de los cápsides del virus aftoso. *Texto en inglés.* (Location of antigenic sites on the capsid polypeptides of foot-and-mouth disease virus). Ph.D. Thesis, University of Sussex, 1980. (*FMD Bull. Wellcome* 20 (2): 81/16, 1981). [Animal Virus Research Institute, Pirbright, Woking, Surrey, England]

HARRIS, T.J.R.

Comparación de la secuencia nucleotídica en el extremo 5' de los ARNs de nueve virus aftosos, incluyendo los siete serotipos representativos. *Texto en inglés.* (Comparison of the nucleotide sequence at the 5' end of RNAs from nine aphthoviruses, including representatives of the seven serotypes). *J. Virol.* 36: 659-664, 1980. (*FMD Bull. Wellcome* 20 (2): 81/17, 1981). [Animal Virus Research Institute, Pirbright, Woking, Surrey, England]

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

Estudio del nivel de conservación de la secuencia nucleotídica entre los ARNs de dos serotipos del virus aftoso. *Texto en inglés.* (A study of the level of nucleotide sequence conservation between the RNAs of two serotypes of foot-and-mouth disease virus). *J. gen. Virol.* 50: 403-418, 1980. (*FMD Bull. Wellcome* 20 (1): 81/7, 1981). [Biochemistry Dept., Animal Virus Research Institute, Pirbright, Woking, Surrey, England]

KAZIMI, S.E. & SHAH, S.K.

Efectos de la fiebre aftosa en la producción ganadera. *Texto en inglés.* (Effect on production performance in cattle due to foot-and-mouth disease). *Bull. Off. int. Epiz.* 92 (3-4): 159-166, 1980. (*FMD Bull. Wellcome* 20 (4): 81/33, 1981). [Livestock Production Research Institute, Bahadurnagar, Okara, District Sahiwal, Pakistan]

KURZ, C., FORSS, S., KÜPPER, H., STROHMAIER, K., SCHALLER, H.

Secuencia nucleotídica y correspondiente secuencia aminoácida del gene del antígeno principal del virus aftoso. *Texto en inglés.* (Nucleotide sequence and corresponding amino acid sequence of the gene for the major antigen of foot-and-mouth disease virus). *Nucleic Acids Research* 9 (8): 1919-1931, 1981. (*FMD Bull. Wellcome* 20 (5): 81/51, 1981). [Mikrobiologie Universität Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 230, 6900 Heidelberg, West Germany]

PUSTIGLIONE NETTO, L., YIDA, O., DIAS DA SILVA, G.

Efectos del metisoprinol sobre la fiebre aftosa. *Texto en portugués.* (Effect of methisoprinol on foot-and-mouth disease). *Biológico* (S.Paulo) 45 (1-2): 5-10, 1979. (*FMD Bull. Wellcome* 20 (3): 81/20, 1981). [Instituto Biológico, Caixa Postal 7119, São Paulo, Brazil]

RAI, A. & LAHIRI, D.K.

Una prueba inmunosorbente de microenzima marcada (micro ELISA) para la detección de antígeno y anticuerpo de virus aftoso. *Texto en inglés.* (A micro-enzyme-labelled immunosorbent assay (micro-ELISA) for the detection of foot-and-mouth disease virus antigen and antibody). *Acta Virol.* 25: 49-52, 1981. (*FMD Bull. Wellcome* 20 (4): 81/36, 1981). [Indian Veterinary Research Institute, Mukteswar-Kumaon 263138, Uttar Pradesh, India]

RAI, A. & LAHIRI, D.K.

Subtipificación del virus de la fiebre aftosa por la prueba inmunosorbente de microenzima marcada (micro-ELISA). *Texto en inglés.* (Subtyping of foot-and-mouth disease virus by the micro-enzyme-labelled immunosorbent assay (micro-ELISA)). *Acta Virol.* 25: 53-56, 1981. (*FMD Bull. Wellcome* 20 (4): 81/37, 1981). [Indian Veterinary Research Institute, Mukteswar-Kumaon 263138, Uttar Pradesh, India]

WHITESIDE, J.P. & SPIER, R.E.

Aumento a escala desde 0,1 a 100 litros de un sistema de proceso unitario basado en esferas de cristal de 3mm de diámetro para la producción de cuatro cepas de virus aftoso de monocapas de células BHK. *Texto en inglés.* (The scale-up from 0.1 to 100 litre of a unit process system based on 3mm-diameter glass spheres for the production of four strains of foot-and-mouth disease virus from BHK monolayer cells). *Biotech. Bioeng.* 23: 551-565, 1981. (*FMD Bull. Wellcome* 20 (5): 81/55, 1981). [Animal Virus Research Institute, Pirbright, Woking, Surrey, England]

**BOLETIN DEL CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA****INVITACION A LOS AUTORES**

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

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

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

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

**Trabajo de revisión:** Formato flexible.

**INSTRUCCIONES A LOS AUTORES**

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

**COMITE EDITORIAL**

Dr. Raúl Casas Olascoaga, Director  
Dr. Paul Sutmöller, Jefe de los Laboratorios  
Dr. Juan Zapatel, Planif. y Evaluac. de Programas Antiaftosos  
Dr. Felix J. Rosenberg, Epidemiólogo  
Sra. Perla Vaccaro, Secretaria

---

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

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

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

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

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

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

**INSTRUCTIONS TO AUTHORS**

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

**EDITORIAL COMMITTEE**

Dr. Raúl Casas Olascoaga, Director  
Dr. Paul Sutmöller, Chief of Laboratories  
Dr. Juan Zapatel, Planning and Evaluation FMD Programs  
Dr. Felix J. Rosenberg, Epidemiologist  
Ms. Perla Vaccaro, Secretary