

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

A. Alonso Fernández¹, Y.L. Vianna Filho², L.A.E. Durini³, P. Suttmöller¹

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 O₁. Los virus del tipo A analizados por seroneutralización pueden dividirse en dos grupos, uno constituido por el A_{2.4} Cruzeiro, A_{2.4} Argentina/68 y A_{2.7} 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 C₂ Pando y C₃ 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

O₁ 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.

O₁ Caseros—Argentina/67: Cepa aislada de un foco de fiebre aftosa en bovinos vacunados con O₁ Campos, de la provincia de Santa Fe, Argentina, en 1967. Tiene un comportamiento antigénico semejante a la anterior.

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

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

³SELAB - Servicio de Laboratorios, Chorroarín 134, Buenos Aires, Argentina.

O₁ Urubamba-Perú/63: Aislado en 1963 en Perú, de bovinos no vacunados. Es bastante similar a las dos cepas anteriores.

O₁ 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 *O₁ Campos*.

O₁ 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.

A₅ Westerwald/47: Subtipo representativo de Europa.

A₂₄ 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 *A₂₄*. En la actualidad únicamente muestras del pantanal matogrosense (Brasil), Ecuador, Perú, Colombia y Venezuela mantienen las características antigénicas del *A₂₄*.

A₂₄ Argentina/68: Fue aislada en Argentina en 1968 de bovinos vacunados. Predominó en este país hasta 1976.

A₂₇ Cundinamarca-Colombia/76: Se aisló de bovinos vacunados. Es la cepa representativa de Colombia desde 1967. Está muy relacionada con el subtipo *A₅*. Esta característica era más marcada en la cepa *A₂₇ Colombia/67*.

A₃₂ Venezuela/70: Cepa predominante en Venezuela desde 1969 a 1980.

A Venceslau-Brasil/76: Fue colectada de bovinos vacunados con *A₂₄ 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 *A₂₄ 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 *A₂₄ 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.

C₁ GC: Cepa aislada en Holanda en la onda epidémica de 1962.

C₂ 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.

C₂ 997: Cepa responsable por los brotes de 1953 y 1965 en Gran Bretaña.

C₃ 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.

C₃ Indaial-Brasil/71: Virus aislado de bovinos vacunados en el estado de Santa Catarina en 1971 y tiene una aceptable relación con la cepa *C₃ Resende*.

C₄ Tierra del Fuego-Argentina/66: Virus causante de un foco, en 1966, en bovinos no vacunados en Tierra del Fuego.

C₅ 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% (UFC₅₀) 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 BHK₂₁, clon 13, cultivadas en frascos rolantes, a excepción de las cepas C₁ GC y C₂ 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 O₁ Campos, el A₂₄ Cruzeiro y el C₃ Resende.

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

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

^aCepas usadas en el control. En Venezuela el control es realizado con las cepas O₁ Cura y A₃₂ Venezuela.

^bCepas 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 A₅ Westerwald, C₁ GC y C₂ 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 ₁ Camp.	O ₁ Cas.	O ₁ Urub.	O ₁ Cura	O Mag.	O RS
O ₁ Campos-Brasil/58	1,00	0,96	0,67	0,81	0,44	0,37
O ₁ Caseros-Argentina/67	0,87	1,00	0,73	0,92	0,67	0,35
O ₁ Urubamba-Perú/63	0,77	0,88	1,00	0,78	0,48	0,26
O ₁ Cura-Venezuela/71	0,80	0,88	0,65	1,00	0,56	0,29
O ₁ 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 ₁ Camp.	O ₁ Cas.	O ₁ Urub.	O ₁ Cura	O Mag.	O RS
O ₁ Campos-Brasil/58	2,50	2,60	2,46	2,25	1,65	≤ 1,35
O ₁ Caseros-Argentina/67	3,12	3,15	3,00	2,76	1,89	1,86
O ₁ Urubamba-Perú/63	2,85	3,18	3,34	2,67	2,01	1,92
O ₁ Cura-Venezuela/71	2,63	2,73	2,64	2,42	1,80	≤ 1,35
O ₁ 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 ₂)	Sueros hiperinmunes (r ₁)									
	A ₅ West.	A ₂₄ Cruz.	A ₂₄ Arg.	A ₂₇ Cund.	A ₃₂ Ven.	A Venc.	A Bagé	A Arg/79	A Br/79	A RS/81
A ₅ Westerswald/47	1,00	0,51	0,53	0,54	0,23	0,24	0,26	0,60	0,55	0,07
A ₂₄ Cruzeiro-Br/55	0,29	1,00	0,48	0,27	0,15	0,08	0,14	0,49	0,32	0,05
A ₂₄ Argentina/68	0,46	0,61	1,00	0,45	0,27	0,24	0,32	0,76	0,61	0,14
A ₂₇ Cundinamarca-Col/76	0,50	0,37	0,48	1,00	0,14	0,20	0,18	0,52	0,37	0,05
A ₃₂ 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 ₂₄ Cruz.	A ₂₄ Arg.	A Cund.	A Venc.	A Arg/79	A Br/79
A ₂₄ Cruzeiro-Brasil/55	2,68	2,28	1,71	≤ 1,35	≤ 1,53	≤ 1,35
A ₂₄ Argentina/68	2,42	2,97	2,07	≤ 1,43	1,83	≤ 1,50
A ₂₇ 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 ₂)	Sueros hiperinmunes (r ₁)							
	C ₁ GC	C ₂ 997	C ₃ Res.	C ₄ TF	C ₅ Arg.	C ₃ Ind.	C ₂ Pando	C Chaco
C ₁ GC Holanda/62	1,00	0,42	0,28	0,20	0,44	0,32	0,47	0,79
C ₂ 997 Gran Bretaña/53	0,80	1,00	0,38	0,37	0,30	0,47	0,97	0,76
C ₃ Resende-Brasil/55	0,54	0,46	1,00	0,17	0,30	0,54	0,27	0,65
C ₄ Tierra del Fuego-Arg/66	0,37	0,49	0,14	1,00	0,29	0,27	0,28	0,59
C ₅ Argentina/69	0,42	0,34	0,30	0,34	1,00	0,40	0,17	0,63
C ₃ Indaial-Brasil/71	0,67	0,49	0,44	0,25	0,29	1,00	0,38	0,85
C ₂ 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 ₃ Res.	C ₃ Ind.	C ₂ Pando	C Chaco
C ₃ Resende-Brasil/55	2,50	1,70	2,30	1,80
C ₃ Indaial-Brasil/71	1,60	2,20	1,80	≤ 1,40
C ₂ 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 O₁ Campos y comprobados a los 35 días después de la revacunación (DPR). Los valores de seroprotección para los virus O₁ 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 O₁ Campos y comprobados con este virus y el O RS-Brasil/81*

Virus de comprobación	Nº bov. proteg/ usados	Media ISP
O ₁ 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 (DPB₅₀) 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 O₁ Campos, A₂₄ Cruzeiro y C₃ 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 O₁ Campos, O₁ Caseros, O₁ Urubamba y O₁ 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 O₁ 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% (DPB₅₀) entre las cepas A Argentina/68 y A Argentina/79

Dilución de la vacuna	Vac. A ₂₄ 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 ₅₀	> 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 O₁.

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 A₂₄ Cruzeiro, A₂₄ Argentina y A₂₇ 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 A₂₇ Cundinamarca con el A₅ Westerwald. Además, esa relación es mayor con la cepa A₂₇ 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 A₂₄ Argentina/68 y A Argentina/79 por la DPB₅₀ muestran que esta última cepa es dominante, ya que proporciona una relación inmunológica de 0,34, contra $\leq 0,18$ del A₂₄ Argentina/68 (Cuadro 10).

Las cepas del tipo C son las que presentan menores 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 C₂ Pando y C₃ 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 O₁. (Immune response of cattle after vaccination with inactivated foot-and-mouth disease vaccine of 5 strains of subtype O₁). *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).