

Universidade Federal de Minas Gerais
Conselho de Pós-Graduação
Escola de Veterinária

PRESENÇA DO ANTÍGENO VIA (VIRUS INFECTION ASSOCIATED) EM
BOVINOS VACINADOS, NÃO VACINADOS E CONVALESCENTES DE
FEBRE AFTOSA

Paulo Roberto de Oliveira

Belo Horizonte
Minas Gerais
1981

Paulo Roberto de Oliveira

PRESENÇA DO ANTÍGENO VIA (VIRUS INFECTION ASSOCIATED) EM
BOVINOS VACINADOS, NÃO VACINADOS E CONVALESCENTES DE
FEBRE AFTOSA

Tese apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária.

Área: Epidemiologia

Belo Horizonte
Minas Gerais
1981

Oliveira, Paulo Roberto

048p Presença do antígeno VIA (Virus Infection Associated) em bovinos vacinados, não vacinados e convalescentes de febre aftosa. Belo Horizonte, Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, 1981.

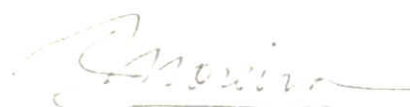
xiv + 35p ilustr.

Tese de Mestrado

1. Aftosa-Bovino. 2. Antígeno VIA-Presença.
I. Título.

CDD 636.208.969.26
CDU 616.988.4:636.2

APROVADA EM 30/4/1981



Prof. ÉLVIO CARLOS MOREIRA
- Orientador -



Prof. PAULO CALDEIRA BRANT



Prof. FRANCISCO CECÍLIO VIANA

Pelo estímulo e entusiasmo recebidos, dedico este trabalho aos meus pais e à minha esposa.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. ÉLVIO CARLOS MOREIRA, pela indispensável orientação.

Ao Prof. JOSÉ AILTON DA SILVA, pela colaboração prestada.

Ao Prof. RABINDRANAH LOYOLA CONTRERAS e aos Drs. ROBERTO WAGNER C. MELADO e DÉCIO MACIEL LEITE pelo inestimável auxílio.

Ao Dr. ARTHUR RIBEIRO NETO e demais colegas do IESA que colaboraram para a realização deste.

A todos os colegas e professores do Curso de Pós-Graduação pelo convívio e conhecimentos transmitidos.

Aos funcionários e professores do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva pela presteza e convívio agradável.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, pela bolsa de estudo concedida e auxílio financeiro ao Curso de Mestrado em Epidemiologia.

Ao CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA, pelos testes de soroneutralização.

A todos que colaboraram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA DO AUTOR

PAULO ROBERTO DE OLIVEIRA, filho de Ivo Silva de Oliveira e Maria da Conceição Vieira, nasceu em Belo Horizonte, Minas Gerais, aos 28 dias do mês de abril de 1954.

Em 1977, diplomou-se em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Minas Gerais.

Em 1978, foi contratado pelo GERFAMIG, atual Instituto Estadual de Saúde Animal, onde trabalhou na Campanha contra Febre Aftosa, responsável pelos municípios de São Francisco e São Romão (MG).

Em 1979 foi selecionado para fazer o Curso de Pós-Graduação na Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, em Medicina Veterinária, na área de Epidemiologia.

Este trabalho contou com o apoio financeiro da FUNDAÇÃO DE ESTUDO E PESQUISA EM MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA - FEP-MVP.

RESUMO

Através das provas de dupla difusão em ágar-gel (DDA) e soro-neutralização (SN), foram testados contra o antígeno associado à infecção (VIA), 332 bovinos do rebanho livre de febre aftosa e sem histórico de vacinação, 561 animais de um rebanho livre de febre aftosa vacinado de quatro em quatro meses e 104 bovinos convalescentes de febre aftosa, divididos em grupos de dois, seis e 12 meses após a doença.

Os bovinos de rebanho livre apresentaram-se negativos ao VIA e à soro-neutralização.

Os bovinos de rebanho vacinado e livre, apresentaram positividade de 19,6% ao VIA, enquanto que os bovinos menores de 12 meses não vacinados ou que receberam apenas uma dose de vacina, pertencentes a este mesmo grupo, foram negativos.

Os bovinos convalescentes com dois, seis e 12 meses após a doença, apresentaram positividade de 93,3, 86,4 e 50,0%, respectivamente, ao VIA. Nestes animais verificou-se uma relação entre o aumento de tempo após a infecção e a diminuição dos índices de positividade ao VIA.

Concluiu-se que bovinos de propriedades livres da ocorrência clínica e sem vacinação contra febre aftosa,

não são reagentes ao VIA e que vacinas anti-aftosa comercializadas no Brasil, podem induzir formação de anticorpos anti-VIA, sendo esta resposta geralmente transitória e de baixo título.

Concluiu-se, também, que, à medida que se aumentava o tempo pós-infecção, diminuía o número de reagentes positivos do VIA e que a prova de VIA é de difícil interpretação, dificultando a diferenciação de positivos entre convalescentes de febre aftosa e vacinados.

Verificou-se que bovinos convalescentes de febre aftosa apresentaram título mais elevado do que bovinos vacinados, após diluição do soro para prova do VIA.

A prova do VIA poderá ser de grande valor para realização de inquéritos epidemiológicos em áreas livres ou em final de programa de erradicação, devendo, entretanto, sempre ser acompanhada de informações sobre histórico de vacinação e de ocorrência ou não da doença clínica.

SUMÁRIO

	<u>Página</u>
1. INTRODUÇÃO	1
2. LITERATURA CONSULTADA	3
3. MATERIAL E MÉTODOS	8
4. RESULTADOS	14
4.1. Grupo 1 - Bovinos de rebanho livre de febre aftosa e sem histórico de vaci- nação	14
4.2. Grupo 2 - Bovinos de rebanho livre de febre aftosa vacinados quadrimestral- mente	14
4.3. Grupo 3 - Bovinos convalescentes de febre aftosa	15
4.3.1. Sub-grupo 1 - dois meses após o surto	15
4.3.2. Sub-grupo 2 - seis meses após o surto	15

	<u>Página</u>
4.3.3. Sub-grupo 3 - doze meses após o surto	16
5. DISCUSSÃO	27
5.1. Bovinos não vacinados contra febre af- tosa, oriundos do rebanho livre	27
5.2. Bovinos de rebanho livre de febre af- tosa vacinados quadrimestralmente	28
5.3. Bovinos convalescentes de febre afto- sa, oriundos de rebanho com histórico recente da doença	30
6. CONCLUSÕES	32
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

ÍNDICE DAS TABELAS

	<u>Página</u>
TAB. I - Frequência de anticorpos anti-VIA segundo a idade, em bovinos livres de febre aftosa e vacinados quadrimestralmente. Grupo 2, Lagoa da Prata, MG. 1980	17
TAB. II - Título final de 30 bovinos positivos ao VIA, de rebanho livre de febre aftosa e vacinados quadrimestralmente, amostrados de animais do grupo 2. Lagoa da Prata, MG. 1980	18
TAB. III - Título final dos 14 bovinos positivos ao antígeno VIA, dois meses após surto de febre aftosa. Grupo 3.1., Esmeraldas, MG. 1980	19
TAB. IV - Frequência de anticorpos anti-VIA segundo a idade, em bovinos seis meses após surto de febre aftosa. Grupo 3.2., Carlos Chagas, MG. 1980	20

Página

TAB. V	- Título final dos 51 bovinos positivos ao VIA seis meses após surto de febre aftosa. Grupo 3.2., Carlos Chagas, MG. 1980	21
TAB. VI	- Frequência de anticorpos anti-VIA segundo a idade, em bovinos 12 meses após surto de febre aftosa. Grupo 3.3., Varginha, MG. 1980	22
TAB. VII	- Título final dos 15 bovinos positivos ao VIA, 12 meses após surto de febre aftosa. Grupo 3.3., Varginha, MG. 1980	23
TAB. VIII	- Limites de confiança, de acordo com os grupos estudados. Minas Gerais, 1980	24

ÍNDICE DE GRÁFICO

Página

GRAF. 1 - Percentagem de bovinos positivos ao VIA, 2 a 12 meses após a in - fecção. Minas Gerais, 1980	25
--	----

ÍNDICE DE FIGURA

	<u>Página</u>
FIG. 1 - Localização dos municípios de origem dos bovinos pesquisados em Minas Gerais, 1980	26

INTRODUÇÃO

Devido à conotação política, econômica e social da febre aftosa, métodos de diagnóstico laboratorial e planos de combate e erradicação da enfermidade, vem sendo desenvolvidos em vários países do mundo. No Brasil a febre aftosa tem sido combatida sistematicamente, nos Estados onde a pecuária tem importância econômica. Torna-se, porém, necessário a utilização de métodos e estratégias atualizadas, técnicas de laboratório modernas, pessoal técnico bem treinado e um trabalho de conscientização da comunidade para se conseguir o controle efetivo desta enfermidade.

O conhecimento da morbidade da febre aftosa é necessário para a avaliação e ajuste das medidas utilizadas no combate à doença. Assim, além do registro dos casos clínicos, a prevalência da infecção no rebanho deve ser determinada através de inquéritos sorológicos.

Na febre aftosa, entretanto, o uso destes inquéritos estava limitado. A dificuldade era diferenciar os anticorpos da infecção dos induzidos pela vacina.

Em 1966, foi descoberto por COWAN & GRAVES, um terceiro componente antigênico associado à infecção pelo vírus de febre aftosa, que foi denominado VIA (Virus Infection Associated).

O teste da dupla difusão em ágar gel (DDA) foi sugerido por MC VIGAR & SUTMOLLER (1970) para a determinação de anticorpos anti-VIA, como instrumento para se realizar levantamentos epidemiológicos. Os mesmos autores afirmaram ser essa prova de baixo custo, de fácil execução e que três técnicos poderiam testar 10.000 soros, aproximadamente, em quatro ou cinco semanas.

Entretanto, a despeito da facilidade de execução da técnica e de seu baixo custo, verificou-se ser, a prova do VIA, de difícil interpretação, por apresentar problemas relativos à sensibilidade e especificidade (CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA, 1980). Em relação à sensibilidade da prova constatou-se a existência de animais negativos ao VIA que, ao mesmo tempo, eram portadores do vírus aftoso (PINTO & GARLAND, 1979; CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA, 1980). Quanto à especificidade da prova, verificou-se a existência de animais vacinados contra febre aftosa não infectados, porém, positivos ao via (PINTO & GARLAND, 1979; CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA, 1980).

No sentido de se determinar a adequação da pesquisa de anticorpos contra o antígeno VIA através da prova de dupla difusão em ágar-gel, este trabalho teve como objetivos principais:

- verificar o percentual de VIA positivo e negativo em rebanho bovino livre da febre aftosa e não vacinado;
- verificar o percentual de VIA positivo em rebanho bovino vacinado e sem histórico da doença;
- verificar o percentual de VIA positivo em bovinos convalescentes da doença no segundo, sexto e 12º meses após o surto.

2. LITERATURA CONSULTADA

COWAN & GRAVES (1966) descobriram um terceiro componente antigênico produzido em células BHK, tecidos de cobaias e bovinos infectados com o vírus tipo A da febre aftosa. Este antígeno, cujo coeficiente de sedimentação é menor do que os então conhecidos 140 S e 12 S componentes antigênicos do vírus da febre aftosa, foi aceito como produzido em consequência da infecção viral, conhecido pela sigla VIA (Virus Infection Associated). Os autores acreditam que o antígeno VIA esteja presente em fluidos de cultura de tecido infectada e que, o mesmo antígeno, perdia sua atividade antigênica quando aquecido por 30 min a 50°C ou quando submetido a um pH ácido (5.0).

MC VICAR & SUTMOLLER (1970) testaram soros de bovinos para um estudo retrospectivo de avaliação do teste ágar-gel difusão como método de determinação de anticorpo contra o antígeno VIA. Encontraram um soro positivo ao VIA, de animal vacinado com vacina produzida em cultivo celular, inativada pelo formol e adsorvida com hidróxido de alumínio. Os autores supõem que tenha havido uma inativação incompleta do vírus ou que o antígeno VIA estivesse presente nos fluidos de tecido infectado presentes na vacina, com consequente estímulo para a formação de anticorpo anti-VIA.

Sugeriram o método como instrumento para se realizar levantamentos epidemiológicos.

LOBO et alii (1974) testaram, pela prova da imunodifusão em ágar-gel, 41 bovinos e 49 suínos infectados naturalmente pelo vírus O e A da febre aftosa, encontrando 88% e 75%, respectivamente, de reações positivas ao VIA. Os autores afirmaram que vacinas formoladas não interferiram no desenvolvimento do anticorpo contra o VIA.

ALONSO et alii (1975) verificaram que cinco de 18 bovinos imunizados com vacina inativada pelo formol e oito de 16 com vacina de vírus vivo modificado desenvolveram anticorpo anti-VIA 21 dias pós-vacinação, o que não foi encontrado em 16 bovinos imunizados com vacina inativada pelo AEI (acetiletlenimina). Postularam que a vacina formolada conteria vírus incompletamente inativado. Em um grupo de 12 bovinos mantidos em isolamento por mais de um ano, que contraiu febre aftosa de animais de um estabelecimento próximo, os autores encontraram 11 bovinos positivos ao VIA oito semanas após o início do surto, ou seja, 91,6%, havendo cinco animais permanecido positivos, 70 semanas após.

LOBO (1976) afirmou que alta percentagem de animais convalescentes de febre aftosa desenvolvem anticorpo anti-VIA, que diminui progressivamente, a ponto de entre os 8º e 9º meses após a infecção somente 40% dos bovinos apresentarem reações positivas ao VIA.

LOBO et alii (1976) utilizando da dupla difusão em ágar encontraram 100% de bovinos positivos ao VIA 30 dias após a infecção. Os autores encontraram suínos cinco, sete e 12 meses após a infecção, 61, 40 e 66%, respectivamente, de positivos e bovinos cinco e sete meses após a infecção, encontraram 64 e 60%, respectivamente, de positivos. Afir-maram que a redução da prevalência de anticorpos contra o VIA através do tempo, após infecção, estaria relacionada ao curto período de vida dos anticorpos ou à baixa sensibilidade da prova. Os autores ainda sugeriram que vacinações re-

petidas com vacinas formoladas não interferiram no desenvolvimento de anticorpos anti-VIA.

O CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA (1976, 1977, 1978) relatou várias pesquisas em bovinos da América Central oriundos de áreas consideradas livres de febre aftosa, em que não encontrou positivos ao VIA.

LOBO et alii (1977) estudaram bovinos do Norte de Choco, na Colômbia, onde o último surto de febre aftosa e a última vacinação ocorreram no ano anterior, e encontraram uma prevalência de 12% de bovinos positivos ao VIA pela DDA. Os autores acreditam que a prevalência encontrada poderia ser consequência de infecções passadas, portadores ou vacinas insuficientemente inativadas, aplicadas várias vezes em animais, que estimulariam a resposta anti-VIA.

ROSEMBERG et alii (1977), definindo ecossistema indene, recomendaram a não vacinação da população suscetível. Defenderam, como medidas sanitárias profiláticas, a vigilância epidemiológica associada à proibição do ingresso de animais oriundos de áreas afetadas. Em caso de surtos, os autores recomendaram sacrifício, vacinações e quarentenas regionais.

QUINTARD & PAREDES (1978) estudaram soros de bovinos oriundos de quatro províncias da X Região Geopolítica do Chile, onde o último surto da febre aftosa ocorreu cinco anos antes, sendo encontrada uma prevalência de $2,35\% \pm 0,48\%$, de positivos ao VIA. Observaram que a maioria dos bovinos positivos possuíam mais de seis anos de idade, portanto, várias vezes vacinados, e que 96,7% destes haviam sido vacinados, pela última vez, no ano do experimento com vacina inativada pelo AEl. A menor prevalência foi encontrada em uma província onde não se vacinava há mais de quatro anos. Concluíram os autores, que as vacinas utilizadas foram estímulo suficiente para provocar resposta anti-VIA capaz de ser detectada pela imunodifusão em ágar-gel (DDA). Os autores acreditam, pelos resultados obtidos, ser

improvável a ocorrência da febre aftosa na região, a não ser que seja introduzida por agentes externos.

QUINTARD (1978) estudou 520 bovinos da XII Região Geopolítica do Chile (livre de febre aftosa há mais de sete anos, não vacinada anteriormente), encontrando - os negativos ao VIA pela DDA, confirmando, desta forma, a ausência de atividade viral na região, apoiada anteriormente pelos parâmetros clássicos, ou seja, a ausência das manifestações clínicas da doença.

DAWE & PINTO (1978) estudaram um grupo de bovinos não infectados, vacinados anualmente contra febre aftosa (vacina inativada AEI) do norte de Malawi (África). Estudaram outro grupo de bovinos livres da febre aftosa e não submetidos a regime de vacinação. Encontraram todos os animais de ambos os grupos negativos ao VIA através da prova de difusão em ágar-gel. Três semanas após vacinação dos animais dos dois grupos, encontraram 27,5% dos bovinos vacinados regularmente positivos ao VIA. Por outro lado, permaneceram negativos ao VIA os animais não submetidos regularmente à vacinação, o que mostrou a diferença imunológica existente entre os dois grupos. A explicação dos autores para o fato foi através da presença de antígeno VIA nas vacinas ou a uma infecção sub-clínica dos animais por pequenas quantidades de vírus vivo inativado presente nas vacinas.

PINTO & GARLAND (1979) estudaram bovinos negativos ao VIA pela DDA antes e após a primeira vacinação (vacina inativada pelo formol), encontrando-os positivos 11 dias após a segunda vacinação. Semelhantemente estudaram bovinos negativos ao VIA antes e após a primeira vacinação (vacina inativada pelo AEI) encontrando 36% de positivos sete dias após a segunda vacinação. Os autores explicaram o fato pela presença do antígeno via na vacina, havendo uma resposta secundária ao antígeno após a segunda vacinação e afirmam que à medida que se aumentava o número de va-

vacinações, mais animais respondiam positivamente ao VIA.

O CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA (1980) estudou, pela dupla difusão em ágar-gel, um rebanho leiteiro em Minas Gerais livre da febre aftosa, vacinado a cada quatro meses com vacina inativada pelo AEI ou BEI (etilenimina binária). Através da amostragem, encontrou-se, durante o período de quatro meses entre vacinações, o mais alto número de bovinos positivos ao VIA no terceiro mês, correspondendo a 27%. No quarto mês, encontrou-se uma variação de 0 a 16% de positivos. Relatando haver encontrado 100% de bovinos positivos ao VIA pela DDA 30 dias após o surto de febre aftosa na região oriental do Paraguai, afirmou que a possibilidade de animais vacinados apresentarem-se positivos ao VIA aumentava com o número de vacinações, e com o uso de formol como inativante.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas amostras de soros sanguíneos de bovinos de ambos os sexos, idades e raças diversas, oriundos de diferentes municípios do Estado de Minas Gerais (FIG. 1).

Os bovinos foram divididos em três grupos. O cálculo de número de bovinos a serem estudados em cada grupo foi feito segundo recomendação do CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS (1979), utilizando-se a seguinte fórmula:

$$n_1 = \frac{p \cdot (100 - p) \cdot z^2}{\left(\frac{d \cdot p}{100}\right)^2}$$

onde:

n = número de animais a testar;

p = prevalência esperada;

z = grau de confiança;

d = margem de erro esperada;

Grupo 1 - Bovinos não vacinados contra febre aftosa, oriundos do rebanho livre

O número de animais estudados neste grupo foi obtido através de amostragem crítica, ao nível de 1%, sendo 298 o número de amostras recomendadas pelo CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS (1979). A este número foram acrescentadas 34 amostras, sendo examinados, neste grupo, um total de 332 soros. Após o exame foram sorteadas, aleatoriamente, 16 amostras que foram submetidas ao teste de soro-neutralização.

Os 332 bovinos pertenciam a duas propriedades de mesmo proprietário, localizadas no município de Curvelo/MG, distanciadas a três e 20 quilômetros, respectivamente, da cidade e 17 quilômetros entre si, tendo como limite a estrada que liga Curvelo a Felixlândia. Os bovinos são manejados conforme disponibilidade da pastagem entre as duas fazendas.

Foram introduzidas seis vacas mestiças no plantel em 1979, oriundas de São Paulo, o que, segundo o proprietário, não acontecia há mais de dez anos, não havendo vacinações anti-aftosa durante tal período (1969-1979) nem surto da enfermidade. Foram estudados, neste grupo, 83 bovinos menores de um ano de idade, 133 de 2 a 4, 79 de 5 a 7, 27 de 8 a 10 e 10 de 11 a 12 anos de idade.

Grupo 2 - Bovinos de rebanho vacinado contra febre aftosa e sem histórico da doença

Os bovinos do grupo 2 pertencem às propriedades localizadas no município de Lagoa da Prata, oeste de Minas Gerais. As propriedades são constituídas por duas fazendas (Máquina e Catingueiro), ambas na periferia da cidade, distanciadas aproximadamente cinco quilômetros uma da outra, havendo intercâmbio constante de animais entre as duas fa-

zendas. As fazendas são limitadas por várias estradas, onde há intenso trânsito de caminhões carregadores de cana de açúcar. Os bovinos são criados sob regime extensivo e semi-extensivo, sendo este para animais que se apresentam em exposições.

A exploração da propriedade é baseada na venda de reprodutores, sendo Indubrasil a raça trabalhada. Não há registro de febre aftosa na propriedade há mais de 15 anos, havendo vacinação sistemática anti-aftosa de quatro em quatro meses, rigorosamente, a partir do quarto mês de vida dos bovinos.

Os animais foram vacinados em janeiro/1980 com vacina produzida em cultivo celular, inativada com o AEI, sendo sangrados um mês após. Os bezerros não vacinados foram sangrados em março/1980. Não há introdução de novos animais na propriedade há mais de 10 anos.

O cálculo do número de bovinos foi feito tendo como base os seguintes valores:

$p = 27\%$ (CENTRO PANAMERICANO DE FEBRE AFTOSA, 1980)

$z = 1,96$

$d = 20\%$

$$n_2 = \frac{27 \cdot 73 \cdot (1,96)^2}{\left(\frac{20 \cdot 27}{100}\right)^2} = 260 \text{ soros}$$

Somou-se 301 amostras a este grupo, sendo examinados um total de 561 soros. Dentre os positivos foram sorteados, aleatoriamente, 30 amostras para determinação do título final.

Grupo 3 - Bovinos convalescentes da febre aftosa, oriundos de rebanhos com histórico recente da doença

Foram utilizados bovinos com histórico recente

de febre aftosa dois, seis e 12 meses após a doença, sendo estes últimos subdivididos em três sub-grupos.

Estes animais são de fazendas localizadas nos municípios de Esmeraldas, Carlos Chagas e Varginha - MG. À exceção da propriedade de Esmeraldas, as outras estão localizadas em áreas submetidas ao programa regular de Controle da Febre Aftosa, executado pelo IESA (Instituto Estadual de Saúde Animal). Todas as três propriedades tiveram febre aftosa diagnosticada por exame laboratorial.

Sub-grupo 3.1. Bovinos dois meses após haverem sofrido febre aftosa

p = 88% (LOBO et alii, 1974)

z = 1,96

d = 20%

$$n_{3.1} = \frac{88 \cdot 12 \cdot (1,96)^2}{\left(\frac{20 \cdot 88}{100}\right)^2} = 13 \text{ soros}$$

Foram acrescentadas duas amostras a este sub-grupo, sendo examinados um total de 15 soros. Determinou-se o título final dos positivos.

Sub-grupo 3.2. Bovinos seis meses após haverem sofrido febre aftosa

p = 62%

z = 1,96

d = 20%

$$n_{3.2} = \frac{62 \cdot 38 \cdot (1,96)^2}{\left(\frac{20 \cdot 62}{100}\right)^2} = 59 \text{ soros}$$

Estudou-se 59 soros neste grupo. Determinou-se o título final dos positivos.

Sub-grupo 3.3. Bovinos 12 meses após haverem sofrido febre aftosa

p = 93%

z = 1,96

d = 10%

$$n_{3.3} = \frac{93 \cdot 7 \cdot (1,96)^2}{\left(\frac{10 \cdot 93}{100}\right)^2} = 29 \text{ soros}$$

Para aumento da segurança dos resultados estipulou-se, neste grupo, erro de apenas 10%.

Acrescentou-se uma amostra a este grupo, sendo examinados 30 soros. Determinou-se o título final dos positivos

Após obtenção do sangue por punção da jugular dos animais, os soros foram conservados a frio e transportados por via rodoviária para o Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG e mantidos a -20°C até a realização das provas.

Através da prova de dupla difusão em ágar-gel (DDA), os soros foram testados utilizando-se técnicas de MC VICAR & SUTMOLLER (1970) e ALONSO et alii (1975) que constituiu na preparação de um tampão com 0,5 M de glicina, 0,025 M de dietilbarbiturato de sódio, 0,5% de azida sódica e com pH 7,8 no qual foi dissolvido ágar purificado a 2%. Desta solução foi colocado 20 ml em placa de Petri de 120 mm. Uma vez solidificado o ágar, fez-se cavidades de 4 mm de diâmetro dispostas da forma: uma no centro e seis na periferia guardando simetria e medindo entre elas 6 mm.

O antígeno VIA foi colocado na cavidade central

e o soro-controle positivo em duas cavidades periféricas opostas. Nas quatro cavidades restantes colocou-se os soros a serem testados. As reações foram desenvolvidas em ambiente úmido e à temperatura de 26°C aproximadamente. As leituras foram feitas de dois a cinco dias após terem sido colocados os reativos.

O antígeno VIA foi gentilmente cedido pelo Centro Panamericano de Febre Aftosa, que também realizou a prova de soro-neutralização nas amostras do grupo 1.

A leitura, segundo LOBO et alii (1976), foi dada pelo desenvolvimento de uma linha clara de precipitação, se uma reação de completa identidade ocorreu com a linha do soro-controle positivo.

Reações nas quais houve deflexão para dentro no final da linha de precipitação obtida com o soro-controle foram consideradas fracamente positivas. Finalmente, quando a linha de precipitação formada pelo soro-controle seguiu direto pela parede do soro testado, a reação foi interpretada como negativa. As leituras foram realizadas em luz indireta, aproximadamente 72 horas após o início da prova.

A análise estatística compreendeu o estudo comparativo das frequências observadas nos grupos e nas diferenças entre eles pela prova de qui-quadrado (SNEDECOR & COCHRAN, 1971).

Fixou-se, para aceitação da existência da diferença entre os grupos, risco de erro menor do que 5%.

4. RESULTADOS

4.1. Grupo 1 - Bovinos de rebanho livre de febre aftosa e sem histórico de vacinação

Os animais deste grupo apresentaram-se negativos ao VIA. Dentre os 16 animais que foram sorteados aleatoriamente e testados para anticorpos soro-neutralizantes, não encontrou-se soro positivo.

4.2. Grupo 2 - Bovinos de rebanho livre de febre aftosa vacinados quadrimestralmente

Encontrou-se que 19,6% dos soros examinados eram positivos ao VIA, ou seja, 110 animais positivos dentre 561 animais estudados (TAB. I). Observou-se que bovinos menores de 12 meses nunca vacinados ou que foram vacinados apenas uma vez, foram negativos ao VIA. Observou-se (TAB. II) que a maioria dos animais amostrados, 29 em 30, reagiram apenas fracamente ao VIA. Após várias diluições, encontrou-se que dos 30 bovinos amostrados, apenas um animal reagiu fracamente ao VIA na diluição 1:8, diluição máxima obtida neste grupo, sendo os 29 bovinos restantes negativos nesta diluição.

Observou-se que, à medida que se aumentavam as diluições, diminuíam os reagentes positivos e que à diluição 1:16 todos os bovinos apresentaram-se negativos ao VIA. Obteve-se os limites de confiança para este grupo (16,31 - 22,89) (TAB. VIII).

4.3. Grupo 3 - Bovinos convalescentes de febre aftosa

4.3.1. Sub-grupo 1 - dois meses após o surto

Encontrou-se 93,3% dos 15 soros examinados positivos ao VIA, sendo apenas um soro negativo à prova. Os limites de confiança calculados variaram (80,64 - 100,00) (TAB. VIII). Foi registrado o título final de 14 soros positivos ao VIA (TAB. III) e notou-se que sete animais reagiram fortemente à prova do VIA e sete reagiram fracamente. À medida que se aumentava a diluição, diminuía o número de positivos sendo encontrados à diluição 1:8 dois animais reagindo fortemente ao VIA, três animais reagindo fracamente num total de cinco positivos e nove negativos ao VIA, não sendo observada nenhuma reação a uma diluição 1:16.

4.3.2. Sub-grupo 2 - seis meses após o surto

Encontrou-se 51 soros positivos ao VIA dentre 59 estudados, ou seja, 86,4% de bovinos positivos ao VIA (TAB. IV). Encontrou-se (77,66 - 95,14) para os limites de confiança calculados (TAB. VIII). Mostrou-se o título final dos positivos após uma série de diluições (TAB. V). Na diluição 1:8 verificou-se apenas dois soros fracamente positivos e 49 negativos ao VIA. Observou-se que, à medida que se aumentava a diluição, menor era o número de reagentes positivos, até que à diluição 1:16 todos os bovinos apresentaram-se negativos ao VIA.

4.3.3. Sub-grupo 3 - doze meses após o surto

Estudou-se 30 soros bovinos, sendo encontrados 15 positivos ao VIA e 15 negativos, ou seja, 50% de reagentes cujos limites de confiança variaram de (32,1 - 67,9) (TAB. VI e VIII). Mostra-se o título final dos 15 soros positivos ao VIA após série de diluições (TAB. VII). Inicialmente notou-se duas reações fortes ao VIA e 13 fracas. À medida que aumentava a diluição, diminuía o número de reatores positivos, sendo encontrado à diluição 1:8, apenas um animal fracamente positivo e os 14 restantes negativos, não sendo observada nenhuma reação à diluição 1:16.

O valor de χ^2 através de estudo comparativo entre o Índice de positividade ao VIA e o tempo decorrido após infecção para os subgrupos 1, 2 e 3, foi $\chi^2 = 17,55$.

A queda dos percentuais de reagentes positivos revelou-se estatisticamente significativa à medida que aumentava o tempo após a infecção (GRAF. 1).

TABELA I - Frequência de anticorpos anti-VIA segundo a idade, em bovinos livres de febre aftosa e vacinados quadrimestralmente. Grupo 2, Lagoa da Prata, MG. 1980

Idade (meses)	Animais examinados	VIA			
		Positivo	%	Negativo	%
0 → 4	80	-	-	80	100,00
5 → 12	4	-	-	4	100,00
13 → 24	31	10	32,3	21	67,7
> 24	374	87	23,3	287	76,7
S/especif.	72	13	18,1	59	81,9
TOTAL	561	110	19,6	451	80,4

TABELA II - Título final de 30 bovinos positivos ao VIA, de rebanho livre de febre aftosa e vacinados quadrimestralmente, amostrados de animais do grupo 2, Lagoa da Prata, MG. 1980

Titulo	Positivo	Fracamente positivo	Negativo
S/diluir	1	29	-
1:2	-	17	13
1:4	-	3	27
1:8	-	1	29
1:16	-	-	30

TABELA III - Título final dos 14 bovinos positivos ao antígeno VIA, dois meses após surto de febre aftosa. Grupo 3.1., Esmeraldas, MG. 1980

Título	Positivo	Fracamente positivo	Negativo
S/diluir	7	7	-
1:2	5	8	1
1:4	3	6	5
1:8	2	3	9
1:16	-	-	14

TABELA IV - Frequência de anticorpos anti-VIA segundo a idade, em bovinos seis meses após surto de febre aftosa. Grupo 3.2., Carlos Chagas, MG. 1980

Idade (meses)	Animais estudados	VIA			
		Positivo	%	Negativo	%
4 - 12	10	10	100,0	-	-
13 - 24	14	14	100,0	-	-
> 24	35	27	77,1	8	22,9
TOTAL	59	51	86,4	8	13,6

TABELA V - Título final dos 51 bovinos positivos ao VIA seis meses após surto de febre aftosa. Grupo 3.2., Carlos Chagas, MG. 1980

Título	Positivo	Fracamente positivo	Negativo
S/diluir	30	21	-
1:2	5	27	19
1:4	1	13	37
1:8	-	2	49
1:16	-	-	51

TABELA VI - Frequência de anticorpos anti-VIA segundo a idade, em bovinos 12 meses após surto de febre aftosa. Grupo 3.3., Varginha, MG. 1980

Idade (anos)	Nº animais estudados	VIA			
		Positivo	%	Negativo	%
5	10	6	60,0	4	40,0
6	9	5	55,6	4	44,4
7	6	2	33,3	4	66,7
8	3	2	66,7	1	33,3
9	1	-	-	1	100,0
10	1	-	-	1	100,0
TOTAL	30	15	50,0	15	50,0

TABELA VII - Título final dos 15 bovinos positivos ao VIA, 12 meses após surto de febre aftosa. Grupo 3.3., Varginha, MG. 1980

Título	Positivo	Fracamente positivo	Negativo
S/diluir	2	13	-
1:2	1	7	7
1:4	-	2	13
1:8	-	1	14
1:16	-	-	15

TABELA VIII - Limites de confiança, de acordo com os grupos estudados. Minas Gerais, 1980

Grupos	Animais estudados	VIA		Limites de confiança
		Positivo	%	
1	343	-	-	-
2	561	110	19,6	(16,31-22,89)
3 - 3.1.	15	14	93,3	(80,64-100,0)
3.2.	59	51	86,4	(77,66-95,14)
3.3.	30	15	50,0	(32,1 - 67,9)

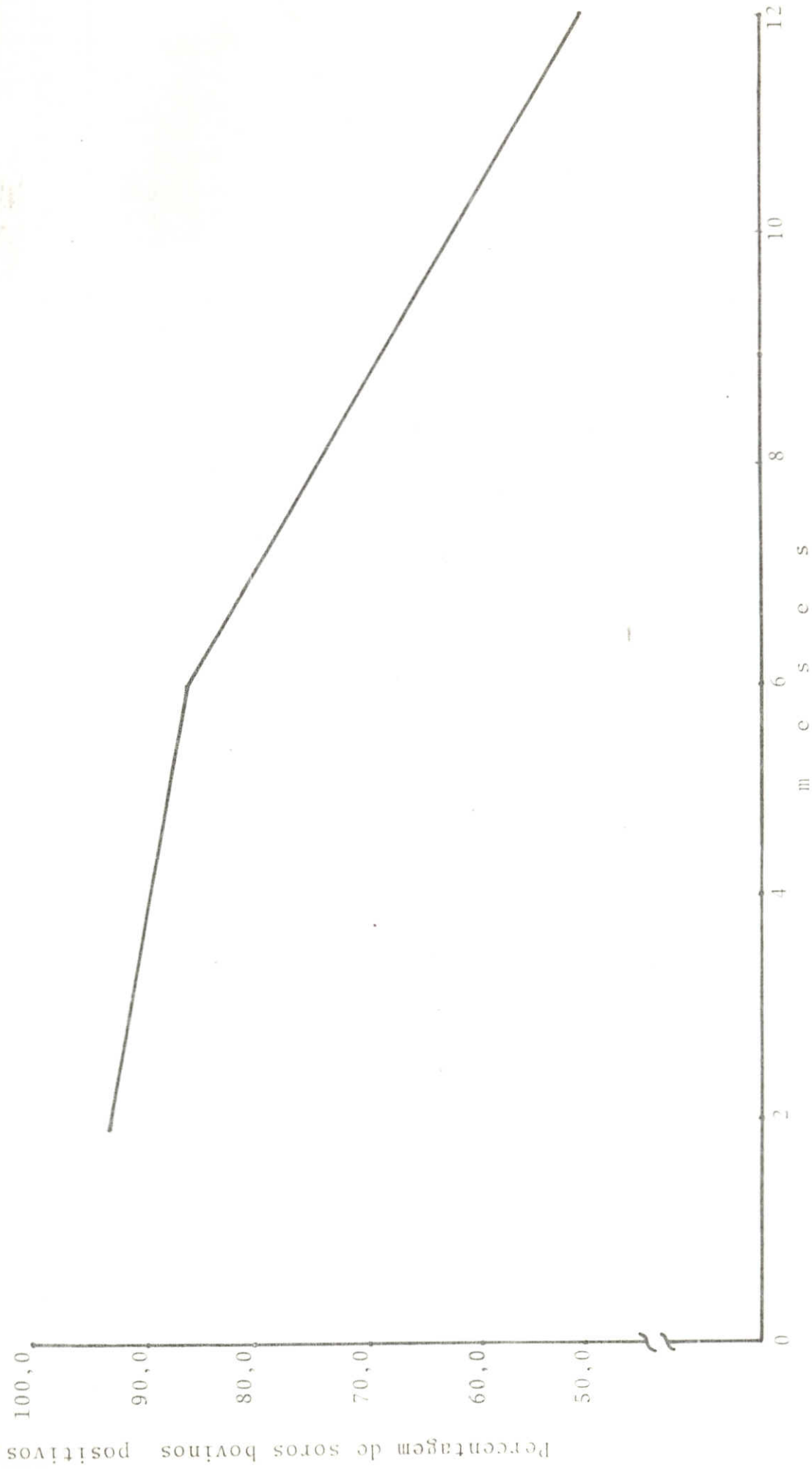


GRÁFICO 1 - Percentagem de bovinos positivos ao VIA, 2 a 12 meses após a infecção. Minas Gerais, 1980

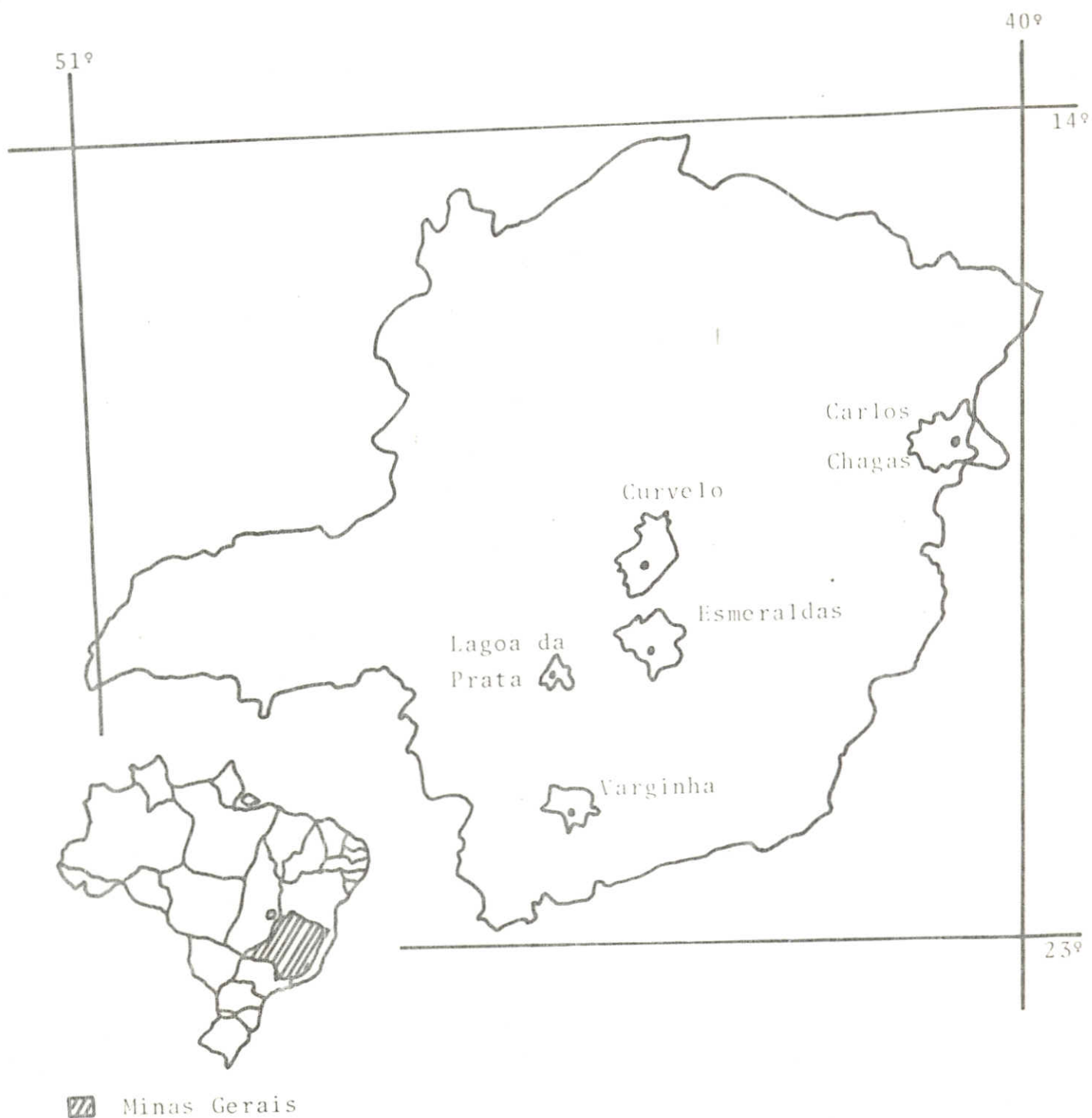


FIGURA 1 - Localização dos municípios de origem dos bovinos pesquisados em Minas Gerais, 1980.

5. DISCUSSÃO

5.1. Bovinos não vacinados contra febre aftosa, oriundos do rebanho livre

Todos os 332 bovinos examinados neste grupo, pela dupla imunodifusão em ágar-gel (DDA), apresentaram-se negativos ao antígeno VIA, indicando não haver atividade viral na propriedade. Este resultado torna-se mais significativo através da amostragem dos 16 soros testados pela soro-neutralização, que apresentaram-se negativos ao teste. Sugere tal resultado, que o rebanho estudado não possuía contato com o agente da febre aftosa há alguns meses e à época de experimento, quer seja por infecção aparente, inaparente ou por imunização, mostrando ser o rebanho altamente sensível ao vírus e estando sujeito ao risco de uma epidemia grave da doença.

Resultados semelhantes foram obtidos em regiões da América Central pelo CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA (1976, 1977, 1978) e por QUINTARD (1978) na XII Região do Chile. Os autores consultados são unânimes ao demonstrarem ausência completa de reagentes ao VIA em áreas livres.

Da mesma forma que não se vacina nos países livres de febre aftosa, sugerem os achados a necessidade de se obter uma metodologia mais adequada para proteção das áreas

livres nos países onde a doença é endêmica. Como inexistente o agente da doença nestas regiões, medidas sanitárias como a vigilância epidemiológica e a proibição da entrada de animais susceptíveis oriundos de áreas afetadas, devem ser adotadas profilaticamente. Isto está de acordo com ROSEMBERG (1977), que completa o exposto afirmando que em caso de ocorrência de surto, a erradicação será obtida por sacrifício ou por sua combinação com vacinação e quarentenas regionais.

5.2. Bovinos de rebanho livre de febre aftosa vacinados quadrimestralmente

Observou-se neste grupo, a existência de 19,6% de bovinos reagentes ao VIA pela DDA. A observação dos resultados distribuídos pela faixa etária dos animais (TAB. 1) mostrou a inexistência de reagentes ao antígeno VIA em 84 animais menores de 12 meses, dos quais quatro eram primovacinações e o restante nunca foi vacinado contra febre aftosa.

Estes fatos sugerem que as vacinas, de alguma forma, são estímulo suficientemente fortes para desencadear respostas anti-VIA, estando de acordo com QUINTARD & PAREDES (1978). Este fato tem sido explicado através de duas hipóteses:

- 1a.) alguns autores sugerem a ocorrência de infecção subclínica no rebanho pelo vírus da febre aftosa, introduzido através da vacina contendo vírus incompletamente inativado. A sua multiplicação provocaria resposta ao antígeno VIA sem manifestação clínica, pela rápida ação dos anticorpos do hospedeiro. Hipótese defendida por MC VICAR & SUTMOLLER (1970); ALONSO et alii (1975); LOBO et alii (1977); DAWE & PINTO (1978);
- 2a.) é dada pela presença do antígeno VIA em fluidos de cultura de tecido infectado. Estes fluidos são utilizados

na produção de vacinas anti-aftosa acreditando os autores, que haja a presença do antígeno VIA em quantidade suficiente nas vacinas para estimular a formação de anticorpos quando inoculada nos animais. Hipótese de COWAN & GRAVES (1966); MC VICAR & SUTMOLLER (1970); DAWE PINTO (1978) e PINTO & GARLAND (1979).

Pelos resultados observados na presente pesquisa e das teorias anteriormente expostas, pode-se inferir que, provavelmente, a reação positiva ao VIA, em bovinos vacinados, seja consequência tanto da presença de vírus ativo ou do próprio antígeno VIA na suspensão celular da vacina ou pela simultaneidade de ambos.

Foram observados baixos títulos nos bovinos regularmente vacinados e sem histórico da doença, sendo encontrado somente um animal positivo ao VIA a uma diluição 1:8 (TAB. II). A percentagem de reagentes observada neste grupo (19,6%), não difere significativamente dos valores encontrados por outros autores (ALONSO et alii, 1975; DAWE & PINTO 1978; QUINTARD & PAREDES, 1978; PINTO & GARLAND, 1979; CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA, 1980). As diferenças são explicadas em função de algumas variáveis, que, segundo o CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA (1980), aumentariam a possibilidade de animais vacinados apresentarem-se positivos ao VIA, que são: o número de vacinações que, segundo PINTO & GARLAND (1979), é o mais importante (animais que receberam maior número de vacinação anti-aftosa, possuem maior possibilidade de serem reagentes ao VIA), menor intervalo entre vacinações e o uso do formol como inativante. O número de reagentes diminui de forma bastante acentuada entre 30 e 60 dias pós-vacinação.

Resultados que contrariam os observados até aqui foram encontrados por LOBO et alii (1974, 1976), que afirmam que vacinas formoladas e adsorvidas em hidróxido de alumínio não influenciam no desenvolvimento de anticorpos contra o antígeno VIA

5.3. Bovinos convalescentes de febre aftosa, oriundos de rebanhos com histórico recente da doença

Nota-se que os resultados obtidos neste grupo não diferem significativamente dos trabalhos de outros pesquisadores. Pelos resultados obtidos nos sub-grupos, nota-se que ocorre queda acentuada dos percentuais de positividade, havendo, em contrapartida, um acréscimo no tempo ocorrido após a infecção (GRAF. 1). Isto sugere que os anticorpos contra o antígeno VIA, formados a partir de imunização ativa natural, diminuem ao longo do tempo pós-infecção, fato também mencionado por LOBO (1976).

A persistência de anticorpos contra o VIA em animais convalescentes foi também encontrada por ALONSO et alii (1975), 17 meses após infecção em 41,6% dos animais submetidos à prova. Por outro lado, é desconhecido o efeito de vacinações repetidas sobre a persistência dos anticorpos em animais previamente infectados.

Observou-se, entre os bovinos convalescentes de febre aftosa, dois meses após a doença, uma elevada porcentagem de animais reagentes (93,3%) ao antígeno VIA. Esta taxa apresenta-se como indicador seguro da difusão da doença na propriedade. Este fato também foi observado por LOBO et alii (1974, 1976); ALONSO et alii (1975) e CENTRO PAN-AMERICANO DE FIEBRE AFTOSA (1980).

Foram observados títulos mais elevados em bovinos dois meses após o surto de febre aftosa (cinco animais reagiram positivamente ao VIA, à diluição 1:8) (TAB. III), do que em animais regularmente vacinados sem histórico da doença (apenas dois positivos à mesma diluição). Isto sugere a existência de títulos mais elevados em animais que sofreram febre aftosa do que nos animais somente vacinados.

A frequência de 86,4%, observada entre os bovinos convalescentes de febre aftosa seis meses após a doen-

ça, é mais elevada do que a encontrada por LOBO et alii (1976), que poderá ser explicada pelo fato dos animais pesquisados neste trabalho haverem-se infectado em condições de campo, provavelmente com tipo de vírus diferente em relação à antigenicidade, sem nenhum controle posterior da atividade viral, quer seja através de manifestações clínicas ou subclínicas da enfermidade, enquanto os animais estudados por LOBO et alii (1976) foram acompanhados clinicamente durante o experimento.

Somente 50% dos bovinos, 12 meses após a doença, foram positivos ao VIA. Este resultado não mostra diferença significativa com os achados de LOBO et alii (1976). Comparativamente aos resultados anteriores, nota-se o decréscimo de reagentes em animais convalescentes ao longo do tempo (GRAF. 1). Tal fato certamente está ligado ao período de sobrevivência do anticorpo anti-VIA nos animais.

O CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA (1980) afirma que quase todos os animais infectados pelo vírus da febre aftosa desenvolvem anticorpos anti-VIA detectáveis pela DDA por um período mínimo de seis meses, frequentemente até mais de um ano e ocasionalmente acima de dois anos. Assim, o decréscimo de reagentes, em bovinos convalescentes ao longo do tempo, conforme se observa no GRAF. 1, está ligado ao período de sobrevivência de anticorpo anti-VIA nos animais.

6. CONCLUSÕES

Utilizando os dados obtidos e nas condições em que foi realizado este trabalho, concluiu-se que:

1) bovinos de propriedades livres da ocorrência clínica e sem vacinação contra febre aftosa, não são reagentes ao antígeno VIA e à soro-neutralização;

2) vacinas anti-aftosa comercializadas no Brasil podem induzir à formação de anticorpos anti-VIA. Esta resposta é, geralmente, transitória e de baixo título;

3) a prova do VIA é de difícil interpretação. A diferenciação entre positivos convalescentes de febre aftosa e vacinados exige informações sobre histórico de vacinação e ocorrência ou não da doença clínica;

4) à medida que se aumenta o tempo pós-infecção, ocorre diminuição do número de reagentes positivos ao VIA;

5) a prova do VIA poderá ser de grande valor para realização de inquéritos epidemiológicos em áreas livres ou em final de programa de erradicação, devendo, entretanto, sempre ser acompanhada de informações sobre a ocorrência de casos da doença.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALONSO, F.A.; AUGÉ DE MELLO, P.; GOMES, I.; ROSEMBERG, F.J. El uso del antígeno asociado a la infección viral (VIA) en la detección de ganado expuesto al virus de la fiebre aftosa. Bol. Cent. Panam. Fiebre Aftosa, Rio de Janeiro, 17-18:17-22, 1975.
2. ALONSO, F.A. & SONDHAL, M.S. Preparación y concentración de los antígenos 140S, 12S y VIA del virus de la fiebre aftosa. Bol. Cent. Panam. Fiebre Aftosa, Rio de Janeiro, 17-18:1-8, 1975.
3. CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA, Rio de Janeiro. El uso de las pruebas del antígeno asociado a la infección por virus (VIA) de la fiebre aftosa. Rio de Janeiro, 1980. 34p. (Serie de monografías científicas y técnicas, 16).
4. CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA, LABORATORIO DE DIAGNOSTICO Y REFERENCIA PARA LAS AMERICAS. Informes Anuales, 1976, 1977 y 1978 apud CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA, Rio de Janeiro. El uso de las pruebas del antígeno Asociado a la Infección por Virus (VIA) de la fiebre aftosa. Rio de Janeiro, 1980. 34 p. (Serie de Monografías Científicas y Técnicas, 6).
5. CENTRO PANAMERICANO DE ZONOSIS, Ramos Mejia. Procedi-

- mientos para estudios de prevalencia por muestreo.
Ramos Mejia, Buenos Aires, 1979. 35p. (Nota Tecnica, 18. Rev. 1).
6. COWAN, K.M. & GRAVES, J.H. A third antigenic component associated with foot-and-mouth disease infection. Virology, Baltimore, 30(3):528-40, 1966.
 7. DAWE, P.S. & PINTO, A.A. Antibody responses to type-specific and "virus-infection-associated" antigens in cattle vaccinated with polyvalent foot-and-mouth disease virus in North Malawi. Br. Vet. J., London, 134(5):504-11, 1978.
 8. LOBO, C.A. Importancia de los portadores del virus de la fiebre aftosa. I.C.A. Temas Didaticos, Bogotá, 4 (1/2):5-10, 1976.
 9. LOBO, C.A.; ARBELAEZ, R.G.; RESTREPO, S.C.; RESTREPO, A.J.G. Prevalencia de anticorpos VIA en bovinos del Norte del Choco, Colombia, 1975. Bol. Cent. Panam. Fiebre Aftosa, Rio de Janeiro, 26:31-5, 1977.
 10. LOBO, C.A.; GUTIERREZ, A.; MARINO, J.O.C. Evaluation d'anticorps induits par infection par le virus de la Fièvre Aphteuse. Bull. Off. Int. Epiz., Paris, 81(3-4):287-303, 1974.
 11. LOBO, C.A.; HANSON, R.P.; GUTIERREZ, A.; BELTRAN, L.E. Sorological detection of natural foot-and-mouth disease infection in cattle and pigs. Bull. Off. Int. Epiz., Paris, 35(11-12):1075-104, 1976.
 12. MC VICAR, J.W. & SUTMOLLER, P. Foot-and-mouth disease: the agar gel diffusion precipitin test for antibody to Virus Infection-Associated (VIA) antigen as a tool for epizootiologic surveys. Am. J. Epidemiol., Baltimore, 92(4):273-8, 1970.
 13. PINTO, A.A. & GARLAND, A.J.M. Immune response to Virus Infection-Associated (VIA) antigen in cattle repeatedly vaccinated with food-and-mouth disease virus inactivated by formalin or acetyleneimine. J. Hyg., London, 82:41-50, 1979.

14. QUINTARD, C.S. Estudio de prevalencia de bovinos reaccionantes al antígeno VIA en un área libre de fiebre aftosa, la XII región de Chile. Bol. SAG, Santiago, 22:16-21, 1978.
15. QUINTARD, C.S. & PAREDES, B.A. Estudio de prevalencia de reactores al antígeno VIA en bovinos de la región X de Chile. Bol. SAG, Santiago, 22:1-15, 1978.
16. ROSEMBERG, F.J.; ASTUDILLO, V.M.; GOIC, R. Estrategias regionales para el control de la fiebre aftosa: un enfoque ecológico. In: CONGRESO CIENTIFICO INTERNACIONAL DE LA ASOCIACION EPIDEMIOLOGICA INTERNACIONAL, 8º, Puerto Rico, 1977 (Trabajo presentado).
17. SNEDECOR, G.W. & COCHRAN, W.G. Métodos estadísticos. Mexico, DF, Continental, 1971. 703p.