

# PRUEBA DE LUCAM SIMPLIFICADA EN COBAYOS PARA EL CONTROL DE VACUNA ANTIAFTOSA Y ANALISIS INMUNOLOGICO DE DIFERENTES CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA\*

Mario G. Navarrete S.\*\*  
César A. Lobo A.

## 1. INTRODUCCION

Uno de los procedimientos básicos en el control de la Fiebre Aftosa (F.A.) es el método profiláctico de vacunación periódica y masiva, condicionado, entre otros factores, al empleo de una buena vacuna.

Para el control de calidad, dicho producto debe ser sometido a una serie de pruebas biológicas que aseguren su esterilidad, inocuidad y eficacia.

Entre los métodos de eficacia se cuentan el índice de protección "C" en cobayos, el índice de protección "S" en cultivos celulares, el índice de protección "K" en bovinos y el índice de seroprotección (ISP) en ratones lactantes.

De todas estas pruebas la más indicada es el índice "K", pero la dificultad en la consecución de bovinos libres de anticuerpos contra el virus de la F.A. y su alto costo hacen difícil su realización. De los métodos indirectos restantes, la prueba más indicada es el índice "C" de Lucam en cobayos, el cual requiere un mínimo de 168 animales cada vez que se efectúa una prueba en un lote trivalente de vacuna antiaftosa. Factores tales como dificultad en la consecución simultánea de grandes números de animales, espacio suficiente para su mantenimiento, homogeneidad en edad y peso, costos elevados por alimentación, etc., hacen cada vez más dispendiosa su realización rutinaria, particularmente cuando se piensa analizar la capacidad antigénica de cepas vacunales frente a las varias cepas actuantes en el campo.

---

\* Contribución del Programa de Estudios para Graduados en Ciencias Agrarias UN-ICA y de la División de Ciencias Veterinarias. Adaptación y resumen de la Tesis de grado presentada por el autor principal al Programa para Graduados, como requisito parcial para optar al título de Magister Scientiae.

\*\* Respectivamente: Médico Veterinario, M.S., Laboratorio de Investigaciones Veterinarias de Enfermedades Tropicales (LIVET), ICA, Apartado Aéreo 206, Montería; y Médico Veterinario, Ph.D., Director de la División de Ciencias Veterinarias, Apartado Aéreo 29743, Bogotá

Con el presente trabajo se estudia la utilización de una simplificación al método de Lucam en cobayos que permita con un mínimo de animales valorar la capacidad antigénica de las cepas vacunales prevalentes en las diferentes regiones del país, como indicador de cambio en sus características inmunológicas. Lo anterior ayudaría en la selección de cepas vacunales apropiadas y en la evaluación inmunológica de la distribución de las mismas. Además, el uso de la técnica de seroprotección con el suero de cobayos vacunados y los índices presentados frente a las diferentes cepas de campo podría servir de criterio complementario en la determinación de la capacidad antigénica de los mismos, con la posibilidad de utilizar dicho método cada vez que se realicen las pruebas originales o modificadas de Lucam en cobayos.

## 2. REVISION DE LITERATURA

Uno de los recursos de mayor utilidad en el control de la F.A. es la vacunación masiva de los animales susceptibles a esta enfermedad (Maupas y Perraud, 1969), para lo cual se hace necesario contar con sistemas adecuados de control de eficacia de las vacunas, entre los cuales se destacan las pruebas directas en bovinos tales como el método del índice "K" original (Lucam y Dannacher, 1964), o modificado de Lucam (Dannacher *et al.*, 1972), el cual se correlaciona además con los métodos serológicos indirectos de seroprotección (SP) y seroneutralización (SN). De acuerdo con los resultados obtenidos, se aceptan como vacunas de buena calidad aquellas que presentan un índice "K" modificado igual o superior a 1,5 que deberá corresponder a una protección frente a la generalización podal igual o

superior al 75% (CPFA, 1974; Dannacher *et al.*, 1972 y MacKowiak *et al.*, 1965).

La correlación entre los índices K iguales o superiores a 1,5 y los métodos indirectos de SP y SN, indica que los valores de estos índices no deben ser inferiores a 3,0 y 1,6 respectivamente (Centro Panamericano de Fiebre Aftosa, 1974; Dannacher *et al.*, 1972; Lobo, 1972).

Experimentos sobre más de 10.000 cobayos y 800 bovinos demostraron que el establecimiento de la dosis vacunal 50% en el cobayo para una vacuna anti-aftosa determinada permite reunir información precisa acerca de la actividad del producto aplicado en bovinos (Roumiantzeff *et al.*, 1965 y Terre y Stellmann, 1966). La equivalencia en títulos de anticuerpos en cobayos y bovinos señala al cobayo como un elemento de gran utilidad en el control de vacunas antiaftosas destinadas a los bovinos (MacKowiak *et al.*, 1965).

En Colombia por Resolución No. 1323 de Septiembre 20 de 1973, emanada de la Gerencia General del ICA se dieron a conocer los estatutos y procedimientos por medio de los cuales se controla la esterilidad, inocuidad y eficacia de la vacuna antiaftosa producida en el país. Se establece como criterio de eficacia en prueba sobre cobayos un índice igual o mayor al logaritmo 2,0 (Centro Panamericano de Fiebre Aftosa, 1974).

El análisis de las diferentes variantes del virus de la F.A. presentes en los países afectados es cada vez más importante en la práctica profiláctica, para establecer rápidamente el parentesco entre las nuevas cepas y el virus empleado en la producción de vacuna, indispensable para tomar las medidas necesarias

en caso de brote (Jiranova, 1969; Kuleshova, 1970; Reed y Muench, 1938). Los cultivos celulares, tales como las células BHK (Baby Hamster Kidney), además de servir como medio adecuado en la preparación de la vacuna anti-aftosa, según recomendación de la fundación Wellcome (Lucam y Dannacher, 1964), se utilizan como método indicador para el control de vacuna por evaluación de anticuerpos neutralizantes mostrando una sensibilidad mayor respecto a bovinos y ratones (Anderson *et al.*, 1970 y Cowan, 1969).

Algunos investigadores (Wagner y McVicar, 1970), compararon las pruebas de microneutralización y de seroprotección en ratón lactante encontrando semejanza en los títulos infectantes con un coeficiente de correlación igual a 0,7435. El método de cultivo de tejidos en microplatos para examen de anticuerpos neutralizantes, es más sensible, uniforme y económico que la neutralización (Helmke *et al.*, 1970).

### 3. MATERIALES Y METODOS

Se seleccionaron seis cepas representativas de diferentes zonas ecológicas del país y causantes de brotes recientes de importancia epidemiológica, así:

- Cepa A27-6304: aislada en 1971 en la zona de Riohacha (Guajira) utilizada actualmente en la preparación de la vacuna.
- Cepa A27/67 del CPFA: correspondiente a la cepa de referencia del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (CPFA).
- Cepa A32-7070: aislada en Valledupar (Cesar) en 1973.

- Cepa A Sabana 7510: aislada en el municipio de Cota (Cundinamarca) en 1974.
- Cepa A Sabana 7742: aislada en Madrid (Cundinamarca) en 1975.
- Cepa A27-7372: aislada en Cartago (Valle) en 1974.

Para la tipificación y subtipificación se utilizó la prueba de fijación de complemento según Brooksby (1948), modificada por Camargo *et al.* (1950), siguiendo recomendaciones del CPFA (1974).

Cada una de las cepas fue adaptada a cobayo y células BHK 21 por medio de pases sucesivos. Para la titulación en células, se utilizó el sistema de microtécnica (MT) en platos plásticos de 96 celdas (Inc. Disposo Trays Modelo IS-FB-96-TC Linbro Chemical Co. New Haven, Conn U.S.A.). La simplificación de la técnica del índice "C" de Lucam, consistió básicamente en la reducción en el número de animales necesarios para su ejecución en razón a utilizar solamente como dosis única de virus 100 DGC 50% (Dosis Generalizante Cobayo 50%) equivalente al logaritmo 2,0 cifra límite tomado para la aceptación o rechazo de la vacuna (CPFA, 1974) en la prueba completa (Lucam y Dannacher, 1964).

Para el trabajo con cada cepa, se vacunaron cinco animales por grupo con la vacuna anti-aftosa hidroxisaponinada de uso en bovinos (Vecol Registro ICA 1129. Lote 012) por vía subcutánea en dosis de 0,5 ml. A los 21 días post-vacunación, se inoculó la cepa viral por vía intradermoplantar (IDP) en dosis de 100 DGC 50%, tanto al grupo vacuna como a otro grupo control de cinco

animales no vacunados. Las lecturas se hicieron cada 24 horas hasta las 120 horas con el objeto de observar presencia o ausencia de lesión generalizante.

Igualmente se vacunó un grupo adicional de 20 animales con el objeto de obtener a los 21 días, suero inmune antivacuna aftosa, necesario para las pruebas posteriores de SP y SN. Con el objeto de establecer controles de dosis virales y darle más seguridad a la prueba simplificada, se utilizaron también grupos de animales vacunados y controles no vacunados con inoculación de 1; 10; 1000 y 10.000 DGC 50% para cada una de las seis cepas virales.

Como control comparativo de la prueba en ensayo, se tomó el ISP en ratones lactantes, aceptado internacionalmente como método indirecto de control de vacuna antiaftosa (CPFA, 1974; Dannacher *et al.*, 1970; Maupas y Perraud, 1969). Se inocularon ratones de 6 a 7 días vía subcutánea con 0,1 ml de suero inmune antivacuna aftosa previamente inactivado a 56°C por 30 minutos. Una hora más tarde se inoculó 0,1 ml de cada una de las diferentes diluciones virales vía intraperitoneal. Las lecturas se hicieron hasta los 10 días realizándose los cálculos de acuerdo con el sistema de Reed y Muench (Guy y Fisher, 1963 y Reed y Muench, 1969). También se ensayó la prueba de SN por el sistema MT con cultivos de células BHK 21, pensando en su posible utilización en pruebas de control de vacuna antiaftosa. Partes iguales de virus (0,05 ml) y suero diluido (0,05 ml) fueron colocadas en los orificios de las microplacas y con incubación a 37°C por 30 minutos. Después de este tiempo, se colocaron las células BHK 21 en concentración de 20.000/0,05 por orificio, incubándose las placas a 37°C por 72

horas al término de las cuales se hicieron las lecturas bajo el microscopio basadas en el efecto citopático (ECP)

#### 4. RESULTADOS

Los títulos de las cepas en cobayos fluctuaron entre 5,0 y 6,4, logaritmo base 10 por un ml y en células BHK 21 entre 5,3 y 6,2 por ml. Estas cifras indican un buen poder infectante de las cepas, al quedar por encima de 4,0, margen mínimo requerido en la prueba. También hubo uniformidad del título entre las varias cepas por los dos sistemas indicadores, lo cual es importante para facilitar los trabajos comparativos.

Los resultados de la prueba de Lucam se pueden observar en la Tabla 1 y Figura 1 en las cuales aparecen los datos de los grupos vacunados y no vacunados o controles. Las columnas oscuras en la tabla indican los porcentajes de generalización para los dos grupos y los porcentajes de protección frente a 100 DGC 50% de cada una de las cepas virales. Las dosis reales empleadas en la prueba, aparecen en la última columna. Para la obtención de las dosis reales, se usó un sistema de cálculo parecido al utilizado en trabajos con MT (Lobo, 1975b y Wagner y McVicar, 1970).

La Figura 2 muestra cómo la vacuna frente a la cepa homóloga A 27-6304, presenta un porcentaje de protección del 100% como era de esperarse, mientras que con la cepa de referencia del CPFA, solamente muestra una cobertura del 40%. Frente a las demás cepas la vacuna protege en un 80% quedando por encima del límite de efectividad (75%)

TABLA 1 Resultados de la prueba simplificada de Lucam en cobayos para control de vacuna antiaftosa.

	Cobayos testigos no vacunados						Cobayos vacunados									Dosis real utilizada en la prueba
	Generalización Lesiones podales			Porcentaje Generalización			Generalización Lesiones podales			Porcentaje Generalización			Porcentaje Protección			
DGC/50%	1	10	100	1	10	100	100	1000	10,000	100	1000	10,000	100	1000	10,000	
A27 - 6304	2/5	5/5	5/5	40	100	100	0/5	3/5	3/5	0	60	60	100	40	40	80
A27 - CPFA	4/5	5/5	5/5	80	100	100	3/5	4/5	5/5	60	80	100	40	20	0	200
A32 - 7070	3/5	4/5	5/5	60	80	100	1/5	1/5	2/5	20	20	40	80	80	60	80
AS - 7742	3/5	5/5	5/5	60	100	100	1/5	2/5	3/5	20	40	60	80	60	40	125
AS - 7510	4/5	5/5	5/5	80	100	100	1/5	4/5	4/5	20	80	80	80	20	20	200
A27 - 7372	3/5	4/5	5/5	60	80	100	1/5	1/5	2/5	20	20	40	80	80	60	80

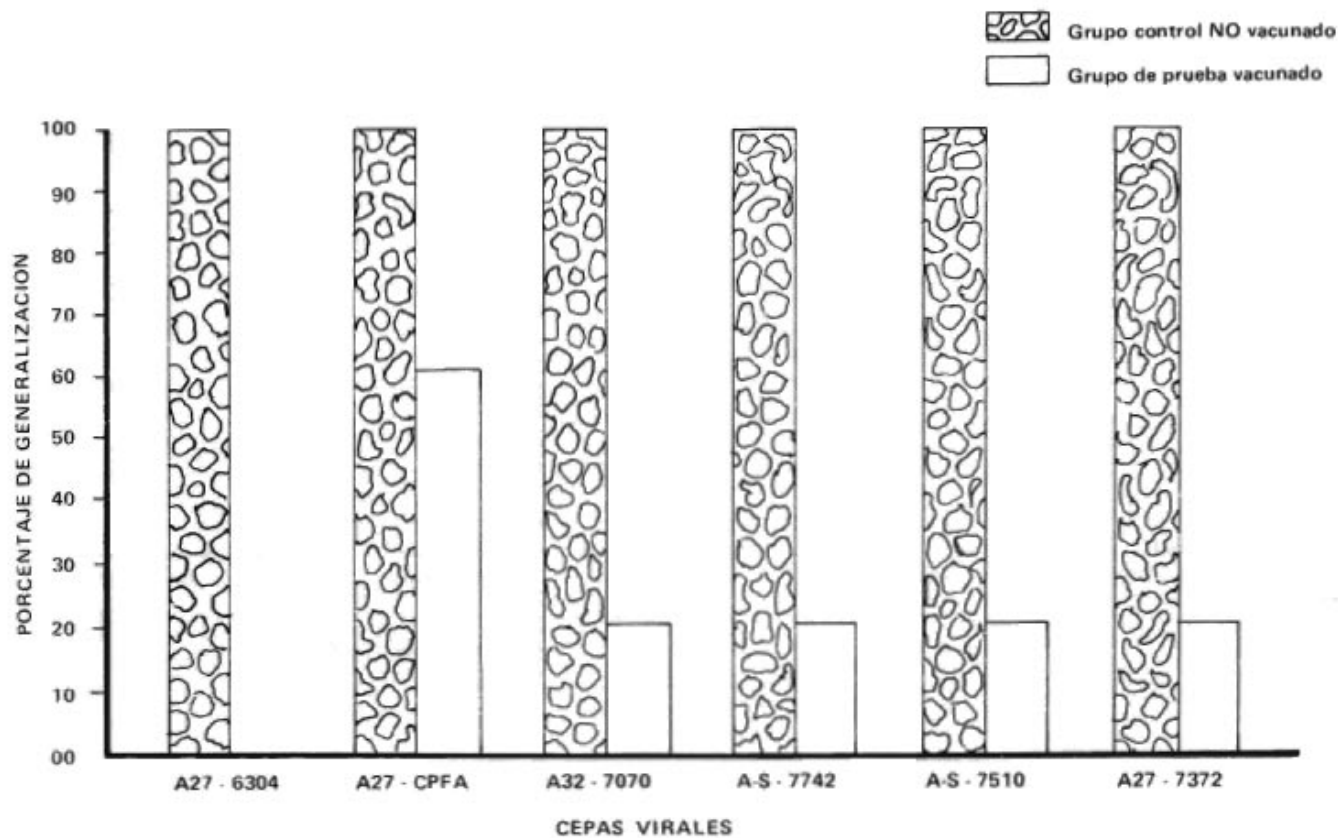


FIGURA 1. Comparación en porcentaje de lesión generalizante en cobayos entre las diferentes cepas de virus aftoso utilizando 100 DGC50%.

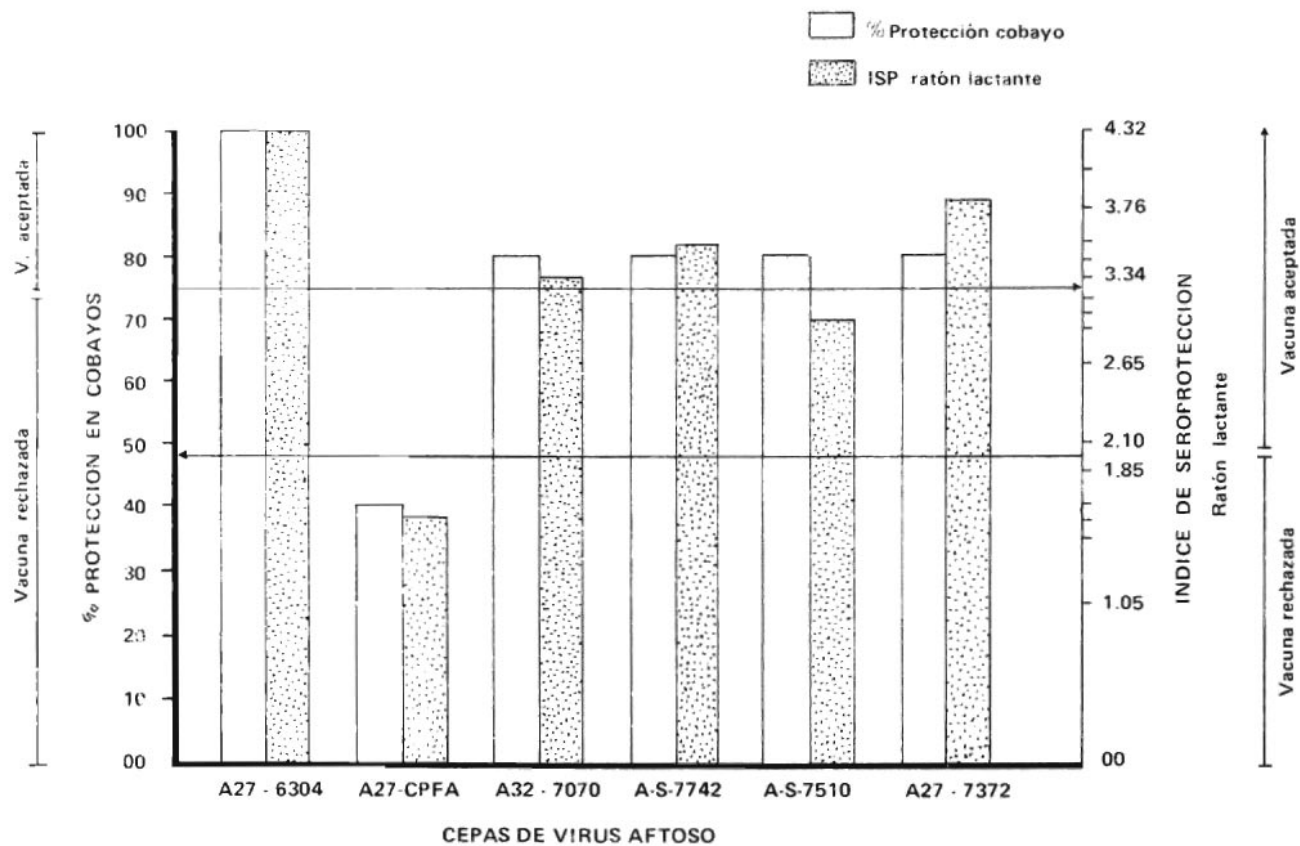


FIGURA 2. Comparación entre valores de aceptación y rechazo de vacuna por porcentaje de protección en cobayos e índice de seroprotección en ratones.

Ante el desconocimiento del poder antigénico de la vacuna y teniendo en cuenta que con algunas cepas, superara al margen de 100 DGC 50%, se amplió la cantidad de virus a 1 000 y 10.000 DGC 50%. En la Tabla 1 se encuentra los resultados correspondientes. En la Tabla 2, se presentan los títulos obtenidos para la prueba de SP en ratón lactante tanto en el grupo vacunado (V) como en el grupo testigo (T). Los porcentajes de protección se calcularon en base al resultado de la cepa homóloga A 27-6304. En la Tabla 3 se observan las seis repeticiones correspondientes a la prueba SN.

En todos los casos, las pruebas se realizaron con un cálculo previo de 50 DECP 50% por virus. Sin embargo los controles de dosis para cada prueba arro-

jaron cifras diferentes a las calculadas tal como aparece en las columnas correspondientes a la letra D. Los índices neutralizantes (IN) correspondientes a la dosis igual o menor a 120 y los correspondientes a dosis iguales o mayores a 20 se representan en sombra. Con la cepa A 32-7070 se observa frecuentemente un IN mayor o igual ( $\geq$ ) al valor presentado, lo cual significa que en la última dilución de suero empleada se observó efecto de neutralización viral, calculándose el valor respectivo con base a este resultado. En la Tabla 3 se aprecia un IN para la cepa A 32-7070 muy alto con relación a las cepas restantes; en cambio la cepa homóloga A 27-6304 que debería aparecer con el mayor IN, presenta la cifra más baja. Esos resultados están en desacuerdo con los encontrados en la prueba simplificada de Lucam y de ISP en ratones.

TABLA 2. Resultados de la prueba de seroprotección en ratón lactante.

	T	V	ISP T/V	% Protección*
A27 - 6304	6,22	1,90	4,32	100
A27 - CPFA	6,80	5,20	1,60	37,03
A32 - 7070	6,80	3,50	3,30	76,38
AS - 7742	7,00	3,50	3,50	81,01
AS - 7510	7,74	4,66	3,08	71,29
A27 - 7372	7,46	3,64	3,82	88,42

T = Título testigos, base 10

V = Título vacunados, base 10

ISP = Índice de seroprotección

\* = % Sacado en base al mayor ISP.

TABLA 3. Resultados de las Pruebas de Sero-Neutralización (SN) por Microtécnica (MT) hecha sobre células BHK-21 para las seis cepas en estudio frente al suero inmune antivacuna antiáfosa.

No. prueba	1		2		3		4		5		6		Promedios	
	D	IN	D	IN	D	IN	D	IN	D	IN	D	IN	D	IN
A27 - 6304	4,0	1,52	8,0	1,20	30,0	1,05	190,0	1,07	38,0	1,30	177	1,1	74,5	1,20
A27 - 67 CPFA	2,5	1,45	42,0	1,12	9,0	1,20	21,0	0,97	5,3	2,07	68	0,8	24,6	1,26
A32 - 7070	0,5	> 2,20	15,0	> 2,20	0,0	0,00	56,0	2,75	7,1	> 3,18	110	2,1	37,7	≥ 2,48
A27 - 7372	2,0	1,37	81,0	1,15	10,0	1,50	21,0	1,20	5,5	1,50	100	1,0	36,5	1,28
A Sab - 7510	1,5	1,45	89,0	1,22	11,0	1,57	17,0	1,32	13,0	1,92	177	1,0	51,4	1,41
A Sab - 7742	6,0	1,50	81,0	1,42	2,0	1,70	13,0	1,20	3,6	2,18	82	1,0	31,2	1,50

D = Número de dosis utilizados en cada prueba

IN = Índice de Neutralización.

## 5. DISCUSION

Con la prueba de Lucam simplificada se reduce en tres o cuatro veces el número de cobayos necesarios para una prueba completa (Kuleshova, 1970), ya que en lugar de utilizar un número elevado de animales para las varias diluciones, solamente se requeriría el necesario para la dilución correspondiente a 100 DGC 50%, que corresponde al logaritmo 2 de base 10, índice límite mínimo de protección en cobayos (índice C de Lucam) establecido para la vacuna anti-aftosa (CPFA, 1974). De esta manera se obtiene una apreciable economía en tiempo y costos facilitándose el control de vacunas, sometidas a condiciones de dudosa conservación.

En la Figura 1 la diferencia observada entre el porcentaje de generalización en los grupos de animales vacunados y no vacunados, refleja la protección conferida por la vacuna en ensayo frente a las diferentes cepas de virus aftoso utilizadas. El grado de protección diferente conferido por la vacuna frente a las cepas homóloga de vacuna A 27-6304, de referencia A 27-CPFA, homóloga de campo A 27-7372 y heterólogas de campo A 32-7070, A Sabana 7742 y A Sabana 7510 demuestra que la prueba de Lucam simplificada permite diferenciar el carácter de protección o no protección frente a determinadas cepas aunque es posible que el grado de diferenciación no alcance a ser establecido.

La igualdad de resultados frente a las cepas A-7070, A-7742, A-7510 y A-7372 puede encontrar su explicación en uno o varios de los factores siguientes: amplio espectro de la cepa vacunal frente a subtipos diferentes, lo cual puede deberse en parte a su reciente elaboración con aumento de su poder neutralizante; especificidad de tipo pero

no de subtipo de los anticuerpos inducidos por la vacuna, asumiéndose que el carácter de especificidad pueda estar más relacionado con determinadas cepas; poca sensibilidad de la prueba para detectar diferencias inmunológicas significativas entre cepas. El objetivo complementario de establecer el grado de diferenciación inmunológico entre cepas podría lograrse por un proceso de evaluación diferencial de lesiones en cada una de las extremidades de los cobayos inoculados.

Respecto al posible grado de inespecificidad al momento de la prueba Cowan (1969) y Wagner y Cowan (1971) a través de estudios con variantes antigénicas del virus de la F.A. demostraron que la diferenciación de variantes sólo podía ser hecha con sueros de cobayo que contuviesen anticuerpos de tipo 19S presentes al comienzo de la fase de inmunización, mientras que con sueros ricos en anticuerpos de tipo 7S, no se lograba una diferenciación entre las variantes.

Utilizando 1.000 DGC 50% en lugar de 100 DGC 50%, cabe el error de exceso de virus, puesto que la prueba si se basa en la no producción de generalización frente a la cepa homóloga de vacuna (A 27-6304), con 1.000 DGC 50% estaría mostrando un 60% de generalización (Tabla 1). Por otra parte, si se hubiesen utilizado 10 DG 50%, se habría presentado el problema de insuficiencia en la dosis de virus, ya que no se partiría de una base máxima límite del 100%, salvo en algunas de las cepas con un 80% de generalización (Tabla 1).

De todas maneras los resultados deben interpretarse con cautela ya que este tipo de prueba da una indicación de la calidad de la vacuna en una especie diferente a la bovina en un momento

dado, cuyos resultados difícilmente pueden extrapolarse a todo el período de duración del producto. Además, los valores protectivos frente a los virus homólogos y heterólogos pueden diverger a medida que aumenta el tiempo entre la vacunación y la exposición a un virus de campo. En bovinos inmunizados con vacuna Frenkel no se observaron diferencias significativas en los niveles de anticuerpos frente a la cepa homóloga A 6304 y el virus heterólogo A 18 (Lobo, 1975a); pero en un experimento de protección frente a la cepa A-6304 y el subtipo A Sabana 74, se evidenció una diferencia significativa en la respuesta frente a ambos virus a medida que aumentaba el tiempo transcurrido desde la última vacunación (Lobo, 1975b).

Los porcentajes de protección frente a cada una de las seis cepas de virus fueron comparativamente similares tanto en la prueba de Lucam simplificada como en la prueba ISP en ratones lactantes con suero de cobayo (Figura 2) semejanza estadísticamente significativa por análisis de varianza ( $p > 0,95$ ) y que indica que la prueba de Lucam simplificada presenta un margen aceptable como prueba complementaria en el control de vacuna antiaftosa.

Los valores diferentes del ISP frente a las varias cepas y su correlación con los valores en cobayos señalan aún más el valor de esta prueba en la diferenciación de las varias cepas en estudio y sugieren la posibilidad de su realización cada vez que se lleve a cabo una determinación de potencia de vacuna en cobayos, cuyo valor depende de una buena disponibilidad de un cepario que incluya virus representativos de los principales subtipos prevalentes en el campo.

No fue posible estandarizar la prueba de seroneutralización para su utilización

en el control de vacuna antiaftosa con sueros de cobayo, debido posiblemente a factores tales como dificultad en la lectura de los ECP por efecto tóxico del suero de cobayo sobre las células BHK 21. Como este efecto desaparece con diluciones de suero mayores a 1:8, una de las formas de lograr la detección de anticuerpos neutralizantes, sería aumentar su concentración preparando suero hiperinmune o utilizando clones celulares de mayor resistencia a condiciones adversas.

## 6. CONCLUSIONES

La prueba propuesta de Lucam simplificada efectuada sobre cobayos para el control de vacuna antiaftosa, presentó resultados correlativos con la prueba del índice de seroprotección (ISP) en ratones lactantes, comprobándose su factibilidad de uso como prueba complementaria y presuntiva para juzgar sobre la capacidad protectora de determinada vacuna frente a virus presentes en el campo.

Con la prueba de Lucam simplificada se puede determinar en forma cualitativa la posible protección o no protección conferida por la vacuna frente a una o varias cepas de virus de campo.

La prueba de seroprotección, utilizando sueros de cobayos vacunados, dada su correlación con el índice C en cobayos, permite obtener datos valiosos complementarios de protección frente a un número ilimitado de cepas que se desee incluir en prueba.

La prueba de seroneutralización por microtécnica, no se recomienda como método evaluativo del comportamiento de la vacuna antiaftosa, hasta tanto no se aclaren aspectos relacionados con el montaje de la misma.

## 7. RESUMEN

Se ensayó una prueba simplificada del índice C de Lucam en cobayos para el control de vacuna antiaftosa, reduciendo hasta en cuatro veces el número de animales necesarios y utilizando como dosis única de descarga viral, 100 dosis generalizantes cobayo 50% (DGC 50%), en los grupos de animales vacunados (V) y testigos (T) no vacunados.

La prueba se montó frente a seis cepas de virus de la Fiebre Aftosa tipo A, de reciente aislamiento y representativas de diferentes zonas ecológicas del país, realizándose paralelamente con la prueba un estudio inmunológico diferencial sobre la actividad de la vacuna frente a cada una de las cepas virales.

Se ensayaron además como pruebas de control a partir del suero de cobayos vacunados, la seroprotección en ratones lactantes (SP) y la neutralización por microtécnica (MT) sobre cultivos de células BHK 21.

Por análisis estadístico de los resultados, se encontró una alta correlación ( $r = 0,96$ ) entre la prueba de Lucam simplificada en ensayo y la prueba patrón de SP; por lo que se considera que la prueba en cobayo puede ser aceptada como complementaria en el control de la vacuna antiaftosa.

A pesar de que con la prueba de Lucam simplificada utilizando 100 DG 50% no se logra determinar el grado de diferenciación inmunológica entre las varias cepas en estudio, es posible que su empleo permita evidenciar si la cepa vacunal protege o no protege frente a las diferentes cepas actuantes en el campo.

La utilización de la prueba MT como criterio complementario de control y de

diferenciación de cepas depende de su posible ajuste para lo cual se sugieren una serie de pruebas adicionales.

## 8. SUMMARY

**Simplified Lucam test in Guinea pigs for the control of foot-and-mouth disease vaccine and immunological analysis of different strains of foot-and-mouth disease virus.**

A simple Lucam's C index test in Guinea pigs for Foot-and-mouth Disease vaccine potency testing was assayed in which the number of Guinea pigs was reduced four times from the usual Lucam test. One hundred fifty percent guinea pig generalizing dose (GGD 50%) was used both in vaccinated (V) and in non vaccinated (C) guinea pigs.

The test was carried out with six Foot-and-mouth disease virus type A strains recently isolated and representing different ecological zones of Colombia. At the same time a differential immunological study of the activity of the vaccine against each strain was performed.

As a control, seroprotection in suckling mice and microneutralization (MT) in BHK 21 tissue culture cells using sera from vaccinated guinea pigs were also assayed.

Statistical analysis showed a high correlation ( $r = 0,96$ ) between the simple Lucam's test and the seroprotection test; for this reason the former might be accepted as a complementary test in the potency test controlling of Foot-and-mouth disease vaccines.

Despite the fact that utilizing 100 GGD 50% in the simple Lucam's test was not possible to distinguish the degree of immune differences among the various strains studied, it is possible that its use evidence whether the vaccine may

protect or not against virus strains present in the field.

The use of the MT as a complementary criterium of control and strain differentiation depends on its future adjustment.

## 8. BIBLIOGRAFIA

1. ANDERSON, E.C.; P.B. CAPSTICK and G.N. MOWAT. 1970. In vitro methods for safety testing of Foot-and-mouth disease vaccines. *J. Hyg. Camb.* 68(2):159-172.
2. BROOKSBY, J.B. 1948. Vesicular stomatitis and Foot-and-mouth disease differentiation by complement fixation. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 63:254.
3. CAMARGO, N.F.; EICHORN, E.A.; LEVINE, J.M. and TELLEZ, G.A. 1950. A complement fixation technique for Foot-and-mouth disease and vesicular stomatitis. *Ann. Meet. Am. Vet. Med. Assoc.* 87th, Mexico, Proceeding. pp. 207-211.
4. CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA (CPFA). 1974. Manual de procedimientos para el control de las vacunas antiaftosas. Río de Janeiro, Brasil. 32 p.
5. COWAN, K.M. 1969. Immunochemical studies of Foot-and-mouth disease. Antigenic variants of virus demonstrated by immunodiffusion analysis with 19S but not 7S antibodies. *J. of Exp. Med.* 192(2):333-350.
6. DANNACHER, G.; FEDIDA, M.; THOMAS, L.P.; COUNDERT, M. et PEILLON, M. 1970. Controle d'innocuite du vaccin antiaphteux sur culture cellulaires. *Rec. Med. Vet.* 146(12):1395-1413.
7. ----- A.I. GOMEZ; A. VIEIRA. 1972. Control de vacunas antiaftosas. Relación entre el índice K (modificado) y los índices de seroprotección y seroneutralización. *Bol. Cent. Pan. Fiebre Aftosa.* 6:1-16.
8. GUY, R.E. y E.F. FISHER. 1963. Cálculos y fórmulas matemáticas a emplearse en trabajos con virus aftoso y en el estudio y elaboración de vacunas antiaftosas. *Gaceta Veterinaria* 26(163):60-80.
9. HELMKE, R.J.; R.L. HEBERLING and S.S. KALTER. 1970. Technique for viral neutralization antibody surveys in primary microcultures. *Appl. Microb.* 20(6):986-988.
10. JIRANOVA, M. 1969. Evaluación del antisuero de la Fiebre Aftosa por la prueba de neutralización. *Vet. Bull.* 39(4):1562.
11. KULESHOVA, L.A. 1970. Prueba en cobayos para la potencia de vacunas antiaftosas de hidróxido de aluminio formolizadas. *Cuadernos del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa.* 7(2):54.

12. LOBO, C.A. 1972. Comparative studies of four different subtypes of Foot-and-mouth disease virus type A. M.S. Thesis. University of Wisconsin Madison, Wisconsin, USA (Mecanografiada).
13. -----, 1975a. Studies of the antibody response of Colombian cattle and swine to Foot-and-mouth disease virus. Ph.D. Thesis. University of Wisconsin, Madison, Wisconsin, USA.
14. -----, 1975b. Informe preliminar a la Subgerencia de Producción Pecuaria sobre el virus A Sabana 74. 12 h. (Mimeografiado).
15. LUCAM, F. et G. DANNACHER. 1964. Mesure de l'immunité antiaphteuse post-vaccinale du boeuf, par épreuve sur le cobaye. *Rev. Med. Vet.* 115(4):225-246.
16. MACKOWIAK, C.; LANG, R.; PETERMANN, H.G.; ROUMIANTZEFF, M.; FONTAINE, L. et STELLMANN, C. 1965. Contrôle quantitatif du vaccin antiaphteux. Titrage des anticorps neutralizants chez les cobayes vaccinés. *Rev. Med. Vet.* 116(7):497.
17. MARTINS, A. 1971. Vacunas antiaftosas hidróxido-saponinadas inactivadas por formol. Centro Paramericano de Fiebre Aftosa. Boletín No. 1 p 1.
18. MAUPAS, P. y J. PERRAUD. 1969. Investigaciones sobre seroneutralización en ratones lactantes empleados para medir la inmunidad antiaftosa post-vacunal en bovinos. *Bull. Off. Epiz.* 71(3-4):509-517.
19. REED, L.J. and MUENCH, H.A. 1938. A simple method of estimating fifty percent end points. *Amer. Jour. Hyg.* 27:493-497.
20. ROUMIANTZEEFF, M.; FONTAINE, J.; STELLMANN, C. et MACKOWIAK, C. 1965. Contrôle quantitatif du vaccin anti-aphteux. Détermination de la dose vaccinante 50% chez le cobaye. *Rev. Med.* 116(8-9):597.
21. TERRE, C. et STELLMANN, C. 1966. Contrôle quantitatif du vaccin antiaphteux inactif monovalent sur cobayes. Etude de la loi dose effect et equivalence entre les doses vaccinales 50% chez les cobayes et le pourcentage de protection chez les bovins. Lyon, Instituto Francaise de la Fievre Aphteuse. pp. 373-402.
22. WAGNER, G.C. and J.W. McVICAR. 1970. Foot-and-mouth disease virus antibodies: Comparison of a tissue culture microneutralization test with the assay in suckling mice. *Appl. Microb.* 20(6):995-997.
23. ----- and K.M. COWAN. 1971. Immunochemical studies of Foot-and-mouth disease. IX. Differences in neutralizing activities of guinea pigs and bovine 19S and 7S antibodies. *J. of Imm.* 106(3):656-660.