



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA**

Valdenia Lopes da Silva Gonçalves

**VERIFICAÇÃO DE DESEMPENHO DO ENSAIO DE NEUTRALIZAÇÃO  
VIRAL PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS PARA O VÍRUS DA  
FEBRE AFTOSA**

**Belo Horizonte**  
**Fevereiro de 2019**

Valdenia Lopes da Silva Gonçalves

VERIFICAÇÃO DE DESEMPENHO DO ENSAIO DE NEUTRALIZAÇÃO  
VIRAL PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS PARA O VÍRUS DA  
FEBRE AFTOSA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Microbiologia.

Orientação: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Giliane de Souza Trindade

Co-orientador: Dr. Marcelo Fernandes Camargos

**Belo Horizonte**

**Fevereiro de 2019**

- 043      Gonçalves, Valdenia Lopes da Silva.  
Verificação de desempenho do ensaio de neutralização viral para detecção de anticorpos para o vírus da Febre Aftosa [manuscrito] / Valdenia Lopes da Silva Gonçalves. – 2019.  
122 f. : il. ; 29,5 cm.
- Orientação: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Giliane de Souza Trindade. Co-orientador: Dr. Marcelo Fernandes Camargos.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-graduação em Microbiologia.
1. Microbiologia. 2. Febre Aftosa. 3. Testes de Neutralização. 4. Ensaio de Imunoadsorção Enzimática. 5. Vacinação. I. Trindade, Giliane de Souza. II. Camargos, Marcelo Fernandes. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 579



**UFMG**  
2014 ICROBIOLOGIA  
MESTRADO PROFISSIONAL

Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Aplicada  
Mestrado Profissional

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO PROFISSIONAL DE VALDENIA LOPES DA SILVA GONÇALVES

Às 9 horas do dia 15 de fevereiro de 2019, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Microbiologia da UFMG, a Comissão Examinadora composta pela Profa. Maria Isabel Maldonado Coelho Guedes, Escola de Veterinária – UFMG; Dr. Pedro Augusto Alves do Centro de Pesquisa Rene Racho-FIOCRUZ- MG e a Prof.ª Giliane de Souza Trindade, orientadora deste Programa, para julgar o trabalho final, "Verificação de desempenho do ensaio de neutralização viral para detecção de anticorpos para o vírus da Febre Aftosa", da candidata Valdenia Lopes da Silva Gonçalves, requisito final para obtenção do grau de MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profa. Erna Geessien Kroon – Coordenadora do Programa, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares, passou a palavra à candidata, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Em seguida, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata, e do público, para julgamento e expedição de resultado final. A candidata foi considerada APROVADA. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 15 de fevereiro 2019.

Profa. Maria Isabel Maldonado Coelho Guedes

Dr. Pedro Augusto Alves

Guiliane de Souza Trindade (Orientadora)

Prof. Erna Geessien Kroon

Coordenadora

Prof.ª Dr.ª Erna Kroon  
Depto. Microbiologia, ICB/UFMG

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela dádiva da vida e por me permitir realizar tantos sonhos nesta existência. Obrigado por me permitir errar, aprender e crescer, por Sua eterna compreensão e tolerância, por Seu infinito amor, que não me permitiu desistir e principalmente por ter me dado uma família tão linda e especial. Meu pai, minha mãe, meus queridos irmãos, minha linda sobrinha e afilhada, um agradecimento mais que especial. Ainda não descobri o que eu fiz para merecer tanto.

Ao meu marido e eterno namorado, Pedro Henrique, sempre paciente e incentivador.

Ao meu amor, agradeço o apoio e todos os momentos felizes sempre juntos.

À professora Giliane Trindade, pela orientação, competência, profissionalismo e dedicação tão importantes que tornaram possível este trabalho.

A professora Erna Kroon, por tamanha competência, dedicação e incentivo ao Mestrado Profissional.

Aos membros da banca examinadora, Professora Maria Isabel Maldonado Coelho Guedes e ao Professor Pedro Augusto Alves, que tão gentilmente aceitaram participar e colaborar com esta dissertação.

À UFMG em especial ao ICB, por me oportunizar um aperfeiçoamento gratuito e de excelência.

E um agradecimento especial a todos do LANAGRO, especialmente aos colegas do LDDV, que me receberam com tanto carinho há quase cinco anos atrás. Aládio, Isabela, Anselmo, Anapolino, Marconi, Tatiana, Jacqueline, Amanda, Pádua, a minha companheira do laboratório de biossegurança Aline, e em especial ao meu co-orientador, que proporcionou a oportunidade da realização deste trabalho, Marcelo Fernandes Camargos.

*E aprendi que se depende sempre  
De tanta, muita, diferente gente  
Toda pessoa sempre é as marcas  
Das lições diárias de outras tantas pessoas*

*E é tão bonito quando a gente entende  
Que a gente é tanta gente onde quer que a gente vá  
E é tão bonito quando a gente sente  
Que nunca está sozinho por mais que pense estar*

**Gonzaguinha**

## RESUMO

O Brasil é um dos países com maior destaque internacional no agronegócio, devido ao aumento crescente das exportações nesse setor. Uma das doenças de maior impacto para a pecuária nacional é a Febre Aftosa (FA), que tem grande importância social e econômica. A FA é uma doença viral altamente infecciosa, de alta disseminação que acomete animais biungulados, de casco fendido, que causa febre, claudicação, lesões vesiculares nas patas, língua, focinho e tetas. É considerada uma barreira sanitária para o comércio internacional, e demanda elevados investimentos para controle e prevenção. O *Foot-and-Mouth disease virus* (FMDV) possui sete sorotipos, que são imunologicamente distintos, O, A, C, SAT-1, SAT-2, SAT-3 e Ásia 1, sorotipos que não são distribuídos uniformemente no mundo. Os sorotipos O, A e C, tem a maior distribuição e foram responsáveis por surtos, especialmente no Brasil. Métodos sorológicos para diagnóstico e avaliação do FMDV, como o teste de neutralização viral (NV), tornam-se imprescindíveis para diagnóstico da infecção e avaliação da eficácia das vacinas utilizadas. O objetivo deste trabalho foi verificar o desempenho do método de NV, a partir da avaliação de amostras de soros de bovinos vacinados com a vacina para FA produzidas no Brasil. As amostras foram coletadas após 28 dias da vacinação e 28 dias após reforço. Foi possível verificar o desempenho do método de neutralização viral de anticorpos para o FMDV de maneira satisfatória. Os resultados de incerteza de medição, repetitividade e reprodutibilidade ficaram dentro dos limites esperados, comprovando a eficácia e garantindo a qualidade do método de ensaio. O teste piloto de avaliação da potência da vacina para FA realizado por ELISA, alcançou uma Expectativa Percentual de Proteção (EPP) acima de 99% para os três sorotipos vacinais, comprovando a eficácia da vacina utilizada. Valores de  $r_1$  e EPP, avaliam a combinação dos sorotipos virais das vacinas e os isolados de campo, os resultados de  $r_1$  mostraram que o isolado do sorotipo C possui maior semelhança antigênica com o sorotipo viral vacinal, e os isolados O e A possuem uma menor semelhança antigênica. Os resultados de EPP mostraram que os sorotipos vacinais possuem maior semelhança antigênica com os isolados virais avaliados.

Palavras-chaves: Febre Aftosa, neutralização viral, ELISA, vacinação, verificação de desempenho



## ABSTRACT

Brazil is one of the countries with the greatest international prominence in agribusiness, due to the increase of exports in this sector of the economy. A disease of great impact for national livestock farming is Foot-and-Mouth Disease (FMD), which has great social and economic importance. FMD is a highly infectious, highly disseminated viral disease that affects split cloven-hoofed animals, causing fever, lameness, vesicular lesions on the paws, tongue, snout and teats. It is a sanitary barrier to international trade, and demands high investments for control and prevention. Foot-and-Mouth disease virus (FMDV) has seven serotypes, which are immunologically distinct, O, A, C, SAT-1, SAT-2, SAT-3 and Asia 1, serotypes that are not uniformly distributed throughout the world. O, A and C serotypes have the highest distribution and are responsible for outbreaks, especially in Brazil. Serological methods for diagnosis and evaluation of FMDV, such as the viral neutralization test (NV), are essential for the diagnosis of the infection and evaluation of the efficacy of the vaccines used. The objective of this work was to verify the performance of the NV method, based on the evaluation of samples of bovine sera vaccinated with the FMD vaccine produced in Brazil. The samples were collected, after 28 days of vaccination and 28 days after booster vaccination. It was possible to verify the performance of the virus neutralization method of antibodies to the foot-and-mouth disease virus satisfactorily. The results of measurement uncertainty, repeatability and reproducibility were within the expected limits of evaluation, proving the effectiveness and guaranteeing the quality of the test method. The pilot test for the evaluation of the potency of the Foot-and-Mouth disease vaccine, performed by ELISA, reached a Percent Protection Expectancy (EPP) above 99% for the three vaccine serotypes, proving the efficacy of the vaccine used. Values of  $r_1$  and EPP, evaluating the combination of viral serotypes of the vaccines and the field isolates, the results of  $r_1$  showed that the serotype C isolate had the highest antigenic similarity to the vaccine strain, and the O and A isolates had less antigenic similarity to the vaccine viral strains. The EPP results showed that the vaccine serotypes have greater antigenic similarity with the evaluated viral isolates.

Key words: Foot-and-mouth disease, virus neutralization, ELISA, vaccination, standardization

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Representação esquemática da partícula do FMDV.....	25
FIGURA 2: Mapa esquemático do genoma do FMDV, com os produtos de clivagem parcial das proteínas virais.....	27
FIGURA 3: Imagem das estruturas da partícula do FMDV obtidas através da cristalografia de raio-X, todas as estruturas são representativas.....	31
FIGURA 4: Ciclo de multiplicação do FMDV .....	33
FIGURA 5: Sintomas dos animais com Febre Aftosa .....	37
FIGURA 6: Sinais clínicos observados nos animais com Febre Aftosa.....	37
FIGURA 7: Sinais clínicos observados nos animais com Febre Aftosa.....	37
FIGURA 8: Sintomas dos animais com Febre Aftosa .....	38
FIGURA 9: Mapa do <i>status</i> oficial para Febre Aftosa dos países membros da OIE.....	40
FIGURA 10: Condição sanitária do Brasil para FA em maio de 2018.....	42
FIGURA 11: Organização geográfica do Brasil para zonificação em blocos.....	50
FIGURA 12: Fotomicrografias da monocamada de células ZZ-R infectadas com FMDV.....	54
FIGURA 13: Fotomicrografias da monocamada de células BHK-21 infectadas com FMDV.....	55
FIGURA 14: Representação esquemática das etapas para obtenção da verificação de desempenho do método de NV para o vírus da FA.	69

FIGURA 15: Imagem obtida dos poços do teste de neutralização viral, em destaque efeito citopático e toxicidade nas células.....	87
FIGURA 16: Avaliação dos títulos de anticorpos obtidos por NV, dos soros coletados de animais após 28 dias da primeira vacinação, e após 28 dias da vacinação de reforço.....	90
FIGURA 17: Coeficientes de relação sorológica obtidos após avaliação de 12 soros de bovinos, representação dos resultados dos sorotipos O e A.....	92
FIGURA 18: Coeficientes de relação sorológica obtidos após avaliação de 12 soros de bovinos, representação dos resultados do sorotipo C.....	92
FIGURA 19: Avaliação dos títulos de anticorpos obtidos por NV e ELISA CFL, com os sorotipos virais vacinais do FMDV.....	95

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Métodos disponíveis para o diagnóstico de FA.....	52
TABELA 2: Critérios de classificação dos parâmetros de repetitividade e reprodutibilidade.....	61
TABELA 3: Expectativa percentual de proteção da vacina de Febre Aftosa por ELISA .....	85
TABELA 4: Expectativa Percentual de Proteção (EPP) da vacina de Febre Aftosa, títulos obtidos a partir do método de neutralização viral.....	88
TABELA 5: Expectativa Percentual de Proteção (EPP) e valores de $r_1$ .....	94
TABELA 6: Coeficientes de variação do ensaio de NV para o vírus da Febre Aftosa, sorotipo O1 Campos.....	97
TABELA 7: Coeficientes de variação do ensaio de NV para o vírus da Febre Aftosa, sorotipo A24 Cruzeiro.....	97
TABELA 8: Coeficientes de variação do ensaio de NV para o vírus da Febre Aftosa, sorotipo C3 Indaial.....	98
TABELA 9: Valores de incerteza de medição do ensaio de NV para os sorotipos do FMDV.....	99

## LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
µL	Microlitro
BCRJ	Banco de células do Rio de Janeiro
BEI	Etilenoimina binária
BHK-21	Células de Rim de hamster (do inglês, <i>Baby Hamster Kidney</i> )
BID50	Doses infectantes para bovinos (do inglês, <i>Bovine Infective Doses</i> )
CGAL	Coordenação Geral de Apoio Laboratorial
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
ECP	Efeito citopático
ELISA	Ensaio imunoenzimático (do inglês, <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> )
FA	Febre Aftosa
FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (do inglês, <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> )
FLI	Intituto Friedrich-Loeffler (do francês, <i>Friedrich-Loeffler- Institut</i> )
FMDV	Vírus da Febre Aftosa (do inglês, <i>Foot-and-Mouth Disease Virus</i> )
HS	Heparam Sulfato (do inglês, <i>Heparan Sulfate</i> )
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IEC	Comissão Eletrotécnica Internacional (do inglês, <i>International Electrotechnical Commission</i> )
Ig	Imunoglobulina
IN	Instrução normativa

INFs	Interferons
IRES	Sítio Interno de Entrada do Ribossomo (do inglês, <i>Internal Ribosomal Entry Site</i> )
ISO	Organização Internacional de Normalização (do inglês, <i>International Organization of Standardization</i> )
LDDV	Laboratório de Diagnóstico de Doenças Virais
LFDA	Laboratório de Defesa Agropecuária
MAbs	Anticorpos monoclonais
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MEM	Meio Essencial Mínimo
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade (do inglês, <i>Major Histocompatibility Complex</i> )
mL	Mililitro
MSA	Análise de Sistemas de Medição (do inglês, <i>Measurement Systems Analysis</i> )
NBR	Norma Brasileira
NSPs	Proteínas não-estruturais (do inglês, <i>Non-Structural Proteins</i> )
NV	Neutralização viral
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal (do inglês, <i>World Organisation for Animal Health</i> , anteriormente <i>Office des Epizooties</i> )
OPD	Orto-Fenileno-Diamina
ORF	Janela aberta de leitura (do inglês, <i>Open Reading Frame</i> )
PABs	Anticorpos policlonais (do inglês, <i>Polyclonal Antibodies</i> )
PAHO	Organização Pan Americana da Saúde (do inglês, <i>Pan American Health Organization</i> )
PAMPs	Padrões Moleculares Associados a Patógenos (do inglês, <i>Pathogen Associated Molecular Patterns</i> )

PANAFTOSA	Centro Pan Americano de Febre Aftosa
PBSTB	Solução salina tamponada fosfatada com tween e soro de bovino e albumina (do inglês, <i>Phosphate Buffered Saline with Tween and Bovine Serum Albumin</i> )
pH	Potencial hidrogeniônico
PNEFA	Programa Nacional de Erradicação de Febre Aftosa
S	Svedberg
SAT	Territórios do Sul da África (do inglês, <i>Southern African Territories</i> )
SDA	Secretaria de Defesa Agropecuária
SP	Proteínas estruturais (do inglês, <i>Structural Proteins</i> )
SUASA	Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária
TCID50	Dose infecciosa para 50% da cultura de tecidos (do inglês, <i>50% Tissue Culture Infective Dose</i> )
TLR	Receptores do tipo Toll (do inglês, <i>Toll-like receptors</i> )
RRP	Receptores de Reconhecimento de Padrões
USDA	Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (do inglês, <i>United States Department of Agriculture</i> )
ZZR	Células embrionárias de cabra (do inglês, <i>Fetal Goat Cell Line</i> )

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
1.1	A importância do agronegócio no Brasil.....	17
1.2	A Febre Aftosa e a ameaça econômica.....	19
1.3	A história da Febre Aftosa.....	20
1.4	O agente etiológico.....	24
1.4.1	Taxonomia e estrutura da partícula.....	24
1.4.2	O genoma do vírus.....	26
1.4.3	Ciclo de multiplicação.....	31
1.5	A patogênese da Febre Aftosa em bovinos.....	34
1.6	Epidemiologia da doença.....	38
1.7	Resposta imune do hospedeiro à infecção pelo FMDV.....	44
1.8	Vacinação.....	47
1.9	Métodos diagnósticos.....	50
1.9.1	Neutralização viral.....	52
1.9.2	ELISA.....	55
1.9.3	Combinação de vacinas.....	57
1.10	Parâmetros de padronização do método de ensaio.....	59
1.10.1	Repetitividade.....	59
1.10.2	Reprodutibilidade.....	60
1.10.3	Incerteza de medição.....	61
1.10.3.1	Incerteza padrão combinada.....	62
1.10.3.2	Incerteza expandida.....	63



2	JUSTIFICATIVA.....	64
3	OBJETIVOS.....	66
3.1	OBJETIVO GERAL.....	66
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	66
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	68
4.1	Amostras de soros de bovinos.....	69
4.2	Ensaio de neutralização viral.....	71
4.2.1	Cultivo de células.....	71
4.2.2	Amostras de vírus.....	72
4.2.3	Titulação viral.....	72
4.2.4	Neutralização viral.....	73
4.3	ELISA.....	74
4.3.1	Sensibilização de placas para identificação de anticorpos para o teste de ELISA-CFL.....	74
4.3.2	Titulação de anticorpos contra proteínas estruturais do vírus da Febre Aftosa.....	76
4.4	Teste de potência de vacina por ELISA.....	78
4.5	Teste de combinação de vacinas.....	79
4.5.1	Teste bidimensional por neutralização viral.....	79
4.5.2	Teste unidimensional por neutralização viral.....	80
4.6	Parâmetro de padronização do método de NV.....	81
4.6.1	Repetitividade e reprodutibilidade.....	81
4.6.2	Incerteza de medição.....	82
5	RESULTADOS.....	83
5.1	Teste de potência da vacina de Febre Aftosa.....	83
5.2	Teste de potência da vacina por neutralização viral.....	86
5.3	Resposta de anticorpos após vacinação e reforço.....	89

5.4	Avaliação da combinação de vacinas da Febre Aftosa por r <sub>1</sub> .....	90
5.5	Avaliação da combinação de vacinas da Febre Aftosa por EPP.....	93
5.6	Títulos de anticorpos pelo método de NV e ELISA CFL.....	95
5.7	Repetitividade e reprodutibilidade do método de NV.....	96
5.8	Incerteza de medição do método de NV.....	98
6	DISCUSSÃO.....	100
7	CONCLUSÃO.....	108
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	110

# **1 INTRODUÇÃO**

## **1.1 A importância do agronegócio no Brasil**

A participação brasileira no comércio internacional do agronegócio, vem ganhando cada vez mais destaque, devido ao aumento crescente das exportações nesse setor. Em 2017, as exportações do agronegócio brasileiro totalizaram 96,0 bilhões de dólares, em 2018 totalizaram 101,7 bilhões de dólares, um aumento crescente nos últimos anos. Em 2019, no mês de janeiro as exportações já bateram a quase sete bilhões de dólares, sendo 15,5% deste total correspondente às exportações de carne. O principal destino das exportações brasileiras do agronegócio vem sendo a China, que importou quase 35,6 bilhões de dólares em 2018. A China permanece na liderança dos principais compradores mundiais dos produtos do agronegócio brasileiro, e em janeiro de 2019 foi o destino final de 23% dos produtos desse mercado (BALANÇA COMERCIAL DO AGRONEGÓCIO BRASILEIRO, 2018).

De acordo com os indicadores do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em 2017 foram abatidas 30,83 milhões de cabeças de bovinos, que estavam sob algum tipo de serviço de inspeção sanitária, representando um aumento de 3,8% em relação ao ano anterior. No acumulado de 2017, foram abatidas 43,19 milhões de cabeças de suínos, representando um aumento de 2,0% em relação ao ano de 2016. A série anual mostra que houve crescimentos ininterruptos dessas atividades, culminando em novo patamar recorde em 2017. Ainda naquele ano, os laticínios sob

os quais atuam algum tipo de serviço de inspeção sanitária captaram 24,12 bilhões de litros de leite. O Brasil é líder mundial em exportação de aves, o segundo em bovinos e o quarto em suínos.

No Brasil, em 2017, a população total de bovinos atingiu a marca de aproximadamente 217,8 milhões de animais; a de bubalinos 1,4 milhões, resultando em um rebanho total maior que 219,1 milhões de animais, um aumento significativo na população total, em comparação com o ano anterior que atingiu um pouco mais de 218,7 milhões de animais (MAPA, 2018).

Todos esses números comprovam a importância do agronegócio brasileiro, especialmente o comércio nacional e internacional de carne. Apesar da crise que o Brasil vem enfrentando em todos os setores da economia e política, segundo o *United States Department of Agriculture (USDA)*, o país está conseguindo uma recuperação sustentável da economia, e a estimativa para 2018 era um crescimento no PIB (Produto Interno Bruto), no acumulado de 12 meses em 2018 a alta chegou a 1,3%. As previsões do USDA para o ano de 2019 é de um aumento de 3% na produção de carne bovina. Esse aumento será impulsionado por exportações sólidas, principalmente para a China e Hong Kong, e moderada demanda doméstica. A previsão é de que a produção de suínos aumente também em 3%, refletindo a recuperação das exportações, com moderada demanda interna, e custos de alimentação favoráveis em 2019. Espera-se um crescimento da economia brasileira em 2019, com queda da inflação e desemprego e com otimismo no setor de proteína animal no país (USDA, 2018).

## **1.2 A Febre Aftosa e a ameaça econômica**

A saúde e o bem-estar animal são os responsáveis pelo aumento da produção de produtos animais, e pela garantia da qualidade do produto gerado. A intensificação da agricultura e pecuária, geram significativos impactos na segurança alimentar. Esses fatores, que podem afetar a produção agropecuária são extremamente importantes (HOTZEL & MACHADO, 2004).

Os surtos de doenças, principalmente as virais, podem causar sérios danos sobre a saúde animal, afetando assim a produção de produtos de origem animal e até mesmo a saúde humana. Uma das doenças de maior impacto para a pecuária nacional é a Febre Aftosa (FA), que tem grande importância social e econômica, causando severos prejuízos para produtores, empresários e famílias rurais, quando os surtos emergem. Surtos de FA são capazes de causar grandes perdas, para o comércio nacional e internacional de animais e produtos de origem animal, com restrições prolongadas a exportações desses produtos. Nos países em que a FA é endêmica, principalmente países em desenvolvimento como na Ásia e África e na América do Sul, onde ocorrem surtos esporádicos, a doença representa uma ameaça constante para a saúde dos animais, e para a segurança alimentar, comprometendo a produção e causando instabilidade no comércio de alimentos (FAO/OIE, 2012).

### 1.3 A história da Febre Aftosa

Os primeiros registros na história, que descrevem os sintomas clínicos da Febre Aftosa, foram creditados a Fracastorius no século XVI, quando ele descreveu uma doença similar em bovinos na Itália. Somente em 1897, alguns séculos depois, Loeffler, professor do Instituto de Higiene da Universidade alemã em Greifswald, com a colaboração de Frosch em Berlim, começaram a descrever algumas observações e concluíram que a doença era causada por um agente filtrável, um vírus (BROWN, 2003). Após sua identificação no ano de 1897, a circulação do vírus causador da Febre Aftosa começou a ser registrada em vários países (BROOKSBY, 1958).

Os pesquisadores Vallée & Carré, em 1922, observaram que o gado originário da França, que havia se recuperado da Febre Aftosa, tornou a se infectar quando entrou em contato com o gado infectado pelo *Foot-and-Mouth Disease Virus* (FMDV), proveniente da Alemanha, o que apontava para a ocorrência de sorotipos distintos. Eles nomearam esses sorotipos de acordo com o local de origem, O, devido ao departamento de Oise na França, e A, para o sorotipo originário da Alemanha. (BROOKSBY, 1958)

Em 1926, Waldmann & Trautwein, na Alemanha, em suas observações, constataram um tipo de vírus diferente dos dois já identificados e o nomearam de C. Os três tipos originais eram internacionalmente conhecidos como Vallée O, Vallée A e Waldmann C. Mais tarde ficaram conhecidos apenas como O, A e C (BROOKSBY, 1958).

Em 1948, uma amostra de vírus da Bechuanaland (região da atual República do Botswana, na África), foi enviada ao Instituto Pirbright, no Reino Unido, e constataram que se tratava de outro tipo diferente de vírus da Febre Aftosa. Novas amostras também haviam sido encaminhadas ao Instituto, provenientes da Rodésia do Norte e da Rodésia do Sul, e após extensos testes de identificação dos sorotipos virais, os resultados confirmaram a existência de outros tipos que ainda não haviam sido identificados. Três novos tipos de vírus da Febre Aftosa foram então descobertos, e nomeados como S.A.T. (Territórios do Sul da África) 1, 2 e 3. Em 1957, Brooksby & Rogers examinaram várias amostras de vírus de países da Ásia e identificaram outro tipo diferente de todos os já encontrados, e o designaram de Ásia 1 (BROOKSBY, 1958).

Após a identificação e registros da doença em vários países do mundo, o desenvolvimento de uma vacina contra a Febre Aftosa tornou-se alvo de intensas pesquisas. Waldmann & Pape na década de 1920, conseguiram reproduzir a doença em cobaias, mas outras dificuldades ainda existiam, como a descoberta até então de três diferentes sorotipos do vírus. Animais infectados com um dos sorotipos ainda eram susceptíveis aos outros sorotipos. Portanto, a vacina deveria conferir proteção contra os diferentes sorotipos. A produção do FMDV em larga escala só foi possível a partir de 1947 por Frenkel. Nesse período surgiram as primeiras vacinas contendo diferentes sorotipos do vírus (BROWN, 2003).

A FA foi identificada na América do Sul em 1870, após um incremento das importações de bovinos pelos colonizadores, mesmo período em que ocorria uma epidemia no continente europeu, onde a doença já era conhecida desde 1546. Inicialmente, registros apontam a doença na Argentina, de onde se propagou para o

centro do país, posteriormente para a região central do Chile, para o Uruguai e para a região sul do Brasil, especificamente no estado do Rio Grande do Sul. Devido à ausência de controles sanitários, a doença se difundiu e em meados de 1895 foi registrada no Triângulo Mineiro, e posteriormente no estado de São Paulo (MARQUES *et al.*, 2015).

Após a introdução do vírus da Febre Aftosa na América do Sul, a doença se tornou endêmica em todo o território. A ocorrência da Febre Aftosa no Brasil contribuiu para a criação do Ministério da Agricultura em 1909. Em 1950, foram estabelecidas normas para controle da doença na Primeira Conferência Nacional de Febre Aftosa. O cenário contribuiu para a criação do Centro Pan Americano de Febre Aftosa (PANAFTOSA) em 1951, a partir de um acordo entre a Organização dos Estados Americanos e o governo brasileiro, com o apoio da *Pan American Health Organization* (PAHO) (CLAVIJO *et al.*, 2017).

Nos anos 60 os focos de Febre Aftosa no Brasil, referiam-se aos municípios afetados, diferente do critério atual que considera as propriedades afetadas. Na década de 60, foram registrados 2.748 municípios afetados com FA. Naquela época, ainda não existia um programa de vigilância epidemiológica, no entanto, os dados obtidos permitiram a identificação dos sorotipos O, A e C; sendo responsáveis por 55%, 26% e 19% dos casos, respectivamente. Nos anos 70, a taxa de mortalidade entre animais com menos de quatro meses aumentou consideravelmente, o número de focos alcançou o número de 66.114, o sorotipo A demonstrou maior virulência, e o sorotipo C foi o menos diagnosticado. A movimentação de animais susceptíveis foi considerada fator principal na disseminação da doença. Na década de 80, foram registrados 25.248 focos de FA, com maior frequência dos sorotipos A e O. O número



de focos decresceu a partir de 1977, devido ao maior aporte de recursos financeiros, e melhor qualidade da vacina administrada, principalmente a partir da década de 80. Já na década de 90, foram registrados 7.550 focos de FA no Brasil, o sorotipo A foi o mais frequente, o sorotipo C ocorreu no início da década e depois tornou-se ausente. No Brasil entre 1970 e 2002, o sorotipo O provocou epidemias a cada quatro a cinco anos, o sorotipo A responsável por picos epidêmicos irregulares a cada seis anos, e o sorotipo C ocasionou epidemias amplamente difundidas em longos intervalos, e permaneceu com poucas manifestações entre seus longos ciclos de 18 a 20 anos (LYRA & SILVA, 2004).

Os resultados obtidos a partir da década de 80, em que se verificou uma diminuição dos focos de Febre Aftosa, foram alcançados devido ao maior controle das partidas de vacinas e identificação das áreas endêmicas. Resultados obtidos após a criação e implantação dos programas de vigilância no Brasil, comprovam essa redução no número de focos da doença, em que ocasionalmente alguns surtos ocorreram pelo país, como foi o caso em agosto de 2000 no estado do Rio Grande do Sul, que era reconhecido desde 1998 como área livre de FA com vacinação (MAYEN, 2003). Focos da doença foram registrados, em junho e setembro de 2004, no Pará e Amazonas, respectivamente, e em outubro de 2005, no Mato Grosso do Sul e Paraná (OTUKI *et al.*, 2009). O último foco de Febre Aftosa no país ocorreu em 2005 no estado do Mato Grosso do Sul, associado com o sorotipo O (CLAVIJO *et al.*, 2017). Os dois últimos surtos, ocasionados pelo sorotipo C no mundo, ocorreram em 2004 no Quênia e no Brasil (BRITO *et al.*, 2015).

Em 2007, a Instrução Normativa nº 44, de 2 de outubro de 2007, passou a definir as diretrizes gerais para erradicação e prevenção da FA em todo o Brasil,

visando a implementação do Programa Nacional de Erradicação e Prevenção da Febre Aftosa (PNEFA), conforme o estabelecido pelo Sistema Unificado de Atenção a Sanidade Agropecuária (SUASA). O PNEFA executa medidas, que tem como objetivo a erradicação da FA em todo o território nacional e a sustentação dessa condição sanitária, por meio da implantação e implementação de um sistema de vigilância sanitária, apoiado na manutenção das estruturas do serviço veterinário oficial e na participação da comunidade (BRASIL, 2007).

## **1.4 O agente etiológico**

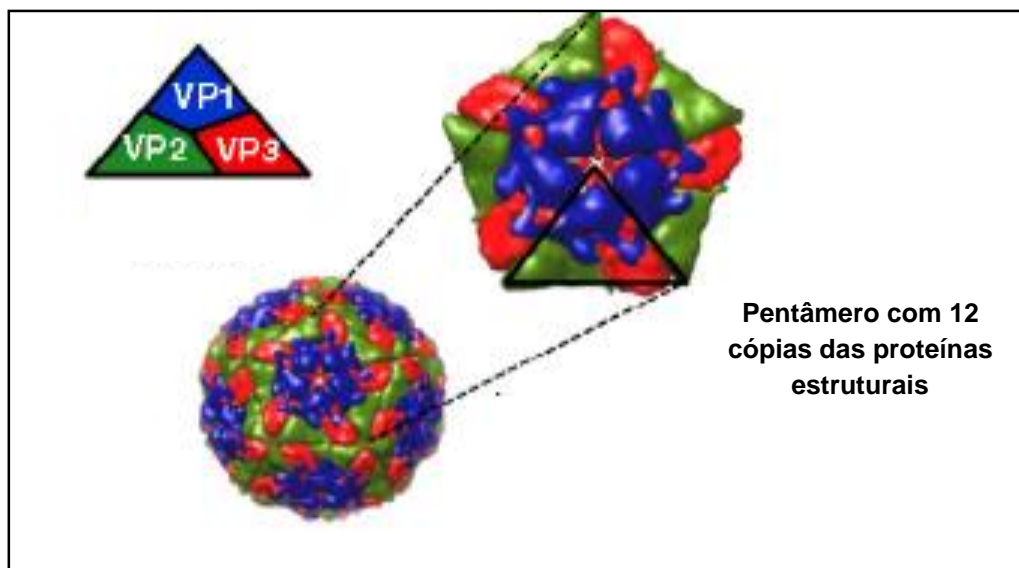
### **1.4.1 Taxonomia e estrutura da partícula viral**

A ordem *Picornavirales* abriga a família *Picornaviridae*, que compreende aproximadamente 47 gêneros, contendo 110 espécies. Dentre os membros desta família, alguns gêneros se destacam por conter vírus que infectam vertebrados, abrigando importantes patógenos humanos e animais, como o poliovírus humano, o vírus da encefalomiocardite e o vírus da Febre Aftosa. Os picornavírus causam infecções que podem induzir doenças do sistema nervoso, trato respiratório e gastrointestinal, do coração, fígado, pâncreas, pele e olhos (ZELL *et al.*, 2019).

O FMDV foi o primeiro vírus animal a ser descoberto no século XIX. Anos mais tarde o poliovírus foi isolado, devido a uma epidemia de poliomielite na virada do século XX. Devido à grande importância veterinária e humana desses dois

picornavirus, compreendem alguns dos vírus mais bem estudados dentro da virosfera, e cujos estudos contribuíram significativamente para o desenvolvimento da virologia moderna. O FMDV pertence ao gênero *Aphthovirus* (RACANIELLO, 2013).

Os picornavírus são vírus pequenos, icosaédricos, sem envelope viral e possuem uma molécula de RNA linear de polaridade positiva (6,7 - 10,1 Kb). O nome da família é derivado de *pico* (pequeno) e RNA, em referência ao genoma de ácido ribonucléico (RIEDER & BRUM, 2007). O RNA genômico está contido em um capsídeo icosaédrico, representado na figura 1. Os capsídeos dos picornavírus possuem 60 proteínas estruturais, sendo 1AB, 1C e 1D, também nomeadas de VP0 (VP2+VP4), VP3 e VP1 (ZELL *et al.*, 2017).



**Figura 1:** Representação esquemática da partícula do FMDV. As partículas de vírus montadas, contêm uma única cópia do RNA viral e 60 cópias das 4 diferentes proteínas da cápside (VP1-VP4). A proteína VP4 é interna (JAMAL & BELSHAM, 2013).

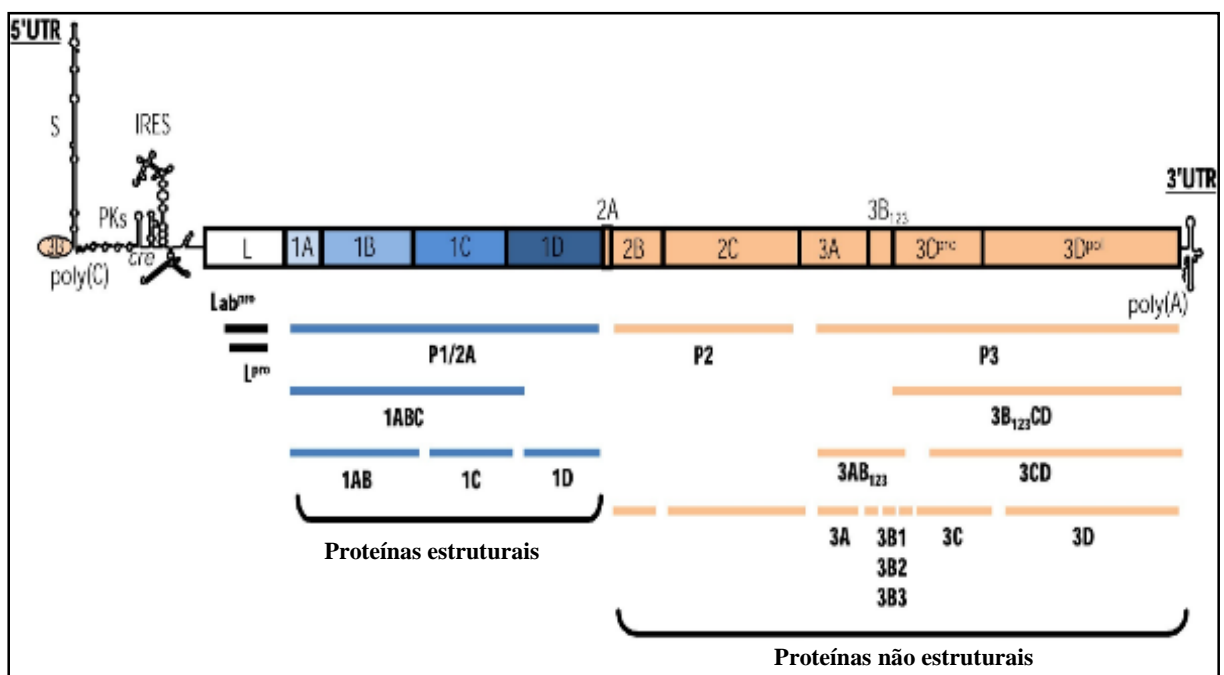
O FMDV apresenta sete sorotipos, atualmente nomeados em A, O, C, SAT-1, SAT-2, SAT-3 e Ásia 1. Os sorotipos são imunologicamente distintos, e possuem mais de 60 subtipos, sendo que eventualmente, novos subtipos aparecem espontaneamente (OIE, 2017). Após a ocorrência da infecção com um determinado sorotipo, o animal estará protegido contra a infecção pelo mesmo sorotipo, mas permanece susceptível à infecção por um sorotipo diferente. Ou seja, não há proteção cruzada, em razão das diferenças antigênicas entre eles (RIEDER & BRUM, 2007). Essa situação pode resultar em comprometimento da eficácia das vacinas. Nesses casos, a identificação do sorotipo do vírus da FA é de grande importância.

#### **1.4.2 O genoma do vírus**

O vírus da Febre Aftosa possui um genoma de RNA fita simples de polaridade positiva. Possui uma organização básica semelhante a de outros picornavirus. O genoma é dividido em três regiões principais: a 5' UTR (região não traduzida), uma região regulatória; a região da ORF (*Open Reading Frame*), e a região 3'UTR que também é uma região regulatória. O RNA é traduzido de uma única ORF em uma poliproteína, seguida de uma série de clivagens proteolíticas pós-traducionais, para geração de proteínas estruturais e não estruturais (GRUBMAN & BAX, 2004). A figura 2, representa o mapa esquemático do genoma do FMDV, em que podem ser observadas todas as regiões descritas.

A região 5'UTR, é o elemento central que inicia a replicação e tradução do genoma. A proteína 3B ou VPg está ligada covalentemente a essa região, e exerce

função de iniciador para a síntese do RNA viral. O FMDV é o único dentre os picornavírus que codifica três cópias não-idênticas de VPg. A região 5' UTR é altamente estruturada, e contém um segmento curto, conhecido como segmento S. Estudos indicam que esse segmento previne a função das exonucleases. Após o segmento S está o elemento poli(C) (cadeia de citosinas) (RACANIELLO, 2013).



**Figura 2:** Mapa esquemático do genoma do FMDV, com os produtos de clivagem parcial das proteínas virais denominadas de acordo com a nomenclatura de RUECKERT & WIMMER (1984). As linhas grossas abaixo do diagrama do genoma indicam produtos de clivagem parcial. Região 5'UTR: S é um pequeno fragmento do genoma; poli (C) - poli-citosina; PK - pseudoknot; cre - elemento essencial de replicação de ação cis; IRES - local interno de entrada de ribossomos. Região 3'UTR: sequência de nucleotídeos e cauda poli (A) (DIAZ-SAN SEGUNDO *et al.*, 2017).

Na extremidade 3' de poli(C), há um segmento de RNA que pode formar estruturas secundárias altamente conservadas, os “pseudoknots” (PKs), e sua função possivelmente está associada ao elemento poli(C). Associada à região PK, encontra-

se o elemento de replicação de ação cis (cre), essencial para a replicação do RNA. A última porção do 5' UTR é uma estrutura relacionada com a iniciação da tradução independente de *cap* do RNA viral. Essa estrutura é denominada *Internal Ribosomal Entry Site* (IRES) (YUAN *et al.*, 2016).

Existem quatro grupos diferentes de IRES, que foram classificados de acordo com vários critérios específicos, como sua localização no códon de iniciação e sua atividade em diferentes células. O FMDV assim como os cardiovírus possuem IRES tipo II (RACANIELLO, 2013). O IRES do FMDV possui cinco domínios e evidências indicam que esses domínios estão envolvidos no controle traducional e nas interações RNA-RNA (YUAN *et al.*, 2016). Entre os cinco domínios presente no IRES, os domínios conhecidos como III e IV exercem importantes atividades, sendo o domínio III o mais crítico para seu efetivo funcionamento. A particularidade observada no domínio III refere-se às diferenças no número, e na posição dos nucleotídeos em sua região apical (GARCIA-NUNES *et al.*, 2014).

A região 3'UTR possui dois componentes, sendo o primeiro uma sequência de aproximadamente 90 nucleotídeos seguidos por uma cauda poli(A) (cadeia de adeninas) de comprimento variável. Estudos indicam que esses componentes estão envolvidos na replicação viral, na virulência, e apresentam efeito estimulador nas atividades do elemento IRES (YUAN *et al.*, 2016).

A ORF do FMDV possui quatro regiões codificadoras de proteínas, sendo divididas em região L, P1, P2 e P3. A região P1 é a região da poliproteína que codifica as quatro proteínas estruturais do vírus VP4, VP2, VP3 e VP1 (também conhecido como 1A, 1B, 1C e 1D). As regiões P2 e P3 codificam a maioria das proteínas não-

estruturais do vírus, as proteínas 2A, 2B, 2C, 3A, 3 cópias de 3B, 3Cpro e 3Dpol (RUECKERT & WIMMER,1984).

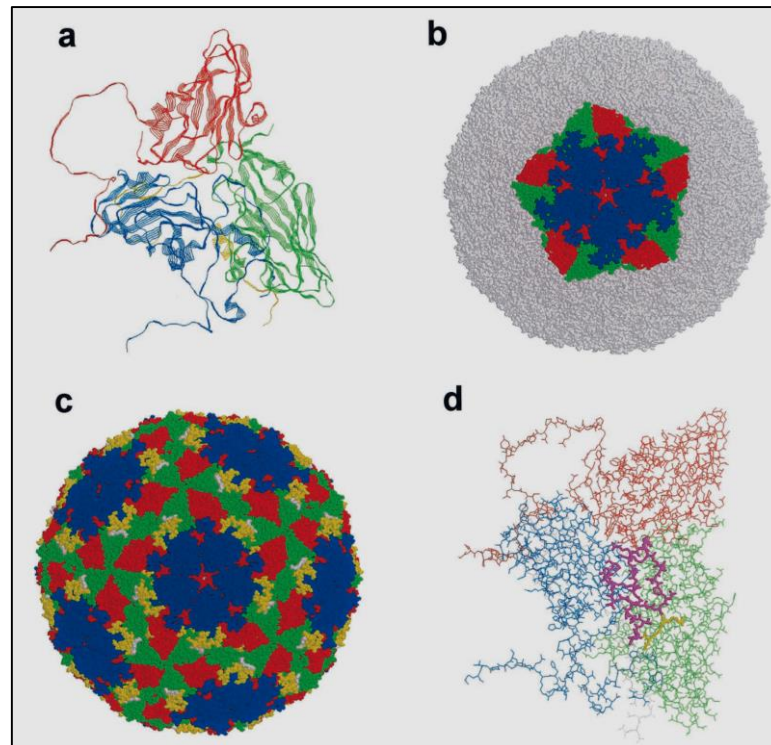
A região L da ORF codifica a proteinase Lpro, que participa do processamento da poliproteína e da interrupção da tradução da célula do hospedeiro. Estudos mostram que Lpro não é essencial para a replicação viral, mas é indispensável para a patogênese do hospedeiro ((YUAN *et al.*, 2016). A clivagem de Lpro é seguida pelo processamento das regiões P1/2A, P2BC e P3, resultado da clivagem primária. Após clivagens secundárias e de maturação, a região P1/2A produz as proteínas estruturais 1A, 1B, 1C e 1D, e a não estrutural 2A; a região P2BC e P3 produzem as proteínas não estruturais 2B, 2C, 3A, 3B1-3, 3Cpro e 3Dpol. As proteínas 2A e 3Cpro auxiliam no processamento da poliproteína juntamente com Lpro. As proteínas 2B, 2C e a intermediária 2BC, desestruturam as membranas da célula hospedeira, e juntamente com 3A participam da multiplicação viral (GARCIA-NUNES *et al.*, 2014). 2B pertence a uma classe de proteínas transmembranas, cruciais para a patogenicidade viral. 2C é uma das moléculas altamente conservadas do FMDV (YUAN *et al.*, 2016). As proteínas 2B e 2C são implicadas na indução do efeito citopático induzido pelo vírus, e desempenham papel importante na adaptação da cultura celular (MASON *et al.*, 2003).

As proteínas 3B1, 3B-2 e 3B3 exercem importantes funções na replicação do genoma viral, sendo que a proteína 3B3 possui funções de maior relevância que 3B1 e 3B2. A proteína intermediária 3ABC, precursora de 3A, é a proteína mais antigênica entre todas as proteínas não estruturais, sendo a mais utilizada como indicador sorológico de infecção por FMDV. A proteinase 3C é responsável pela maioria das clivagens da poliproteína viral, e também está associada à inibição da transcrição e

tradução da célula do hospedeiro. A proteína 3D é à RNA polimerase-RNA dependente, codificada pelo vírus, responsável pela replicação do RNA (YUAN *et al.*, 2016).

A região mais antigênica em todos os sorotipos de FMDV se localiza no laço flexível presente na superfície do vírion na proteína VP1, o *loop* G-H, estruturalmente desordenado. Os peptídeos dessa região são altamente imunogênicos, e induzem altos níveis de anticorpos neutralizantes. Essa região da proteína VP1 é seguida por um tripeptídeo de arginina-glicina-ácido aspártico (RGD), e essa sequência é altamente conservada e está envolvida na interação vírus-receptor (BURMAN *et al.*, 2006). A proteína VP1 também possui uma porção C terminal altamente imunogênica. Essas sequências de nucleotídeos da região de codificação da VP1, têm sido usadas para a caracterização genética do FMDV, pela sua importância para penetração do vírus, imunidade protetora e especificidade de sorotipo (JAMAL & BELSHAM, 2013). A figura 3, apresenta as estruturas representativas do vírion da Febre Aftosa, em destaque o *loop* G-H e a sequência RGD.





**Figura 3:** Estrutura da partícula de FMDV obtida a partir da cristalografia de raio-X. Todas as estruturas são representativas do vírion da Febre Aftosa, e as proteínas virais são de cor azul (VP1), verde (VP2) e vermelho (VP3). a) Organização das proteínas virais com seus dobramentos, a proteína VP1 é responsável por grande parte da estrutura do capsídeo, b) organização do pentâmero do FMDV, c) organização de todo o vírion, destacando o *loop* G-H (amarelo) e a sequência RGD (branco), d) destaque das posições do *loop* G-H (roxo) e da sequência RGD (amarelo) (GRUBMAN & BAX, 2004).

### 1.4.3 Ciclo de multiplicação

O ciclo de multiplicação do FMDV ocorre inteiramente no citoplasma da célula hospedeira. Inicialmente, a multiplicação é caracterizada pela interação do vírion com os receptores celulares. A sequência RGD do *loop* G-H da proteína VP1 é o componente primário no local de adsorção celular, interagindo com os receptores da integrina da membrana, para o início da infecção pelo vírus. As proteínas VP1, VP2 e VP3 interagem com as subunidades da proteína integrina. Dentre o grupo das

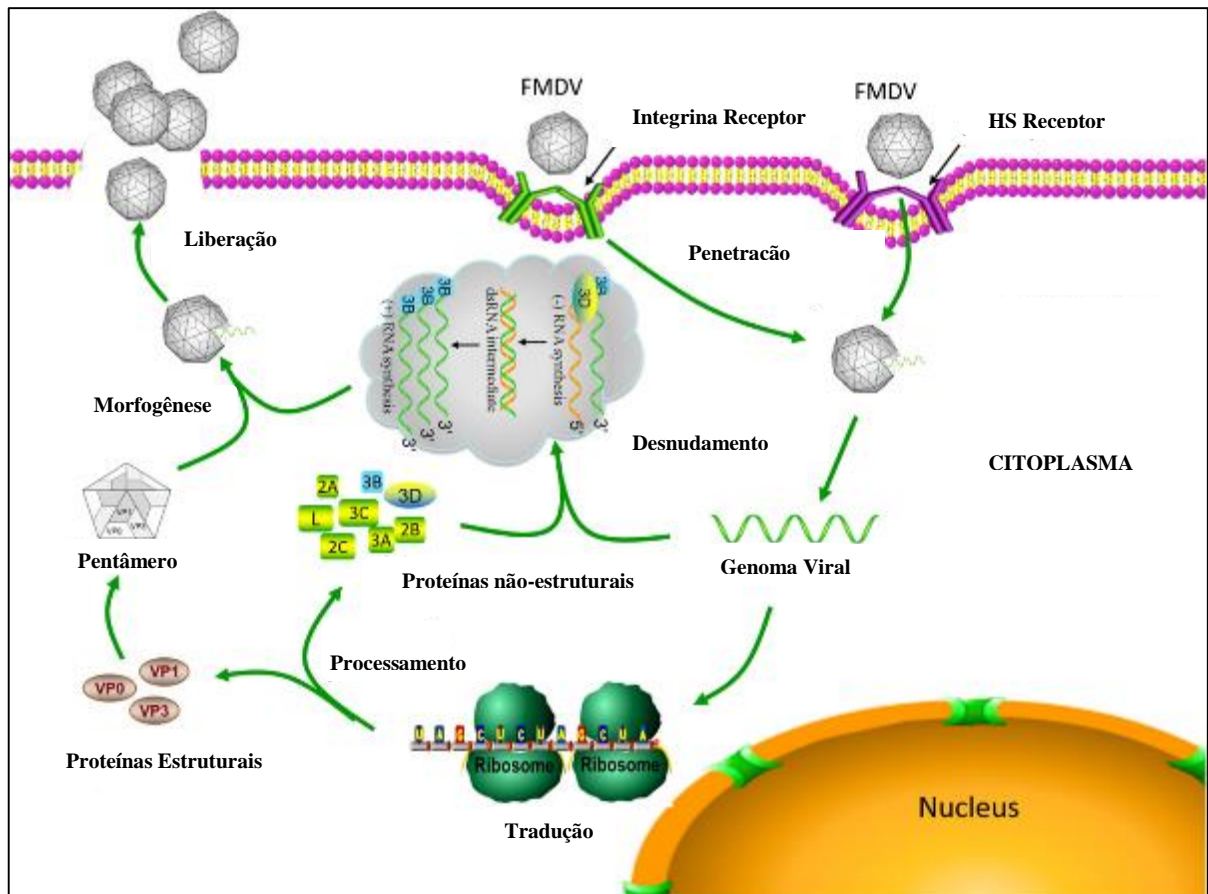
integrinas, quatro podem ser utilizadas como receptores do FMDV, para mediar a infecção, as quais são  $\alpha\beta 1$ ,  $\alpha\beta 3$ ,  $\alpha\beta 6$  e  $\alpha\beta 8$ . Além da sequência RGD, o FMDV também pode utilizar outras sequências tripeptídicas similares como ligantes (WANG *et al.*, 2015).

Sob condições de cultura celular adaptada, o FMDV obteve a capacidade de utilizar os proteoglicanos de heparan sulfato (HS) como receptor celular (WANG *et al.*, 2015). Após interação com o receptor celular, o vírus é internalizado por endocitose, e a liberação do genoma ocorre a partir da vesícula endocítica acidificada (RIEDER & BRUM, 2007). Essa acidificação desestabiliza as ligações entre VP2 e VP3 do capsídeo, resultando no desnudamento da fita de RNA (GRUBMAN & BAX, 2004).

A infecção viral induz o rearranjo de membranas intracelulares. Nesse processo, o retículo endoplasmático e o complexo de Golgi são destruídos e vesículas membranosas são formadas. A replicação do RNA viral ocorre nessas vesículas. O RNA genômico não exerce apenas a função de mRNA, mas também serve como molde para a síntese de RNA de fita negativa (RACANIELLO, 2013). O RNA então é traduzido, diretamente pelos poliribossomos, através da ligação com o IRES. A ORF, como já descrita, é então traduzida em uma poliproteína que é rapidamente clivada nos precursores P1, P2 e P3 que originarão as proteínas individuais (RIEDER & BRUM, 2007).

Quando um pool de proteínas do capsídeo atinge um determinado nível, a encapsidação se inicia. O vírus infeccioso, então encapsidado, será liberado da célula. Para ocorrer a liberação do vírus, as células infectadas sofrerão alterações morfológicas. Tais alterações são conhecidas como efeito citopático (ECP),

ocasionando assim a lise celular (RACANIELLO, 2013). As etapas de multiplicação do FMDV, estão representadas esquematicamente na figura 4.



**Figura 4:** Ciclo de mutiplicação do FMDV. A adsorção do vírus acontece via receptores específicos, as integrinas ou o Heparan Sulfato. Após a interação com o receptor celular, o vírus é internalizado por endocitose, e ocorre a liberação do genoma. O RNA é traduzido pelos poliribossomos, gerando uma poliproteína que é rapidamente clivada, originando proteínas individuais. Quando um *pool* de proteínas atinge um elevado número, a encapsidação se inicia. E então, um vírus encapsidado é liberado da célula (YUAN *et al.*, 2016).

## 1.5 A patogênese da Febre Aftosa em bovinos

A Febre Aftosa acomete animais biungulados, de casco fendido, os artiodáctilos domésticos e silvestres, incluindo bovinos, suínos, ovinos, caprinos e búfalos do gênero *Bubalus*. Outras espécies suscetíveis incluem ouriços, tatus, castores, elefantes, capivaras, ratos e camundongos (OIE, 2017). A doença é caracterizada por febre, claudicação, lesões vesiculares nas patas, língua, focinho e tetas. Os efeitos debilitantes, ao invés de altas taxas de mortalidade, são responsáveis por grandes perdas de produtividade associadas a FA. A natureza altamente contagiosa do vírus e a gravidade dos impactos econômicos associados à doença determinam o *status* da FA como uma das mais importantes doenças animais, limitando o comércio de animais e de seus produtos em todo o mundo (ARZT *et al.*, 2011).

O período de incubação do vírus da Febre Aftosa pode variar dependendo da espécie animal e do meio de transmissão. Através do contato direto e indireto, o período de incubação do vírus em suínos é de 2 a 4 dias, e para bovinos de 3 a 6 dias. Já através de aerossóis, este tempo pode variar de 4 a 10 dias com uma possibilidade de até 14 dias quando a quantidade de vírus no ar estiver baixa (SELLERS & FORMAN, 1973).

As diferenças no período de incubação do FMDV estão relacionadas à intensa associação entre dose, tempo de incubação do vírus e susceptibilidade da espécie animal afetada. Altas doses virais correspondem a menores períodos de incubação. As doses do FMDV são influenciadas em condições de campo, pelo tipo de manejo,

estrutura do alojamento, e tipo de ventilação do ambiente oferecidos aos animais (ALEXANDERSEN *et al.*, 2003).

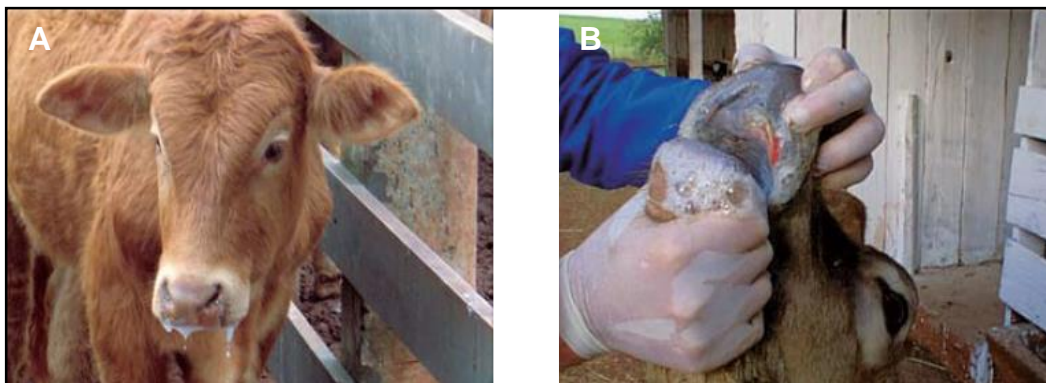
De acordo com Saraiva e Lopez (1998), após inalação, a patogenia e os sinais clínicos da Febre Aftosa podem ser descritos nos seguintes eventos:

- Após contato com o vírus, de 24 a 72 horas ocorrem: infecção de células na cavidade nasal, faringe e esôfago, replicação do vírus e disseminação para células adjacentes, passagem do vírus aos vasos sanguíneos e linfáticos, infecção dos linfonodos e outras glândulas, infecção das células da cavidade oral, patas, úbere e rúmen;
- 72 a 96 horas: início da febre, aparecimento de vesículas na cavidade oral, patas, úbere e rúmen, salivação excessiva, descarga nasal e claudicação;
- 120 horas: ruptura de vesículas e intensificação dos sintomas, final da febre, final da viremia e começo da produção de anticorpos;
- A partir do 10<sup>o</sup> dia: diminuição do título de vírus em vários tecidos e líquidos;
- 15<sup>o</sup> dia: cura das lesões, o animal volta a se alimentar;

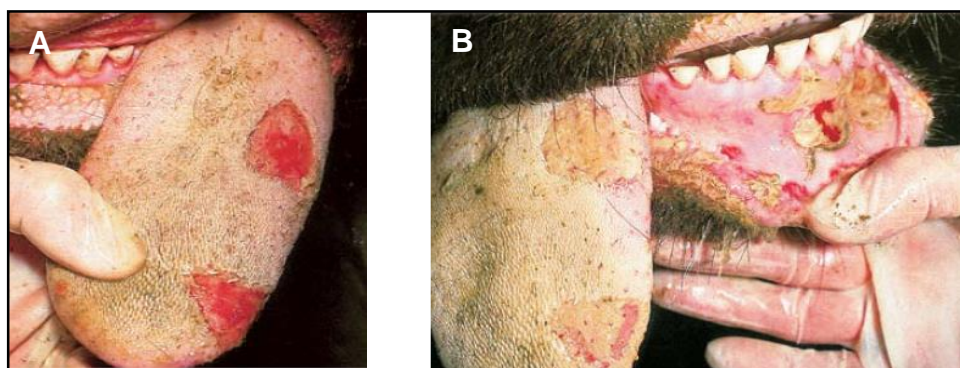
- A partir do 15º dia: desaparecimento gradual do vírus nos tecidos e líquidos, aumento da produção de anticorpos, cura completa das lesões e persistência do vírus na faringe. (SARAIVA & LOPEZ, 1998).

Animais em período de incubação do FMDV e aqueles clinicamente afetados são fontes de infecção para animais saudáveis e susceptíveis. A infecção pode ocorrer através do ar expirado pelos animais afetados, saliva, sêmen e leite, até quatro dias antes dos sintomas clínicos (MAPA, 2009).

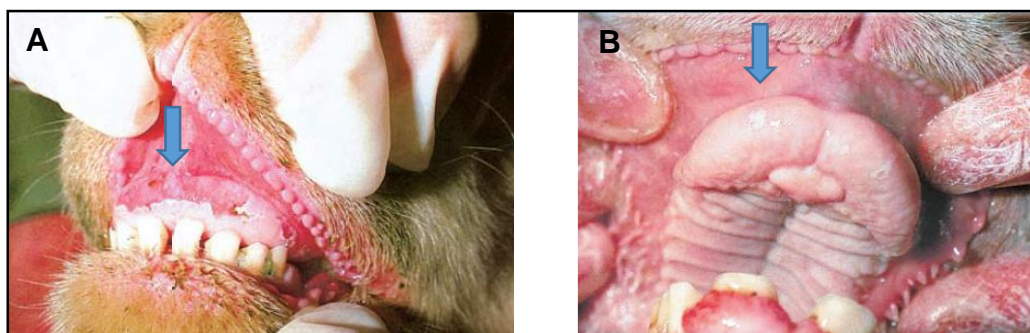
Desde o início da infecção até o desaparecimento gradual dos sintomas, a doença dura em média duas semanas. A mortalidade de animais devido ao agravamento da FA é considerada baixa, mas quando é observada entre animais jovens, essa taxa é alta devido a miocardite associada à doença (ARZT *et al.*, 2011). A miocardite é causada pela multiplicação do vírus que ocorre no tecido cardíaco. Exames macroscópicos do coração destes animais, frequentemente revelam um tecido mole e flácido, com listras brancas ou acinzentadas, ou manchas. Em animais jovens que morrem, e não apresentam essas características macroscópicas, o vírus geralmente é isolado do tecido cardíaco e do sangue, e exames histopatológicos geralmente detectam lesões. Essas características são observadas provavelmente, devido a fatores fisiológicos e genéticos. A FA também pode causar abortos em animais prenhes (ALEXANDERSEN, *et al.*, 2003). As figuras 5 a 8 evidenciam lesões em diferentes estágios de animais infectados, e os sinais clínicos da doença.



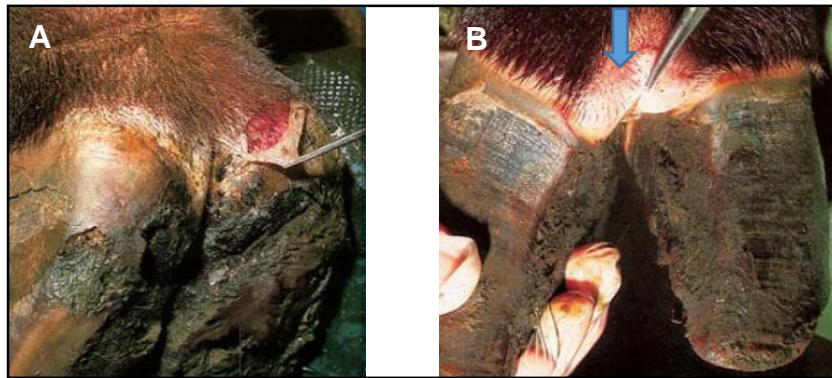
**Figura 5:** Sintomas dos animais com Febre Aftosa. Animais apresentando salivação excessiva. A - Imagem do surto no Mato Grosso do Sul em 2005; B - Imagem do surto no Rio Grande do Sul em 2000 (MAPA, 2009).



**Figura 6:** Sinais clínicos observados nos animais com Febre Aftosa. Animais apresentando úlceras na cavidade oral. A - Língua de bovino com lesão de três dias. B - Mesmo animal com lesão de quatro dias, indicando progressiva perda das margens e considerável deposição de exsudato fibrinoso (MAPA, 2009).



**Figura 7:** Sinais clínicos observados nos animais com Febre Aftosa. A - Ovino com duas pequenas vesículas de um dia não rompidas no pulvino dental. B - Lesão de dois dias no pulvino dental e gengiva superior de ovino (MAPA, 2009).



**Figura 8:** Sintomas dos animais com Febre Aftosa. Animais apresentando ulcerações no casco. A - Vesícula interdigital rompida. B - Vesícula interdigital de dois dias (MAPA, 2009)

## 1.6 Epidemiologia da doença

SELLERS & FORMAN (1973), ao avaliarem um surto de FA em Hampshire em 1967, no Reino Unido, concluíram que os principais métodos de disseminação do vírus seriam a movimentação de animais, veículos, pessoas, resíduos de matadouros e a disseminação pelo ar.

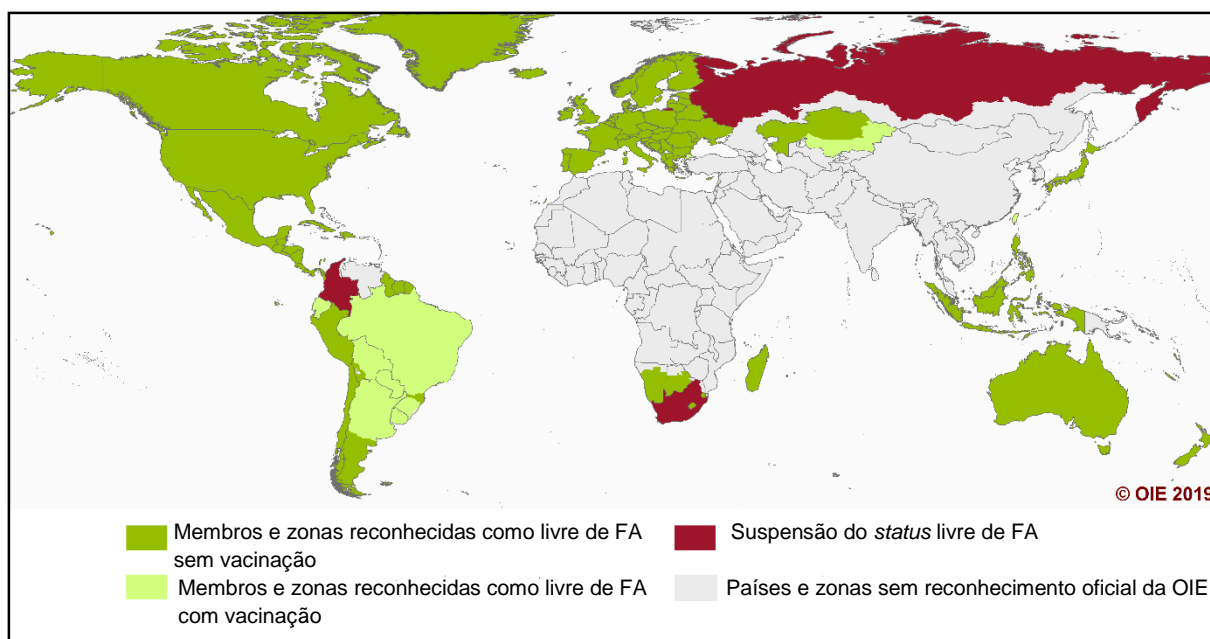
Os bovinos sensíveis podem ser infectados pelo FMDV como resultado do contato direto ou indireto, com animais infectados ou com um ambiente contaminado. A transferência aérea de gotículas é provavelmente o modo de transmissão mais comum. A transmissão do vírus por aerossol é uma via de infecção importante, que requer a possibilidade de combinação de fatores específicos, incluindo as espécies animais, o número e a localização dos animais transmissores e receptores, e as condições topográficas e meteorológicas favoráveis. Existem situações especiais como a dos suínos, que são resistentes a exposição via aerossóis, e a transmissão



neste caso ocorre, na maioria das vezes, por contato direto (ALEXANDERSEN *et al.*, 2003).

Dentre as espécies domesticadas, os suínos são os animais que liberam as maiores quantidades de vírus no ar. Já os ruminantes secretam doses menores de vírus, mas são altamente susceptíveis a infecção pela via respiratória. Experimentalmente, os ruminantes podem ser infectados pela via aérea com uma dose infecciosa de 10 TCID<sub>50</sub>, enquanto suínos requerem uma dose de 10<sup>3</sup> TCID<sub>50</sub>. Já pela via oral, a dose infecciosa para suínos é de 10<sup>4</sup>-10<sup>5</sup> TCID<sub>50</sub>, e para ruminantes de 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup> TCID<sub>50</sub> (ALEXANDERSEN *et al.*, 2003). Nos ovinos e caprinos, a doença pode passar despercebida, já que a infecção pelo FMDV frequentemente não causa lesões nessas espécies. Assim, a disseminação da doença pode ocorrer com o trânsito de ovinos e caprinos aparentemente saudáveis (LYRA & SILVA, 2004).

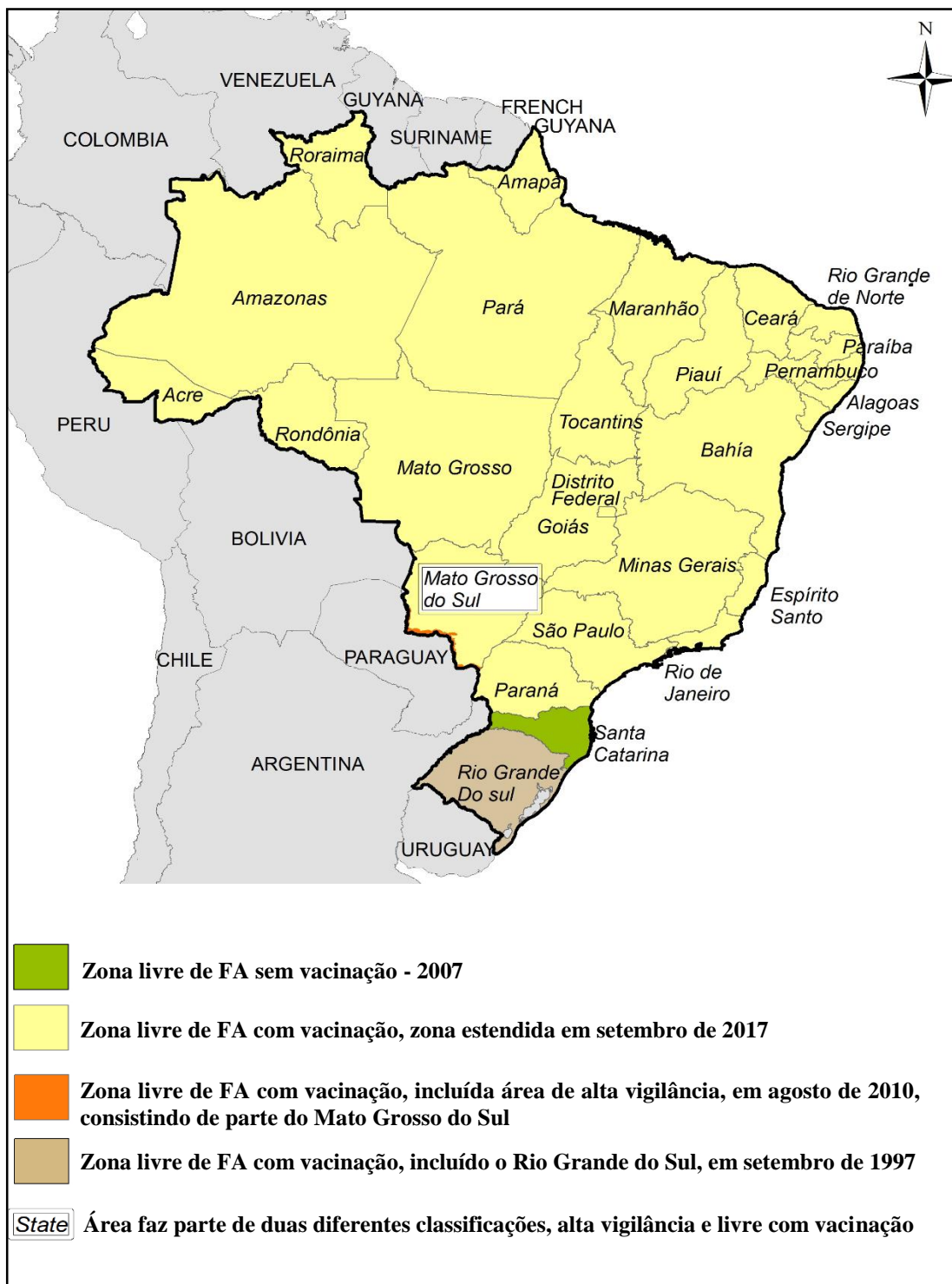
A ocorrência de surtos de FA é uma barreira sanitária para o comércio internacional e demanda elevados investimentos para controle e prevenção. Devido à sua natureza extremamente contagiosa, a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), desenvolveu e publicou medidas para minimizar o risco de propagação. Os padrões internacionais para garantir a segurança sanitária dos animais e seus produtos, foram publicados no *Terrestrial Code* da OIE (GARLAND & CLERCQ, 2011). De acordo com a OIE, 68 países membros possuem classificação livre de Febre Aftosa sem vacinação; dois países possuem classificação livre da doença com vacinação, e os demais possuem zonas livres da doença com e sem vacinação. A figura 9 classifica o *status* sanitário conferido pela OIE aos países membros. A classificação é feita de acordo com notificações recebidas e avaliações realizadas pela organização



**Figura 9:** Mapa do *status* oficial para Febre Aftosa dos países membros da OIE. Classificação dos países de acordo com a situação sanitária para Febre Aftosa em janeiro de 2019

Essa doença vesicular é uma das doenças animais de maior importância econômica do Brasil. Devido a isso o governo criou o Programa Nacional de Erradicação e Prevenção da Febre Aftosa, que tem como estratégia principal a implantação progressiva e manutenção de zonas livres da doença, de acordo com as diretrizes estabelecidas pela OIE. Existem algumas doenças vesiculares clássicas que precisam de diagnóstico laboratorial para distingui-las da FA, são elas: Estomatite Vesicular, Doença Vesicular do Suíno, Exantema Vesicular do Suíno, Rinotraqueíte Infecciosa Bovina, Diarreia Viral Bovina, Febre Catarral Maligna, Língua Azul, Seneca Vírus, Ectima Contagioso, Pseudovaríola e Estomatite Papular Bovina. Dentre estas, as doenças vesiculares com sinais clínicos indistinguíveis da FA são: Estomatite Vesicular, Doença Vesicular dos Suínos e Exantema Vesicular dos Suínos (PAHO/PANAFTOSA, 2017).

No Brasil, existem áreas de zona livre de FA com vacinação e de zona livre sem vacinação, com reconhecimento pela OIE. Após as ocorrências de FA em 2005 e 2006, as restituições de *status* sanitários suspensos e ampliações de zonas livres, levaram o país a situação sanitária conforme apresentado pela figura 10. O estado de Santa Catarina registrou a última ocorrência em 1993. Amazonas, Roraima e Amapá foram os últimos estados, a adquirirem a condição de zona livre de FA com vacinação (OIE, 2018).



**Figura 10:** Condição sanitária do Brasil para FA em maio de 2018 (OIE, 2018).

Atualmente, o vírus da Febre Aftosa é endêmico em várias regiões do mundo, que podem ser agrupadas geograficamente de acordo com a semelhança do vírus que partilham. O sudeste, leste e sul da Ásia possuem o sorotipo O do vírus, como causador de maior número de surtos da doença nos últimos anos, seguidos pelo sorotipo A e Ásia 1. O sorotipo O também é mais prevalente no Oriente Médio e Eurásia, seguido pelo Ásia 1, e o A que causa surtos esporádicos na região. O SAT-2 foi confirmado em 2012 no Egito, Líbia e na Faixa de Gaza. Os sorotipos O, A e SAT são endêmicos na África, sendo SAT-2 seguido por SAT-1, responsáveis pela maioria dos surtos. O SAT-3 é identificado principalmente em búfalos, mas já foi detectado em bovinos (BRITO *et al.*, 2015).

As áreas endêmicas foram divididas em sete *pools* geográficos do FMDV, agrupados de acordo com as semelhanças entre os vírus. Portanto, o *pool* um compreende o Sudeste Asiático, Ásia Central e Ásia Oriental, e os sorotipos endêmicos são Ásia 1, O e A. O *pool* dois compreende Sul da Ásia, e os sorotipos endêmicos da região são Ásia 1, O e A. O *pool* três compreende o Oeste da Eurásia e o Oriente Médio, sorotipos Ásia 1, O e A. O *pool* quatro compreende a África Oriental, sorotipos SAT-1, 2, 3, O e A. O *pool* cinco compreende a África Central e Ocidental, sorotipos SAT-1, 2, O e A. O *pool* seis compreende o Sul da África, sorotipos SAT-1, 2, 3, O e A. O *pool* sete compreende a América do Sul, os sorotipos endêmicos O e A, que atualmente circulam e provocam ciclos de emergência e disseminação na Colômbia e na Venezuela (FAO/EuFMD, 2018).

Entre os países da América do Sul, a última ocorrência da Febre Aftosa na Guiana foi em 1978, no Chile em 1987, no Uruguai em 2001, no Peru em 2004, na Argentina em 2006, na Bolívia em 2007, no Equador em 2011, no Paraguai em 2012.

No Panamá e Suriname, na América Central, nunca foi registrado o aparecimento da doença (PANAFTOSA/OPS, 2016). A Venezuela, que havia registrado o último foco em 2013, em 2017 teve novos focos foram confirmados (MAPA, 2018). A Colômbia havia registrado seu último surto em 2009, mas a doença voltou a ser registrada em 2017 e em abril de 2018. Entre setembro e outubro de 2018, sete novos surtos de FA sorotipo O, foram notificados em cidades da Colômbia (FAO/EuFMD, 2018).

## 1.7 Resposta imune do hospedeiro à infecção pelo FMDV

A primeira linha de defesa do organismo é composta por barreiras físicas e químicas, como as superfícies epiteliais do corpo e as enzimas das secreções. Quando o patógeno consegue romper a primeira defesa, o sistema imune inato induz a segunda defesa do organismo, iniciando uma resposta inflamatória para impedir que o patógeno se dissemine (MURPHY, 2014).

Algumas moléculas comumente encontradas nas superfícies de microrganismos, conhecidas como Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs), ativam a resposta imune inata, devido à interação com Receptores de Reconhecimento de Padrões (RRP), dentre os quais se encontram os receptores *Toll-like* (TLRs). Estes receptores estão presentes principalmente em macrófagos, neutrófilos e células dendríticas (fagócitos). Na fagocitose os receptores de superfície dos fagócitos se ligam ao patógeno, nos quais são internalizados em vesículas que são denominadas fagossomos. O fagossomo irá se fundir a lisossomos, em que o

conteúdo é liberado com a degradação e eliminação do patógeno (CRUVINEL *et al*, 2010).

Uma classe especial de citocinas, os interferons (INFs) tipo I e II, possuem funções únicas nas respostas inatas e adaptativas. Os INFs tipo I são os principais responsáveis por induzir respostas antivirais diretas em células infectadas. INFs tipo II podem ativar componentes do sistema imune celular, e também podem exibir atividade antiviral (DIAZ-SAN SEGUNDO *et al*, 2009).

A resposta imune adaptativa depende da ativação de células especializadas e das moléculas solúveis produzidas por essas células, como os anticorpos, quimiocinas e citocinas (CRUVINEL *et al*, 2010). Os linfócitos B amadurecem na medula óssea, e são responsáveis pela imunidade humoral, que se caracteriza pela produção e liberação de anticorpos. Os linfócitos T amadurecem no timo e reconhecem peptídeos de patógenos apresentados por moléculas do MHC (complexo de histocompatibilidade principal), em células infectadas ou apresentadoras de antígenos, que podem então, ativar macrófagos, mobilizar neutrófilos, apresentar atividade citotóxica contra células infectadas por patógenos, sendo responsáveis também, pela ativação da resposta imune humoral (MURPHY, 2014).

Em contraste com a imunidade adaptativa, existem poucas informações sobre a contribuição do sistema imune inato no controle da multiplicação do FMDV. O controle rápido da viremia durante a infecção por FA e a indução precoce de respostas imunes adaptativas indicam que as respostas imunes inatas estão ativas. Sabe-se que as células dendríticas, os macrófagos e as células *natural killer*, estariam envolvidas na defesa imunológica inata do hospedeiro. E que o sistema interferon,

especialmente o tipo I, desempenha um importante papel no controle da infecção pelo FMDV (SUMMERFIELD *et al.*, 2009). Os macrófagos seriam os principais responsáveis pela eliminação do vírus do animal infectado, pela fagocitose do vírus opsonizado (GRUBMAN & BAXT, 2004). A principal resposta imune efetora contra o vírus da FA utilizaria tanto anticorpos específicos quanto a atividade dos macrófagos (McCULLOUGH *et al.*, 1992). E a imunidade que protege os animais da infecção pelo FMDV envolveria não apenas as respostas da imunidade humoral através de anticorpos, mas também fatores da imunidade celular e inata (MATTION *et al.*, 2009).

O vírus da FA provoca uma rápida resposta humoral em animais infectados. A infecção em animais com o FMDV induz uma imunidade rápida e duradoura em bovinos, que se caracteriza pela manutenção de títulos elevados de anticorpos neutralizantes no soro do animal. A resposta primária à infecção no bovino é caracterizada por IgM detectável entre 3 e 7 dias após desafio intradermolingual, atingindo um pico entre 5 e 14 dias p.i. (pós infecção), reduzindo para níveis indetectáveis após 56 dias p.i. (HABIELLA *et al.*, 2014).

Experimentos com animais infectados por via oronasal demonstraram que as respostas de IgM e IgG1 específicas para o FMDV, foram induzidas rapidamente quatro dias p.i. O título de IgM atingiu um pico com 5 dias p.i. Foi demonstrado que a resposta inicial à IgM constitui o principal componente da atividade de neutralização do vírus *in vitro*, no soro bovino entre 5 e 6 dias p.i. (PEGA *et al.*, 2013). A troca de isotipo, ocorre rapidamente com IgG1 e IgG2 específicos, detectados a partir de 4 dias p.i. e atingindo níveis máximos a partir de 14 dias até 28 dias p.i. A IgA é inicialmente detectada no soro a partir de 7 dias p.i., atingindo um pico entre 7 e 14 dias p.i.



(COLLEN *et al*, 1994). A infecção pelo FMDV induz a manutenção de altos títulos de anticorpos nos animais afetados durante vários anos (HABIELA *et al*, 2014).

## 1.8 Vacinação

A primeira vacina inativada contra a Febre Aftosa foi desenvolvida usando fluido vesicular obtido de línguas de bovinos infectados experimentalmente, e posteriormente tratado com formaldeído para inativação viral. A produção industrial da vacina começou a partir da década de 1950. Outras vacinas foram produzidas a partir da década de 1960, e se baseavam no crescimento do FMDV em linhagem de células BHK-21 (*Baby Hamster Kidney*), e inativação com BEI (Etilenoimina Binária). Na década de 70 houve a introdução de adjuvantes oleosos na vacina. Atualmente vacinas que não contêm antígenos inativados já foram desenvolvidas, como as vacinas de DNA, as atenuadas e as de peptídeos sintéticos, mas seu uso ainda é muito limitado (DIAZ-SAN SEGUNDO *et al.*, 2017).

No Brasil, a substituição da vacina aquosa pela oleosa ocorreu gradativamente, sendo que a partir de 1992 as indústrias passaram a produzir apenas vacinas oleosas, para aumento da qualidade e do tempo de imunização. Atualmente, apenas é permitida a produção e a utilização no país de vacina inativada, formulada com as amostras virais A24 Cruzeiro e O1 Campos, emulsificada em adjuvante oleoso. A formulação consiste de uma emulsão primária, tipo água-em-óleo. A produção dos antígenos é realizada através de cultivo celular em suspensão, sendo empregados diferentes métodos de concentração (como ultrafiltração e PEG) (PNEFA, 2005). O

sorotipo C foi retirado da vacina após recomendações feitas à Comissão Sul-Americana para a Luta contra a Febre Aftosa (Cosalfa), em 2017.

De acordo com a OIE (2017), as vacinas contra a Febre Aftosa recebem duas classificações, as de potência padrão e as de alta potência. As vacinas padrão, devem ser formuladas para garantir um nível mínimo de proteção, apresentar 3PD50 (50% de dose protetora), sendo este um teste de desafio *in vivo*. Já as vacinas de alta potência são utilizadas para controle de surtos, e devem apresentar antígeno e adjuvante suficiente para produzir nível de proteção > 6PD50.

Os sorotipos do vírus da FA usados nas vacinas da América do Sul foram selecionados de isolados representativos da situação epidemiológica da região. O PANAFTOSA vem testando, adaptando e desenvolvendo a produção industrial das vacinas (SARAIVA, 2003).

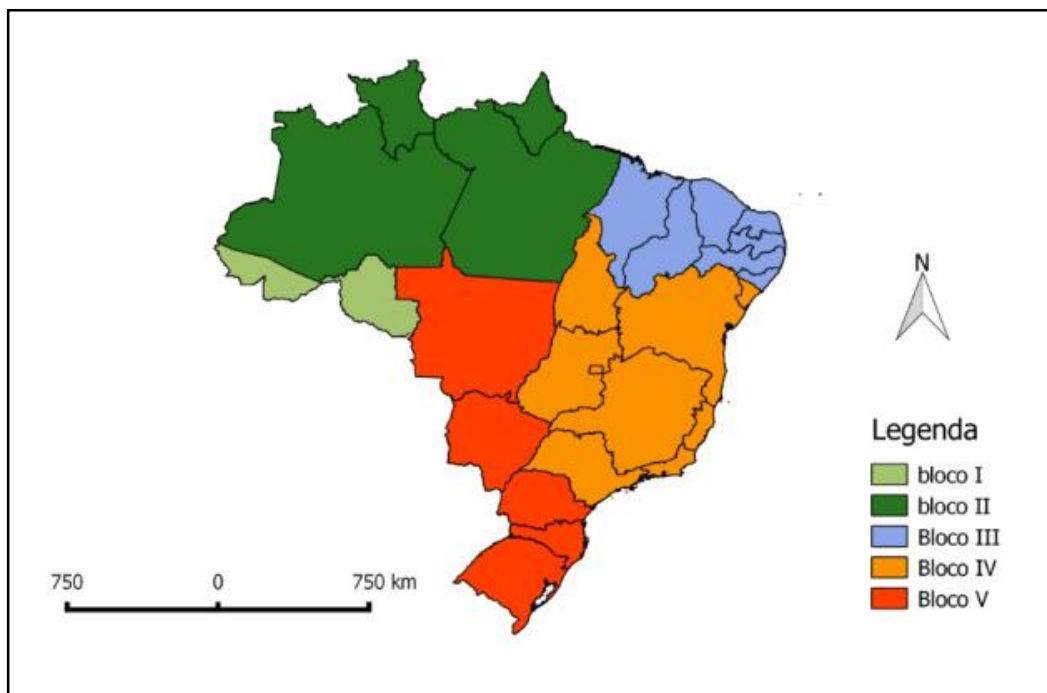
Como discutido anteriormente, a infecção pelo FMDV induz a manutenção de altos títulos de anticorpos nos animais afetados durante vários anos. Já as vacinas atuais utilizadas, induzem uma proteção relativamente curta, com reforços sendo recomendados a cada seis meses. A vacinação protege bovinos e suínos do desenvolvimento da doença clínica, mas não de uma infecção subclínica. A vacinação de bovinos com o antígeno de FMDV usando formulações de óleo ou de hidróxido de alumínio / saponina também é caracterizada por uma rápida resposta de anticorpos, com IgM específica para o FMDV detectada de 3 a 4 dias após a vacinação (p.v.), IgG1 e IgG2 de 4 a 6 dias p.v., títulos de anticorpos neutralizantes no soro detectados de 3 a 4 dias p.v. (HABIELA *et al*, 2014).

As três estratégias de vacinação utilizadas no Brasil são: 1) duas campanhas de vacinação anuais de todo o rebanho bovino e de búfalos; 2) vacinação por diferentes grupos etários: os dois ciclos anuais englobam todo o rebanho bovino e de búfalos com menos de 24 meses de idade e um ciclo anual para todo o rebanho bovino e de búfalos com mais de 24 meses de idade; 3) uma vacinação anual de todos os animais, em regiões onde as características geográficas permitem a gestão da exploração apenas por um período limitado do ano (Pantanal, Arquipélago do Marajó e Amapá) (CLAVIJO *et al.*, 2017).

Após o início do processo de erradicação da FA no país, o Brasil alcançou a condição de líder mundial na produção de bovinos e quarto de suínos, assim como na exportação de seus produtos. O PNEFA, buscando a manutenção da liderança da pecuária brasileira, lançou em 2017 um Plano Estratégico, que visa consolidar a condição sanitária conquistada para a FA, fortalecer a vigilância para as doenças vesiculares, e avançar com a zona livre de FA sem vacinação. O processo de transição de zonas livres de Febre Aftosa com vacinação, para zonas livres sem vacinação, terá início em 2019 e conclusão em 2023 (MAPA, 2017).

O Brasil foi agrupado em cinco blocos pelo PNEFA, em que foram considerados critérios técnicos, estratégicos, geográficos e estruturais, para a realização da transição de retirada da vacina de FA. O agrupamento está ilustrado na figura 11. De acordo com o plano de transição, o bloco I comunicará à OIE em abril de 2019 a retirada da vacina, e suspenderá efetivamente em maio de 2019. Os blocos II e III comunicarão à OIE a retirada da vacina em maio de 2020, e efetivarão a retirada em junho de 2020. Os blocos IV e V comunicarão à OIE a retirada da vacina em maio de 2021, e efetivarão a retirada em junho de 2021. Durante a execução do plano de

transição, será avaliada a necessidade de antecipar ou adiar qualquer etapa do processo (MAPA, 2017). Exatamente o que aconteceu no final de 2018 com o estado do Paraná, que antecipou a retirada da vacina de 2021 para maio de 2019 (MAPA, 2018).



**Figura 11:** Organização geográfica do Brasil para zonificação em blocos. A transição para retirada da vacina de FA irá obedecer aos critérios dessa zonificação (MAPA, 2017).

## 1.9 Métodos diagnósticos

Métodos diagnósticos aplicados à medicina veterinária são extremamente importantes para a detecção de doenças que acometem animais, tanto nas atividades de pesquisa como em análises laboratoriais de rotina.

O diagnóstico clínico da Febre Aftosa é difícil de ser realizado, e existem espécies em que os efeitos podem ser evidentes e debilitantes, como em bovinos e suínos, mas em outras, os sintomas da doença são quase imperceptíveis, como em ovinos e caprinos (ALEXANDERSEN *et al.*, 2003). Os métodos laboratoriais são imprescindíveis para um diagnóstico correto.

Os testes sorológicos para o diagnóstico da Febre Aftosa são realizados com os principais objetivos: 1) certificar animais individuais antes da importação ou exportação; 2) confirmar casos suspeitos de FA; 3) comprovar ausência de infecção; 4) demonstrar a eficácia da vacinação. Os testes são de dois tipos: aqueles que detectam anticorpos contra proteínas estruturais virais; aqueles que detectam anticorpos contra proteínas não estruturais virais e testes que detectam os dois grupos de proteínas. Os testes de detecção de proteínas estruturais virais são relativamente específicos para o sorotipo e detectam anticorpos induzidos por vacinação e infecção, como a neutralização viral (NV), o Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) de competição de fase sólida e o ELISA de bloqueio de fase líquida (OIE, 2017). A tabela 1 apresenta os ensaios recomendados pela OIE para o diagnóstico e vigilância da FA.

**Tabela 1:** Métodos disponíveis para o diagnóstico de FA recomendados pela OIE

<b>MÉTODOS</b>	
<b>Identificação do Agente</b>	<b>Deteção da Resposta Imune</b>
Isolamento Viral	ELISA NSP e SP para Anticorpos
ELISA para deteção de Antígeno	Neutralização viral
Fixação de Complemento	
LFD Dispositivos de Fluxo Lateral	
Real Time RT - PCR	Imunodifusão em Gel de Ágar
RT - PCR	

Fonte: Adaptado do Manual da OIE, 2017

### **1.9.1 Neutralização Viral**

O teste de neutralização viral detecta anticorpos, no soro sanguíneo, induzidos por vacinação ou por infecção. É considerado como o "padrão-ouro", para a deteção de anticorpos contra proteínas estruturais do vírus da Febre Aftosa. É um teste para certificação de importação e exportação de animais e produtos animais (JAMAL & BELSHAM, 2013). A NV é usada para investigar resultados sorológicos não conclusivos, obtidos por ELISA. A especificidade da NV, em uma diluição de 1/45 é de 100%. Atualmente, a OIE recomenda a NV, como teste definitivo para a avaliação final de quantificação de anticorpos. É essencial este tipo de avaliação, para determinar o estado da Febre Aftosa no rebanho, e nos produtos animais destinados ao comércio internacional (ALEXANDERSEN *et al.*, 2003).

A neutralização viral é um teste altamente específico e sensível, para vírus que produzem efeito citopático. A presença de anticorpos neutralizantes no soro, previne a infecção das células e conseqüentemente o ECP. O título do soro analisado corresponde à maior diluição em que o vírus é neutralizado. Os resultados dos títulos obtidos podem ser expressos em números aritméticos ou logarítmicos. Esses anticorpos neutralizantes tendem a persistir em animais já recuperados por longos períodos, muitas vezes por anos (MACH, 2006). As características importantes dos anticorpos incluem afinidade, isotipo, concentração, razão entre anticorpos e vírus, valência, capacidade de ligar o receptor de polimunoglobulina, capacidade de fixar o complemento e a especificidade da proteína do vírus e do epítipo de interesse (GRAHAM *et al*, 2013).

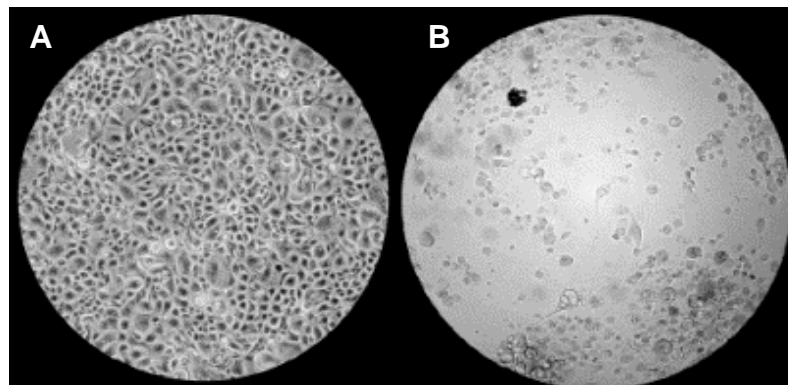
O teste de NV é amplamente utilizado para avaliar a resposta do sistema imune em animais vacinados, pois existe uma forte correlação entre título de anticorpos neutralizantes e proteção contra a infecção pelo FMDV (MAHAPATRA & PARIDA, 2018).

Os estudos de eficácia da vacina e as análises *in vitro* da defesa imune contra a FA, devem levar em consideração o papel central desempenhado pelo sistema reticuloendotelial, e sua função de fagocitose, nesta resposta imune protetora. Só então será possível obter uma clara apreciação da resposta imune após infecção por desafio, infecção natural e vacinação (McCULLOUGH, 1992).

Avaliar a correspondência da vacina com um determinado sorotipo do vírus é de extrema importância em determinadas situações, como em um surto. Essa avaliação indica se a vacina que será ou está sendo utilizada é eficaz ou não para

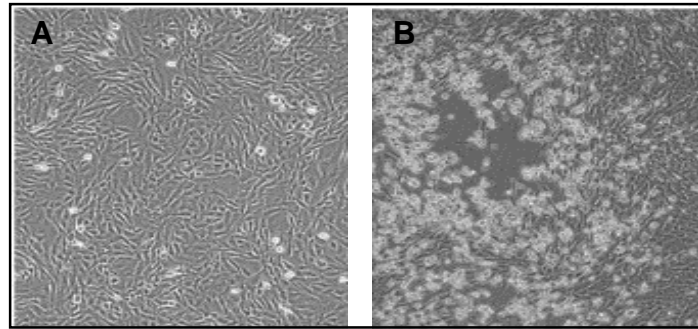
aquele determinado sorotipo do vírus. A neutralização viral é amplamente utilizada nessas avaliações (MATTION *et al.*, 2009). É o teste padrão recomendado pela OIE para a realização dos testes de combinação antigênica de FA (OIE, 2017), podendo ser utilizado para soros de diferentes espécies animais.

O efeito citopático (ECP) nas culturas celulares pode ser detectado quando existem alterações na morfologia celular, que são causadas pelo vírus infectante. Exemplos destas alterações são o arredondamento da célula infectada, a fusão com células adjacentes e o aparecimento de corpos de inclusão nuclear ou citoplasmática (ALBRECHT *et al.*, 1996), nas figuras 12 e 13 observamos o ECP do FMDV em monocamada de duas diferentes células, a ZZ-R, que são células embrionárias de cabra, e a BHK-21, células de rim de hamster.



**Figura 12:** Fotomicrografias da monocamada de células ZZ-R infectadas com FMDV. A – Monocamada de células ZZ-R. B – Imagem mostra a evolução do efeito citopático 48 horas após adição de suspensão viral (BREHM *et al.*, 2017).





**Figura 13:** Fotomicrografias da monocamada de células BHK-21 infectadas com FMDV. A – Monocamada de células BHK-21. B – Imagem mostra a evolução do efeito citopático 36 horas após adição de suspensão viral (ZHANG *et al*, 2013).

### 1.9.2 ELISA

O teste de neutralização viral exige pessoal altamente treinado e especializado, utilização de linhagens celulares, e de vírus ativo. As linhagens celulares são propensas a contaminação, e a manipulação de vírus ativo, principalmente do FMDV, exige utilização de instalações restritivas de biocontenção. Devido a essas particularidades, foram desenvolvidos imunoenaios que utilizam vírus inativados e com resultados mais rápidos.

O Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) pode ser aplicado no desenvolvimento de vacinas e no diagnóstico de doenças, e para medir e monitorar mudanças na resposta imune de animais infectados ou imunizados. Esse monitoramento serve como base, para o entendimento imunológico das doenças (HOSSEINI *et al.*, 2018). O teste de ELISA para FMDV é utilizado para identificar amostras positivas, e a identificação do sorotipo do vírus na amostra em análise. Em

2001 durante um surto de FA no Reino Unido, 90% das amostras positivas de bovinos e suínos foram detectadas pelo ELISA (ALEXANDERSEN *et al.*, 2003).

De acordo com a OIE, o ELISA é o principal procedimento para detecção do antígeno viral da FA e identificação do sorotipo. ELISAS de competição e bloqueio, que detectam proteínas estruturais e não-estruturais do FMDV, estão presentes no mercado e são usados para avaliação da infecção, da imunização, e para testes vacinais (OIE, 2017). McCULLOUGH e colaboradores (1985) desenvolveram no Instituto Pirbright um ELISA de competição em fase líquida, utilizado na identificação de epítomos do FMDV. Posteriormente, o PANAFTOSA adaptou a técnica para identificação de anticorpos contra proteínas estruturais do vírus, a fim de obter uma avaliação sorológica de animais após a vacinação (PANAFTOSA, 2001). A identificação de anticorpos contra proteínas não estruturais do FMDV pode ser usada para identificar a infecção passada ou presente com qualquer um dos sete sorotipos do vírus, mesmo que o animal também tenha sido vacinado. Tais testes detectam os anticorpos para as poliproteínas 3AB ou 3ABC, e não são específicos para o sorotipo (OIE, 2017).

Reações falso-positivas de baixo título podem ocorrer em uma pequena proporção dos soros testados nos ELISAs de competição ou bloqueio, que utilizam anticorpos policlonais (PABs) específicos de sorotipo ou anticorpos monoclonais (MABs), devido a diferenças de reatividade. Uma abordagem que combina triagem por ELISA, e confirmação das amostras positivas pela NV, minimiza a ocorrência de resultados falso-positivos (OIE, 2017).

### 1.9.3 Combinação de vacinas

A vacinação anual contra Febre Aftosa em animais susceptíveis contribui para erradicação da doença, mas muitos países estão substituindo a vacinação por novas estratégias de controle, como eliminação e controle de movimentos dos animais e vacinação emergencial. Outra estratégia que está sendo almejada é a eliminação do abate de animais em futuros surtos de FA. Vários países estabeleceram banco de vacinas para contenção de surtos, embora seja necessário tentar combinar as amostras de vírus da vacina o mais próximo possível dos isolados de campo, contra as quais é necessária proteção. Muitas vezes surgem novas variantes em relação às quais nenhuma dessas vacinas armazenadas são eficazes. A maneira mais precisa de se avaliar a proteção entre uma combinação específica da vacina e os isolados de campo, é realizando um teste *in vivo*. Devido aos riscos, os custos e o tempo necessários, a execução deste tipo de avaliação torna-se inviável (BREHM *et al.*, 2008).

A qualidade da vacina utilizada é o fator de maior importância para o sucesso de um programa de vacinação, mas uma combinação antigênica razoável entre a vacina contra FA e as amostras do vírus de um surto também é considerada essencial para a eficácia da vacina. Testes sorológicos são utilizados para medir o nível de proteção conferida pela vacina e a combinação antigênica. Nestes testes, o título de anticorpos de amostras de animais vacinados é obtido a partir do teste de neutralização viral, em que é utilizado a amostra de vírus vacinal, e também a amostra de um isolado de campo. Uma relação entre esses títulos é estabelecida, a fim de determinar a eficiência da vacina utilizada (TEKLEGHIORGHIS *et al.*, 2014). Os

resultados obtidos para avaliação da combinação antigênica, a partir de valores de  $r_1$  e da avaliação da Expectativa Percentual de Proteção (EPP), orientam a seleção das amostras vacinais que serão mais efetivas, seja para vacinação profilática rotineira ou uso emergencial, e também para monitorar de forma contínua a proteção eficaz da vacina. Valores de  $r_1$  são encontrados a partir da avaliação dos títulos de amostras de soros de animais vacinados, através dos métodos de NV, ELISA e fixação do complemento, em que é obtido um coeficiente de relação sorológica. Os resultados dos testes de NV e ELISA também são utilizados para obtenção da EPP, comumente utilizada pelo PANAFTOSA na América do Sul nos programas de controle e erradicação do FMDV. Portanto, a EPP e o coeficiente  $r_1$  são utilizados como parâmetro para avaliação da similaridade entre vírus de sorotipos vacinais e isolados de campo, a fim de determinar se a vacina utilizada é eficaz contra aquele sorotipo circulante (OIE, 2017).

A eficácia da vacina inativada para FA depende principalmente da integridade da partícula do vírus. O FMDV pode ser dividido em quatro partículas específicas, baseadas no coeficiente de sedimentação (S), por centrifugação em gradiente de sacarose: virions intactos (146S), capsídeos vazios (75S), peptídeos relacionados à infecção (45S) e subunidades de proteína 12S (12S) (FENG *et al.*, 2016). A eficácia das vacinas de FMDV depende, portanto, da obtenção das partículas 146S do vírus, e da estabilidade e integridade dessa partícula, após a inativação e purificação (BAZID *et al.*, 2016). Inúmeros problemas podem ocorrer durante a produção da vacina, comprometendo sua qualidade, como também mutações do vírus, que podem resultar no surgimento de novos tipos virais. Portanto, a análise da combinação antigênica vacinal é extremamente importante.

## **1.10 Parâmetro de validação de métodos laboratoriais**

A credibilidade de um resultado laboratorial depende da verificação ou validação do método utilizado, ou seja, da avaliação e fornecimento de comprovação de que os requisitos pretendidos tenham sido cumpridos. A verificação de desempenho de um ensaio deve conceber experimentos que forneçam informações sobre possíveis fontes de variação dentro e entre laboratórios na precisão do teste. A repetitividade, reprodutibilidade e avaliação da especificidade e sensibilidade analítica devem ser realizados com seleção aleatória de amostras (OIE, 2017).

A norma NBR ISO/IEC 17025:2017 descreve os requisitos para laboratórios de calibração e ensaio, ao seguir tais requisitos, os laboratórios tornam-se capazes de demonstrar que são tecnicamente competentes. A acreditação nessa norma exige a obtenção da estimativa da incerteza de medição associada aos seus resultados.

### **1.10.1 Repetitividade**

O ISO GUM 2008 (Guia para Expressão da Incerteza de Medição), define a repetitividade como grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo mensurando, efetuadas sob as mesmas condições de medição. Estas condições são denominadas condições de repetitividade que incluem: mesmo procedimento de medição, mesmo observador, mesmo instrumento de medição, utilizado nas mesmas condições, mesmo local, repetição em curto período de tempo.

A repetitividade pode ser expressa, quantitativamente, em função das características de dispersão dos resultados.

A repetitividade é conhecida como a variabilidade do analista. As causas possíveis para uma baixa repetitividade são: variação do analista (falta de técnica, posição, experiência, habilidades de manipulação, de treinamento, sensibilidade e fadiga), variação do ambiente (flutuações na temperatura, umidade, iluminação, limpeza), variação na qualidade do padrão utilizado, variação do método (MSA, 2010).

### **1.10.2 Reprodutibilidade**

O ISO GUM 2008, define reprodutibilidade como grau de concordância entre os resultados das medições de um mesmo mensurando efetuadas sob condições modificadas de medição. Para que uma expressão da reprodutibilidade seja válida é necessário que sejam especificadas as condições modificadas. As condições modificadas podem incluir: princípio de medição, método de medição, observador, instrumento de medição, padrão de referência, local, condições de utilização, tempo. A reprodutibilidade pode ser expressa quantitativamente em função das características da dispersão dos resultados.

A reprodutibilidade é conhecida como a variabilidade entre os analistas. As causas possíveis para baixa reprodutibilidade são: variação entre analistas (falta de treinamento, técnica, habilidade e experiência), variação entre ambientes (flutuações

na temperatura, umidade, iluminação, limpeza), variação na qualidade do padrão utilizado, variação do método (MSA, 2010).

Os resultados obtidos de repetitividade e reprodutibilidade são expressos em CV (coeficiente de variação), e classificados de acordo com os critérios da tabela 2:

**Tabela 2:** Critérios de classificação dos parâmetros de repetitividade e reprodutibilidade

<b>CV</b>	<b>CONCLUSÃO</b>
Abaixo de 10%	Resultados considerados satisfatórios
Entre 10 e 30%	Resultados considerados aceitáveis, com base na importância da aplicação do método após análise crítica
Acima de 30%	Resultados considerados insatisfatórios

Fonte: Adaptado de Análise dos Sistemas de Medição (MSA), 2010.

### 1.10.3 Incerteza de medição

De acordo com o ISO GUM 2008, incerteza de medição é um parâmetro não-negativo que caracteriza a dispersão dos valores atribuídos a um mensurando com base nas informações utilizadas. É preciso primeiramente especificar o mensurando, levantar as possíveis fontes de incerteza do mesmo, como a incerteza relacionada a equipamentos, analistas, insumos, qualidade da amostragem, ambiental, e por fim avaliar as incertezas padrão das grandezas de entrada. A incerteza padrão da grandeza de entrada é dada pelo desvio padrão da média amostral.

A incerteza de medição é uma expressão quantificada da confiabilidade da medição. É um conceito utilizado internacionalmente para descrever a qualidade de um valor medido, embora esse termo tenha sido utilizado para medições de grande exatidão. Muitas normas de sistema da qualidade requerem que a incerteza de medição seja conhecida e consistente com a capacidade de medição do ensaio avaliado (MSA, 2010).

#### **1.10.3.1 Incerteza padrão combinada**

De acordo com o ISO GUM 2008, a incerteza padrão combinada é quando a incerteza padrão de um resultado de uma medição é obtido, por meio dos valores de várias outras grandezas, sendo igual à raiz quadrada positiva de uma soma de termos, que constituem as variâncias, ou covariâncias destas outras grandezas, ponderadas de acordo com o quanto o resultado da medição varia com mudanças nestas grandezas.

A incerteza combinada inclui todos os componentes significativos da variação do processo de medição. Conhecer o valor da incerteza combinada permite a identificação de todos os erros significativos e permite que a medição seja replicada (MSA, 2010).



### **1.10.3.2 Incerteza expandida**

De acordo com o ISO GUM 2008, a incerteza expandida é a quantidade que define um intervalo em torno do resultado de uma medição, com o qual se espera abranger uma grande fração da distribuição dos valores que podem ser razoavelmente atribuídos ao mensurando.

A incerteza expandida é obtida a partir da multiplicação da incerteza combinada pelo fator de abrangência  $k$ . Assumindo uma distribuição normal, esse valor é frequentemente interpretado como  $k = 2$  (MSA, 2010).

## 2 JUSTIFICATIVA

A Febre Aftosa é uma doença viral altamente infecciosa. Em animais infectados, o vírus pode ser encontrado nas feridas, na saliva, no leite, e qualquer objeto que tenha contato com o vírus, que pode disseminar a doença de rebanho a rebanho. Nos últimos anos o Brasil vem ganhando posições de destaque no mercado mundial de produtos de origem animal, devido a melhora progressiva da condição sanitária do rebanho brasileiro. Para que novos e valiosos mercados possam ser alcançados, o aprimoramento do diagnóstico animal torna-se imprescindível. Os métodos diagnósticos aplicados à medicina veterinária são extremamente importantes para a detecção de doenças que acometem animais, tanto nas atividades de pesquisa como em análises laboratoriais de rotina. Os testes sorológicos para diagnóstico da FA, como o teste de neutralização viral e o ELISA, são utilizados para certificar animais antes do trânsito, inclusive para fins de comércio internacional. São métodos apropriados para confirmar a infecção anterior ou em andamento em animais não-vacinados, como também, para monitorar a imunidade conferida pela vacinação no campo. O teste de neutralização viral detecta anticorpos induzidos por vacinação ou por infecção. É considerado como o "padrão-ouro" pela OIE, para a detecção de anticorpos contra proteínas estruturais da FA, e é um teste para certificação de animais, e produtos animais. O método de neutralização viral para o FMDV ainda não foi verificado pelo Laboratório Federal de Defesa Agropecuária (LFDA) de Minas Gerais, e como o objetivo do PNEFA para os próximos anos é a retirada da vacina em

todo o país, alcançando o *status* de zona livre sem vacinação, o teste de NV torna-se imprescindível para avaliação sorológica dos animais. Além disso, em caso de surtos de FA, é importante ter essa técnica padronizada, a fim de avaliar a eficácia da vacina contra um isolado de campo, já que o teste de combinação de vacinas por NV é o mais indicado e preciso. Em uma situação de emergência sanitária, é preciso uma avaliação rápida e eficaz do cenário, para que ações eficientes eliminem e controlem os focos. Todos os métodos laboratoriais para o diagnóstico da FA devem estar verificados e prontos para execução. Os resultados de incerteza de medição, de repetitividade e reprodutibilidade, obtidos na avaliação de desempenho do ensaio de neutralização viral do FMDV, permitem avaliar se o teste está dentro dos padrões estabelecidos, e são parâmetros exigidos pela NBR ISO/IEC 17025:2017. Esses critérios foram definidos pelo LFDA localizado em Pedro Leopoldo, a fim de certificar a qualidade dos resultados fornecidos pelo laboratório. Dessa forma, neste trabalho foi proposto a verificação do desempenho do ensaio de neutralização viral para a detecção de anticorpos para o vírus da Febre Aftosa.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Verificar o desempenho do ensaio de neutralização viral de anticorpos para o vírus da Febre Aftosa, para amostras de vírus disponíveis no LANAGRO: amostras vacinais A24 Cruzeiro, C3 Indaial e O1 Campos, e também amostras de isolados de campo O BR RS 80, A 2795 MG e C3 AM BR 04.

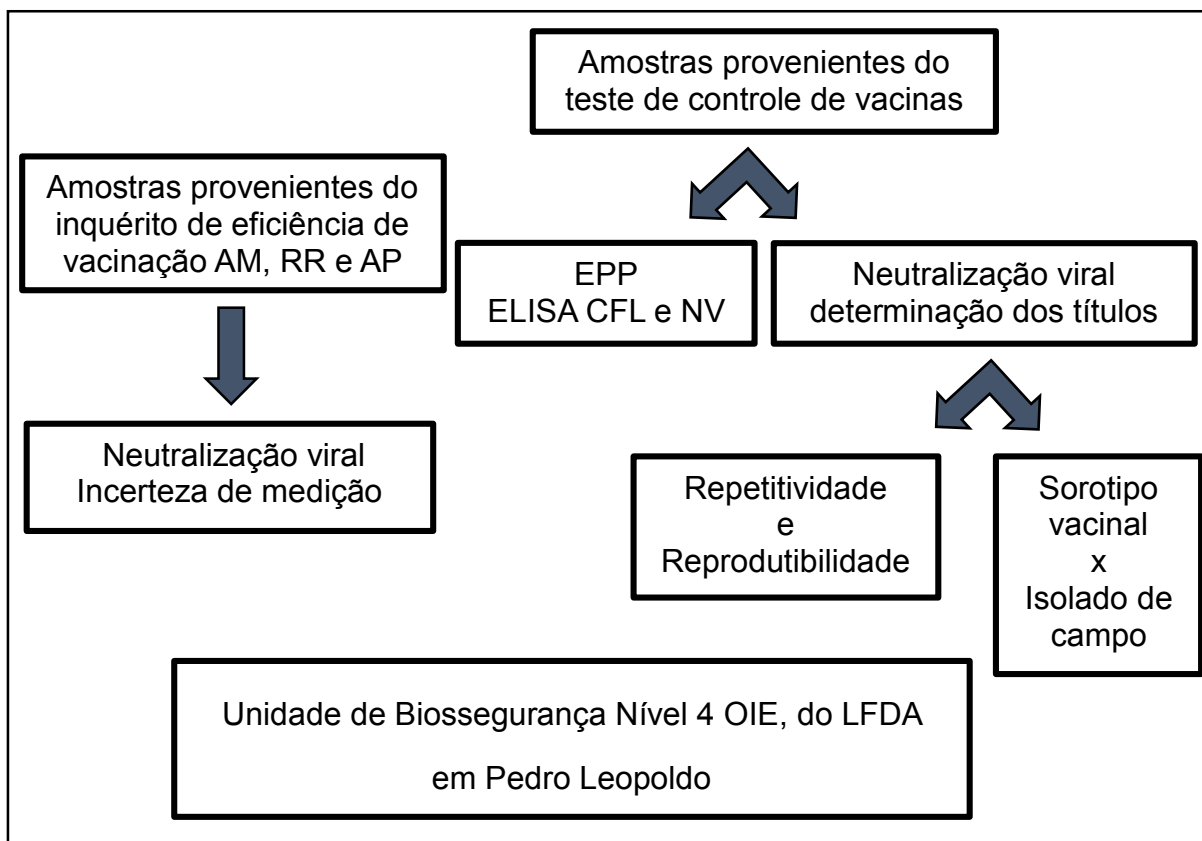
#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Verificar o desempenho do método de neutralização viral do FMDV a partir da determinação da incerteza de medição, repetitividade e reprodutibilidade;
- Avaliar a proteção entre a combinação dos sorotipos O, A e C da vacina utilizada no Brasil e isolados de campo, a fim de testar a correspondência vacinal através da neutralização viral;

- Avaliar os títulos de anticorpos induzidos em bovinos após primeira vacinação e vacinação de reforço por neutralização viral, e avaliar a correspondência dos resultados obtidos com o método de ELISA.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

Este trabalho foi conduzido nos Laboratórios da Unidade de Biossegurança Nível 4 OIE do LFDA em Pedro Leopoldo, Minas Gerais. O LFDA é uma unidade descentralizada do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), pertencente à Rede Oficial de Laboratórios, subordinada à Coordenação Geral de Apoio Laboratorial (CGAL) e vinculada à Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA). Os ensaios realizados seguem o fluxograma apresentado pela figura 14:



**Figura 14:** Representação esquemática das etapas para obtenção da verificação de desempenho do método de NV para o vírus da FA. Amostras provenientes do inquérito de eficiência de vacinação foram utilizadas para avaliação da incerteza de medição do método. Amostras provenientes do teste de controle de vacinas foram utilizadas para avaliação da eficácia da partida da vacina pela EPP, identificação da repetitividade e reprodutibilidade do método e avaliação dos coeficientes de relação sorológica entre os sorotipos vacinais do FMDV e isolados de campo. Ensaios realizados no Laboratório de Diagnóstico de Doenças Virais (LDDV) e na Unidade de Biossegurança nível 4 do LFDA-MG.

#### 4.1 Amostras de soros de bovinos

As amostras de soros de bovinos originadas de uma fazenda do município de Matozinhos em Minas Gerais, utilizadas nos ensaios foram provenientes de um teste piloto de controle de vacinas para FA, realizado no segundo semestre de 2016. Outras amostras que também foram utilizadas nos ensaios pertenciam ao inquérito

sorológico, para determinação da eficiência da vacinação para a FA, dos estados do Amapá, Roraima e Amazonas. O inquérito sorológico realizado pelo LFDA, é uma etapa das ações que foram propostas pelo PNEFA, cujo objetivo é a avaliação da resposta imunológica dos bovinos vacinados anualmente no país, a partir dos resultados do título de anticorpos para proteínas estruturais do FMDV nos soros desses animais.

A vacina utilizada no teste piloto foi a AFTOVACIN (MSD), previamente avaliada com resultados satisfatórios pelo LFDA do Rio Grande do Sul, é uma vacina trivalente partida 020/15, fabricada em novembro de 2015 e com data de validade até novembro de 2017, cada dose continha 10µg de antígenos purificados e inativados, formulada com as amostras virais O1 Campos, A24 Cruzeiro e C3 Indaial, emulsificados em óleo mineral. Para seleção dos animais, foram coletadas amostras de sangue de 29 bovinos machos com 20 meses de idade originados da Sanipeç Agropecuária, localizada no município de Matozinhos no estado de Minas Gerais. As 29 amostras de soros coletadas foram testadas com o ELISA indireto, para detecção de proteínas 3ABC do FMDV, e também com o ELISA CFL, para titulação de anticorpos contra proteínas estruturais, ambos produzidos pelo PANAFTOSA. Os animais foram então imunizados com a vacina citada anteriormente, via intramuscular, cada dose continha 5 mL da suspensão. Após 28 dias pós vacinação (dpv), foi realizada a coleta de amostras de sangue dos animais, e realizada a revacinação dos bovinos. Após 28 dias pós reforço (dpr), foi realizada nova coleta de amostras de sangue desses animais.



Portanto, as amostras de soros de bovinos utilizadas nos ensaios deste trabalho, eram provenientes de animais vacinados dos estados do Amapá, Amazonas, Minas Gerais e Roraima, todos os animais com menos de 24 meses de idade.

## **4.2 Ensaio de neutralização viral**

O ensaio avalia a capacidade de neutralização do FMDV *in vitro* pelos anticorpos produzidos, inibindo assim a infecção de células BHK, reduzindo o efeito citopático observado. A partir dos dados obtidos por essa avaliação, o título de anticorpos no soro analisado é então determinado. O método utilizado neste trabalho, seguiu as orientações do Manual da OIE (2017).

### **4.2.1 Cultivos de células**

Os testes de multiplicação, titulação e neutralização virais foram realizados em células da linhagem BHK-21 (*Baby Hamster Kidney*) provenientes do subcultivo da amostra ATCC CCL-10, obtidas pelo Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). A escolha da linhagem BHK-21 é devida à sua indicação no método descrito pela OIE. As células foram subcultivadas em meio MEM (Meio Essencial Mínimo com sais de Earle), contendo 2,2 % de bicarbonato de sódio; 0,11 % de piruvato de sódio; 0,3 %

de L-glutamina e 2 % de HEPES, suplementado com 10 % de soro fetal bovino, condições de cultura à 37°C, mantidas em atmosfera de 5 % de CO<sub>2</sub>.

#### **4.2.2 Amostras de vírus**

Um estoque de cada sorotipo de vírus foi produzido em monocamada de células BHK-21 e conservados a -80°C. Os sorotipos vacinais utilizados foram: O1 Campos, A24 Cruzeiro e C3 Indaial. Os isolados virais de campo, utilizados nos ensaios foram: O BR RS 80, isolado do surto de 1980 no estado do Rio Grande do Sul, A 2795 MG, isolado de Minas Gerais em 1995, e C3 AM BR 04, isolado do Amazonas em 2004.

#### **4.2.3 Titulação viral**

Para determinar o título do vírus, uma alíquota foi submetida a uma série de oito diluições seriadas logarítmicas do vírus, em meio MEM com 1% de solução de antimicrobianos (estreptomicina, kanamicina, micostatina ou anfotericina B, penicilina e polimixina B). Destas diluições, 50 µL foram distribuídas em placas de 96 poços que continham 50 µL de meio. As placas foram incubadas a 37 °C em estufa com 5 % de CO<sub>2</sub> por uma hora. Posteriormente foram adicionadas 15.000 células BHK-21/poço e incubadas a 37°C em estufa de CO<sub>2</sub> por 48 horas. Foram incluídos em cada placa

controles contendo apenas células. Após esse período, foi realizada leitura visual em microscópio óptico, para verificação do efeito citopático nas células.

O cálculo do título viral foi feito pela dose infecciosa 50% em cultura de tecidos (TCID<sub>50</sub>/mL) utilizando o método de Reed-Muench (1938). O título viral foi determinado através da seguinte fórmula: log da diluição acima de 50% (em que foi observado ECP) + distância proporcional x log do fator de diluição. A distância proporcional é uma relação entre valor encontrado acima de 50% de ECP e abaixo de 50% de ECP (BURLESON *et al.*, 1992).

#### **4.2.4 Neutralização viral**

A verificação de desempenho do método de NV de FA seguiu as orientações do manual da OIE. Para os ensaios de neutralização viral foram utilizadas células da linhagem BHK-21 C-13, provenientes do subcultivo da amostra ATCC CL-10. As células foram subcultivadas em meio MEM (Cultilab) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco). O ensaio foi realizado em placas de microtitulação de fundo chato com 96 poços, para cultivo de células. Os soros foram inativados a 56°C por 30 minutos. Foi adicionado 8,7µL dos mesmos em duplicata, nos poços da linha A da placa, resultando em uma diluição inicial de 1:11,5. Os soros foram diluídos seriadamente, com micropipeta multicanal, passando 50µL da diluição para a linha posterior, e assim sucessivamente até o final da placa. Ao final, foram adicionados 50µL da diluição do vírus, contendo 100 TCID<sub>50</sub>/poço, para cada sorotipo do vírus em teste. Foram incluídos na placa controles contendo apenas células, um controle

negativo correspondente ao soro de um animal não vacinado nem infectado, e um controle positivo, previamente testado pelo LFDA. Alíquotas de uma diluição seriada logarítmica do vírus foram adicionadas para controle das doses. As placas foram então incubadas a 37°C em estufa de CO<sub>2</sub>, por uma hora, para que ocorresse a interação do antígeno com o anticorpo. Após, foram adicionadas 15.000 células BHK-21/poço, as placas foram incubadas a 37°C em estufa de CO<sub>2</sub> por 48 horas.

Os títulos dos soros foram obtidos a partir do método de Karber (1931), em que o resultado que é expresso corresponde a maior diluição em que foi observado proteção em 50% dos poços. Nos testes relacionados a avaliação de correspondência vacinal, os cálculos seguiram as orientações propostas por Spearman-Kärber (FINNEY, 1964). Amostras com título igual ou maior a 1,66 log<sub>10</sub>, correspondente a diluição 1:46 são consideradas positivas, amostras com títulos menores são consideradas negativas (OIE, 2017).

### **4.3 ELISA**

#### **4.3.1 Sensibilização de placas para identificação de anticorpos para o teste de ELISA-CFL**

O ELISA CFL, de competição em fase líquida, é um set comercial produzido pelo PANAFTOSA. O ELISA CFL baseia-se na competição pelo mesmo antígeno, dos anticorpos para proteínas estruturais presente no soro de animais vacinados e os

soros captura produzidos em coelho, presente nas placas de fase sólida sensibilizadas. Esse método tem por objetivo, titular o nível de anticorpos para proteínas estruturais para o vírus da Febre Aftosa em soros de bovinos.

A sensibilização das placas para o ensaio é realizada com anticorpos específicos para os antígenos da prova de ELISA CFL que serão utilizadas para titulação de anticorpos contra o vírus da Febre Aftosa. Baseia-se na sensibilização de placas para ELISA com um soro de captura produzido em coelho imunizado contra os vírus dos sorotipos O1 Campos, A24 Cruzeiro e C3 Indaial. É utilizada uma placa para cada sorotipo. Os procedimentos utilizados estão descritos abaixo e seguiram as orientações do fabricante.

As placas para ELISA foram sensibilizadas com soro captura, hiperimune de coelho, diluído em 100µL de solução carbonato-bicarbonato 0,05mol/L (1,59g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 2,93g de  $\text{NaHCO}_3$  dissolvidos em água deionizada – q.s.p. 500mL, pH 9,6). As diluições dos soros captura foram, para o sorotipo O de 1:2000, para o A de 1:2000 e para o C de 1:1600. Em seguida, as placas foram incubadas de 2°C a 8°C, por 16 a 20 horas. As placas foram retiradas da geladeira e deixadas em temperatura ambiente por 1 hora. Em seguida, as placas foram lavadas com 300 µL por poço de solução salina fisiológica 0,85 % (8,5 g de NaCl dissolvido em água deionizada – q.s.p. 100mL, pH 7,4). Após a lavagem, foram adicionados 100 µL por poço de solução salina fosfatada (8,0g de NaCl, 0,2g de KCl, 2,9g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 0,2g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , dissolvidos em água deionizada – q.s.p. 100mL, pH 7,4-7,6.), no momento do uso foi adicionada Ovoalbumina Grau V (1 %P/V), incubadas por uma hora à temperatura ambiente. Após, as placas foram lavadas uma vez com solução salina fisiológica 0,85 %, seladas e armazenadas invertidas em freezer

### **4.3.2 Titulação de anticorpos contra proteínas estruturais do vírus da Febre Aftosa**

Em uma placa de fundo em U inerte auxiliar, foram adicionados os soros dos bovinos, puros e diluídos (diluição a partir 1:2 até 1:6250), diluição realizada em PBSTB (Phosphate Buffered Saline + Tween + Bovine Serum Albumin) (80,0 g de NaCl, 2,0 g de KCl, 29,0 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O, 2,0 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, dissolvidos em água deionizada – q.s.p. 1000mL, pH 7,4-7,6, no momento do uso foram adicionados 10,0 g de Albumina Grau II, 500 µL de Tween 20 e 2% dos soros bloqueadores presentes no set biológico, de coelho e bovino). Cada placa possuía controle negativo, controle fraco positivo, controle forte positivo, controle de antígeno e controle dos reagentes (amostra em branco). Os controles do ensaio são obtidos no kit comercial. Em cada poço, foi acrescentado 40µL do antígeno em suspensão viral inativada com BEI glicerinada, (diluição de 1:80 sorotipos O e A, 1:140 sorotipo C em PBSTB). As placas foram incubadas por 60 minutos à 37°C, sendo os primeiros 20 minutos sob agitação. Concomitantemente, as placas sensibilizadas foram descongeladas por 20 minutos em geladeira, 20 minutos à temperatura ambiente e 20 minutos em estufa à 37°C. Após a incubação, 50 µL do soro-antígeno, foram transferidos da placa auxiliar para a placa sensibilizada, e incubada por 30 minutos à 37°C sob agitação. As placas foram lavadas três vezes com solução salina fisiológica com tween 20 a 0,05%. E adicionados em cada poço 50 µL do anticorpo primário, soro hiperimune de cobaio (diluição 1:600 sorotipo O, 1:300 sorotipos A e C em PBSTB); incubação a 37°C por 30 minutos sob agitação. Em seguida, as placas foram lavadas três vezes com solução salina fisiológica com tween 20 a 0,05%. Foram adicionados em cada poço 50µL do anticorpo secundário (IgG de cabra anti IgG de cobaio, diluição 1:650 para o

sorotipo O, 1:1800 sorotipo A e 1:700 sorotipo C, conjugado à peroxidase, Sigma-Aldrich, diluído em PBSTB), incubação a 37 °C por 30 minutos sob agitação. As placas foram lavadas quatro vezes com solução salina fisiológica com tween 20 a 0,05 %, e reveladas com solução de OPD (O-Phenylenediaminedihydrochloride, Sigma-Aldrich) (26,0mL de  $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$  0,1 M, 28,0mL de  $Na_2HPO_4$  0,2 M, 40  $\mu$ L de  $H_2O_2$  e 40mg de OPD), em que foram adicionados 50  $\mu$ L por poço. A incubação ocorreu à temperatura ambiente sob a proteção da luz por 20 minutos. Em seguida a reação foi interrompida com 50 $\mu$ L por poço de ácido sulfúrico 1,5mol/L. A leitura foi realizada em espectrofotômetro de microplacas (Tecan Sunrise RChisto) a 492nm.

O cálculo para determinação do título da amostra pelo ELISA CFL, utiliza a realização do método de interpolação linear, procedendo da seguinte forma:

- Cálculo da densidade óptica (DO) média do controle do antígeno (X);
- Obtenção de 50 % deste valor médio  $X/2=Y$ ;
- A partir do valor médio obtido anteriormente (Y), eleger a leitura imediatamente superior (A);
- Da mesma forma eleger a leitura imediatamente inferior (B);
- Subtrair a leitura inferior da superior  $(A-B) = (Z)$ ;
- Subtrair do valor médio (Y), a leitura inferior (B):  $(Y-B)$ ;
- Multiplicar o logaritmo do fator de diluição (C) por  $(Y-B)$ ;
- Dividir o valor obtido no cálculo anterior pelo valor de (Z);
- Somar o valor obtido anteriormente com o logaritmo da diluição da leitura inferior B(D).

Interpolação linear: Título 50 % = [(Y - B) C] / Z + D (resultado em valor logarítmico).

#### 4.4 Teste de potência da vacina por ELISA e NV

O teste de potência da vacina contra o FMDV foi realizado a partir dos resultados obtidos, dos títulos de anticorpos de 17 animais selecionados aleatoriamente entre o grupo inicial de 29 bovinos, após 28 dias da vacinação. Foram utilizados bovinos, com idade entre dezoito e vinte e quatro meses, com peso mínimo de duzentos quilos, homogêneos, em bom estado sanitário e de nutrição, que não foram previamente vacinados contra a Febre Aftosa, e nem infectados pelo vírus. Portanto, os soros não possuíam anticorpos contra proteínas estruturais e não estruturais do vírus da Febre Aftosa. A vacina é considerada aprovada quando apresenta uma EPP (Expectativa Percentual de Proteção) de 80% para cada um dos sorotipos virais que a compõe, com nível de confiança de 95%. Foi calculada para cada partida de vacina a média de EPP, excluindo-se os soros com maior e menor título; uma partida de vacina é considerada aprovada quando a média das EPPs for igual ou superior a 80% para cada um dos antígenos testados; uma partida de vacina é considerada reprovada quando a média das EPPs for inferior a 80% em pelo menos um dos antígenos testados (BRASIL, 2018).

Uma correlação definida entre os títulos *in vitro* e a proteção contra o desafio *in vivo* contra 10.000 BID50 (*Bovine Infective Doses*) do vírus da vacina foi realizada pelo PANAFITOSA. Os títulos de anticorpos utilizados para correlação foram obtidos



tanto por ELISA quanto pela neutralização viral. Na experiência do PANAFTOSA com os programas de controle e erradicação do FMDV na América do Sul, um valor EPP médio de 75% confere proteção em animais vacinados. As tabelas de correlação para O1 Campos, A24 Cruzeiro e C3 Indaial foram obtidas mediante solicitação ao PANAFTOSA (OIE, 2017).

## **4.5 Teste de combinação de vacinas**

### **4.5.1 Teste bidimensional por neutralização viral**

De acordo com o Manual da OIE 2017, o teste padrão recomendado é o teste de neutralização viral. O ELISA também pode ser usado se os reagentes adequados estiverem disponíveis ou como um teste de triagem. Para a NV ou ELISA, os soros pós-vacinação devem ser derivados de pelo menos cinco bovinos 21-30 dias após a vacinação primária e / ou 21-30 dias após a vacinação de reforço. O título de anticorpo para a amostra de vírus da vacina é estabelecido para cada soro.

Foram avaliados 12 soros de bovinos, obtidos após 28 dias da vacinação e 28 dias após revacinação. Utilizando o ensaio de NV bidimensional, os títulos de anticorpos dos soros de animais vacinados contra sorotipo da vacina e o isolado de campo para cada dose de vírus utilizada foram calculados usando o método de

Spearman-Karber. A relação entre o isolado de campo e o vírus vacinal é então expressa como um valor "r" como:

$$r_1 = \frac{\text{Título aritmético recíproco do soro de referência contra o vírus de campo}}{\text{Título aritmético recíproco do soro de referência contra o vírus da vacina}}$$

Na interpretação dos resultados dos testes de reatividade cruzada, geralmente é aceito que, no caso da neutralização viral, valores de  $r_1$  maiores que 0,3 indicam que o isolado de campo é suficientemente semelhante ao vírus da vacina, de modo que o uso de uma vacina com base nessa amostra de vírus, provavelmente irá conferir proteção contra desafio, com o isolado de campo.

Os soros foram avaliados no mínimo duas vezes nos testes, para avaliação da combinação vacinal, e em cada uma dessas avaliações, cada soro foi testado com quatro repetições, a fim de aumentar a precisão dos títulos obtidos.

#### **4.5.2 Teste unidimensional por neutralização viral**

Os testes de combinação de vacinas baseados em valores de EPP são amplamente realizados na América do Sul pelo PANAFTOSA. Os títulos obtidos das 12 amostras avaliadas anteriormente por neutralização viral, tanto com o vírus sorotipo vacinal quanto com os isolados de campo, foram correlacionados nas tabelas obtidas após solicitação ao PANAFTOSA. Valores de EPP médio de 75% conferem

proteção aos animais vacinados, avaliação realizada para cada sorotipo do vírus O, A e C (OIE, 2017).

#### **4.6 Parâmetro de validação do método de NV**

##### **4.6.1 Repetitividade e reprodutibilidade**

Os testes de repetitividade e reprodutibilidade foram realizados de acordo com as orientações do Guia para Expressão das Incertezas de Medição (GUM) de 2008. Foram selecionadas duas amostras, que possuíam diferentes títulos de anticorpos. Cada amostra foi testada com seis repetições, por dois analistas e em três experimentos distintos, a fim de avaliar a repetitividade e a reprodutibilidade do método de NV. Foram utilizadas amostras do teste piloto realizado pelo LFDA-MG. Os valores máximos para o Coeficiente de Variação, obtidos na padronização do método aceitos pelo LDDV, devem obedecer aos seguintes critérios: valores até 10% são satisfatórios, entre 10 e 30% são aceitáveis, acima de 30% são considerados insatisfatórios. Critérios concordantes com a classificação MSA, 2010.

#### **4.6.2 Incerteza de medição**

Os testes para avaliação da incerteza de medição, tanto a padrão combinada quanto a expandida, foram realizados de acordo com as orientações do Guia para Expressão das Incertezas de Medição (GUM) de 2008. Foram selecionadas aleatoriamente, oito amostras de soros do inquérito para determinação da eficiência da vacinação para FA. Estes soros foram testados em duplicata, por dois analistas, por no mínimo dois dias. Como critério de avaliação dos resultados obtidos, é o menor valor que é possível estabelecer, para a incerteza do método.

## **5 RESULTADOS**

### **5.1 Teste de potência da vacina de Febre Aftosa por ELISA**

Os primeiros testes de ELISA CFL realizados, foram para seleção dos soros sanguíneos, dos 29 animais para o teste piloto. Estes ensaios foram realizados antes da primeira vacinação. Os resultados dos testes de ELISA das 29 amostras foram considerados negativos.

O teste piloto para avaliação da potência da vacina contra o FMDV foi realizado para comprovar a efetiva imunização dos animais. Esta avaliação foi a etapa inicial dos testes, realizada logo após a coleta das amostras de sangue dos animais, depois da primeira vacinação. Foi utilizado o ELISA de competição em fase líquida produzido pelo PANAFTOSA, e excluídos da avaliação os menores e maiores títulos encontrados para cada sorotipo.

De acordo com os resultados apresentados na tabela 3, a titulação dos soros dos 17 animais testados que foram selecionados aleatoriamente, após 28 dias da primeira vacinação, comprova que a vacina AFTOVACIN (MSD) conferiu proteção a todos os animais avaliados, visto que a vacina é aprovada quando atinge uma EPP de 80%, de acordo com o Regulamento Técnico para a Produção, Controle da Qualidade, Comercialização e Emprego de Vacinas contra a Febre Aftosa, publicado

na Instrução Normativa n.11 de 2018. A proteção adquirida foi contra os três sorotipos do vírus. Os resultados da EPP média ficaram todos acima de 99%. Para o sorotipo O1 Campos a proteção foi de 99,85%, para o A24 Cruzeiro de 99,68% e C3 Indaial de 99,77%.

**Tabela 3:** Expectativa Percentual de Proteção da vacina de Febre Aftosa por ELISA

Amostra	O1 Campos		A24 Cruzeiro		C3 Indaial	
	Título (log <sub>10</sub> )	EPP (%)	Título (log <sub>10</sub> )	EPP (%)	Título (log <sub>10</sub> )	EPP (%)
1			3,30	99,99	3,77	99,99
2	3,26	99,99	3,06	99,97	3,77	99,99
3	3,46	100,00	3,39	100,00		
4	3,80	100,00	3,45	100,00	3,80	99,99
5	3,80	100,00			3,80	99,99
6	3,21	99,99	2,82	99,85	3,09	99,77
7	2,33	97,88	2,32	96,20	2,73	98,92
8	3,05	99,96	2,92	99,92	3,42	99,95
9	3,80	100,00	3,80	100,00	3,80	99,99
10	2,98	99,95	2,59	99,34		
11					2,59	98,03
12	3,27	99,99	3,05	99,97	3,41	99,94
13	3,80	100,00	3,42	100,00	3,80	99,99
14	3,80	100,00	3,67	100,00	3,80	99,99
15	3,80	100,00	3,80	100,00	3,80	99,99
16	3,80	100,00	3,74	100,00	3,80	99,99
17	3,80	100,00	3,80	100,00	3,80	99,99
<b>EPP média</b>		<b>99,85</b>		<b>99,68</b>		<b>99,77</b>

\* Resultados da EPP obtidos por ELISA apresentados na tabela acima, comprovam a eficácia da vacina trivalente da Febre Aftosa. Os percentuais encontrados para os três sorotipos virais vacinais ficaram todos acima de 99%, a partida da vacina é considerada aprovada quando atinge um percentual de 80%. Foram excluídos o maior e o menor valor encontrado na titulação dos soros, grupo de 17 animais

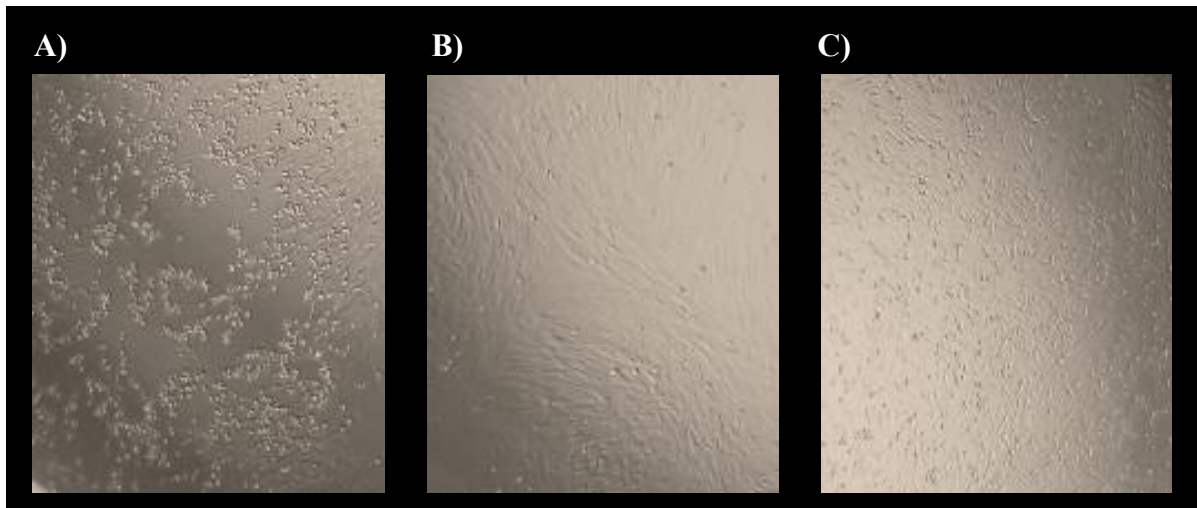
testados, em cada sorotipo do vírus. Os valores de EPP encontrados, foram obtidos através de tabelas de correlação cedidas pelo PANAFTOSA (dados não publicados).

## **5.2 Teste de potência da vacina de Febre Aftosa por neutralização viral**

Os primeiros testes de NV realizados, foram os ensaios para seleção dos soros sanguíneos, dos 29 animais para o teste piloto. Estes ensaios foram realizados antes da primeira vacinação. Os testes de NV das 29 amostras para seleção foram realizados com os sorotipos virais vacinais, O1 Campos, A24 Cruzeiro e C3 Indaial, e todos os resultados encontrados foram considerados negativos, ou seja, título menor ou igual a  $1,36 \log_{10}$ .

Posteriormente a essa avaliação, começaram os testes por NV de 12 amostras de soros de seis animais, selecionados aleatoriamente, seis amostras após a etapa de vacinação e seis amostras após o reforço. Essa seleção aleatória consistia na exclusão de três animais do grupo inicial de 29 bovinos, em que os soros apresentaram toxicidade no cultivo de células BHK-21 mostrados na figura 15, nos primeiros testes realizados. A toxicidade foi observada até a diluição 1:128, e os soros foram excluídos, a fim de reduzir erros de observação do efeito citopático do vírus.





**Figura 15:** Imagem obtida dos poços da placa de neutralização viral. A - Monocamada de célula BHK-21 apresentando efeito citopático produzido pelo FMDV, após 48 horas de incubação dos testes iniciais de NV; B – Monocamada de célula de BHK-21 formada após 48 horas de incubação, célula e soro dos bovinos testados, imagem mostra ausência de toxicidade; C - Monocamada de célula de BHK-21 formada após 48 horas de incubação, célula e soro dos bovinos testados, imagem mostra presença de toxicidade. Soros nessas condições foram excluídos.

A avaliação da eficácia da vacina de FA também pode ser avaliada através dos títulos obtidos pela neutralização viral. O PANAFTOSA realiza a avaliação das partidas da vacina tanto por ELISA como pela NV, e consideram a vacina aprovada pelos dois métodos quando a EPP encontrada alcança valores mínimos de 75%. As tabelas que correlacionam títulos obtidos por ELISA e pela NV foram obtidas após solicitação ao PANAFTOSA.

Os ensaios de NV das 12 amostras selecionadas foram realizados utilizando os três sorotipos virais vacinais, e foram correlacionados nas tabelas do PANAFTOSA para obtenção da EPP. Os resultados encontrados estão apresentados na tabela 4, e também comprovam que a vacina AFTOVACIN (MSD) conferiu proteção aos animais avaliados. Amostras 1, 3, 5, 7, 9 e 11 correspondem aos soros coletados de animais

após a primeira vacinação, amostras 2, 4, 6, 8, 10 e 12 são referentes aos mesmos animais após vacinação de reforço. As médias da EPP encontradas por NV ficaram todas acima de 98%, para o sorotipo O a média alcançada foi de 98,24%, para o sorotipo A 99,90% e para o sorotipo C 98,34%.

**Tabela 4:** Expectativa Percentual de Proteção (EPP) da vacina de Febre Aftosa. Títulos obtidos a partir do método de neutralização viral

Amostras	O1 Campos		A24 Cruzeiro		C3 Indaial	
	Título (log <sub>10</sub> )	EPP (%)	Título (log <sub>10</sub> )	EPP (%)	Título (log <sub>10</sub> )	EPP (%)
1	2,19	94,57	2,34	99,78	1,74	86,91
2	3,24	99,83	3,61	99,99	3,46	99,96
3	2,19	94,57	2,11	99,26	2,34	98,32
4	2,79	99,21	2,79	99,98	2,71	99,50
5	2,56	98,39	2,71	99,96	2,64	99,39
6	2,71	98,98	3,16	99,99	2,94	99,78
7	2,86	99,40	2,71	99,96	2,26	97,80
8	3,01	99,60	3,09	99,99	3,09	99,86
9	2,49	97,91	2,71	99,96	2,56	99,20
10	2,94	99,53	3,01	99,99	2,94	99,78
11	2,41	97,30	2,94	99,99	2,86	99,71
12	3,01	99,60	3,16	99,99	3,09	99,86
<b>EPP média</b>		<b>98,24</b>		<b>99,90</b>		<b>98,34</b>

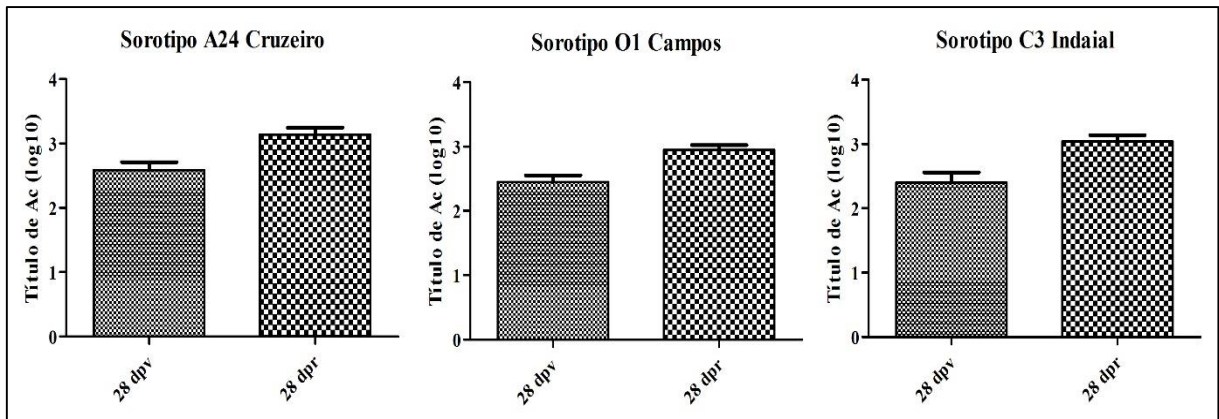
\*Resultados da EPP apresentados na tabela acima, comprovam a eficácia da vacina trivalente da Febre Aftosa. Resultados encontrados a partir dos títulos obtidos, através do método de neutralização viral. Os valores de EPP encontrados, foram obtidos através de tabelas de correlação cedidas pelo

PANAFTOSA (dados não publicados). Os percentuais encontrados para os três sorotipos virais vacinais ficaram todos acima de 98%. De acordo com o PANAFTOSA, valores acima de 75% consideram a vacina para a Febre Aftosa eficaz.

### **5.3 Resposta de anticorpos após vacinação e reforço**

Os ensaios de NV foram realizados utilizando os três sorotipos virais vacinais, e todos os soros dos animais avaliados individualmente, apresentaram um aumento do título de anticorpos após a vacinação de reforço, conforme indicado pela figura 16. O animal 1, apresentou o maior aumento em todos os sorotipos testados. A média dos títulos de anticorpos para o sorotipo A após vacinação foi de 2,59, após o reforço foi de 3,14, para o sorotipo O após vacinação foi de 2,45, após reforço foi de 2,95, para o sorotipo C após vacinação foi de 2,40, após reforço 3,04.

Pode-se inferir que após avaliação dos títulos de anticorpos obtidos pelo teste de NV, todas as amostras avaliadas apresentaram um aumento significativo no título de anticorpos neutralizantes, após o reforço. Os soros com título na neutralização viral, igual ou maior a  $1,66 \log_{10}$ , correspondendo a diluição 1:46, são considerados positivos.



**Figura 16:** Avaliação dos títulos de anticorpos obtidos por NV, dos soros coletados de animais após 28 dias da primeira vacinação, e após 28 dias da vacinação de reforço. Foram utilizados os três sorotipos vacinais do FMDV nos testes. O grupo de amostras 28 dpv (dias pós vacinação) do sorotipo O1 Campos apresentou erro padrão 0,10; e o grupo 28 dpr (dias pós reforço) apresentou erro padrão 0,08. O sorotipo A24 Cruzeiro, grupo de animais 28 dpv apresentou erro padrão 0,12 e o grupo 28 dpr 0,11. O sorotipo C3 Indaial, apresentou erro padrão para o grupo de animais 28 dpv 0,16 e o grupo 28 dpr 0,10. Estatística: Graph PRISM, teste de Wilcoxon,  $p < 0,05$ .

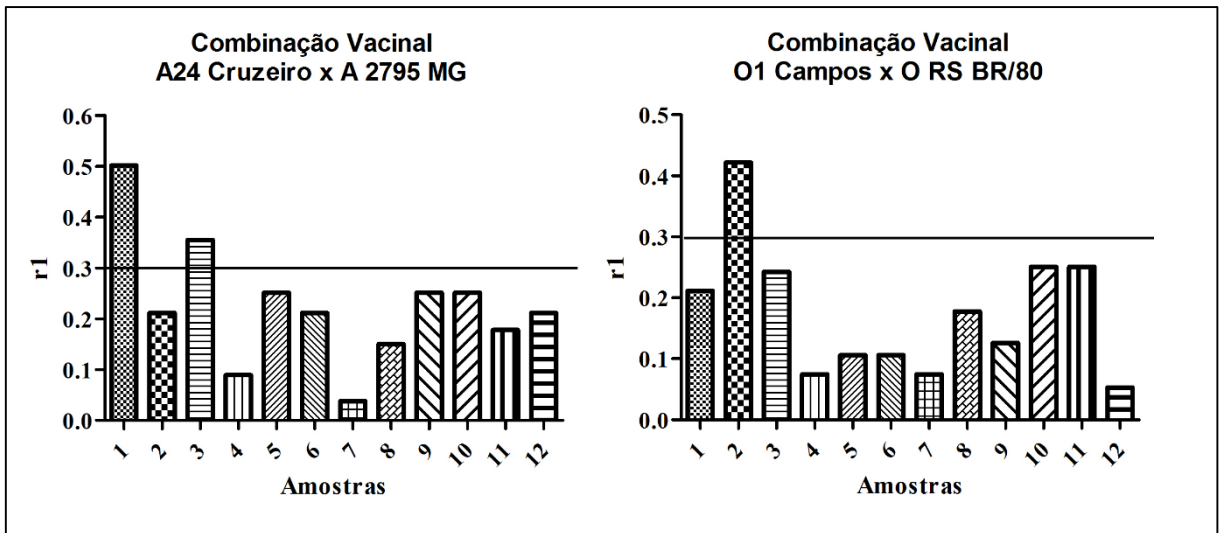
#### 5.4 Avaliação da combinação de vacinas da Febre Aftosa por $r_1$

O teste de combinação vacinal determina a eficiência da vacina utilizada para contra o vírus circulante, a partir da verificação da correspondência do sorotipo do vírus utilizado na produção da vacina e do isolado de campo. Resultados de  $r_1$  superiores a 0,3 indicam que o sorotipo vacinal é semelhante antígenicamente ao isolado de campo.

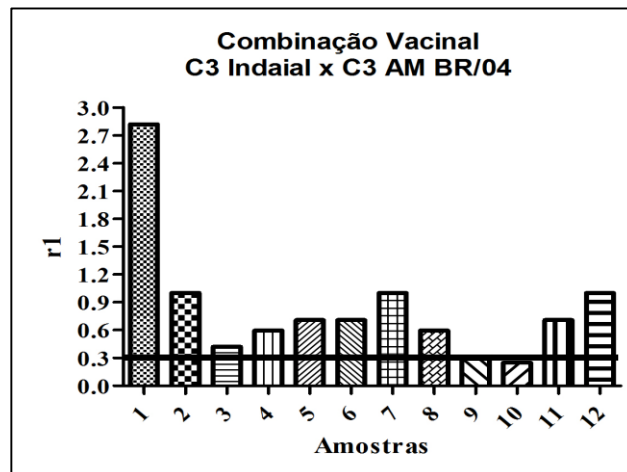
Foram utilizados 12 soros de bovinos, obtidos após 28 dias da vacinação e 28 dias após reforço. Os testes de NV para avaliação do coeficiente de  $r_1$  utilizaram os soros de animais vacinados e os sorotipos vacinais, obtendo assim os títulos de anticorpos para esses vírus homólogos. Na etapa posterior foram utilizados os

mesmos soros de animais vacinados e os vírus isolados de campo, obtendo assim os títulos de anticorpos para os vírus heterólogos.

Os testes de NV para avaliação da combinação da vacina contra o FMDV utilizaram a amostra de vírus da vacina homóloga O1 Campos e a amostra heteróloga O BR RS 80; homóloga A24 Cruzeiro e a heteróloga A 2795 MG; homóloga C3 Indaial e heteróloga C3 AM BR 04. Os resultados obtidos para o sorotipo O, apresentaram coeficiente de relação sorológica  $r_1$  superior a 0,3 em apenas uma amostra, para o sorotipo A dois valores de  $r_1$  acima de 0,3, e para o sorotipo C apenas um valor de  $r_1$  ficou abaixo de 0,3. As médias dos valores de  $r_1$  obtidos para o sorotipo O foi de 0,175, sendo que dois valores de  $r_1$  ficaram abaixo de 0,1; a média para o sorotipo A foi de 0,225, e um valor de  $r_1$  ficou abaixo de 0,1; e para o sorotipo C a média obtida foi 0,842, e um valor de  $r_1$  ficou abaixo de 0,3. Os resultados apresentados na figura 17 são relacionados aos tipos O e A, a figura 18 apresentada os resultados obtidos na avaliação do tipo C do FMDV. Alguns valores apresentaram uma diminuição dos valores de  $r_1$  após a vacinação de reforço, essa característica foi observada em pelo menos um animal por sorotipo avaliado.



**Figura 17:** Coeficientes de relação sorológica obtidos após avaliação de 12 soros de bovinos, as amostras analisadas foram coletadas 28 dias após vacinação, e 28 dias após vacinação de reforço. Amostras 1, 3, 5, 7, 9 e 11 são após a primeira vacinação, amostras 2, 4, 6, 8, 10 e 12 são referentes aos mesmos animais após reforço. Foram avaliadas a combinação vacinal dos três sorotipos do FMDV, amostras de vírus homólogas e amostras de vírus heterólogas dos sorotipos O, A e C do vírus. Graph PRISM.



**Figura 18:** Coeficientes de relação sorológica obtidos após avaliação de 12 soros de bovinos, as amostras analisadas foram coletadas 28 dias após vacinação, e 28 dias após vacinação de reforço. Amostras 1, 3, 5, 7, 9 e 11 são após a primeira vacinação, amostras 2, 4, 6, 8, 10 e 12 são referentes aos mesmos animais após vacinação de reforço. Graph PRISM.

## 5.5 Avaliação da combinação de vacinas da Febre Aftosa por EPP

A avaliação da combinação da vacina de FA é realizada na América do Sul a partir de valores de EPP. De acordo com o PANAF-TOSA valores de EPP superiores a 75% indicam que o sorotipo do vírus da vacina é semelhante ao isolado de campo. As 12 amostras utilizadas na avaliação do coeficiente de  $r_1$ , foram avaliadas também por EPP. A tabela 5 apresenta os resultados obtidos de EPP de acordo com cada amostra avaliada e a média para cada isolado de campo.

Os resultados na tabela 5 apresentam a média encontrada para os parâmetros que avaliam a combinação das amostras de vírus vacinais e os isolados de campo. Os parâmetros apresentados são baseados no coeficiente de relação sorológica  $r_1$  e valores de EPP. A média encontrada para os valores de EPP isolado O foi de 80,93% e de  $r_1$  uma média de 0,17, para o isolado A média de EPP de 96,10% e de  $r_1$  média de 0,23, e para o isolado C média de EPP de 98,25% e de  $r_1$  média de 0,84. Amostra 1 obteve valor de EPP para o isolado O de 66,39%, amostras 3, 5 e 9 obtiveram valores de EPP de aproximadamente 71% também para o isolado O, amostra 7 do isolado A resultou em uma EPP de aproximadamente 68%. Todos os outros valores de EPP ficaram acima de 75%.

**Tabela 5:** Expectativa Percentual de Proteção (EPP) e valores de  $r_1$ , avaliação da combinação dos sorotipos vacinais com os isolados de campo

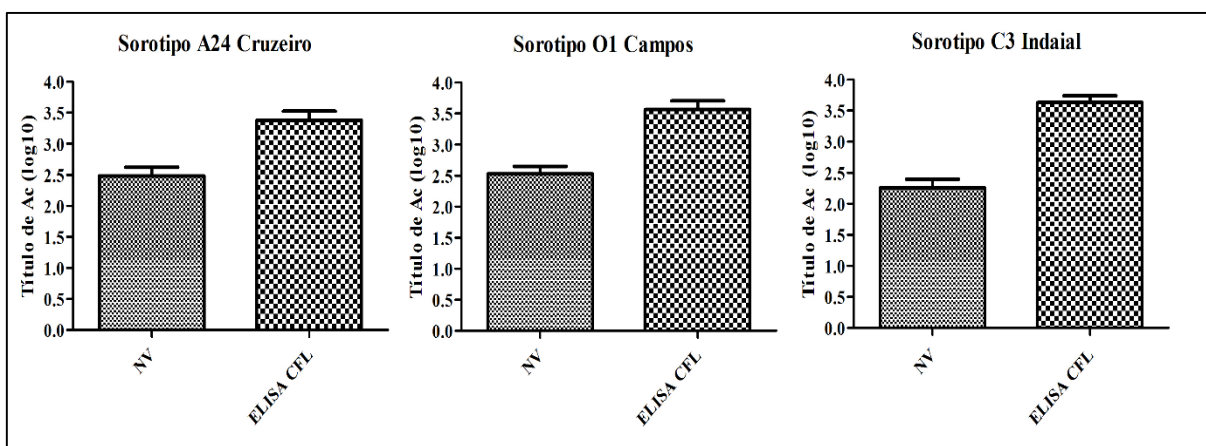
Amostra	O BR RS 80		A 27 95 MG		C3 AM BR 04	
	EPP (%)	$r_1$	EPP (%)	$r_1$	EPP (%)	$r_1$
1	66,39	0,21	99,01	0,50	97,14	2,82
2	99,40	0,42	99,99	0,21	99,96	1,00
3	70,65	0,24	93,51	0,35	93,75	0,42
4	75,81	0,07	95,58	0,09	98,95	0,60
5	70,65	0,11	99,34	0,25	98,95	0,71
6	80,32	0,11	99,89	0,21	99,62	0,71
7	80,32	0,07	67,61	0,04	97,80	1,00
8	95,78	0,18	99,67	0,15	99,71	0,60
9	70,65	0,13	99,34	0,25	95,47	0,30
10	96,73	0,25	99,85	0,25	98,32	0,25
11	84,16	0,25	99,51	0,18	99,53	0,71
12	80,32	0,05	99,89	0,21	99,86	1,00
<b>Média</b>	<b>80,93</b>	<b>0,17</b>	<b>96,10</b>	<b>0,23</b>	<b>98,25</b>	<b>0,84</b>

\*Resultados da EPP apresentados na tabela acima, avaliam a combinação entre os sorotipos vacinais e os isolados de campo do FMDV. Amostras 1, 3, 5, 7, 9 e 11 são referentes após a primeira vacinação. Amostras 2, 4, 6, 8, 10 e 12 são referentes aos mesmos animais após reforço. Os valores de EPP encontrados são obtidos através de tabelas de correlação, cedidas pelo PANAFTOSA (dados não publicados). De acordo com o PANAFTOSA, valores acima de 75% consideram a vacina para a Febre Aftosa eficaz contra o isolado de campo. Portanto de acordo com a avaliação da média da EPP, a vacina utilizada possui semelhante antigênica com os três isolados de campo avaliados. Os valores de  $r_1$  também são utilizados para avaliar a combinação vacinal. Valores acima de 0,3 consideram a vacina de Febre Aftosa eficaz contra o isolado de campo, de acordo com o manual da OIE. Assim, com os resultados obtidos de  $r_1$ , o sorotipo C vacinal possui alta semelhança antigênica com o isolado de campo. Os sorotipos O e A possuem baixa semelhança antigênica.



## 5.6 Títulos de anticorpos pelo método de NV e ELISA CFL

Após a primeira etapa de imunização dos animais, os soros de 11 animais foram selecionados e avaliados pelos métodos de ELISA CFL e NV para os três sorotipos do FMDV. Os títulos obtidos das amostras analisados pelos dois métodos estão apresentados na figura 19. O ELISA CFL é um teste que realiza a medição de todos os anticorpos induzidos após a vacinação para o FMDV, o teste de neutralização viral avalia os anticorpos neutralizantes induzidos após vacinação.



**Figura 19:** Avaliação dos títulos de anticorpos obtidos por NV e ELISA CFL, com os sorotipos virais vacinais do FMDV. O grupo avaliado por NV do sorotipo O1 Campos apresentou erro padrão de 0,12; e por ELISA 0,14. O grupo avaliado por NV do sorotipo A24 Cruzeiro apresentou erro padrão de 0,14, e por ELISA de 0,14. O sorotipo C3 Indaial, nos testes por NV apresentou erro padrão de 0,14, e o por ELISA de 0,11. Estatística: Graph PRISM, teste de Wilcoxon,  $p < 0,05$ .

## 5.7 Repetitividade e reprodutibilidade do método de NV

Para avaliação da repetitividade e reprodutibilidade do método, foram utilizadas duas amostras positivas, selecionadas aleatoriamente, para cada sorotipo específico do FMDV, sendo uma amostra considerada positiva e outra considerada fraco positiva. A repetitividade foi avaliada a partir dos resultados do CV alcançado pela variação entre analistas, ou seja, foram realizadas observações repetidas da mesma amostra, pelo mesmo analista. A reprodutibilidade foi avaliada a partir da avaliação do CV alcançado pela variação geral do método, ou seja, todos os parâmetros de variação da medição sobre a mesma amostra, incluindo variação de analistas.

Nos testes de NV para o sorotipo O do vírus, o soro fraco positivo, foi encontrado um coeficiente de variação dos analistas de 15,125% a 16,517%, a variação geral entre analistas foi de 15,811%, já para a amostra positiva a variação dos analistas ficou entre 7,485% e 7,992%, e a geral 8,313%. Os testes realizados com o vírus sorotipo A obteve para a amostra fraco positiva, uma variação dos analistas de 16,541% a 21,147%, e a geral 18,885%, já a amostra positiva a variação dos analistas ficou entre 7,096% e 9,534%, a geral foi de 8,390%. O vírus sorotipo C, obteve para a amostra fraco positiva uma variação dos analistas entre 13,337% e 21,102%, e a geral foi de 17,374%, já para amostra positiva a variação dos analistas ficou entre 2,030%, e a geral foi de 2,001%. Todos esses resultados obtidos são considerados aceitáveis, de acordo com os parâmetros definidos pelo LDDV, de um CV < 30%. Todos os dados estão resumidamente apresentados nas tabelas de 6 a 8.

**Tabela 6:** Coeficientes de variação do ensaio de NV para o vírus da Febre Aftosa, sorotipo O1  
Campos - repetitividade e reprodutibilidade

<b>Analista</b>	<b>Amostra</b>	<b>CV (%)</b>
1	Fraco positiva	15,125
	Positiva	7,992
2	Fraco positiva	16,517
	Positiva	7,485
Geral	Fraco positiva	15,811
	Positiva	8,313

\*A repetitividade do método é obtida pela avaliação dos resultados de CV do analista 1 e do analista 2.  
A reprodutibilidade do método é obtida pela avaliação dos valores de CV geral.

**Tabela 7:** Coeficientes de variação do ensaio de NV para o vírus da Febre Aftosa, sorotipo A24  
Cruzeiro - repetitividade e reprodutibilidade

<b>Analista</b>	<b>Amostra</b>	<b>CV (%)</b>
1	Fraco positiva	16,541
	Positiva	7,096
2	Fraco positiva	21,147
	Positiva	9,534
Geral	Fraco positiva	18,885
	Positiva	8,390

\*A repetitividade do método é obtida pela avaliação dos resultados de CV do analista 1 e do analista 2.  
A reprodutibilidade do método é obtida pela avaliação dos valores de CV geral.

**Tabela 8:** Coeficientes de variação do ensaio de NV para o vírus da Febre Aftosa, sorotipo C3 Indaial  
repetitividade e reprodutibilidade

<b>Analista</b>	<b>Amostra</b>	<b>CV (%)</b>
1	Fraco positiva	21,102
	Positiva	2,030
2	Fraco positiva	13,337
	Positiva	2,030
Geral	Fraco positiva	17,374
	Positiva	2,001

\*A repetitividade do método é obtida pela avaliação dos resultados de CV do analista 1 e do analista 2. A reprodutibilidade do método é obtida pela avaliação dos valores de CV geral.

## 5.8 Incerteza de medição do método de NV

Para a avaliação da incerteza padrão combinada e expandida da medição do teste de NV, foram avaliadas as incertezas por sorotipo do vírus. A incerteza combinada foi calculada a partir das incertezas relacionadas, e é equivalente a uma medida de dispersão de um desvio padrão. As incertezas avaliadas foram obtidas a partir dos resultados das repetições de oito soros selecionados, e do controle positivo utilizado em cada placa de teste.

A incerteza expandida foi avaliada, com probabilidade de abrangência de 95,45% de uma distribuição normal. Os valores das incertezas combinadas e expandidas para os sorotipos do FMDV estão apresentados na tabela 9.

**Tabela 9:** Valores de incerteza de medição do ensaio de NV para os sorotipos do FMDV

<b>Sorotipo</b>	<b>Incerteza Combinada</b>	<b>Incerteza Expandida</b>
O1 Campos	0,35034	0,711
A24 Cruzeiro	0,37336	0,755
C3 Indaial	0,24793	0,502

## 6 DISCUSSÃO

A Febre Aftosa é uma enfermidade animal altamente infecciosa que causa enormes prejuízos a economia de um país. É uma doença de rápida disseminação que acomete animais biungulados, de casco fendido, que causa febre, claudicação, lesões vesiculares nas patas, língua, focinho e tetas. A FA é considerada uma barreira sanitária para o comércio internacional e demanda elevados investimentos para controle e prevenção. Em um surto de FA, rigorosos procedimentos de abate e quarentena tem que ser adotados (ARZT *et al*, 2011). O FMDV possui sete sorotipos que são imunologicamente distintos, O, A, C, SAT-1, SAT-2, SAT-3 e Ásia 1. Os sorotipos do FMDV não são distribuídos uniformemente no mundo. Os sorotipos O, A e C tiveram a maior distribuição e foram responsáveis por surtos na Europa, Ásia, África e América. Os países mais desenvolvidos praticamente erradicaram a doença, mas os programas de vigilância têm que estar sempre atuantes (JAMAL & BELSHAM, 2013).

O PNEFA lançou o Plano Estratégico 2017-2026, com ações que ampliam, revisam e aprimoram o programa de erradicação e controle. O Plano Estratégico prevê que a partir de 2021, não seja mais preciso vacinar rebanhos. As ações para retirada da vacina começam a partir de 2019, e todas as etapas de efetivação e reconhecimento internacional, das novas zonas livres sem vacinação sejam cumpridas até 2023. Uma das mais importantes ferramentas, de monitoramento e identificação da doença, são os métodos laboratoriais, que são um dos pontos de

maior relevância do programa de controle da doença. O método de NV para o FMDV, com seu desempenho verificado, é um dos principais testes de diagnóstico sorológico, principalmente após a retirada da vacinação no país.

O teste piloto para avaliação da eficácia da partida da vacina para o FMDV, foi considerado satisfatório tanto pelo método de ELISA quanto pelo método de neutralização viral. A EPP para os três sorotipos vacinais por ELISA alcançou resultados acima de 99%, pelo método de NV alcançou percentuais mínimos de 98%. Todos os resultados consideraram a vacina para o FMDV eficaz para os três sorotipos. Comprovando a eficácia da vacina utilizada e confirmando a eficácia da avaliação da EPP pelos dois métodos sorológicos.

O controle da Febre Aftosa não está restrito apenas à existência dos sete sorotipos virais, já que as variações antigênicas dentro do mesmo sorotipo, podem tornar as vacinas existentes ineficazes. Durante a grande epidemia de FA, que ocorreu no México entre 1946 e 1954, isolados de campo pertencentes ao sorotipo A, romperam a imunidade induzida pelas vacinas produzidas com o mesmo sorotipo, provocando infecção em animais vacinados e enormes prejuízos ao país (BROWN, 2003). Em uma incursão do FMDV em que vacinas de controle venham a ser implementadas, é importante combinar a vacina o mais próximo antigenicamente com o isolado em campo. Essa suposta situação deve ser avaliada com cautela, especialmente após a retirada da vacina para Febre Aftosa.

Os resultados obtidos neste trabalho para a avaliação, da combinação vacinal, indicam uma baixa relação antigênica das amostras de vírus da vacina dos sorotipos O e A, com os isolados de campo do banco de vírus do LFDA-MG. A relação

antigênica do isolado de campo com a amostra de vírus da vacina referente ao sorotipo C apresenta uma maior similaridade, ou seja, são mais antigenicamente relacionados. Tais resultados, em um possível foco do FMDV, devem ser criticamente avaliados, para que atitudes eficazes sejam tomadas.

BREHM e colaboradores (2008) avaliaram títulos de anticorpos induzidos por vacinação e posterior desafio em bovinos com o FMDV. Os experimentos foram realizados com diferentes amostras virais do sorotipo A, em que foram avaliados os valores de  $r_1$  e realizados desafios com as amostras virais homólogas e heterólogas. Os resultados de  $r_1$  obtidos não excederam 0,23. Apesar de todos os valores de  $r_1$  terem ficado abaixo de 0,3, a vacina conferiu proteção aos bovinos nos desafios homólogo e heterólogo. Os resultados deste trabalho, são similares aos obtidos na nossa avaliação em relação ao sorotipo A. Nos resultados obtidos em relação ao sorotipo A, encontramos dentre as 12 amostras avaliadas dois valores de  $r_1$  acima de 0,3, o que faz inferência a uma maior similaridade entre as duas amostras de vírus avaliadas em nossos testes.

Sabe-se que a imunidade protetora à infecção por FMDV é complexa, e envolve não apenas respostas humorais de anticorpos, mas também fatores derivados da imunidade inata e celular. Como também de anticorpos não-neutralizantes, que podem induzir proteção. Tais mecanismos do sistema imunológico não são detectados pelo método de NV (PATON *et al.*, 2005).

MATTION e colaboradores (2009) concluíram que o teste de NV é a maneira mais eficaz de avaliar a combinação vacinal de maneira indireta, a partir de testes *in vitro*, e que melhores indicadores de  $r_1$  são obtidos a partir de soros com elevados



títulos de anticorpos. Essas conclusões foram obtidas, a partir de testes realizados com isolados do vírus e amostras de animais de um foco de FA na Argentina. Os pesquisadores encontraram baixos valores de  $r_1$ , obtidos de animais com elevados títulos de anticorpos, e esses dados correlacionaram aos testes de desafio *in vivo*. Ou seja, os animais que haviam sido vacinados com a vacina utilizada no período em questão, não foram protegidos no desafio heterólogo realizado com o isolado do sorotipo A. Os resultados desse desafio corroboram com as conclusões obtidas, já que este vírus isolado foi o causador de um surto de FA na Argentina em 2001.

Os resultados de  $r_1$  também indicaram que em alguns casos após a vacinação de reforço os coeficientes encontrados foram menores que os obtidos após a primeira vacinação. Isso ocorreu com três animais avaliados para o tipo A, dois animais para o tipo O e dois animais para o tipo C. De acordo com as observações do trabalho citado anteriormente, podemos concluir que valores de  $r_1$  obtidos de animais após vacinação de reforço seriam melhores indicadores de  $r_1$ , já que os títulos aumentaram consideravelmente. Avaliar amostras de animais após vacinações de reforço, portanto poderiam ser melhores indicadores de semelhança entre sorotipos virais para produção de vacinas.

Potência da vacina e doses de reforço podem contribuir para aumento da cobertura antigênica fornecida por uma vacina. Essas constatações corroboram para a importância dos dados obtidos neste trabalho. Como os resultados do teste de potência, conferida pela vacina de FA para os três sorotipos virais, considerados satisfatórios logo após a primeira vacinação realizada. E os resultados obtidos após a vacinação de reforço que foi realizada nos animais e conferiu aumento do título de anticorpos. Avaliação realizada a partir de resultados obtidos pelo método de NV.

A proteção conferida pela vacina aos animais depende tanto da reatividade cruzada dos anticorpos induzidos pela vacinação, quanto da intensidade da resposta dos anticorpos. Uma vacina altamente potente que estimule uma forte resposta imunológica pode dar proteção a vírus heterólogos (OIE, 2017). Doses de reforço da vacina podem aumentar a eficácia e sua cobertura antigênica, mas essa resposta sorológica demanda tempo para que seja eficaz. Em uma situação de emergência sanitária de FA, pelo menos dois isolados de campo devem ser avaliados para obtenção de valores de  $r_1$  (PATON *et al.*, 2005).

Na avaliação realizada, sobre a utilização ou não da vacina, para os quais valores de  $r_1$  inferiores a 0,3 são observados, devem sempre ser levados em consideração fatores que incluem, a disponibilidade de amostras virais vacinais de melhor correspondência, ou melhores resultados de potência da vacina. Possibilidade de usar doses adicionais de reforço, e até que ponto o controle da doença será complementado por outras medidas sanitárias, ou se dependerá somente da vacinação. Possibilidades essas, que deverão sempre ser avaliadas (OIE, 2017).

Na América do Sul o PANAFTOSA avalia a combinação vacinal de acordo com a EPP encontrada, e considera que valores acima de 75% induzem proteção. Os resultados de EPP encontrados indicam que as amostras de vírus utilizadas para a produção das vacinas, são mais antigenicamente semelhantes aos isolados de campo avaliados do que os valores obtidos por  $r_1$ . Os resultados da média de EPP encontrados para os três isolados de campo avaliados, consideram os vírus semelhantes as amostras de vírus vacinais. As médias encontradas alcançaram um valor mínimo de 80,93% para o isolado O, para o isolado A 96,10% e para o C 98,25%. Quando avaliados individualmente, quatro valores de EPP do isolado O obtiveram

resultados próximos a 70%, um valor do isolado A apresentou EPP de aproximadamente 68%, todos os outros valores ficaram acima de 75%. Como já discutido, trabalhos anteriores mostram que baixos valores de  $r_1$  não são indicativos de falta de proteção das vacinas utilizadas. Uma avaliação criteriosa deve ser realizada em uma situação de emergência com o FMDV, já que os dois indicativos de eficiência da vacina não foram totalmente concordantes. Em relação aos resultados encontrados após a vacinação de reforço, apenas um valor de EPP referente ao sorotipo O foi observada redução.

Um das diretrizes estratégicas do PNEFA (2017-2026), é deixar de utilizar a vacinação sistemática, e reforçar os mecanismos de prevenção e vigilância. Uma dessas diretrizes prevê, a disponibilização de antígenos para emergências veterinárias, em que o país deve ter acesso a um banco de antígenos, para produção de vacinas contra a FA, articulado com outros bancos regionais ou mundiais, para uso em situações de emergência.

Além da manutenção de um banco de antígenos, existe a necessidade da produção de um banco de soros de animais vacinados. A partir da disponibilidade de um banco sorológico, avaliar a combinação vacinal em uma situação de emergência, a partir de isolados de campo, torna-se importante ferramenta de análise do problema enfrentado. Principalmente após a retirada da vacina em todo o território nacional.

Os resultados obtidos pelo ELISA CFL e pela neutralização viral, indicam que os títulos de todas as amostras avaliadas por ELISA foram maiores do que os obtidos pela neutralização viral. A medição realizada pelo ELISA avalia todos os anticorpos induzidos após a vacinação para o FMDV, a neutralização viral avalia os anticorpos

neutralizantes induzidos pela vacina. Pode-se inferir que os resultados obtidos confirmam o objetivo da avaliação realizada por esses dois métodos sorológicos.

Gerar resultados confiáveis, com a qualidade garantida do ensaio, é o objetivo primordial do LFDA. Sendo assim, os resultados do presente trabalho demonstraram que foi possível verificar o desempenho do método de neutralização viral para o FMDV. Todos os valores obtidos na avaliação da repetitividade e reprodutibilidade alcançaram um coeficiente de variação inferior a 30%, que é a faixa aceitável pelo LFDA. Apenas dois valores correspondentes a avaliação da amostra fraco positiva, na avaliação da repetitividade, ficaram acima de 20%, sendo 21,147% e 21,102%. Todos os resultados obtidos de repetitividade ficaram na faixa considerada satisfatória ou aceitável. Medições que avaliam a repetitividade e a reprodutibilidade, a partir do coeficiente de variação, são comumente utilizadas em validações de ensaios laboratoriais. BRÉARD e colaboradores (2013), validaram um kit comercial de ELISA e teste de NV, para identificação de anticorpos para o vírus Schmallerberg que afeta bovinos, caprinos e ovinos, a partir dos resultados de repetitividade e reprodutibilidade obtidos. Assim é possível determinar a robustez do ensaio que está sendo executado, e assegurar a qualidade e confiabilidade dos resultados que estão sendo gerados.

Os valores obtidos para a incerteza de medição, dos três sorotipos virais, também são considerados satisfatórios, já que estão entre os menores valores obtidos em outras padronizações realizadas pelo LDDV. O LDDV já realizou oito padronizações do teste de NV para as mais variadas doenças animais, e os resultados da incerteza expandida encontrados foram: 0,295; 0,652; 0,714; 0,735; 0,747; 0,798; 0,900 e 1,08. Portanto, os resultados da incerteza expandida obtida para os três

sorotipos do FMDV, 0,502, 0,711 e 0,755, estão dentre os valores obtidos nessas padronizações.

SUCHANEK & ROBOUCH (2009), publicaram um trabalho em que avaliam a importância da incerteza de medição em testes sorológicos e utilizaram o ELISA como exemplo. Em suas conclusões relataram a importância das incertezas em todas as etapas dos testes e as contribuições para a incerteza combinada resultante.

Identificar a incerteza de medição possibilita a identificação dos fatores que mais influenciam no resultado do ensaio, e, dessa forma, a implementação de controles adequados baseados na avaliação da incerteza do método, contribuem para melhoria contínua e para a garantia da qualidade do resultado obtido.

## 7 CONCLUSÃO

Foi possível verificar o desempenho do método de neutralização viral de anticorpos para o vírus da Febre Aftosa de maneira satisfatória. O teste piloto de avaliação da potência da vacina de FA alcançou um EPP acima de 99% para os três sorotipos vacinais, o que comprova a eficácia da partida da vacina em teste. Houve um aumento dos títulos de anticorpos, obtidos de animais após vacinação de reforço, avaliados pela NV.

Os resultados de  $r_1$  mostraram que o isolado do sorotipo C possui maior semelhança antigênica com a amostra de vírus da vacina, e os isolados O e A avaliados, possuem uma menor semelhança antigênica com as amostras de vírus vacinais. Já os resultados de EPP que também avaliam a combinação das vacinas com os isolados de campo indicaram uma maior semelhança antigênica entre as amostras vacinais e os três isolados avaliados.

Estes resultados mostraram a importância da avaliação de desempenho da técnica de NV, para avaliação das respostas imunológicas geradas pela vacina de FA. A compreensão dos resultados gerados *in vitro* é essencial para obtenção de uma avaliação eficaz em uma situação emergencial, para controle e erradicação de possíveis focos da doença.

Os resultados de incerteza de medição, repetitividade e reprodutibilidade ficaram dentro dos limites esperados de avaliação, comprovando a eficácia e garantindo a qualidade do método de ensaio.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABU ELZEIN, E. M.; CROWTHER, J. R. Detection and quantification of IgM, IgA, IgG1 and IgG2 antibodies against footand- mouth disease virus from bovine sera using an enzyme-linked immunosorbent assay. *J Hyg (Lond)*. v. 86, n. 1, p. 79-85, 1981.

ALBRECHT, T.; FONS, M.; BOLDOGH, I.; RABSON, A. S. Effects on Cells: Cytocidal Infections. In: BARON, S. *Medical Microbiology*. 4. ed. Galveston: Hardcover. Cap. 44, 1997.

ALEXANDERSEN, S.; ZHANG, Z.; DONALDSON, A. I., GARLAND, A. J. M. The Pathogenesis and Diagnosis of Foot-and-Mouth Disease. *Journal of Comparative Pathology*, v. 129, n. 1, p. 1-36, 2003.

ARZT, J.; BAXT, B.; GRUBMAN, M.J.; JACKSON, T.; JULEFF, N.; RHYAN, J.; RIEDER, E.; WATERS, R.; RODRIGUEZ, L.L. The Pathogenesis of Foot-and-Mouth Disease II: Viral Pathways in Swine, Small Ruminants, and Wildlife, Myotropism, Chronic Syndromes, and Molecular Virus–Host Interactions. *Transbound Emerg Dis.*, v. 58, n. 4, p. 305-326, 2011.

BALANÇA COMERCIAL DO AGRONEGÓCIO BRASILEIRO – JANEIRO A AGOSTO DE 2017 - DISPONÍVEL EM: <http://indicadores.agricultura.gov.br/index.htm> - ACESSO EM 27/11/2018 às 19:30.



BAZID, A. H. I.; EL-ASHMAWY, W. R.; EL-SAYED, M. Serum Neutralization Titers and Protective Efficacy Induced by Foot and Mouth Disease Virus Inactivated Vaccine with different 146S Particles Concentrations in Cattle. *Pakistan Veterinary Journal*, v. 36, n. 2, p.204-208, 2016.

BRASIL. Instrução Normativa n. 44, 2 de outubro de 2007. Aprova as diretrizes gerais para a Erradicação e a Prevenção da Febre Aftosa. Documento do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. DISPONÍVEL EM: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/febre-aftosa/documentos-febre-aftosa/instrucao-normativa-mapa-no-44-de-02-de-outubro-de-2007.pdf>. ACESSO EM: 28/11/2018 ÀS 11:00.

BRASIL. Instrução Normativa n. 11, 18 de janeiro de 2018. Aprova o Regulamento Técnico para a Produção, Controle da Qualidade, Comercialização e Emprego de Vacinas contra a Febre Aftosa. Documento do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. DISPONÍVEL EM: [http://www.in.gov.br/materia/-/asset\\_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/2014014/do1-2018-01-22-instrucao-normativa-n-11-de-18-janeiro-de-2018-2014010](http://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/2014014/do1-2018-01-22-instrucao-normativa-n-11-de-18-janeiro-de-2018-2014010). ACESSO EM: 28/11/2018 ÀS 12:00.

BRÉARD, E.; LARA, E.; COMTET, L.; VIAROUGE, C.; DOCEUL, V.; DESPRAT, A.; VITOUR, D.; POZZI, N.; CAY, A. B.; REGGE, N.; POURQUIER, P.; SCHIRRMIEIER, H.; HOFFMANN, B.; BEER, M.; SAILLEAU, C.; ZIENTARA, S. Validation of a Commercially available indirect ELISA using a nucleocapside recombinant protein for detection of Schmallenberg virus antibodies. *Plos one*, v. 8, n. 1, p. 1-5, 2013.

BREHM, K.E., FERRIS, N.P., LENK, M., RIEBE, R., HASS, B. Highly Sensitive Fetal Goat Tongue Cell Line for Detection and Isolation of Foot-and-Mouth Disease Virus. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 47, n. 10, p. 3156-3160, 2009.

BREHM, K.E.; LENK, M.; RIEBE, R.; HAAS, B. Foetal goat tongue cell line is highly sensitive for foot-and-mouth disease virus. DISPONÍVEL EM: [http://www.fao.org/ag/againfo/commissions/docs/research\\_group/erice/02\\_poster.pdf](http://www.fao.org/ag/againfo/commissions/docs/research_group/erice/02_poster.pdf) ACESSO EM: 01/11/2017 às 15:00.

BRITO, B. P.; RODRIGUEZ, L. L.; HAMMOND, J. M.; PINTO, J.; PEREZ, A. M. Review of the Global Distribution of Foot-and-Mouth Disease Virus from 2007 to 2014. *Transboundary and Emerging Diseases*, v. 64, n. 3, p. 316-332, 2015.

BROOKSBY, J. B., ROGERS, J. (1957). Methods used in typing the virus of Foot-and-mouth disease at Pirbright, 1950–1955. In: *Methods of Typing and Cultivation of Foot-and-Mouth Disease Virus*, Project No. 208. European Productivity Agency of the Organization of European Cooperation (OEEC), Paris, p. 31–34.

BROOKSBY, J.B. The virus foot-and-mouth disease. *Adv. Virus Res.*, v. 5, p.1-37, 1958.

BROWN, F. The history of research in foot-and-mouth disease. *Virus Research*. New York, v. 91, p. 3-7, 2003.

BURLESON, F. G.; CHAMBERS, T. M.; WIEDBRAUK, D. L.; *Virology: a laboratory manual*, San Diego, 1992, 250 p.

BURMAN, A.; CLARK, S.; ABRESCIA, G.A.; FRY, E.E.; STUART, D.I.; JACKSON, T. Specificity of the VP1 GH loop of Foot-and-Mouth disease virus for  $\alpha$ v integrins. *Journal of Virology*, v. 80, n. 19, p. 9798-9810, 2006.

CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA. Informe de Situación de los Programas de Erradicación de la Fiebre Aftosa em Sudamérica y Panamá em 2016. PANAFTOSA-OPS/OMS, 2017. DISPONÍVEL EM: [http://panaftosa.org/cosalfa44/dmdocuments/Informe\\_Situacion\\_Paises\\_2016\\_\[300317\].pdf](http://panaftosa.org/cosalfa44/dmdocuments/Informe_Situacion_Paises_2016_[300317].pdf). ACESSO EM: 28/11/2018 às 10:00.

CLAVIJO,A.; SANCHEZ-VAZQUEZ, M. J.; BUZANOVSKY, L. P.; MARTINI, M.; POMPEI, J. C.; COSIVI, O. Current Status and Future Prospects to Achieve Foot-and-Mouth Disease Eradication in South America. *Transboundary and Emerging Diseases*, v. 64, n. 1, p. 31-36, 2017.

COLLEN, T. Foot and mouth disease (Aphthovirus): viral T cell epitopes. In: Bruno Goddeeris, M. L.; Morrison W. I. *Cell-Mediated Immunity in Ruminants*. Flórida: CRC, p. 173–197, 1994.

CRUVINEL, W.M.; MESQUITA J., D.; ARAÚJO, J.A.P.; CATELAN, T.T.T.; SOUZA, A.W.S.; A., L.E.C. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. *Rev. Bras. Reumatol.*, v. 50, n. 4, p. 434-461, 2010.

DIAZ-SAN SEGUNDO, F.; MORAES, M. P.; SANTOS, T.; DIAS, C. C. A.; GRUBMAN, M. J.; Interferon-induced protection against Foot-and-Mouth Disease Virus infection

correlates with enhanced tissue-specific innate immune cell infiltration and interferon-stimulated gene expression. *Journal of Virology*, v. 84, n. 8, p. 2063-2077, 2009.

DIAZ-SAN SEGUNDO, F.; MEDINA, G.N.; STENFELDT, C.; ARZT, J.; SANTOS, T. Foot-and-mouth disease vaccines. *Veterinary Microbiology*, v. 206, p. 102-112, 2017.

FENG, X.; MA, J. W.; SUN, S. Q.; GUO, H.C.; YANG, Y.M.; JIN, Y.; ZHOU, G. Q.; HE, J. J.; GUO, J. H.; QI, S. Y. LIN, M. CAI, H.; LIU, X. T. Quantitative Detection of the Foot-And-Mouth Disease Virus Serotype O 146S Antigen for Vaccine Production Using a Double-Antibody Sandwich ELISA and Nonlinear Standard Curves. *PLoS One*. v. 11, n. 3, 2016.

FINNEY, D.J. The Spearman-Kärber method. In: *Statistical method in biological assay*. 2nd. ed. London: Charles Griffin & Company, 1964. p. 524-531.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS/WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH – FAO/OIE. The Global Foot-and-Mouth Disease Control Strategy. DISPONÍVEL EM <https://www.oie.int/doc/ged/D11886.PDF>. ACESSO EM 07/09/2017 às 16:00.

GAO, Y.; SUN, S. Q.; GUO, H.C. Biological function of Foot-and-mouth disease virus non-structural proteins and non-coding elements. *Virology Journal*, v. 13, n. 107, p. 1-17, 2016.

GARCIA-NUNES, S.; GISMONDI, M.I.; KONIG, G.; BERINSTEIN, A.; RIEDER, E.; MARTINEZ-SALAS, E.; CARRILLO, E. Enhanced IRES activity by the 3' UTR element determines the virulence of FMDV isolates. *Virology*, v. 448. p. 303-313, 2014.

GARLAND, A.J.M; CLERCQ, K. Cattle, sheep and pigs vaccinated against foot and mouth disease: does trade in these animals and their products present a risk of transmitting the disease? *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, v. 30, n. 1, p. 189-206, 2011.

GRAHAM, B. S; CROWE Jr, J. E.; LEDGERWOOD, J. E. Immunization against viral diseases. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. *Fields Virology*. Philadelphia: Ed. Lippincott, 2013. Cap.16, p. 379-380.

GRUBMAN, M. J.; BAXT, B. Foot-and-Mouth Disease. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 17, n. 2, p. 465-493, 2004.

HABIELA, M.; SEAGO, J.; PEREZ-MARTIN, E.; WATERS, R.; WINDSOR, M.; SALGUERO, F.J.; WOOD, J.; CHARLESTON, B.; JULEFF, N. Laboratory animal models to study foot-and-mouth disease: a review with emphasis on natural and vaccine-induced immunity. *J Gen Virol.*, v. 95, n. 11, p. 2329-2345, 2014.

HOSSEINI, S.; VÁZQUEZ-VILLEGAS, P.; RITO-PALOMARES, M.; MARTINEZ-CHAPA, S.O. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) From A to Z. Springer. 2018, 114 p.

HOTZEL, M. J.; MACHADO F., L. C. P. Bem-estar animal na agricultura do século XXI. *Revista de Etologia*, v. 6, n. 1, 2004.

INDICADORES IBGE: ESTATÍSTICA DA PRODUÇÃO PECUÁRIA – DISPONÍVEL EM: [ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao\\_Pecuaria/Fasciculo\\_Indicadores\\_IBGE/abate-leite-couro-ovos\\_201802caderno.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Fasciculo_Indicadores_IBGE/abate-leite-couro-ovos_201802caderno.pdf) - ACESSO EM 27/11/2018 ÀS 20:00.

JAMAL, S.M.; BELSHAM, G.J. Foot-and-mouth disease: past, present and future. *Veterinary Research*, v. 44, n. 116, p. 1-14, 2013.

KOTECHA, A.; WANG, Q.; DONG, X.; ILCA, S.L.; ONDIVIELA, M.; ZIHE, R.; SEAGO, J.; CHARLESTON, B.; FRY, E.E.; ABRESCIA, N.G.A.; SPRINGER, T.A.; HUISKONEN, J.T.; STUART, D.I. Rules of engagement between avb6 integrin and foot-and-mouth disease virus. *Nature Communications*. v. 8, n. 15408, p. 1-8, 2017.

LYRA, T.M.P.; SILVA, J.A. A Febre Aftosa no Brasil, 1960-2002. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*. v. 56, n.5, p. 565-576, 2004.

MASON, P.W.; GRUBMAN, M. J.; BAXT, B. Molecular basis of pathogenesis of FMDV. *Virus Res.*, v. 91, p. 9-32, 2003.

MACH, M. Antibody-mediated neutralization of infectivity. REDDEHASE, M.J. *Cytomegaloviruses: Molecular Biology and Immunology*. Norwich, United Kingdom. Caister Academic Press, 2006.

MAHAPATRA, M.; PARIDA, S. Foot and Mouth disease vaccine strain selection: current approaches and future perspectives. *Expert Review of Vaccines*. v. 17, n. 7, p. 577-591, 2018.

MARQUES, G.H.F.; STEFANO, E.; RIBEIRO, C.P.; TURISSI, L.H.A.; DIAS, R.A.; NARANJO, J.; POZZETI, P.S.; COSTA, J.F.; PITUCO, E.M. A experiência brasileira na erradicação da Febre Aftosa e o emprego do sistema I-ELISA 3ABC/EITB para certificação sanitária de bovinos e bubalinos. *Arq. Inst. Biol*. v. 82, p. 1-11, 2015.

MATTION, N.; GORIS, N.; WILLEMS T.; ROBILOLO, B.; MARADEI, E.; BEASCOECHEA, C.P.; PEREZ, A.; SMITSAART, E.; FONDEVILA, N.; PALMA, E.; DE CLERCQ, K.; LA TORRE, J. Some guidelines for determining foot-and-mouth disease vaccine strain matching by serology. *Vaccine*, v. 27, n. 5, p. 741-747, 2009.

MAYEN, F.L. Foot and Mouth disease in Brazil and its control – An overview of its history, present situation and perspectives for eradication. *Veterinary Research Communications*, v. 27, p. 137-148, 2003.

McCULLOUGH, K. C.; ROWTHER, J. R.; BUTCHER, R. N. A liquid-phase ELISA and its use in the identification of epitopes on foot-and-mouth disease virus antigens. *Journal of Virological Methods*, v. 11, n. 4, p. 329-338, 1985.

McCULLOUGH, K. C.; SIMONE, F.; BROCCHI, E.; CAPUCCI, I.; CROWTHER, J. R.; KIHM, U. Protective immune response against foot-and-mouth disease. *Journal of Virology*, v.66, n. 4, 1992.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA, Coletânea de imagens – lesões de Febre Aftosa e de outras doenças incluídas no sistema nacional de vigilância de doenças vesiculares, 2009. DISPONÍVEL EM: [http://www.agricultura.gov.br/assuntos/saude-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/Coletanea\\_imagens\\_FA.pdf](http://www.agricultura.gov.br/assuntos/saude-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/Coletanea_imagens_FA.pdf) - ACESSO EM 27/11/2018 ÀS 18:00.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA, Dados de Rebanho Bovino e Bubalino no Brasil 2017. DISPONÍVEL EM: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/saude-animal-e-vegetal/saude->

animal/programas-de-saude-animal/febre-aftosa/documentos-febre-aftosa/DadosderebanhobovinoebubalinodoBrasil\_2017.pdf – ACESSO EM 27/11/2018 ÀS 20:00.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO – MAPA, Programa Nacional de Erradicação e Prevenção de Febre Aftosa (PNEFA). DISPONÍVEL EM: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/programa-nacional-de-erradicacao-de-febre-aftosa-pnefa>. ACESSO EM 10/09/2017 ÀS 10:00.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO – MAPA. Reunião da Cosalfa servirá para discutir foco recente de aftosa na Colômbia. DISPONÍVEL EM: <http://www.agricultura.gov.br/noticias/reuniao-da-cosalfa-servira-para-discutir-foco-recente-de-aftosa-na-colombia>. ACESSO EM 05/11/2018 ÀS 18:00.

MSA. Manual de referência de análises de sistemas de medição. 4ª ed. São Paulo: IQA, 2010.

MURPHY, H.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. Imunobiologia de Janeway, 8ª ed. Artmed, 2014.

OTUKI, T. F.; WEYDMANN, C. L.; SEABRA, F. Febre aftosa e volatilidade dos preços do produtor de carne suína. *Revista de Economia e Agronegócio*. v.7, n. 2, 2009.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION/CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA – PAHO/PANAFTOSA. Febre Aftosa: Enfermedades Confundibles. DISPONÍVEL EM:



[http://www.paho.org/panaftosa/index.php?option=com\\_content&view=article&id=247:fiebre-aftosa&Itemid=285](http://www.paho.org/panaftosa/index.php?option=com_content&view=article&id=247:fiebre-aftosa&Itemid=285). ACESSO EM: 12/09/2017 ÀS 13:00.

PATON, D.J.; VALARCHER, J.F.; BERGMANN, I.; MATLHOO.G.; ZAKHAROV, V.M.; PALMA, E.L.; THOMSON, G.R. Selection of foot-and-mouth disease vaccine strains – a review. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* v. 24, n. 3, p. 981-993, 2005.

PEGA, J.; BUCAFUSCO, D.; DI GIACOMO, S.; SCHAMMAS, J. M.; MALACARI, D.; CAPOZZO, A. V.; ARZT, J.; PÉREZ-BEASCOECHEA, C.; MARADEI, E.; RODRÍGUEZ, L. L.; BORCA, M. V.; PÉREZ-FILGUEIRA, M. Early adaptive immune responses in the respiratory tract of foot-and-mouth disease virus-infected cattle. *Journal Virology.* v. 87, n. 5, p. 2489-2495, 2012.

RACANIELLO, V. R. Picornaviridae: The viruses and their replication. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. *Fields Virology*. Philadelphia: Ed. Lippincott, 2013. Cap.16, p. 453-489.

REED, L.J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *The American Journal of Hygiene*, v. 27, p. 493–497, 1938.

RIEDER, E.; BRUM, M.C. Picornaviridae: Picornavirus de interesse veterinário. In: FLORES, E.F. *Virologia Veterinária*. Santa Maria: Ed. UFMS, 2007. Cap. 21, p. 542-548.

RUECKERT, R.R.; WIMMER, E., 1984. Systematic nomenclature of picornavirus proteins. *Journal of Virology.* v. 50, n. 3, p. 957–959, 1984.

SARAIVA, V. Vaccines and Foot-and-Mouth Disease Eradication in South America. In: BROWN, F.; ROTH, J. Vaccines for OIE List A and Emerging Animal Disease. Developmental Biology. Basel, Karger, v. 114, p. 269-280, 2003.

SARAIVA, V.; LOPEZ A. Febre Aftosa. In: LEMOS, R. A. A. Febre Aftosa. Campo Grande: Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, 1998. p. 179-182.

SELLERS, R.F.; FORMAN, A.J. The Hampshire epidemic of foot-and-mouth disease, 1967. *The journal of hygiene*, v. 71, n. 1, p. 15-34, 1973.

SUCHANEK, M.; ROBOUCH, P. Measurement uncertainty of test kit results – The ELISA example. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, v. 47, n. 7, p. 808-810, 2009.

SUMMERFIELD, A.; GUZYLACK-PIRIOU, L.; HARWOOD, L.; McCULLOUGH, K.C. Innate immune responses against foot-and-mouth disease virus: Current understanding and future directions. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 128, p. 205-210, 2009.

TEKLEGHIORGHIS, T.; WEERDMEESTER, K.; HEMERT-KLUITENBERG, F.; MOORMANN, R.J.M.; DEKKER, A.; Comparison of Test Methodologies for Foot-and-Mouth Disease Virus Serotype A Vaccine Matching. *Clin Vaccine Immunol.*, v. 21, n. 5, p. 674-683, 2014.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE – USDA, Brazil Poultry and Products Annual 2017 Poultry and Products Annual Report. DISPONÍVEL EM:

[https://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Poultry%20and%20Products%20Annual\\_Brasilia\\_Brazil\\_8-4-2017.pdf](https://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Poultry%20and%20Products%20Annual_Brasilia_Brazil_8-4-2017.pdf). ACESSO EM 08/12/2018 ÀS 11:30.

YUAN, G.; SUN, S.Q.; GUO, H.C. Biological function of Foot-and-mouth disease virus non-structural proteins and non-coding elements. *Virology Journal*, v. 13, n. 107, p. 1-17, 2016.

WANG, G., WANG, Y., SHANG, Y., ZHANG, Z., LIU, X. How Foot-and-Mouth Disease Virus receptor mediates Foot-and-Mouth Disease Virus infection. *Virology Journal*, v.12, n.9, p. 2-7, 2015.

WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH - OIE. Chapter 2.1.8. — Foot-and-Mouth Disease Infection with Foot and Mouth Disease Virus. DISPONÍVEL EM: [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.01.08\\_FMD.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.08_FMD.pdf). ACESSO EM: 10/09/2017 às 15:00.

ZELL, R., DELWART, E., GORBALENYA, A.E., HOVI, T., KING, A.M.Q., KNOWLES, N.J., LINDBERG, A.M., PALLANSCH, M.A., PALMENBERG, A.C., REUTER, G., SIMMONDS, P., SKERN, T., STANWAY, G., YAMASHITA, T., ICTV REPORT CONSORTIUM, ICTV Virus Taxonomy Profile: Picornaviridae. *Journal of General Virology*, v. 98, p. 2421–2422, 2019.

ZHANG, H.; LI, Y.; HUANG, X.; ZHENG, C. Global transcriptional analysis of model of persistent FMDV infection reveals critical role of host cells in persistence. *Veterinary Microbiology*, v. 162, n. 2-4, p. 321-329, 2013.