

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

ESCOLA DE VETERINÁRIA

Programa de Pós-graduação em Ciência Animal

***Vaccinia virus*: PADRONIZAÇÃO DE TÉCNICA
PARA IMUNODIAGNÓSTICO E ESTUDO DA
RESPOSTA IMUNE HUMORAL DE BOVINOS**

Ana Carolina Diniz Matos

Belo Horizonte

2012

Ana Carolina Diniz Matos

***Vaccinia virus*: PADRONIZAÇÃO DE TÉCNICA PARA
IMUNODIAGNÓSTICO E ESTUDO DA RESPOSTA IMUNE
HUMORAL DE BOVINOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do grau de mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Prof^ª Dra. Zélia Inês Portela Lobato

Belo Horizonte

Escola de Veterinária - UFMG

2012

M433v Matos, Ana Carolina Diniz, 1986-
Vaccinia virus: padronização de técnica para imunodiagnóstico e estudo da resposta imune humoral de bovinos / Ana Carolina Diniz Matos. – 2012.

68p. : il.

Orientadora: Zélia Inês Portela Lobato

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.

Inclui bibliografia

1. Bovino – Doenças – Teses.
2. Vaccinia – Teses.
3. Anticorpos – Teses.
4. Poxvírus – Teses. I. Lobato, Zélia Inês Portela. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.208 969

Dissertação defendida e aprovada em 02 de agosto de 2012, pela Comissão Examinadora constituída por:



Prof.^a. Zélia Inês Portela Lobato
Presidente - Orientadora



Dra. Fernanda Nobre Amaral Viani
René Rachou - FIOCRUZ



Prof. Andrey Pereira Lage
Escola de Veterinária - UFMG

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Antônio e Vânia, muito obrigada por me apoiarem e incentivarem o meu estudo e trabalho. Obrigada pelo apoio e confiança de sempre.

A minha irmã Ju, muito obrigada pelo apoio, amor e carinho!!!

Ao Diego, pelo grande apoio, amor e paciência. Não é fácil lidar com o meu estresse...

Aos meus amigos e minha família – meus avós, tios, primos - que sempre estão ao meu lado dando força em tudo que faço.

A minha orientadora Professora Zélia, por ter me recebido de braços abertos no laboratório, e ter me ensinado o prazer da pesquisa, desde a iniciação científica, e hoje já nos passos concretos de uma cientista, muito obrigada pelos ensinamentos através das descobertas e eternos questionamentos que sempre nos levam a novas pesquisas.

A Bel, por toda sua disposição, ensinamentos, conhecimentos e grandes auxílios. Um grande exemplo para mim!

A Pri Gerber, agradeço de coração! Exemplo de determinação, disciplina e inteligência! Pri, muito obrigada! Você não imagina como aprendi com você!!!

A Grazi, por toda sua colaboração no lab! Pelos nossos momentos na lavagem, pipetando milhões de amostras, nossas conversas e desabafos! Muito obrigada!

A Iza agradeço a amizade e o companheirismo, nossas aventuras jamais serão esquecidas!!! Obrigada, Rehfeld!!!

Ao prof. Marcos Bryan, pelas conversas, ideias, ensinamentos, puxões de orelha e brincadeiras...

Ao Prof. Marcos Xavier, pela paciência e grande ajuda nas análises estatísticas do trabalho.

A Dra. Marieta e ao IMA, pela colaboração e a disponibilidade para acesso ao material sorológico dos animais monitorados em surtos de Vaccinia bovina e as informações epidemiológicas das regiões.

Aos companheiros de coletas matinais e de finais de semana em PL city: Bel, Iza, Tércia, Anselmo e Luis, e também aos que ajudaram muito nas preparações do experimento; Fabinha, Alê, Pri... A limpeza das baias não é moleza não!!

Ao Seu Zé, que me ajudou muito a superar os medos e a encarar a Pinta Silva e a Roxinha. Que me ajudou a coletar amostras de bezerro nas noites frias de Pedro Leopoldo... Ao Seu Zé, e Seu Geraldo que nas manhãs de sábado e domingo seguravam a barra e as vacas para mim!

*A Amandinha, pelas gargalhadas gostosas de ouvir e as brincadeiras de sempre! Te admiro,
Mandinha!!!*

*A Alê, que aos poucos fomos aproximando, e descobrimos muitas conversas, bombons,
brincadeiras e força, né!?*

*Ao Eduardo, a Lucia, a Doris, Gra, Grazi e todos os técnicos e funcionários do Departamento
de Medicina Veterinária Preventiva, que estão sempre dispostos a nos ajudar.*

*As minhas amigas da vet, Isabela e Ingrid, pelos momentos de descontração e gargalhadas nos
nossos curtos horários de almoço, e também por compartilharem os desabafos sobre
experimento, disciplinas, desesperos...*

*As meninas de PL, Gabi, Flavinha, Lu... por tornarem mais tranquila a nossa viagem diária...
Com casos, brincadeiras e trocas de experiências...*

*Aos meus companheiros do laboratório, e aos colegas do corredor, que sempre me acudiram
com o material que acabou, com aquele reagente que só vai chegar no mês que vem, e claro
com a chave do lab que esqueci....*

*Ao CNPq, pela bolsa de mestrado e também pelo apoio financeiro do projeto. Obrigada
também a CAPES e a FAPEMIG pelo apoio financeiro a pesquisa.*

E o meu imenso agradecimento, respeito e admiração aos animais...

E a Deus agradeço sempre por me iluminar e proporcionar momentos e conquistas como esta.

“Quando penso que alcancei o meu limite, vejo que sou capaz de ir muito mais longe”

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	11
LISTA DE QUADROS	11
LISTA DE ANEXOS	11
LISTA DE ABREVIATURAS	12
RESUMO	14
ABSTRACT	14
1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1. Classificação	16
2.2. Morfologia	17
2.3. Ciclo de Multiplicação	18
2.4. Patogênese	19
2.5. Resposta Imune contra OPXVs	21
2.6. Vaccinia bovina	24
2.7. A Vaccinia bovina no Brasil	25
3. OBJETIVO GERAL	27
3.1. Objetivos Específicos	27
CAPÍTULO I – Validação da técnica de imunoperoxidase em monocamada celular para titulação IgG total anti-Vaccinia virus	28
1. JUSTIFICATIVA	28
2. OBJETIVO	28
3. MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1. Local de realização do experimento	29
3.2. Cultivo Celular	29
3.3. Amostra viral	29
3.3.1. Multiplicação da amostra VACV-WR	29
3.3.2. Purificação viral	29
3.3.3. Titulação viral	30
3.4. Padronização da técnica de IPMC	30
3.5. Validação da técnica de IPMC.....	31
3.5.1. Amostras de soro.....	31
3.5.2. Soroneutralização por redução do número de placas	32
3.5.3. Imunoperoxidase em monocamada celular	32
3.5.4. Análise Estatística	33
4. RESULTADOS	33
4.1. Titulação viral	33
4.2. Padronização da técnica de IPMC	33
4.3. Validação da técnica de IPMC.....	34
5. DISCUSSÃO	36
6. CONCLUSÃO	37
CAPÍTULO II – Resposta imune humoral contra o Vaccinia vírus em bovinos naturalmente infectados	38
1. JUSTIFICATIVA	38

2. OBJETIVO	38
3. MATERIAL E MÉTODOS	38
3.1. Amostras de soro bovino	38
3.1.1. Perfil da resposta imune humoral de vacas naturalmente infectadas com VACV	39
3.1.2. Perfil da resposta imune humoral de bezerros, filhos de vacas doentes, naturalmente infectadas com VACV	40
3.2. Imunoperoxidase em monocamada celular	40
3.3. Soroneutralização por redução do número de placas	40
3.4. Análise Estatística	40
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1. Perfil da resposta imune humoral de vacas naturalmente infectadas com VACV	41
4.2. Perfil da resposta imune humoral de bezerros, filhos de vacas doentes, naturalmente infectadas com VACV	46
5. CONCLUSÃO	47
CAPÍTULO III – Resposta imune humoral contra o Vaccinia vírus em vacas lactantes experimentalmente infectadas	48
1. JUSTIFICATIVA	48
2. OBJETIVO	48
3. MATERIAL E MÉTODOS	48
3.1. Locais dos experimentos	48
3.1.1. Instalações e manutenção dos animais	48
3.2. Seleção dos animais	49
3.3. Delineamento do experimento	49
3.3.1. Infecção inicial	50
3.3.2. Imunossupresão	50
3.3.3. Reinfecção	50
3.4. Coleta das amostras	50
3.5. Imunoperoxidase em monocamada celular (IPMC)	50
3.5.1. IPMC para detecção de IgG1 e IgG2	51
3.6. Soroneutralização por redução do número de placas	51
3.7. Análise Estatística	51
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
4.1. Infecção Inicial	51
4.2. Imunossupresão	55
4.3. Reinfecção	57
5. CONCLUSÃO	60
CONSIDERAÇÕES FINAIS	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1 Morfologia e estrutura dos poxvírus. (A) Eletromicroscopia de um *Orthopoxvirus*, apresentando os túbulos de superfície. (B) Eletromicroscopia de transmissão de uma partícula viral madura (MV) de VACV, com indicações no cerne (C), corpúsculos laterais (L) e membrana externa (E). (C) Representação esquemática de um *Orthopoxvirus*, partícula viral envelopada (EV). Fontes: Moss, 2007; Murphy et al.(1999); Flores, 2007 18

Figura 2 Esquema do ciclo de replicação dos poxvírus. Fonte: Kroon e colaboradores (2011) - adaptado por Rivetti Jr., 2012. 19

Figura 3 Lesões observadas na VB. (A) Lesões na mão de um ordenhador. (B) Lesões ulcerativas nos tetos de uma vaca em lactação. (C) Lesões ulcerativas, evoluindo para crostas no focinho de um bezerro lactente. Fonte: Madureira, 2009; Leite et al., 2005. 24

Figura 4 Estados brasileiros com diagnóstico de surtos de *Vaccinia bovina*, com acometimento de bovinos e humanos durante o período de 1999 a 2011. 26

CAPÍTULO I – Validação de uma técnica de imunoperoxidase em monocamada celular para titulação IgG total anti-*Vaccinia virus*

Figura 5 Média da resposta de anticorpos contra o VACV em quarto vacas naturalmente infectadas determinada pelas técnicas de IPMC e PRNT, de amostras coletadas a partir de 15 dias (15 d) até 13 meses (13m) do início do surto de VACV em suas propriedades. Barras verticais indicam o erro padrão. 35

CAPÍTULO II – Resposta imune humoral contra o *Vaccinia vírus* em bovinos naturalmente infectados

Figura 6 No eixo vertical da esquerda observa-se a distribuição, em porcentagem, dos títulos de IgG total anti-VACV (negativo, <20; baixos, entre 20 e 180 e altos, >540) das vacas em lactação, com lesão de propriedades com surtos de VB, monitoradas por até 15 meses. O eixo vertical da direita mostra a média de IgG total anti-VACV, expresso em log₂, dos mesmos animais – (20= 4,32; 60= 5,90; 180= 7,49; 540= 9,07; 1620= 10,66 e 4860= 12,24). Barras verticais indicam o erro padrão da média. Os tempos indicados com * representam diferença estatística em relação a média de IgG total observada no primeiro mês (p< 0,05). 42

Figura 7 Média de IgG total anti-VACV, em log₂, (20= 4,32; 60= 5,90; 180= 7,49; 540= 9,07; 1620= 10,66 e 4860= 12,24) de vacas naturalmente infectadas, por propriedade (48, 49, 46, 47, 40, 59) com surto de VB. 43

Figura 8 No eixo vertical da esquerda observa-se a distribuição, em porcentagem, das amostras negativas (< 20) e positivas (≥20) para detecção de anticorpos neutralizantes, de dez vacas doentes, em lactação, de propriedades com surtos de VB, monitoradas por até 14 meses após o início do surto. O eixo vertical da direita mostra a média de IgG total anti-VACV, em log₂, dos mesmos animais – (20= 4,32; 60= 5,90; 180= 7,49; 540= 9,07; 1620= 10,66 e 4860= 12,24). Barras verticais indicam o erro padrão da média. .. 45

Figura 9 No eixo vertical da esquerda observa-se a distribuição, em porcentagem, dos títulos de IgG total anti-VACV (negativo, <20; baixos, entre 20 e 180 e altos, >540) de bezerros, filhos de vacas com lesão característica de VB nos tetos, das propriedades com surtos de VB selecionadas (48, 49, 46, 47, 40 e 59),

monitoradas por até 15 meses. O eixo vertical da direita mostra a média de IgG total anti-VACV, expresso em \log_2 , dos mesmos animais – (20= 4,32; 60= 5,90; 180= 7,49; 540= 9,07; 1620= 10,66 e 4860= 12,24). Barras verticais indicam o erro padrão da média. Os tempos indicados com * representam diferença estatística em relação a média de IgG total observada no primeiro mês ($p < 0,05$). 46

CAPÍTULO III – Resposta imune humoral contra o Vaccinia vírus em vacas lactantes experimentalmente infectadas

Figura 10 Local de alojamento dos animais durante o experimento no LANAGRO (A) visão externa das baias; (B) visão interna do corredor que dá acesso às baias; (C) visão interna de uma das baias. 49

Figura 11 Delineamento experimental com infecção inicial, tratamento imunossupressor e reinfecção de vacas lactantes com VACV-GP2. *Dx: Dexametasona, Tr: Tempo após reinfecção. 50

Figura 12 Inoculação e evolução das lesões nos tetos das vacas lactantes experimentalmente inoculadas com VACV-GP2. (A) Escarificação e inoculação do VACV GP2 no teto; (B) Vesícula e pápula (4º d.p.i.); (C) Úlcera e crosta (8º d.p.i). 52

Figura 13 Média de IgG total anti-VACV das oito vacas experimentalmente inoculadas com VACV-GP2, e acompanhadas até o 60º d.p.i. As barras verticais indicam o erro padrão da média. Os tempos indicados com (*) representam diferença estatística em relação à média observada no dia 0. 52

Figura 14 Título de AN anti-VACV, do dia 0 até o 60º d.p.i, das oito vacas inoculadas experimentalmente inoculadas com o VACV-GP2. Cada vaca está representada por um símbolo. Linha pontilhada demonstra a média de AN anti-VACV ao longo do período estudado. 53

Figura 15 Título médio de IgG1 e IgG2 anti-VACV, do dia 0 até o 60º d.p.i, de vacas experimentalmente inoculadas com o VACV-GP2. Barras verticais indicam o erro padrão da média. Letras diferentes (a,b) indicam diferença estatística entre os grupos IgG1 e IgG2. Os tempos indicados com (*) representam diferença estatística em relação à média observada no dia 0 para cada grupo. 54

Figura 16 No eixo vertical da esquerda observa-se o título de IgG total, expresso em \log_2 das quatro vacas (14, 22, 25 e 58) inoculadas e imunossuprimidas com dexametasona. O eixo vertical da direita mostra o título de AN das mesmas vacas. Estão representados no gráfico os tempos: -30 d.p.im (40º d.p.i), -10 d.p.im (60 d.p.i), 0 d.p.im (69 d.p.i), 4 d.p.im (73º d.p.i) e o 12 d.p.im (81º d.p.i). Linha cheia indica a média de AN anti-VACV, linha pontilhada indica a média de IgG total anti-VACV. 56

Figura 17 Lesões observadas nos tetos das vacas experimentalmente re-infectadas com VACV-GP2. Lesões nos tetos da vaca 6, do grupo I no 4º d.p.r (A) e 10º d.p.r (B); lesões observadas na vaca 62, do grupo II no 4º d.p.r (C) e 8º d.p.r (D). 57

Figura 18 Título de IgG total e AN anti-VACV das vacas re-inoculadas com VACV-GP2, expressos em \log_2 . No gráfico (A) estão representadas as duas vacas do grupo I, no gráfico (B) as três vacas do grupo II. Círculos pretos mostram o título de IgG total, e círculos sem preenchimento mostram os títulos de NA. As médias de IgG ao longo do período estudado estão representadas por linhas cheias, as linhas pontilhadas representam a média de NA. 58

Figura 19 Título de IgG1 e IgG2 anti-VACV das vacas re-inoculadas com VACV-GP2, expressos em \log_2 . No gráfico (A) estão representadas as duas vacas do grupo I, no gráfico (B) as três vacas do grupo II. Quadrados pretos mostram o título de IgG1, e quadrados sem preenchimento mostram os títulos de IgG2.

As médias de IgG1 ao longo do período estudado estão representadas por linhas cheias, as linhas pontilhadas representam a média de IgG2. 59

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1 Classificação dos vírus da família Poxviridae, subfamília Chordopoxvirinae, e os seus principais representantes. 17

CAPÍTULO I – Validação de uma técnica de imunoperoxidase em monocamada celular para titulação IgG total anti-*Vaccinia virus*

Tabela 2 Comparação dos resultados obtidos pelas técnicas executadas (IPMC e PRNT) nas 148 amostras de soro bovino de campo. 34

Tabela 3 Parâmetros de validação e repetibilidade (95% de intervalo de confiança) para os IgG total detectados pela técnica de IPMC. 35

CAPÍTULO II – Resposta imune humoral contra o *Vaccinia virus* em bovinos naturalmente infectados

Tabela 4 Número de amostras de vacas doentes, coletadas, em cada propriedade com surto de VB, ao longo do tempo. 39

Tabela 5 Número de amostras coletadas de bezerros, filhos de vacas doentes, em cada propriedade com surto de VB, ao longo do tempo. 40

LISTA DE QUADROS

REVISÃO DE LITERATURA

Quadro 1 Amostras de VACV isoladas no Brasil entre os períodos de 1963 a 2005 e seus respectivos hospedeiros. 26

LISTA DE ANEXOS

ANEXO I Artigo publicado: Gerber, P.F, Matos, A.C.D, Guedes, M.I.M.C., Madureira, M.C., Silva, M.X., Lobato, Z.I.P. Validation of an immunoperoxidase monolayer assay for total anti-*Vaccinia virus* antibody titration. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, v.24, p.355-358, 2012.

LISTA DE ABREVIATURAS

μL – Microlitro
ADCC – citotoxicidade mediada por anticorpos
AN – anticorpos neutralizantes
ARAV – Vírus Araçatuba
ATCC – American Type Cell Collection
BAV – Vírus BeAN 58058
EV – Partícula viral envelopada
CPXV – *Cowpox virus*
CTGV – Cantagalo vírus
d.p.i. – dias pós inoculação
d.p.im – dias pós imunossupressão
d.p.r. – dias pós reinfecção
DNA - ácido desoxirribonucléico
DX - Dexametasona
ECTV – Ectromelia virus
ECP – Efeito citopático
EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético
GP1 – Vírus Guarani P1
GP2 – Vírus Guarani P2
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICB – Instituto de Ciências Biológicas
ICTV – International Committee on Taxonomy of Viruses
Ig – Imunoglobulina
IL - Interleucina
LB – Linfócito B
LT – Linfócito T
IMA – Instituto Mineiro Agropecuário
MV – Partícula viral madura
IPMC – Imunoperoxidase em monocamada celular
ITRs – Regiões terminais invertidas
LANAGRO – Laboratório Nacional Agropecuário
MARV – Mariana vírus

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MEM – Meio mínimo essencial
MHC – Complexo Principal de Histocompatibilidade
mL – Mililitro
MPXV – *Monkeypox virus*
MURV – Muriaé virus
nm – nanômetro
O – oeste
OMS – Organização Mundial de Saúde
OPXV – *Orthopoxvirus*
p.i. – pós inoculação
PV1 – Pelotas Vírus 1
PV2 – Pelotas Vírus 2
PB – Proteína Bruta
PBS – Tampão salina fosfato
PCR - Reação em cadeia da polimerase
PSTV – Vírus Passatempo
PV – peso vivo
RI – reinfestado
RNAm - ácido ribonucleico mensageiro
r.p.m. – Rotações por minuto
S – Sul
SAV – SPAN 232 vírus
PRNT – Soroneutralização por redução do número de placas
UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais
UFP/mL – Unidades formadoras de placa / mililitro
VACV - *Vaccinia virus*
VACV-GP2 – *Vaccinia virus* amostra Guarani P2
VACV-WR -*Vaccinia virus* amostra Western Reserve
VARV – *Variola vírus*
VB – *Vaccinia Bovina*
VBH – Vírus Belo Horizonte
VCM – volume corpuscular médio

RESUMO

Este trabalho teve como objetivos padronizar e validar a técnica de imunoperoxidase em monocamada celular (IPMC) para detecção e quantificação de IgG contra o *Vaccinia virus* (VACV) em bovinos e estudar a resposta imune humoral (RIH) contra este patógeno em animais natural e experimentalmente infectados. A validação da IPMC foi realizada comparando os resultados da soroneutralização (SN) de 148 amostras de soro bovino e apresentou elevada acurácia, sensibilidade, especificidade e índice kappa de concordância. O teste de repetibilidade realizado em 32 soros bovinos positivos na SN apresentou alto coeficiente de correlação intraclasse. A IPMC foi sensível, específica e adequada para triagem do VACV. No estudo da RIH de vacas e seus bezerros naturalmente infectados pelo VACV verificou-se o pico de IgG e de anticorpos neutralizantes (AN) no primeiro mês de infecção, e detecção até um ano após a ocorrência de surtos. A RIH de vacas em lactação experimentalmente infectadas com o VACV-GP2 também foi monitorada, com avaliação diária dos animais e coleta de amostras de soro até o 60º dia após a infecção. Após este período, os animais foram divididos em dois grupos: reinfestado e imunossuprimido. A curva de AN, IgG total, IgG1 e IgG2 destes animais foi determinada e observou-se que a presença de anticorpos protegeu parcialmente as vacas reinfestadas da vaccínia bovina.

Palavras chave: *Vaccinia* bovina; anticorpos; poxvirus

ABSTRACT

The aims of this study were the standardization and validation of an immunoperoxidase monolayer assay (IPMA) for detection and quantification of bovine IgG against *Vaccinia virus* (VACV) and to study the dynamics of the humoral immune response (HIR) against this pathogen in natural and experimentally infected bovines. The assay was validated by comparison with neutralization test (NT) results of 148 bovine serum samples; the results showed elevate accuracy, sensitivity, specificity and kappa index of agreement. Repeatability tests realized with 32 positive serum samples at the NT revealed high intraclass coefficient correlation. The IPMA was sensitive, specific and suitable for VACV screening. The study of HIR in VACV naturally infected cows and their calves demonstrated that the peak of IgG and neutralizing antibodies (NA) was in the first month of infection, with detection up to one year after the occurrence of outbreaks. The HIR of lactating cows experimentally infected with VACV-GP2 was also evaluated. The cows were monitored daily and serum samples were collected until the 60th day post infection. After this period, animals were separated in two treatment groups: re-infected and immunosuppressed. The curve of NA, IgG, IgG1 and IgG2 of these animals were determined. It was observed that the presence of antibodies partially protected reinfected cows against VACV.

Key words: Bovine vaccinia; antibodies; poxvirus

1. INTRODUÇÃO

A *Vaccinia Bovina* (VB) é uma doença causada pelo *Vaccinia vírus* (VACV), caracterizada por lesões cutâneas ulcerativas, que atingem principalmente os tetos de vacas em lactação e as mãos dos ordenadores que mantêm contato direto, no momento da ordenha, com as vacas infectadas. Assim, esta doença é classificada como uma zoonose ocupacional (Silva-Fernandes et al., 2009; Lobato et al., 2005).

O VACV, um protótipo do gênero *Orthopoxvirus* (OPXV) (família *Poxviridae*; subfamília *Chordopoxvirinae*), tem sido caracterizado molecularmente, desde 1999, como o agente etiológico de surtos de VB em todo o Brasil (Schatzmayr et al., 2000; Trindade et al., 2003; Leite et al., 2005; Lobato et al., 2005; Nagasse-Sugahara et al. 2005; Donatele et al., 2007; Megid et al., 2008). Outros dois poxvírus, o *Cowpox vírus*, também do gênero OPVX, e o *Pseudocowpox vírus*, do gênero *Parapoxvirus*, podem causar lesões similares e indistinguíveis clinicamente. A doença causada por esses três vírus é genericamente denominada “varíola bovina”.

Desde 1960, relatos de casos de “varíola bovina” no Brasil foram registrados, no entanto, em nenhum dos casos foi realizado isolamento ou identificação do agente etiológico envolvido (Silva e Moraes, 1961; Silva et al., 1986). No final da década de 1990 houve um aumento exacerbado do número de relatos de surtos de uma doença semelhante à varíola bovina em diferentes regiões do país, e desde então, surtos com doença clínica acometendo milhares de bovinos e humanos, levando a problemas de saúde pública e na produção leiteira têm

ocorrido.

Em propriedades com animais acometidos pelo VACV, há grandes prejuízos, como a ocorrência de mastite, infecções secundárias, redução brusca na produção de leite, gastos com medicamentos, acometimento de bezerros lactentes, levando ao emagrecimento desses animais, além do afastamento temporário e contrato de novo ordenhador (Lobato et al., 2005; Leite et al., 2005; Madureira, 2009).

A emergência desta infecção se configura como um risco à saúde pública, e gera problemas econômicos na cadeia produtiva do leite (Kroon et al., 2011). Dentre as regiões acometidas pela doença, a região Sudeste merece destaque pelo grande número de casos, além de ser a maior produtora de leite do país, sendo responsável por quase 40% da produção leiteira nacional. Só o estado de Minas Gerais mantém 27,24% da produção nacional e 23,52% da ordenha de vacas leiteiras do país (IBGE, 2009).

A circulação do VACV dentro e/ou entre fazendas durante os surtos de VB, geralmente está relacionada ao trânsito de animais doentes entre as propriedades, e aos ordenhadores que trabalham em mais de uma fazenda (Lobato et al., 2005). No entanto, a epidemiologia da VB no rebanho bovino ainda é pouco conhecida, e um inquérito sorológico desses animais é importante na geração de informações fundamentais para a compreensão da circulação do VACV no campo.

Diferentes métodos de diagnóstico para identificação de infecções por VACV como o isolamento viral, testes sorológicos,

técnicas de biologia molecular e microscopia eletrônica são utilizados no estudo da VB (Trindade et al., 2007).

Neste trabalho foi realizada a validação da técnica de imunoperoxidase em monocamada celular (IPMC) para detecção de IgG total contra o VACV, e avaliada a resposta imune humoral de bovinos naturalmente e experimentalmente infectados pelo vírus. Em amostras de soro de vacas naturalmente infectadas, coletadas em surtos de VB no estado de Minas Gerais, estudamos o título e a persistência de anticorpos do primeiro até o 15º mês após a ocorrência da doença nos bovinos. Em amostras de soro das vacas experimentalmente infectadas, e posteriormente imunossuprimidas ou reinfectadas, foi possível estudar a resposta imune humoral nos primeiros dias de infecção e comparar o desenvolvimento da imunidade mediada por anticorpos nos primeiros meses das infecções natural e experimental.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Classificação

Os vírus da família *Poxviridae* se dividem em duas subfamílias, a *Chordopoxvirinae* e *Entomopoxvirinae*, que infectam vertebrados e invertebrados, respectivamente. O *Vaccinia virus* (VACV) é um protótipo do gênero *Orthopoxvirus* (OPXV) da

subfamília *Chordopoxvirinae* (Tabela 1) (McFadden, 2005). Esse gênero também inclui o vírus da varíola humana, o *Variola virus* (VARV), o *Cowpox virus* (CPXV), o *Monkeypox virus* (MPXV) e o *Ectromelia virus* (ECTV) (Moss, 2007; ICTV, 2012).

O VACV foi utilizado na Campanha de Erradicação da Varíola pela Organização Mundial de Saúde (OMS) até o final da década de 1970. As características que o levaram a ser utilizado como amostra vacinal foram: menor patogenicidade e virulência, por não caracterizar-se por lesões disseminadas, e pela capacidade de estimular uma resposta imune protetora contra o VARV (Fenner et al., 1989, Eposito e Fenner, 2001).

A origem e o hospedeiro natural do VACV ainda são desconhecidos, mas há indícios de que o VACV pertença a uma linhagem independente dos OPXV, e não esteja diretamente relacionado com o CPXV ou o VARV (Trindade et al., 2007; Drumond et al., 2008). Alguns estudos tentam explicar a sua origem. Entre algumas hipóteses destacam-se a de que o VACV seja um híbrido do CPXV ou do VARV, ou que o mesmo tenha derivado do CPXV por meio de repetidas passagens em animais ou do VARV após adaptação em animais e humanos, ou ainda, que seu hospedeiro natural esteja atualmente extinto (Buller e Pallumbo, 1991; Trindade et al., 2007).

Tabela 1 Classificação dos vírus da família Poxviridae, subfamília Chordopoxvirinae, e os seus principais representantes.

GÊNERO	PROTÓTIPO
<i>Orthopoxvirus</i>	<i>Vaccinia vírus</i>
<i>Parapoxvirus</i>	<i>Orf vírus</i>
<i>Capripoxvirus</i>	<i>Sheeppox vírus</i>
<i>Suipoxvirus</i>	<i>Swinepox vírus</i>
<i>Leporipoxvirus</i>	<i>Myxoma vírus</i>
<i>Avipoxvirus</i>	<i>Fowlpox vírus</i>
<i>Yatapoxvirus</i>	<i>Yaba monkey tumor virus</i>
<i>Molluscipoxvirus</i>	<i>Molluscum contagiosum vírus</i>
<i>Cervidpoxvirus</i>	<i>Mule deerpox vírus</i>
<i>Crocodylidpoxvirus</i>	<i>Nile crocodilepox vírus</i>

Fonte: International Committee on Taxonomy of Viruses, 2012.
[HTTP://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ictv/index.htm](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ictv/index.htm)

2.2. Morfologia

A família *Poxviridae* compreende grandes e complexos vírus, de formato ovóide ou de tijolo, com dimensões que variam entre 140-260 nanômetros (nm) de diâmetro por 220-450nm de comprimento (ICTV, 2012; Moss, 2007).

A partícula viral contém mais de 100 proteínas distribuídas em quatro estruturas distintas: cerne, corpúsculos laterais, membrana e envelope (Figura 1). O cerne se apresenta bicôncavo e envolve o DNA viral, enzimas e fatores de transcrição de genes precoces. Os corpúsculos laterais

encontram-se dispostos nos dois lados do cerne, ambos envoltos por uma membrana e cujas funções e composição química ainda não são bem definidas (Moss, 2007). A membrana externa, de origem celular, é formada por uma bicamada lipoprotéica e circunda o cerne. Elementos tubulares, denominados túbulos de superfície cobrem a membrana externa e são os responsáveis por induzirem a produção de anticorpos neutralizantes durante uma infecção. Uma membrana adicional, mais externa, denominada envelope, de natureza lipoprotéica, pode ser vista em algumas partículas (Buller e Palumbo, 1991).

Os poxvírus contêm enzimas que sintetizam RNA mensageiro e um genoma composto por uma única molécula de DNA fita dupla de 130 a 300 kilopares de bases (kpb), sendo capazes de realizar a replicação viral inteiramente no citoplasma da célula hospedeira (Moss, 2007).

A porção central do genoma, altamente conservada, codifica principalmente proteínas estruturais e enzimas envolvidas no metabolismo do ácido nucléico. Nas extremidades do genoma são observadas as regiões terminais invertidas (ITRs), sequências idênticas dispostas em orientações contrárias, que codificam vários genes responsáveis pela interação vírus-

hospedeiro, conferindo a cada poxvírus características únicas de patogênese e imunomodulação (Upton et al., 2003). A semelhança entre as proteínas estruturais expressas por diferentes OPXVs contribuem para a reação imunológica e proteção cruzada entre as espécies do mesmo gênero (Moss,2011).

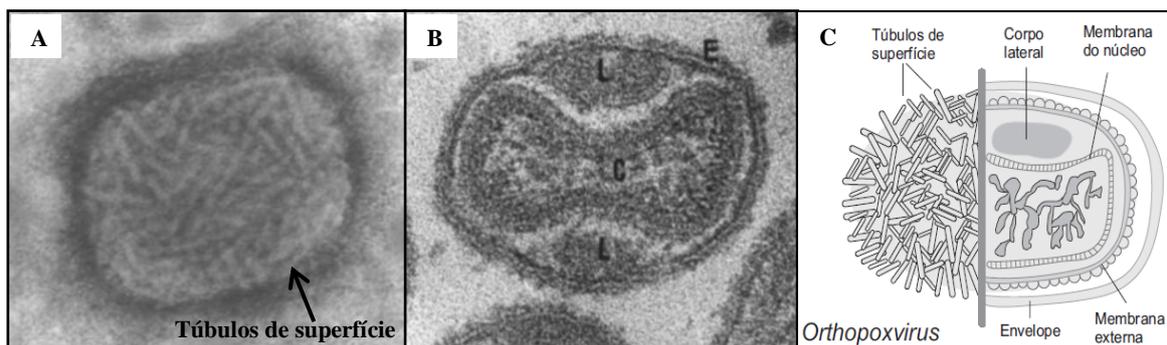


Figura 1 Morfologia e estrutura dos poxvírus. (A) Eletromicroscopia de um *Orthopoxvirus*, apresentando os túbulos de superfície. (B) Eletromicroscopia de transmissão de uma partícula viral madura (MV) de VACV, com indicações no cerne (C), corpúsculos laterais (L) e membrana externa (E). (C) Representação esquemática de um *Orthopoxvirus*, partícula viral envelopada (EV). Fontes: Moss, 2007; Murphy et al.,1999; Flores, 2007.

2.3. Ciclo de Multiplicação

Diferentemente da maioria dos vírus de DNA, a multiplicação viral dos poxvírus ocorre no citoplasma das células infectadas. Esta característica está relacionada à presença na partícula viral de todas as enzimas necessárias para a transcrição, replicação do genoma viral, produção e modificação dos RNA mensageiros (RNAm) para síntese de suas proteínas, o que os torna independentes do núcleo celular (Moss, 2007).

A partícula infecciosa básica dos poxvírus é o vírus maduro (MV), que consiste de um núcleo, que contém o genoma, e um sistema completo de transcrição precoce, envolto por corpúsculos laterais e circundado por uma membrana lipoprotéica (Condit et al., 2006).

Alguns MV podem ser envolvidos por membranas endossomais, oriundas do complexo de Golgi, serem transportados para a periferia da célula em microtúbulos e, posteriormente, liberados por exocitose como partículas virais com envelope (EV). Quando isso ocorre, a proteína viral A36 é fosforilada, induzindo a nucleação de monômeros de actina para formar caudas de actina abaixo da partícula viral. Estas caudas de actina impulsionam a partícula viral para células vizinhas, o que fornece um mecanismo direto de disseminação de célula a célula. As partículas associadas com os filamentos de actina são referidas como partículas virais associadas a células (Roberts e Smith, 2008).

Os MVs são as formas mais abundantes e estáveis, sendo responsáveis pela infecção entre hospedeiros, e os EVs são importantes

na disseminação viral e virulência dentro do hospedeiro (Smith e Kotwal, 2002).

A penetração viral ocorre através da fusão entre as membranas, tanto dos vírus MV como dos EV. O DNA viral é então liberado para o citoplasma, onde ocorre a sua replicação. O processo de expressão gênica é caracterizado pela transcrição temporal de três classes de genes (genes precoces, intermediários e tardios). As proteínas precoces participam do desnudamento completo do genoma, da sua replicação e da transcrição dos genes intermediários, cujos RNAm são traduzidos em proteínas. As

proteínas intermediárias estão envolvidas principalmente na transcrição dos genes tardios, e participam das fases finais de replicação. As proteínas tardias fazem parte da estrutura viral e participam da morfogênese dos núcleos virais. Alguns fatores de transcrição de genes precoces são sintetizados tardiamente na infecção e adicionados às partículas virais para serem utilizados no início do próximo ciclo de infecção (Figura 2) (Moss, 2007).

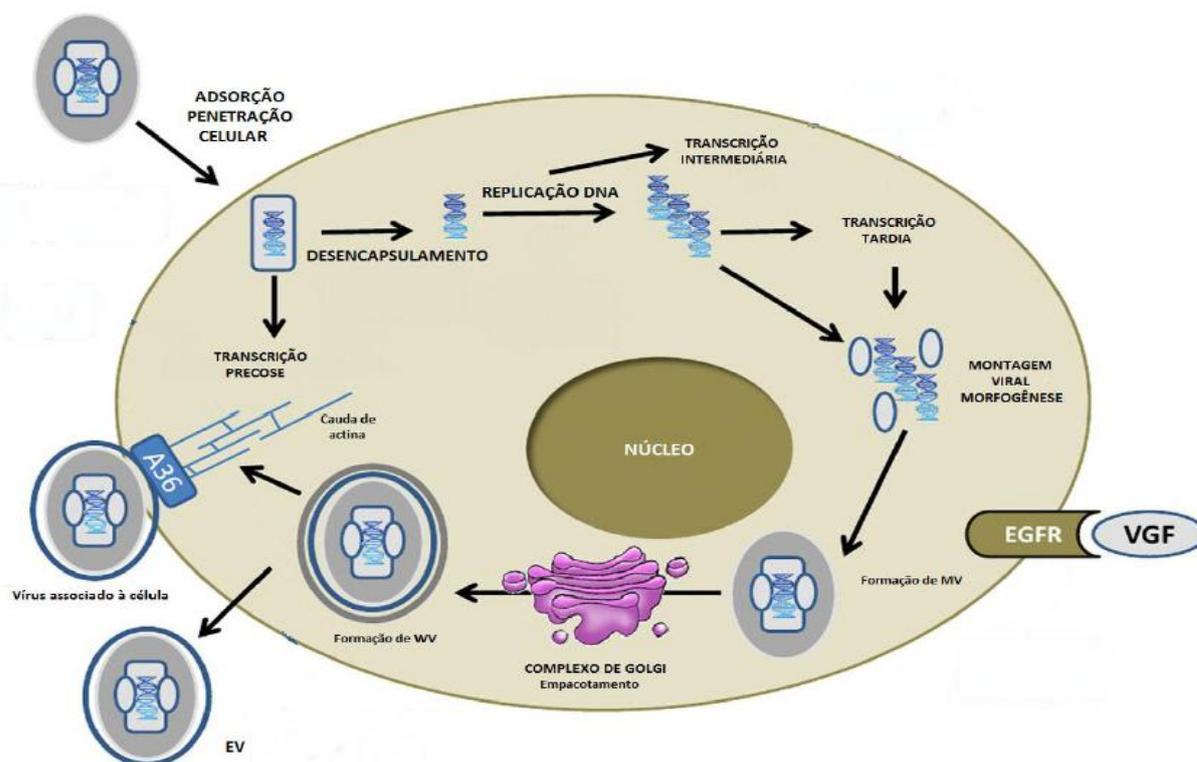


Figura 2 Esquema do ciclo de replicação dos poxvírus. Fonte: Kroon e colaboradores (2011) - adaptado por Rivetti Jr., 2012.

2.4. Patogênese

No estudo da patogênese dos OPXV, diversos modelos animais têm sido

utilizados para a elucidação das infecções causadas pelo VACV, ECTV, MPXV e CPXV (Esteban e Buller, 2005). Aspectos relacionados à patogênese de amostras

brasileiras de VACV têm sido estudados em modelos experimentais, utilizando camundongos e coelhos (Ferreira et al., 2008; Campos et al., 2011; Cargnelutti et al., 2012).

Após inoculação do ECTV por escarificação da face plantar da pata de camundongos é possível identificar replicação viral no local da inoculação, seguida por drenagem linfática antes de oito horas após a inoculação (p.i). Entre o 3º e 4º dias p.i., livre ou associado a células, o vírus é transmitido por via linfática eferente e corrente sanguínea para órgãos como medula óssea, baço e fígado, onde se replica mais. Por volta de cinco dias p.i. os vírus presentes nestes órgão são liberados na corrente sanguínea resultando em uma segunda viremia. Nesta etapa o vírus pode ser detectado em praticamente todos os órgãos, incluindo a pele, onde em aproximadamente nove dias p.i. ocorre a formação de vesículas que ulceram em poucos dias. Esta é a fase mais infecciosa da doença, e pode durar até o 21º dia p.i. (revisado por Stanford et al., 2007).

Ferreira e colaboradores (2008), após a inoculação intradérmica de amostras de VACV, através da escarificação da face plantar da pata posterior de camundongos Balb/c, verificaram, a partir do 2º dia p.i., um aumento no volume da pata inoculada em comparação com as patas não inoculadas. No 4º d.p.i. identificaram vesículas e lesões ulcerativas que variavam de tamanho entre os animais. Entre os dias 10 e 12 p.i. foi descrita a diminuição do edema e uma evolução das vesículas para pústulas. As crostas passaram a surgir no 18º d.p.i. e a completa cicatrização ocorreu no 20º dia p.i., quando a integridade cutânea

das patas de todos os camundongos foi restabelecida. Prostração e perda de peso também foram descritos em camundongos inoculados com VACV. DNA viral foi identificado em amostras de fezes, urina e saliva dos camundongos inoculados.

Utilizando a via intranasal em camundongos Balb/c para estudar a patogênese de amostras de VACV isoladas no Brasil, foi identificada a existência de dois grupos de VACV de acordo com as alterações causadas nos animais inoculados. Em um grupo de amostras de VACV (grupo 1) (ARAV, GP2V, PSTV, PV2), a infecção não provoca sinais clínicos nos camundongos inoculados, enquanto amostras do grupo 2 (GP1V, VBH, SAV, BAV, PV1), a infecção causa sinais clínicos e morte em camundongos infectados (Ferreira et al., 2008; Campos et al., 2011).

Cargnelutti e colaboradores (2012) avaliaram a patogenicidade das amostras brasileiras PV1 e PV2 em coelhos, e não identificaram diferenças entre as amostras, e os coelhos se mostraram mais susceptíveis ao VACV do que os camundongos, reproduzindo um quadro respiratório grave e uma doença sistêmica após a inoculação intranasal com ambos os vírus. O aparecimento de lesões nas orelhas e nas pálpebras e a presença do vírus no sangue, intestino e no pulmão indicaram uma disseminação sistêmica do vírus.

Nas infecções pelo VARV e pelo MPXV as manifestações clínicas são generalizadas. No homem, o VARV promove a infecção através do trato respiratório, enquanto o MPXV, em macacos, a infecção ocorre através de lesões na pele e na mucosa oral. Após a multiplicação do vírus no sítio de

entrada, ocorre a disseminação pelos órgãos linfáticos primários e circulação dos vírus na corrente sanguínea (viremia primária), com consequente infecção e multiplicação viral em órgãos como baço e fígado, e nova circulação dos vírus na corrente sanguínea (viremia secundária). Em seguida surgem as lesões características da doença em outros órgãos como rins, intestino, pulmões e pele (Breman e Henderson, 2002; revisado por Chapman et al., 2010).

2.5. Resposta Imune contra OPXVs

Uma infecção viral pode ser compreendida como uma competição entre a capacidade de replicação e transmissão do vírus e a mobilização dos mecanismos imunológicos de defesa do hospedeiro para erradicação do patógeno. Por esta razão, a severidade de uma doença e a recuperação da infecção estão relacionados tanto ao agente infeccioso como à resposta do hospedeiro (Stanford et al., 2007).

No caso dos poxvírus, os anticorpos podem ajudar no controle da infecção através de vários mecanismos, como vírus neutralização, ativação do sistema do complemento, opsonização e citotoxicidade. Linfócitos (L) T citotóxicos específicos anti-poxvirus são ativados e atacam células infectadas com o vírus, auxiliando na resolução da infecção (Panchanathan et al., 2008).

O tamanho e a natureza complexa dos poxvírus os fazem um alvo significativo para a resposta imune do hospedeiro. Diante disto, estes vírus sintetizam moléculas que são codificadas por genes de virulência e concebidas para subverter diretamente as defesas montadas pelo hospedeiro. As

proteínas modulatórias codificadas pelos poxvírus podem ser classificadas em dois grupos, baseadas no local de ação: as que atuam de forma intracelular e as que atuam de forma extracelular (Johnston e McFadden, 2003; 2004).

Proteínas que atuam de forma intracelular podem interferir na resposta contra a infecção através da inibição do estado antiviral da célula, da lise oxidativa e de mecanismos de apoptose, ou mesmo reduzindo a probabilidade de detecção do antígeno pelo sistema imune, interferindo na apresentação antigênica pelo complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I e por LT CD4⁺.

As moléculas que atuam de forma extracelular são glicoproteínas secretadas ou expressas na membrana celular que competem com os receptores celulares, por se tornarem sítios de ligação para citocinas e quimiocinas secretadas pelos hospedeiros, interferindo assim nas suas funções. Elas também podem mimetizar as citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento secretados pelas células do hospedeiro e assim, atuarem tanto para subverter uma resposta do hospedeiro, promovendo uma resposta favorável à replicação e disseminação viral, quanto comprometendo a própria sobrevivência do vírus (revisado por Santford et al., 2007).

Após a infecção com o VACV, uma forte resposta de anticorpos é verificada em camundongos. Enquanto baixos níveis de anticorpos são identificados até sete dias p.i., uma forte resposta de imunoglobulina (Ig) M e IgG (inclusive de múltiplos isotipos) estão claramente presentes a partir de 14 dias p.i (Spriggs et al., 1992). Anticorpos

neutralizantes (AN) são identificados 20 dias p.i e persistem por mais de três meses (Xu et al., 2004, Coulibaly et al., 2005).

Células B de memória específicas contra o VACV são geradas após a infecção. Uma forte resposta de LT CD8⁺ e LT CD4⁺ pode ser detectada a partir do sétimo dia p.i. Um posterior declínio e estabilização no nível de LT CD8⁺ de memória são identificados após 30 dias da infecção, e esse nível se mantém estável por mais de 300 dias p.i. O nível estável de LT CD4⁺ de memória específicos contra o VACV foi detectado de um a sete meses p.i., e a maioria das células CD4⁺ efectoras produziam IFN- γ . Porém, uma heterogeneidade nessa população foi identificada, com algumas células produzindo fator de necrose tumoral (TNF) e/ou interleucina (IL) 2, caracterizando uma resposta predominante do tipo Th1 (revisado por Amanna et al., 2006).

Em humanos vacinados com amostras vivas de VACV foi possível detectar IgG total e AN a partir do 14ºd.p.i, com o pico da resposta humoral sendo observado no primeiro mês após a vacinação (McClain et al., 1997, Greenberg et al., 2005). A resposta humoral em humanos infectados com amostras vacinais é muito duradoura, sendo possível detectar AN por 20 até 75 anos após a vacinação (McCarthy et al., 1958, Hammarlund et al., 2003).

Estudo realizado por Trindade e colaboradores (2009) demonstrou que houve modulação da resposta imune em paciente humano não vacinado, e infectado pela primeira vez pelo VACV em um surto de VB. Nos estágios iniciais da infecção, aproximadamente 10 dias após o primeiro contato com o vírus, foi identificada redução

do número total de LB e macrófagos, além de diminuição na proliferação de LT e citocinas, como o IFN- γ após estimulação in vitro com VACV.

Após o primeiro contato com o VACV, a proteção contra doenças causadas por OPXV é fortemente dependente da resposta de anticorpos, tanto em modelos animais quanto em humanos (Galmiche et al., 1999; Hammarlund et al., 2003; Amanna et al., 2006).

Edghill-Smith e colaboradores (2005) demonstraram que a resposta de anticorpos é necessária e suficiente para proteção contra o MPXV em animais previamente imunizados com amostras vacinais de VACV.

Para demonstrar a importância dos anticorpos e das células B na resposta imune protetora contra OPXV, Macacos Rhesus (*Macaca mulata*) previamente vacinados com VACV foram desafiados por inoculação pela via intravenosa com MPXV, após um ou seis meses da imunização. Grupos de animais foram divididos e, anteriormente ao desafio, foi realizada a depleção de LT CD4⁺, LT CD8⁺ ou LB. Os animais com depleção de LT CD4⁺ ou LT CD8⁺ não manifestaram doença clínica, apresentaram altos títulos de NA, além de não terem sido detectados níveis significativos de DNA viral no sangue destes animais já no segundo dia depois do desafio.

Os macacos com depleção de LB não desenvolveram níveis significativos de anticorpos, apresentaram altos níveis de DNA viral no sangue e após manifestação clínica com inúmeras lesões cutâneas,

morreram no 13º dia após o desafio. Animais não vacinados e desafiados quatro dias após receberem soro hiperimune contra o VACV apresentaram doença branda, e se recuperaram da doença 18 dias após o desafio com o MPVX.

A maioria dos mecanismos da resposta imune contra os poxvírus é direcionada contra as proteínas de superfície das duas formas virais (MV e EV). A forma MV é a mais abundante nas células infectadas (Condit et al., 2006) e acredita-se ser a principal forma relacionada à disseminação viral entre os hospedeiros. A forma EV está relacionada a disseminação da progênie viral dentro do hospedeiro infectado (Smith e Kotwal, 2002).

Teoricamente, anticorpos contra a forma MV atuam na neutralização da dose viral infectante inicial, e anticorpos contra a forma EV previnem a disseminação da progênie viral dentro do hospedeiro, assim a proteção ótima contra o VACV é adquirida quando há presença de anticorpos contra proteínas das duas formas virais (MV e EV) (revisado por Cohen et al., 2011).

Estudos recentes em camundongos demonstraram que o isotipo monoclonal IgG2a contra a proteína B5, presente na superfície viral da forma EV, pode neutralizar esta forma viral na presença de proteínas do complemento e utiliza esta via para mediar parcialmente a proteção *in vivo* (Benhnia et al., 2009; Cohen et al., 2011). Estas informações sugerem que anticorpos contra a forma EV podem ser mais eficazes se forem de um isotipo que medie funções efetivas como a ativação do complemento e/ou uma atividade dependente do receptor

Fc (FcR) (ex. citotoxicidade mediada por anticorpos (ADCC).

Em bovinos, não há ainda estudos sobre a resposta imune específica contra o VACV. Mas sobre a resposta humoral desenvolvida por bovinos contra infecções, sabe-se que a IgG apresenta duas principais subclasses, IgG1 e IgG2, as quais apresentam diferenças antigênicas na porção Fc das cadeias pesadas. Receptores para a porção Fc de diferentes subclasses de IgG estão presentes nas plaquetas e em algumas células incluindo linfócitos, monócitos/macrófagos, neutrófilos e basófilos (revisado por Spiegelberg, 1974).

As subclasses de IgG (IgG1 e IgG2) apresentam aproximadamente a mesma concentração no soro de bovinos, porém, em secreções mamárias, a concentração de IgG1 pode ser até sete vezes maior em relação a IgG2 (Sasaki et al., 1997).

O predomínio de uma subclasse de imunoglobulina incapaz de ativar importantes vias de agregação como fixação do complemento e fagocitose pode comprometer a saúde do hospedeiro em alguns processos infecciosos. Testes *in vitro* demonstraram que, em bovinos, apesar de tanto os complexos antígeno-anticorpo formados por IgG1, quanto por IgG2 serem capazes de ativar a fixação do complemento, IgG1 pode ser mais eficaz que IgG2 (McGuire et al., 1979), e que a subclasse IgG2 apresenta um importante papel no desenvolvimento de uma resposta do tipo ADCC em ruminantes (Grewal e Rouse, 1979).

2.6. Vaccinia Bovina

A vaccinia bovina (VB) é uma doença causada pelo VACV, que acomete principalmente vacas em lactação e seus bezerros, além de humanos que entram em contato direto com estes animais infectados, como os ordenhadores. A VB é caracterizada por lesões exantemáticas na pele que evoluem de pápulas a vesículas, ulceram e, posteriormente, formam crostas que se soltam e as lesões evoluem para cicatrização.

A transmissão entre os bovinos ocorre, principalmente, através das mãos dos ordenhadores ou pelas ventosas dos

equipamentos de ordenha mecânica (Lobato et al., 2005). A penetração dos vírus ocorre por soluções de continuidade em lesões pré-existentes nos tetos e úbere das vacas (revisado por Fenner et al., 1989; Blood e Radostitis, 1991).

Entre fazendas a doença pode ser transmitida pela introdução de bovinos infectados no rebanho e por ordenhadores que entram em contato com animais doentes em outras propriedades (Lobato et al., 2005; Megid, 2008). Estudo recente conduzido na região norte do Brasil mostrou a importância da comercialização e do trânsito de animais na difusão da VB nesta região (Quixabeira-Santos et al., 2011).



Figura 3 Lesões observadas na VB. (A) Lesões na mão de um ordenhador. (B) Lesões ulcerativas nos tetos de uma vaca em lactação. (C) Lesões ulcerativas, evoluindo para crostas no focinho de um bezerro lactente. Fonte: Madureira, 2009; Leite et al., 2005.

Em humanos, as lesões causadas pelo VACV se localizam principalmente nas mãos e antebraço (Figura 3A), mas já foram identificadas lesões nas regiões periorbitária e vestíbulo nasal (Da Silva *et al.*, 2008).

Abrasões na pele servem de porta de entrada para o vírus, que se replica inicialmente no local de penetração (McFadden, 2005). As lesões iniciam-se com uma coceira local que evoluem para edema. As lesões surgem entre 5 a 7 dias após o contato com as tetos infectados por VACV (Da Silva *et al.*,

2008). Três dias após esses sinais iniciais, é possível verificar a presença de vesículas no local afetado, além de sintomas como febre, cefaleia e exaustão. Após um período de 3 a 4 dias, as vesículas ulceram e pústulas circundadas por uma intensa reação inflamatória e bastante doloridas são formadas (Trindade et al., 2007).

A doença é auto-limitante, e a resolução completa do quadro clínico em humanos ocorre aproximadamente 30 dias após o início dos sintomas (Schatzmayr *et al.*,

2000; Da Silva *et al.*, 2008; Silva-Fernandes *et al.*, 2009). Infecções secundárias podem acontecer, o que pode agravar o quadro clínico, além de retardar o processo de cicatrização.

Nas vacas em lactação, as lesões se localizam no úbere e tetos (Figura 3B). Mastite e outras infecções secundárias foram identificadas em 43% dos animais acometidos, e a redução na produção de leite pode chegar a até 80% em algumas propriedades (Lobato *et al.*, 2005).

Apesar da dificuldade em encontrar animais na fase inicial da infecção, existem relatos sobre a evolução das lesões em animais infectados, com desenvolvimento de um eritema cutâneo característico, que se inicia com o aparecimento de pequenas manchas, as quais evoluem para vesículas umbilicadas, pústulas, úlceras e crostas e terminam por cicatrizar entre 15 e 20 dias (Bremner e Henderson, 2002; Trindade *et al.*, 2003; Lobato *et al.*, 2005). Partículas virais viáveis já foram identificadas no leite e fezes de bovinos infectados (Abrahão *et al.*, 2009a; D'Anunciação *et al.*, 2012).

Em fazendas com sistema de bezerro ao pé, é comum observar o acometimento dos bezerros lactentes, que podem apresentar lesões no focinho, lábios e mucosa oral (Figura 3C) (Leite *et al.*, 2005; Lobato *et al.*, 2005; Madureira, 2009). Como as lesões são bastante dolorosas, ocorre redução da ingestão de alimentos, que leva a perda de peso (Lobato *et al.*, 2005).

Em um único trabalho descrito na literatura, Lauder e colaboradores (1971), após realizarem a inoculação experimental intradérmica de tetos e úbere de vacas com o VACV, observaram lesões iniciais

eritematosas e inflamatórias no 3º dia p.i. Cinco dias p.i., uma das vacas apresentou ulcerações profundas com irregularidades e intensa inflamação do tecido adjacente. As crostas desenvolveram-se no 6º d.p.i. Lesões com as mesmas características foram observadas também no úbere das vacas.

Em relação ao período de incubação do VACV em bovinos, Lauder e colaboradores (1971) observaram o surgimento das lesões entre o 2º e 3º d.p.i., demonstrando que período entre a penetração do vírus na pele, sua multiplicação e o desenvolvimento de lesões é bastante rápido. Após 42 dias da inoculação todos os animais apresentavam os tetos cicatrizados. Ao acompanhar surtos e verificar depoimentos dos proprietários e ordenadores, Lobato e colaboradores (2005) descreveram que o curso clínico da doença ocorre de 15 a 30 dias, nos bovinos.

2.7. A *Vaccinia bovina* no Brasil

A ocorrência da VB no Brasil é relatada desde a década de 30, com registro de casos esporádicos entre os anos de 1950 a 1990. Porém, desde o final da década de 1990, houve um aumento exacerbado na quantidade de surtos da doença, relatados principalmente na região Sudeste do país (Damaso *et al.*, 2000; Trindade *et al.*, 2003). Desde então, surtos de VB acometendo humanos e bovinos, com isolamento e identificação do VACV como agente etiológico, foram descritos em pelo menos 12 estados brasileiros (Figura 4 e Quadro 1): Rio de Janeiro (Damaso *et al.*, 2000; Schatzmayr *et al.*, 2012); São Paulo (Mendes *et al.*, 1999; Trindade *et al.*, 2003; Nagasse-Shugahara *et al.*, 2004; Megid *et al.*, 2008); Minas Gerais (Lobato *et al.*, 2005; Leite *et al.*, 2005; Trindade *et al.*,

2006, Madureira, 2009); Espírito Santo (Donatele et al., 2007); Goiás (Nagasse-Shugahara et al., 2004); Pernambuco (Damaso et al., 2007); Tocantins (Medaglia

et al., 2009); Rondônia e Mato Grosso (Quixabeira-Santos et al., 2011); Pará (Vinhote et al., 2011); Bahia e Maranhão (Kroon, dados não publicados).



Quadro 1 Amostras de VACV isoladas no Brasil entre os períodos de 1963 a 2005 e seus respectivos hospedeiros.

Figura 4 Estados brasileiros com diagnóstico de surtos de Vaccinia bovina, com acometimento de bovinos e humanos durante o período de 1999 a 2011.

AUTOR	VÍRUS ISOLADO	LOCAL	ANO	HOSPEDEIRO
Lanna, 1980;	BeAn 58058 (BAV)	Belém-PA	1963	Roedor Silvestres (<i>Oryzomys</i>)
Fonseca et al., 1998;				
Marques et al., 2001.				
Lopes et al., 1965;	Cotia SPAn 232 (SAV)	Cotia-SP	1965	Camundongos Sentinelas
Lopes et al., 1975.				
Diniz et al., 2001;	Belo Horizonte (BHV)	Belo Horizonte-MG	1993	Camundongos suíços
Trindade et al., 2003;				
Trindade et al., 2004.				
Damaso et al., 2000.	Vírus Cantagalo (CTGV)	Cantagalo-RJ	1999	Vaca
Trindade et al., 2003	Araçatuba (ARAV)	Araçatuba-SP	1999	Vaca
Trindade et al., 2003	Muriaé (MURV)	Muriaé-MG	2000	Humano
Trindade et al., 2006	Guarani P1 (GP1) e Guarani P2 (GP2)	Guarani-MG	2001	Vaca
Leite et al., 2003;	Passatempo (PSTV)	Passatempo-MG	2003	Vaca
Leite et al., 2005.				
Nagasse-Shugahara et al., 2004.	Vaccinia virus	Estado de São Paulo e Goiás	2004	
Trindade et al., 2007	Serro	Serro-MG	2005	Humanos
Abrahão et al., 2009b	Mariana (MARV)	Mariana - MG	2005	Humanos, bovinos e roedores peridomésticos

Fonte: Madureira, 2009 (modificado)

Estudos genéticos de amostras brasileiras de VACV isoladas em surtos de VB mostram que estas se dividem em dois grupos geneticamente distintos (Trindade et al., 2006, Drumond et al., 2008). No primeiro grupo foram identificados os isolados ARAV, CTGV, GP2, PSTV e no segundo, as amostras BAV, SAV, GP1 e BHV. Este polimorfismo genético se reflete também nos perfis de virulência destas amostras em camundongos (Balb/c). As infecções causadas pelas amostras do primeiro grupo não provocam sinais clínicos nos camundongos infectados, enquanto as amostras do segundo grupo, além de causar sinais clínicos, podem levar os camundongos infectados à morte (Ferreira et al., 2008).

Quanto ao tipo de manejo observado nas propriedades com surto de VB no Brasil, tanto em propriedades com ordenha manual quanto com ordenha mecânica houve relatos de surtos da doença. Em estudo dos aspectos clínicos e epidemiológicos da doença em um surto de VB ocorrido na Zona da Mata Mineira, o qual acometeu seres humanos e bovinos, foi observado que a taxa de ataque é extremamente alta, mas pode variar de 100% em propriedades de ordenha manual a 30% em ordenha mecânica. Os principais problemas causados pela doença são: queda na produção de leite, que pode chegar até a 80%; ocorrência de infecção secundária, especialmente mamite em até 50% dos casos; gastos com medicamentos;

acometimento de bezerros que mamam nas vacas doentes e custos com a contratação de novos empregados, pois o ordenhador doente se afasta por mais de uma semana, sendo necessária a contratação de um novo ordenhador (Lobato et al., 2005).

3. OBJETIVO GERAL

Padronizar uma técnica para detecção e quantificação de IgG total contra o VACV em bovinos, e estudar a dinâmica da resposta imune humoral contra este patógeno em animais experimentalmente e naturalmente infectados.

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar e validar a técnica de imunoperoxidase em monocamada celular (IPMC) para detecção de IgG total contra o *Vaccinia vírus*(VACV) em bovinos.
- Avaliar os títulos de anticorpos e a duração da resposta imune humoral de bovinos naturalmente infectados pelo *Vaccinia vírus* (VACV).
- Avaliar a resposta imune humoral contra o VACV, nos primeiros dias e por até dois meses, de vacas em lactação experimentalmente inoculadas com o VACV-GP2, e estudar variações desta resposta após imunossupressão e reinfeção destes animais.

CAPÍTULO I - Validação da técnica de imunoperoxidase em monocamada celular para titulação de IgG total anti-*Vaccinia vírus**

1. JUSTIFICATIVA

Nos últimos anos, surtos de zoonoses associadas aos OPXV foram relatados no mundo, causando sérios prejuízos econômicos e preocupações relacionadas à saúde pública. Infecções por CPXV, afetando humanos e animais têm sido relatadas na Europa, assim como surtos causados por MPXV na África e nos Estados Unidos; *Buffaloxpox virus* na Índia, Egito e Bangladesh; e VACV no Brasil (Silva-Fernandes et al., 2009; Brum et al., 2010; Essbauer et al., 2010).

O VACV causa uma doença conhecida como VB, que é caracterizada por lesões nos tetos e úbere das vacas em lactação, que evoluem de pápulas para vesículas, pústulas e crostas. A circulação do VACV dentro e entre as propriedades durante os surtos de VB geralmente ocorre por contato dos ordenhadores com as vacas infectadas no momento da ordenha e pelo trânsito de bovinos infectados entre propriedades (Lobato et al., 2005). Apesar da frequente ocorrência da VB em propriedades produtoras de leite no Brasil (Damaso et al., 2000; Trindade et al., 2003; Lobato et al., 2005; da Silva et al., 2008; Nagasse-Sugahara et al., 2008; Megid et al., 2012), não existem informações sobre a situação epidemiológica do VACV na população bovina e inquéritos sorológicos poderiam

gerar informações importantes para a compreensão da circulação viral no campo.

Os testes laboratoriais tradicionalmente utilizados para a pesquisa de anticorpos contra o VACV, como o método de referência de neutralização por redução do número de placas (PRNT) (Leparc-Goffart et al., 2005), são complexos, laboriosos e requerem vários dias para obtenção de resultados. Apesar de esforços para tornar esta técnica mais rápida e eficiente (Borges et al., 2008), um método de diagnóstico rápido e adequado para a detecção de anticorpos contra o VACV para ser utilizado em grande volume de amostras de soro ainda é necessário.

O teste de imunoperoxidase em monocamada celular (IPMC) tem se mostrado um método rápido e de fácil execução, sendo uma valiosa ferramenta para o diagnóstico de várias doenças infecciosas (Soliman et al., 1997). Assim, neste trabalho, foi realizada a padronização e validação do teste de IPMC para detecção de IgG total contra o VACV.

2. OBJETIVO

Padronizar e validar a técnica de imunoperoxidase em monocamada celular (IPMC) para detecção de IgG total contra o *Vaccinia vírus* (VACV) em bovinos.

*Artigo publicado: Gerber, P.F, Matos, A.C.D, Guedes, M.I.M.C., Madureira, M.C., Silva, M.X., Lobato, Z.I.P. Validation of an immunoperoxidase monolayer assay for total anti-*Vaccinia vírus* antibody titration. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, v.24, p.355-358, 2012. (ANEXO I)

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local de realização do experimento

O experimento foi realizado no Laboratório de Pesquisa em Virologia Animal da Escola de Veterinária da UFMG (LPVA-UFMG).

3.2. Cultivo Celular

Células Vero, de linhagem contínua de epitélio de rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*), obtidas da “American Type Culture Collection” (ATCC), catálogo número CCL-81 (Maryland, Estados Unidos), foram cultivadas em garrafas planas com 150cm² de área para cultivo celular (A150), em meio mínimo essencial de Eagle (MEM) (GIBCO™), suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB), penicilina potássica (200 U/ml), gentamicina (50 µg/mL), anfotericina B (2,5 µg/ml) e incubadas a 37°C, em atmosfera úmida com 5% de CO₂.

3.3. Amostra viral

Para padronização da técnica foi utilizada a amostra viral VACV Western Reserve (WR) (ATCCVR-119, Rockville, MD), gentilmente cedida pela Professora Dra. Erna Kroon, do Laboratório de Vírus do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

3.3.1. Multiplicação da amostra VACV-WR

Os estoques virais foram obtidos a partir do cultivo de células Vero infectadas com o VACV-WR. Dez garrafas A150, com 5x10⁴ células/cm², foram mantidas em estufa por 24 horas a 37°C. Monocamadas contendo

aproximadamente 2x10⁷ células, após lavagem por duas vezes com solução tampão fosfato salina (PBS) (NaCl 137mM; KCl 7mM; Na₂HPO₄ 1,4mM, pH 7,2), foram infectadas a uma multiplicidade de infecção (MOI) de 0,01 unidades formadoras de placas (UFP)/célula, preparado em 5mL de MEM adicionado de antimicrobianos.

As garrafas foram incubadas a 37°C, por uma hora, para adsorção viral. Posteriormente, 30 mL de MEM com 2 % de SFB e antimicrobianos foram acrescentados, e as garrafas mantidas a 37°C, com observação diária em microscópio óptico de luz invertida, até a detecção de 90% de efeito citopático (ECP), que ocorreu aproximadamente, 48 horas após a incubação. Em seguida, o meio de cultivo foi desprezado, as células lavadas com PBS e desprezadas da garrafa com o auxílio de um raspador (Falcon® 3086). A suspensão viral obtida foi armazenada à -70°C até a purificação viral.

3.3.2. Purificação viral

Para purificação do VACV-WR, o sedimento obtido foi homogeneizado em 8mL de Tris-HCl 10mM, pH 8,0 e centrifugado a 2.500 rpm (rotor H1000B - Sorvall RT6000 B), em temperatura de 4°C, durante 15 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi mantido em banho de gelo e o sedimento celular lisado por duas vezes em 10 mL de solução de lise (MgCl₂ 1mM; Tris 10mM, pH 7,0; KCl 10mM). Em seguida, a suspensão celular foi mantida em banho de gelo, por 10 minutos, homogeneizada mecanicamente por 80 vezes, utilizando o homogeneizador do tipo “Douncer” (Wheaton, USA) e centrifugada, para liberação das partículas virais a 23.000 g

durante 2 horas a 4°C, em colchão de sacarose a 36% em Tris-HCl, 10 mM, pH 8,0.

Após a retirada de impurezas e o descarte da solução de sacarose, o sedimento que permaneceu no tubo, foi homogeneizado com 1mL de Tris 10mM, pH 8,0 e submetido a 2 ciclos de sonicação por 30 segundos, com 40% de potência de saída (Sonic Desmembrator-50, Fisher Scientific – USA). Após a adição de 10mL de Tris 10mM, pH 8,0, e centrifugação a 18.700g, a 4°C por 45 minutos, o sobrenadante foi descartado, o sedimento resuspenso em 500µL de Tris 10mM, pH 8,0 e distribuído em alíquotas de 5µL em microtubos (Joklik, 1962). Uma alíquota do vírus purificado foi retirada para determinação do título viral, e o restante estocado a -70°C.

3.3.3. Titulação viral

O título dos estoques virais purificados foi determinado por ensaios em placas de seis poços, de acordo com técnica descrita por Campos e Kroon (1993), com modificações. Em cada poço da placa foi distribuído 1,5 mL de suspensão celular, contendo 5×10^5 células Vero, em MEM suplementado com 5% SFB e antimicrobianos.

As placas foram incubadas a 37°C, por aproximadamente 24 horas, até a formação da monocamada celular. O meio de cultivo foi desprezado e os poços lavados com PBS por duas vezes. Um microlitro do vírus purificado foi homogeneizado em 199µL de MEM (diluição 10^{-2}) e em seguida, diluições decimais seriadas (10^{-3} a 10^{-12}) foram realizadas.

Em cinco poços de cada placa foram adicionados 300µL de cada diluição, e em um poço, para controle da viabilidade celular, apenas 300µL de MEM. Para adsorção viral, a placa foi mantida por uma hora em estufa com 5% CO₂, a 37°C e homogeneizadas a cada 15 minutos. Posteriormente, 1mL de MEM, com 1% de SFB e antimicrobianos foi adicionado em cada poço, e as placas mantidas em estufa 5% CO₂, a 37°C por 72 horas. Após a incubação, o meio foi desprezado e as placas fixadas e coradas por 10 minutos em solução 10% formol e 1% cristal violeta em PBS.

O título viral foi obtido pela contagem do número de placas no poço cuja diluição apresentou de 30 a 300 placas de lise, multiplicado pelo inverso da diluição em 300µL, sendo posteriormente convertido para o volume final de 1mL. O título foi representado em UFP/mL.

3.4. Padronização da técnica de IPMC

Para determinar as melhores condições para execução da técnica de IPMC, primeiramente foram avaliadas duas concentrações celulares (5×10^4 e 6×10^4 células/cm²), inoculadas com diferentes concentrações virais (0,001 e 0,0001 MOI) em MEM suplementado com 4% de SFB e antimicrobianos, incubadas em placas de 96 poços, por 18, 24 e 36 horas em estufa a 37°C e atmosfera com 5% CO₂. Após o período de incubação, os poços foram fixados com solução acetona: metanol (1:1) por 10 minutos em temperatura ambiente, posteriormente secos ao ar e a placa congelada à -20°C.

Para padronização da técnica foram realizadas diluições seriadas na base 3 (1:20 a 1:4860), em PBS-Tween 20 0,05% (PBS-T) com 1% de caseína, e 50µL de cada diluição de duas amostras negativas e duas positivas, previamente testadas em PRNT, uma com título igual a 20, e outra 160. Um soro hiperimune policlonal anti-VACV de coelho inoculado com o VACV-Guarani P2, nas diluições 1:600, 1:1200 e 1:2400 também foi utilizado.

As placas foram incubadas por 1 hora à 37°C e depois lavadas com solução PBS-T. Em seguida, proteína G conjugada com peroxidase (Invitrogen®), nas diluições 1:500, 1:750 e 1:1000 em PBS foram adicionadas e as placa incubadas por 1 hora à 37°C. Finalmente, as placas foram lavadas com PBS-T e a solução reveladora contendo 3-amino-9-diethyl-carbazole em 0,1M tampão acetato com 0,05% de peróxido de hidrogênio adicionada. A leitura das placas foi realizada em microscópio de luz invertida, em aumento de 200X.

3.5. Validação da técnica de IPMC

3.5.1. Amostras de soro

O cálculo do número de amostras para validação do IPMC foi realizado considerando a sensibilidade média da técnica, 91,5%, com margem de erro de 6,4%, e intervalo de confiança de 95% (Greiner e Gardner, 2000), o que gerou um total de 148 amostras de soro.

As 148 amostras de soro de vacas em lactação foram utilizadas para estimar a acurácia do teste de IPMC na detecção de anticorpos contra o VACV, comparando os resultados positivos e negativos com os obtidos no teste de PRNT.

Soros VACV-positivos foram coletados de vacas mestiças em lactação (n=73), apresentando lesões características de VB, durante um surto no município de Mariana, Minas Gerais, Brasil, em 2006 (Madureira, 2009). Adicionalmente, quatro destas vacas, foram monitoradas durante sete coletas de soro: 2 semanas após o início do surto na propriedade, 15 dias depois e, aproximadamente de dois em dois meses subsequentemente, ao longo de um ano.

As amostras de soro bovino VACV-negativos (n= 75) foram coletadas no mesmo período, em propriedades vizinhas, porém não afetadas com a VB.

Para complementar o trabalho, amostras de soro de duas vacas inoculadas experimentalmente com o VACV Guarani P2, após escarificação da pele dos tetos (Rehfeld, 2011) foram testadas. Estas amostras foram coletadas semanalmente, antes e após a inoculação experimental.

A presença ou ausência de anticorpos contra o VACV nas vacas naturalmente e experimentalmente infectadas foi confirmada pelo método de referência PRNT (OIE, 2008).

As amostras utilizadas na validação da técnica foram obtidas de acordo com as normas do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), com projeto aprovado e registrado sob o número CETEA - 167/2009.

3.5.2. Soroneutralização por redução do número de placas

Células Vero, na concentração de 50.000 células/cm², em MEM, adicionado de 5% de SFB, penicilina (50mg/mL), gentamicina (50 µg/mL) e anfotericina B (2,5mg/mL), foram distribuídas em placas de 6 poços, cada um com 9,6 cm² de área, e cultivadas por 24 horas, em estufa a 37°C e 5% de CO₂. O soro foi inativado a 56°C, em banho maria, por 30 minutos, e em seguida, diluído em série, na base 2 (1:20 a 1:160) em MEM sem SFB.

O VACV-WR foi diluído de acordo com o título viral para obtenção de 300 UFP em 200µL de suspensão viral. Cada 200µL de diluição de soro foram homogeneizados com a mesma quantidade de suspensão viral e incubados a 37°C por 1 hora. Para controle positivo, foi utilizado 200µL de suspensão viral, adicionado de 200µL de MEM sem SFB. Para controle da viabilidade celular, foram incubados 400µL de MEM sem SFB para cada placa.

Após o período de incubação, 300µL de cada diluição foi inoculada em um poço com monocamada celular. Para adsorção das partículas virais, as placas foram incubadas por 1 hora em estufa a 37°C, em atmosfera de 5% CO₂. Posteriormente, foi adicionado 1mL de MEM suplementado com 1% de SFB. As placas foram novamente incubadas a 37°C, por 72 horas.

Após o período de incubação, as placas foram fixadas e coradas por 10 minutos com solução 10% formol, 1% cristal violeta em PBS. As placas de lise foram contadas, e o título de anticorpos neutralizantes determinado pelo inverso da maior diluição

de soro capaz de neutralizar 50% do número de placas detectadas no controle positivo. Amostras com títulos de anticorpos neutralizantes (AN) abaixo de 20 foram consideradas negativas; título igual a 20, baixo; títulos entre 40 e 80, médio; e títulos de 160 ou acima foram considerados de título alto. Os títulos de AN foram expressos em log₂ com as diluições correspondentes a: 20 = 4,32; 40 = 5,32; 80 = 6,32 e 160 = 7,32.

3.5.3. Imunoperoxidase em Monocamada Celular

Em placas de 96 poços, 100 µL de solução contendo 50.000 células Vero/cm² homogeneizada com VACV, em MOI igual a 0,01, em MEM suplementado com 4% de SFB, foram dispensadas em cada poço, e incubadas por 24 horas a 37°C, em atmosfera de 5% CO₂. Para controle da viabilidade celular, seis poços em cada placa eram incubados com 100µL de suspensão celular sem adição viral.

Após o período de incubação, a solução foi descartada, e os poços fixados com solução acetona: metanol (1:1) por 10 minutos em temperatura ambiente, e posteriormente secos ao ar. As placas foram utilizadas tanto imediatamente após a secagem, como também após 3 meses de congelamento a -20°C.

Diluições seriadas dos soros, na base 3 (1:20 a 1:4860), foram realizadas em PBS-Tween 20 0,05% (PBS-T) com 0,1% de caseína e 50µL de cada diluição, dispensados nas placas fixadas, contendo células Vero infectadas com VACV-WR. Em cada placa foram utilizados soros controle negativo e positivo, que eram testados na monocamada

infectada e não infectada para verificação de reações inespecíficas.

As placas foram incubadas por 1 hora a 37°C e depois lavadas com solução PBS-T. Em seguida, 50 µL de proteína G conjugada com peroxidase (Invitrogen® P21041), diluída 1:750 em PBS foram adicionados em cada poço e a placa incubada por 1 hora a 37°C. Finalmente, as placas foram lavadas com PBS-T e 50 µL de solução reveladora contendo 3-amino-9-diethyl-carbazole em 0,1M tampão acetato com 0,05% de peróxido de hidrogênio foi adicionado.

A leitura das placas foi realizada em microscópio de luz invertida, no aumento 200X. O título dos soros testados foi expresso pelo inverso da diluição que apresentou pelo menos cinco células marcadas com a coloração vermelho tijolo. Os títulos foram expressos em \log_2 , correspondendo assim: 20= 4,32; 60= 5,90; 180= 7,49; 540= 9,07; 1620= 10,66 e 4860= 12,24.

3.5.4. Análise Estatística

A avaliação da reprodutibilidade e linearidade do teste dentro e entre as repetições foi realizada como proposto por Rabenau e colaboradores (2007). Trinta e duas amostras positivas para VACV e seis soros negativos foram titulados por PRNT e IPMC. Para o ensaio de reprodutibilidade dentro do teste, quatro réplicas de cada amostra de soro foram realizadas na mesma placa. Para reprodutibilidade entre os testes, cinco réplicas de cada amostra foram processadas em diferentes placas e cinco leituras cegas independentes realizadas por diferentes técnicos.

Para avaliar o efeito do congelamento das placas após a fixação, a 20°C, 14 amostras positivas foram tituladas ao mesmo tempo em placas fixadas imediatamente antes da realização da técnica de IPMC e em placas armazenadas por um, dois e três meses. O título de anticorpos e a intensidade da cor das marcações celulares foram comparados.

Os parâmetros de acurácia utilizados neste trabalho incluem sensibilidade e especificidade, com 95% de intervalo de confiança. O índice Kappa foi utilizado para determinar a concordância dos resultados positivos e negativos entre o PRNT e IPMC, a correlação de Pearson para correlacionar os títulos de anticorpos contra o VACV em ambos os testes. O teste de Wilcoxon para diferenças entre pares ordenadas (Wilcoxon's signed rank test) foi utilizado na comparação pareada dos dois testes (Sampaio, 2010).

A repetibilidade da técnica de IPMC foi testada pelo coeficiente de correlação intraclassa (CCI), por concordância absoluta (*two-way mixed effect model*), com 95% de intervalo de confiança para todas as medidas e análises de variância para as cinco leituras.

4. RESULTADOS

4.1. Titulação viral

Após a multiplicação e purificação do VACV-WR, o título do vírus utilizado na padronização e validação da técnica de IPMC foi $1,4 \times 10^9$ UFP/mL.

4.2. Padronização da técnica de IPMC

De acordo com os testes realizados inicialmente para padronização da técnica de IPMC para avaliação da resposta imune

humoral de bovinos, a melhor concentração celular e nível de infecção foram de 5×10^4 células/cm² e 0,001 MOI, respectivamente. A melhor diluição da proteína G conjugada com peroxidase (Invitrogen®, P21041) foi 1:750. Assim, foi definido o protocolo utilizado para a posterior validação da técnica, como descrito no ITEM 3.3.1.3.

4.3. Validação da técnica de IPMC

Os resultados positivos e negativos obtidos nas duas técnicas (IPMC e PRNT) das amostras de campo estão demonstrados na Tabela 2.

O teste de IPMA padronizado apresentou excelente acurácia (98%), sensibilidade (100%), especificidade (96%) e índice kappa de concordância ($\kappa = 0,959$). Os coeficientes de validação e concordância estão demonstrados na Tabela 3.

A média dos títulos de anticorpos contra o VACV detectados no IPMC foi superior a média obtida no PRNT (média de título =

$11,69 \pm 0,83 \log_2$ e $5,37 \pm 0,96 \log_2$, respectivamente; $P < 0,001$) (Figura 5). Para verificar se os títulos de PRNT e IPMC estavam relacionados, foi realizado um teste de correlação entre as duas variáveis, detectando-se um nível de correlação moderado ($r = 0,31$, $P < 0,05$).

A repetibilidade e linearidade do teste foram determinadas comparando os títulos de anticorpos detectados nas réplicas da técnica de IPMC. O CCI foi de 0,86 ($P < 0,001$; Tabela 3), evidenciando excelente repetibilidade do método de diagnóstico padronizado. Não houve diferença entre as repetições realizadas pelo teste exato de Fisher ($F = 0,72$; $P = 0,57$), indicando que a mediana de todas as repetições foi similar.

A técnica de IPMC também demonstrou boa repetibilidade nos seis soros negativos testados. Diferenças entre títulos e intensidade da cor das marcações não foram observadas nos soros testados em placas imediatamente utilizadas e as armazenadas.

Tabela 2. Comparação dos resultados obtidos pelas técnicas executadas (IPMC e PRNT) nas 148 amostras de soro bovino de campo.

Resultados IPMC	Resultados PRNT		
	Positivo	Negativo	Total
Positivo	73	3	76
Negativo	0	72	72
Total	73	75	148

Tabela 3. Parâmetros de validação e repetibilidade (95% de intervalo de confiança) para os IgG total detectados pela técnica de IPMC.

Parâmetros	Valores
Validação¹	
Kappa	0,959
Sensibilidade	100%
Especificidade	96%
Acurácia	98%
Repetibilidade²	
CCI	0.86

CCI, coeficiente de correlação intraclasse

¹ Os resultados dos parâmetros de validação foram documentados através da comparação dos resultados positivos e negativos das 148 amostras de soro bovino testadas pelas técnicas de PRNT e IPMC.

² Os resultados de repetibilidade foram mensurados utilizando as cinco repetições de 32 amostras de soro positivas, testadas em quadruplicata.

Em vacas naturalmente infectadas, o teste de IPMC detectou anticorpos contra o VACV em maior número de amostras, e com títulos mais elevados que o PRNT durante o período de monitoramento.

Nas vacas experimentalmente infectadas, o IPMC detectou anticorpos contra o VACV com aproximadamente 4 a 7 dias pós-

inoculação (DPI), já o teste de PRNT começou a identificar a presença de anticorpos apenas no 21º DPI, e em baixos títulos.

O perfil sorológico apresentou-se similar nos dois testes realizados em soros bovinos de animais de campo coletados a partir de 15 dias, até seis meses do início do surto de VACV nas propriedades (Figura 5).

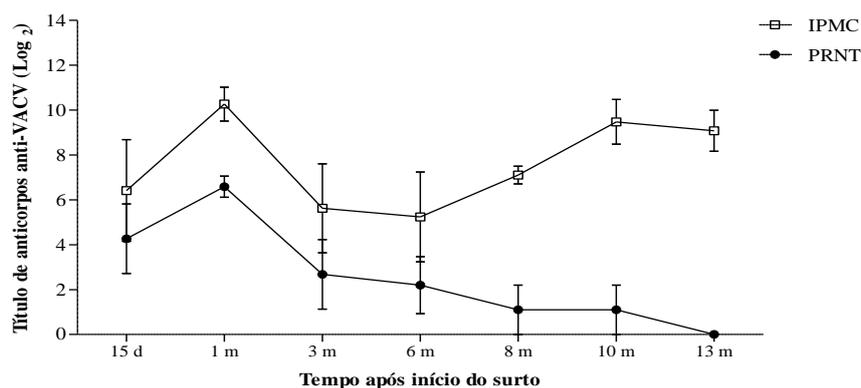


Figura 5 Média da resposta de anticorpos contra o VACV em quarto vacas naturalmente infectadas determinada pelas técnicas de IPMC e PRNT, de amostras coletadas a partir de 15 dias (15 d) até 13 meses (13m) do início do surto de VACV em suas propriedades. Barras verticais indicam o erro padrão.

Na primeira coleta, um de quatro animais foi negativo, tanto na técnica de IPMC quanto na PRNT. Quinze dias depois, anticorpos contra o VACV foram detectados em todos os quatro animais monitorados. Nas amostras coletadas de dois a seis meses, anticorpos contra o VACV foram detectados em três dos quatro, e dois dos quatro, respectivamente.

Do 8º ao 13º mês, houve divergência entre os perfis sorológicos apresentados pelas duas técnicas, enquanto os títulos médios de anticorpos detectados pelo teste de IPMC permaneceram elevados, pelo PRNT os títulos médios caíram. Nos 8º, 10º e 13º meses após início do surto na propriedade monitorada, utilizando o teste de IPMC foi possível detectar anticorpos contra o VACV em todos os animais, já no teste de PRNT, em apenas um dos quatro animais foi detectado anticorpo no 8º e no 10º mês, e em nenhum, no 13º mês (Figura 5).

5. DISCUSSÃO

Este trabalho demonstrou o desenvolvimento e a validação de uma técnica de IPMC para detecção de IgG total contra o VACV em bovinos.

As técnicas de IPMC e PRNT (utilizada como método de referência) apresentaram elevados níveis de concordância nos resultados. No entanto, o IPMC apresentou algumas vantagens em relação ao PRNT, como a não necessidade de inativação do soro teste, menor período de incubação (24 horas *versus* quatro dias), menor custo, maior rapidez de execução e leitura, e possibilidade de armazenamento de placas preparadas com o antígeno.

Com pequenas modificações na padronização, o IPMC pode ser utilizado na detecção de anticorpos contra o VACV em soros de diferentes espécies animais, pois a proteína G pode se ligar à porção Fc da imunoglobulina(Ig)G de uma grande variedade de espécies, incluindo os seres humanos. O teste pode também ser modificado para a detecção de diferentes isotipos de imunoglobulinas, como a IgM, IgG1 e IgG2, modificando apenas o anticorpo secundário utilizado.

O teste padronizado foi capaz de detectar IgG total contra o VACV em vacas experimentalmente infectadas 17 dias antes (4º DPI) da detecção de anticorpos neutralizantes pelo PRNT, e até o 13º mês pós-infecção em vacas naturalmente infectadas, um período de detecção mais longo que o PRNT (Figura 5). Estes dados podem ser parcialmente explicados pela diferença entre os anticorpos identificados.

Técnicas como a IPMC podem ser utilizadas na detecção de anticorpos específicos contra diversos vírus e assim, utilizados para monitorar o estado imunológico dos hospedeiros, enquanto o PRNT pode ser utilizado para verificar a função biológica dos anticorpos.

A detecção de AN é tardia e geralmente em títulos mais baixos quando comparada a IgG total, pois a formação dos AN pode demorar de semanas a meses, dependendo da resposta imune estimulada pelo vírus (revisado por Hangartner et al., 2006). Estas informações justificam a superior sensibilidade do teste de IPMC sobre o PRNT, e podem explicar parcialmente o pequeno número de amostras de campo que apresentaram resultados negativos na PRNT, e positivos no IPMC.

Uma moderada correlação entre os títulos de anticorpos detectados pela técnica de IPMC e PRNT foi encontrada na análise das amostras de campo, independentemente do possível retardo na produção de anticorpos neutralizantes contra o VACV em relação aos IgG total, demonstrando que há uma relação entre os títulos dos dois tipos de anticorpos. Portanto, o IPMC seria mais indicado para monitorar o possível contato dos bovinos com o VACV.

O aumento do título de IgG total em vacas naturalmente infectadas oito meses após o surto de VACV nas propriedades, é sugestivo de que o vírus pode permanecer circulando nos rebanhos, promovendo uma reinfecção dos animais por diferentes vias. Porém esta estimulação parece não ser suficiente para provocar doença clínica com lesões características nos tetos ou estimular a produção de anticorpos neutralizantes. Mais estudos devem ser desenvolvidos para elucidar o papel dos IgG total e neutralizantes na infecção de bovinos pelo VACV.

O diagnóstico de infecções causadas por poxvírus em humanos e bovinos tem aumentado no Brasil (Lobato et al., 2005; Silva-Fernandes et al., 2009; Megid et al., 2012). Apesar dos bovinos assumirem um importante papel na transmissão do VACV para o homem, há pouca informação sobre a circulação viral e a prevalência sorológica nestes animais. A técnica de IPMC padronizada neste trabalho provou ser uma ferramenta válida e simples para o diagnóstico indireto da infecção pelo VACV.

Placas fixadas com monocamadas celulares infectadas podem ser previamente preparadas e estocadas, o que torna o IPMC um teste de rápida execução, podendo ser utilizado em casos de surtos, quando há necessidade de diagnóstico rápido, ou em inquéritos epidemiológicos quando há necessidade de testar um grande número de amostras. Além disso, a técnica poderá ser utilizada como método de triagem para detectar anticorpos contra o VACV em bovinos, promovendo novas e importantes informações sobre a resposta humoral contra o vírus em animais doentes e ou mesmo sem manifestação clínica, e indiretamente sobre a distribuição viral nas fazendas e municípios.

6. CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou que o teste de IPMC desenvolvido para a detecção de IgG total contra o VACV é sensível, específico, de execução fácil, rápida, e adequado para triagem do VACV em um grande número de amostras de soro bovino. A técnica de IPMC descrita é uma ferramenta importante para levantamentos epidemiológicos que colaborariam para maior compreensão da circulação viral no campo.

CAPÍTULO II - Resposta imune humoral contra o *Vaccinia virus* em bovinos naturalmente infectados

1. JUSTIFICATIVA

A VB é uma zoonose caracterizada por lesões exantemáticas nos tetos e úberes de vacas em lactação, mãos e antebraços dos ordenadores, e é causada pelo VACV, um poxvírus pertencente ao gênero OPXV.

Desde o final da década de 90, vários relatos de surtos de VB são descritos no Brasil, que além de ser um problema de saúde pública, por afetar um grande número de ordenadores, causa grandes perdas econômicas, ao comprometer a produção de leite de milhares de vacas (Schatzmayr *et al.*, 2000; Trindade *et al.*, 2003; Leite *et al.*, 2005; Lobato *et al.*, 2005; Nagasse-Sugahara *et al.* 2004; Donatele *et al.*, 2007; Megid *et al.*, 2008; Megid *et al.*, 2012).

No estado de Minas Gerais, maior produtor de leite do país, com mais de três milhões de vacas ordenhadas por ano (IBGE, 2009), os primeiros relatos da doença ocorreram no período de 1999-2000, na Zona da Mata. A partir de então, vários surtos de VB têm sido descritos em quase todas as regiões do estado, em números crescentes (Madureira, 2009).

A resposta imune contra o VACV em bovinos ainda é pouco estudada, e não existem no mundo trabalhos que descrevem os mecanismos de controle e proteção da doença nos bovinos, sendo desconhecidos os títulos e a duração dos anticorpos nos animais infectados. Estas informações são necessárias para realização de levantamentos epidemiológicos, para a avaliação da proteção e da possibilidade de reinfeção,

com ou sem manifestação clínica da doença, dos animais previamente infectados.

2. OBJETIVO

Avaliar os títulos de anticorpos e a duração da resposta imune humoral de bovinos naturalmente infectados pelo *Vaccinia vírus* (VACV).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Amostras de soro bovino

Para avaliar a resposta imune humoral de bovinos naturalmente infectados pelo VACV, soros de vacas em lactação e bezerros lactentes de propriedades com surto de VB foram estudados. Os animais foram monitorados do primeiro mês, por até 15 meses após o surto, e os soros titulados pela técnica de imunoperoxidase em monocamada celular (IPMC). Adicionalmente, foram escolhidos soros de dez vacas, previamente testadas no IPMC, que apresentavam pelo menos cinco coletas ao longo dos 15 meses, e estas amostras foram submetidas à pesquisa de anticorpos neutralizantes (AN) pela técnica de neutralização por redução do número de placas (PRNT).

O estudo da resposta imune humoral de animais naturalmente infectados pelo VACV foi realizado com amostras de soro coletadas em surtos ocorridos em 2006, no estado de Minas Gerais, monitorados, por até 15 meses, e descritos por Madureira (2009). Não foram identificados novos casos clínicos da doença nos bovinos das

propriedades estudadas, durante os 15 meses de monitoramento.

Todas as propriedades apresentavam sistema de ordenha manual, com bezerro ao pé. Em cada propriedade, o número de animais amostrados foi definido em função do número de vacas em lactação existentes na propriedade, sendo amostradas para rebanhos com até 30, de 31 a 60, de 61 a 90 ou acima de 91 vacas em lactação, 5, 7, 9 ou 10 vacas, respectivamente, e quando possível, seus bezerros (Madureira, 2009).

3.1.1. Perfil da resposta imune humoral de vacas naturalmente infectadas com VACV

Para o estudo da resposta humoral de vacas naturalmente infectadas foram utilizadas apenas amostras de vacas em lactação que apresentavam sinais clínicos no momento da primeira coleta.

Os soros foram coletados em 11 propriedades nos municípios de Mariana (20°22'40"S - 43°24'57"O) e Paulistas (18°25'37"S - 42°52'04"O), totalizando 277 soros, de 54 vacas em lactação (Tabela 4), que após criterioso exame clínico dos animais, apresentavam lesões características de VB. Estas vacas foram monitoradas a partir do primeiro mês, por até 15 meses após o início dos surtos nas propriedades, que ocorreram entre junho e início de setembro, período de seca na região acometida.

Tabela 4 Número de amostras de vacas doentes, coletadas, em cada propriedade com surto de VB, ao longo do tempo.

MUNICÍPIO	IDENTIFICAÇÃO DA PROPRIEADE	MÊS APÓS INÍCIO DO SURTO							
		1	2-3	4-5	6-7	8-9	10-11	12-13	14-15
Mariana	48	6	6	-	6	6	6	-	6
Mariana	49	6	6	-	6	-	6	6	6
Mariana	28	4	-	4	4	-	-	4	3
Mariana	29	4	-	-	4	-	4	3	2
Mariana	44	4	-	4	-	2	2	-	2
Mariana	45	2	-	2	-	2	2	2	1
Mariana	46	5	5	-	-	5	5	-	5
Mariana	47	5	5	-	5	5	5	-	4
Paulistas	40	9	9	-	7	4	6	6	7
Paulistas	58	3	-	3	3	2	3	3	-
Paulistas	59	6	-	-	5	4	5	5	-
TOTAL (n)	11	54	31	13	40	30	44	29	36

3.1.2. Perfil da resposta imune humoral de bezerros, filhos de vacas doentes, naturalmente infectadas com VACV

Soros de bezerros, filhos de vacas que apresentavam lesões características de VACV nos tetos, foram testados para detecção e titulação de IgG total anti-

VACV. Estas amostras foram selecionadas de cinco propriedades (Tabela 5), que apresentavam pelo menos cinco bezerros, filhos de vacas doentes monitoradas no período de 15 meses após o início do surto.

Dezenove dos 32 bezerros monitorados apresentavam vesículas, úlceras ou crostas, nos lábios e focinho, que foram identificadas após exame clínico destes animais.

Tabela 5 Número de amostras coletadas de bezerros, filhos de vacas doentes, em cada propriedade com surto de VB, ao longo do tempo.

MUNICÍPIO	IDENTIFICAÇÃO DA PROPRIEDADE	MÊS APÓS INÍCIO DO SURTO					
		1	2-3	6-7	8-9	1--11	14-15
Mariana	48	6	6	6	6	6	6
Mariana	49	6	6	6	-	6	1
Mariana	47	5	5	5	5	5	4
Paulistas	40	9	8	6	3	2	4
Paulistas	59	6	-	6	4	2	-
TOTAL (n)	6	32	25	29	18	21	15

3.2. Imunoperoxidase em monocamada celular

Todas as amostras coletadas foram testadas para detecção e titulação de IgG total contra o VACV pela técnica de IPMC (Gerber et al., 2012). Os títulos de anticorpos foram classificados em: < 20, negativo; entre 20 e 180, baixo; ≥ 540 , alto; e também expressos em \log_2 , correspondendo assim: 20= 4,32; 6= 5,90; 180= 7,49; 540= 9,07; 1620= 10,66 e 4860= 12,24.

3.3. Soroneutralização por redução do número de placas

Para avaliar a presença e duração dos AN anti-VACV, foram utilizados soros de dez vacas, previamente testadas para detecção de

IgG total, coletadas no primeiro mês, dois, seis, dez e 14 meses após o surto nas propriedades. Os AN contra o VACV foram detectados e titulados, a partir de diluições na base 2 (1:20 a 1:160) por PRNT, de acordo com Leparc e colaboradores (2005), com modificações (Capítulo I, item 3.5.2). Amostras com título de AN anti-VACV igual ou superior a 20 foram consideradas positivas.

3.4. Análise Estatística

O teste de normalidade Shapiro-Wilk foi utilizado para avaliar a distribuição dos dados. O teste de Kruskal-Wallis, com 95% de intervalo de confiança, foi utilizado para comparar os dados de IgG total contra o VACV ao longo do tempo. Os resultados

foram considerados significativos quando o valor de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Perfil da resposta imune humoral de vacas naturalmente infectadas com VACV

Este é o primeiro trabalho que avaliou a duração da resposta imune contra o VACV em bovinos naturalmente infectados.

Nas amostras analisadas, IgG total contra o VACV foi identificada em todos os animais testados. No primeiro mês do surto, foi possível detectar altos títulos de IgG total em 38 das 54 vacas monitoradas (70,4%). De dois a três meses depois, o percentual de animais com títulos altos caiu para 48,4% (15/31), e a quantidade de vacas com títulos baixos aumentou para 45,2% (14/31). Após quatro ou cinco meses do início da doença nas propriedades, quando todos os animais que adoeceram já apresentavam cicatrização completa da lesão, foi possível observar aumento no número de vacas com títulos baixos (75%) e redução do número de animais com títulos altos de IgG total anti-VACV (16,7%) (Figura 6).

Após seis meses do início do surto foi verificado um aumento expressivo no número de animais negativos (17,5%). Até 15 meses após início do surto nessas propriedades 75% (27/36) dos animais ainda eram soropositivos, 52,78% (19/36) apresentavam títulos de IgG total baixo, e 22,2% (8/36) títulos altos (Figura 6).

Ao comparar as médias de IgG total, foi detectada redução do título de anticorpos ($p < 0,05$), a partir de 6-7 meses, até 14-15 meses após o início do surto nas propriedades. Foi possível observar também, que a média de IgG total é alta (9,01) no primeiro mês de infecção, seguindo em declínio até o 6º e 7º meses, com posterior estabilidade até 14-15 meses depois (Figura 6).

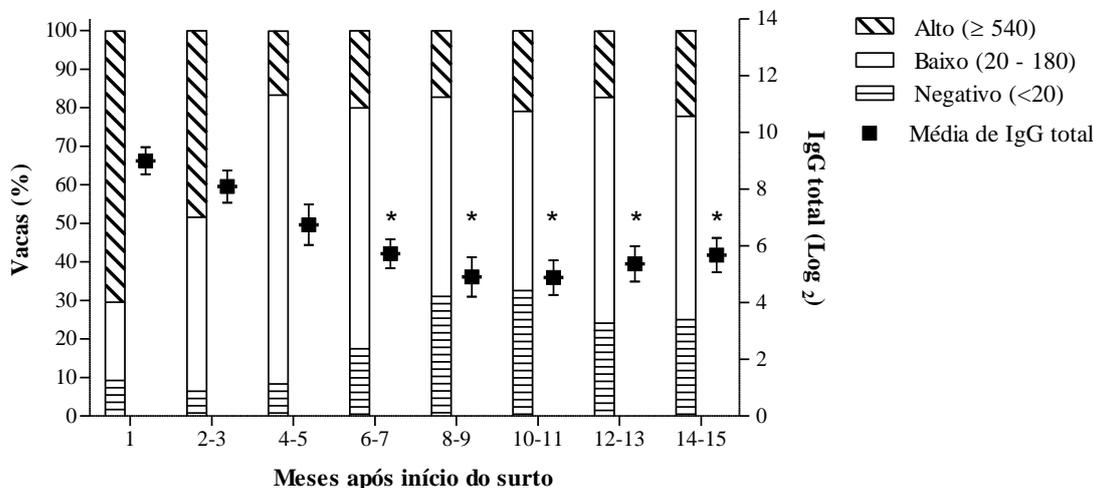


Figura 6 No eixo vertical da esquerda observa-se a distribuição, em porcentagem, dos títulos de IgG total anti-VACV (negativo, <20; baixos, entre 20 e 180 e altos, >540) das vacas em lactação, com lesão de propriedades com surtos de VB, monitoradas por até 15 meses. O eixo vertical da direita mostra a média de IgG total anti-VACV, expresso em \log_2 , dos mesmos animais – (20= 4,32; 60= 5,90; 180= 7,49; 540= 9,07; 1620= 10,66 e 4860= 12,24). Barras verticais indicam o erro padrão da média. Os tempos indicados com * representam diferença estatística em relação a média de IgG total observada no primeiro mês ($p < 0,05$).

Quando os títulos de IgG total foram analisados separadamente, por propriedade, observamos que a curva de anticorpos apresentava um perfil diferente entre elas, e que o número de amostras em algumas propriedades, era muito pequeno, o que aumentava o erro padrão da média, impossibilitando a análise destas propriedades separadamente.

Para avaliar melhor a curva de resposta humoral anti-VACV por propriedade, e verificar se estas diferenças interferiram na avaliação da curva padrão final de IgG total, foram selecionadas seis propriedades (48,

49, 46, 47, 40 e 59) que apresentavam pelo menos cinco animais em cada coleta (Tabela 4). Não foi observada diferença entre a curva da média de de IgG total determinada por estas seis propriedades selecionadas e a média geral das 11 propriedades monitoradas, mostrando que a curva de IgG total anteriormente descrita é representativa.

Porém ao analisarmos separadamente, por propriedade, as curvas de anticorpos das vacas em lactação, observamos dois padrões diferentes (Figura 7), e assim podemos definir dois grupos: o grupo I formado pelas propriedades 46 e 49 e o grupo II, pelas propriedades 40, 47, 48 e 59.

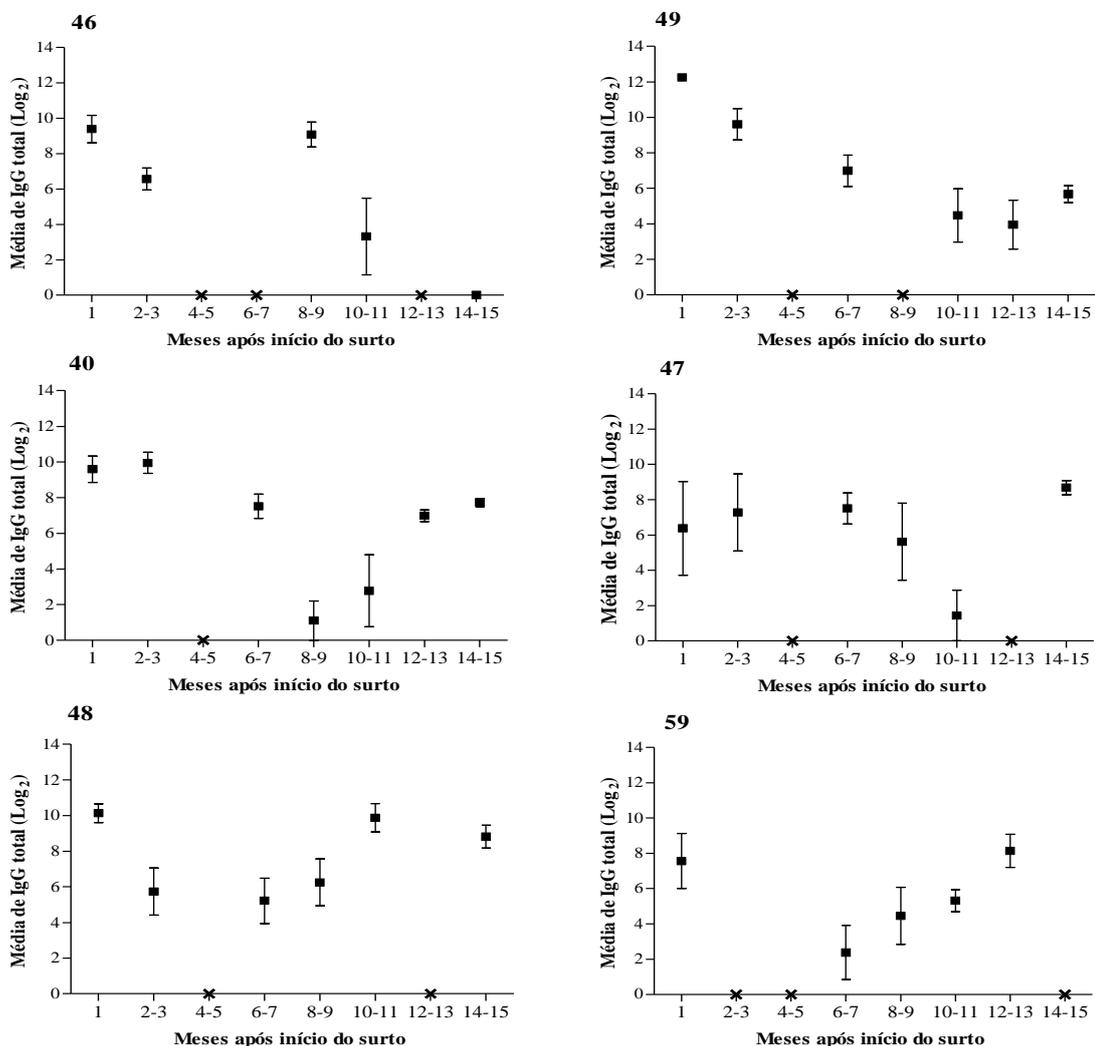


Figura 7 Média de IgG total anti-VACV, em log₂, (20= 4,32; 60= 5,9-; 180= 7,49; 540= 9,07; 162= 10,66 e 4860= 12,24) de vacas naturalmente infectadas, por propriedade (48, 49, 46, 47, 40, 59) com surto de VB. Nos tempos marcados com “x” não foram realizadas coletas de amostras.

Nas curvas das médias de IgG total das propriedades do grupo I observamos que estas seguem em declínio, na maioria dos tempos avaliados, até o 15º mês após o surto; porém nas propriedades do grupo II, após certa estabilidade ou queda da média do título de IgG total até o sétimo mês, aproximadamente um ano após o surto, há um aumento destas médias. Esta diferença

sugere que o vírus pode circular de modo diferente entre as propriedades.

A queda de IgG total nas propriedades do grupo I pode estar associada ao uso contínuo de desinfetantes antes e após a ordenha, limitando a circulação viral no rebanho.

O VACV é sensível a desinfetantes, como o hipoclorito de sódio (Oliveira et al., 2011).

O uso contínuo destes desinfetantes antes e após a ordenha pode controlar a doença clínica e a circulação viral. Um estudo comparativo entre propriedades com casos de VB e propriedades controle detectou que o uso de desinfetantes nas propriedades de produção leiteira é um fator de proteção contra a VB (Madureira, 2009).

Em todas as propriedades estudadas, foi relatado o uso de desinfetantes, como o hipoclorito de sódio para desinfecção dos tetos das vacas, e das mãos dos ordenadores após a ocorrência da doença no rebanho, porém não foi possível saber se o uso destes permaneceu ao longo de todo o período estudado. Uma possível hipótese é que nas propriedades do grupo I, esta queda contínua dos anticorpos contra o VACV possa ter ocorrido pela redução do contato dos bovinos com partículas virais, não havendo estimulação da secreção de anticorpos.

Nas propriedades do grupo II, após certa estabilidade ou queda da média da média de IgG total, a partir do sexto mês depois da ocorrência do surto, foi possível observar um aumento no título médio de IgG total aproximadamente um ano depois, o que sugere uma nova circulação viral nestas propriedades.

Os surtos monitorados ocorreram entre junho e início de setembro. Lobato e colaboradores (2005) observaram tendência à sazonalidade em um surto de VB ocorrido na Zona da Mata Mineira, no ano de 2001. Os autores relataram que 72% dos casos identificados ocorreram nos meses de julho a setembro, coincidindo com a época de seca, que favorece o ressecamento da pele aumentando a existência de pequenas lesões dos tetos das vacas; e destacaram também

que a maior quantidade de suplementação alimentar dos animais, como feno, silo e ração na época da seca poderia favorecer a presença de roedores nos arredores do curral.

Roedores são animais sabidamente susceptíveis à infecção pelo VACV, e o isolamento de poxvírus de roedores silvestres já foi relatado (Diniz et al 2001; da Fonseca et al 2002). Recentemente, o VACV foi também isolado de roedores peridomésticos em surtos da doença e o estudo filogenético das amostras isoladas dos roedores, de humanos e dos bovinos no surto de VB demonstrou perfeita homologia entre elas, sugerindo que o mesmo vírus circula entre as três espécies (Abrahão et al., 2009b).

Além do manejo sanitário das propriedades, a sazonalidade da doença, a presença de hospedeiros silvestres e peridomésticos e a patogenicidade da amostra viral também pode ter influenciado na diferença entre os perfis das curvas de IgG total nos rebanhos. Durante os surtos podemos observar diferenças na taxa de ataque, e até mesmo no padrão das lesões, algumas mais arredondadas e menores e outras alongadas, com aspectos mais ulcerativos. Estas variações no perfil fenotípico das lesões também foram observadas por Madureira (2009) e variações genéticas e de patogenicidade em camundongos foram identificadas em amostras de VACV isoladas de propriedades acometidas pela VB no Brasil (Trindade et al., 2006, Drumond et al., 2008, Ferreira et al., 2008).

Apesar deste aumento no título médio de anticorpos contra o VACV nas propriedades do grupo II é importante ressaltar que,

mesmo com a provável recirculação viral no rebanho, não foram diagnosticadas novas ocorrências de doença clínica nestes animais durante o período estudado.

Para avaliar a correspondência entre IgG total e AN, amostras de dez vacas previamente testadas no IPMC, que apresentavam pelo menos cinco coletas ao

longo dos 15 meses, foram selecionadas e submetidas ao PRNT para detecção de anticorpos neutralizantes anti-VACV.

Todas as vacas selecionadas apresentavam AN, assim como IgG total no 1º mês de infecção (Figura 8). Em quatro vacas (4/10) altos títulos de AN (≥ 160) foram identificados no 1º mês de infecção.

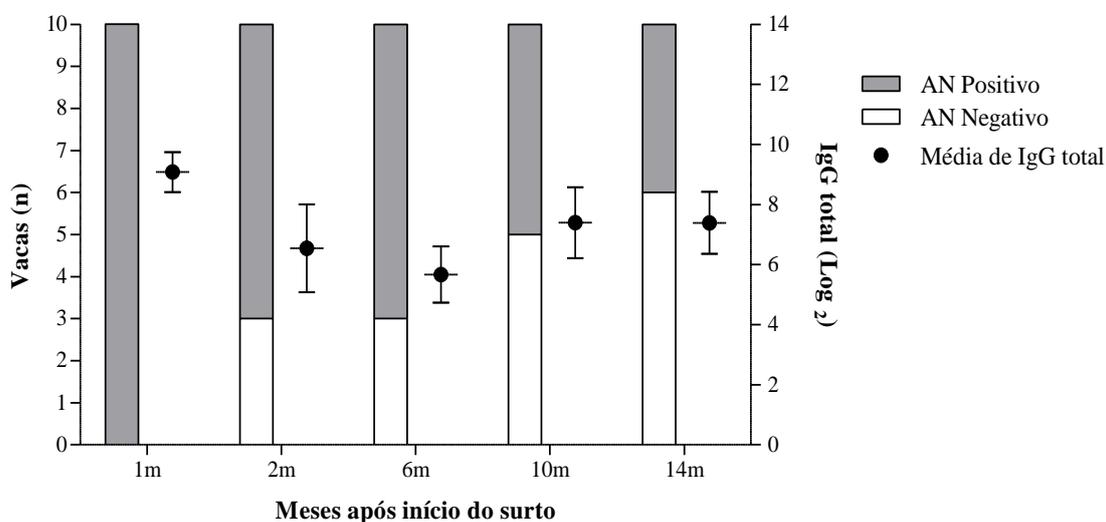


Figura 8 No eixo vertical da esquerda observa-se a distribuição, em porcentagem, das amostras negativas (< 20) e positivas (≥ 20) para detecção de anticorpos neutralizantes, de dez vacas doentes, em lactação, de propriedades com surtos de VB, monitoradas por até 14 meses após o início do surto. O eixo vertical da direita mostra a média de IgG total anti-VACV, em log₂, dos mesmos animais – (20= 4,32; 60= 5,90; 180= 7,49; 540= 9,07; 1620= 10,66 e 4860= 12,24). Barras verticais indicam o erro padrão da média.

No 2º mês após o início do surto, quando todos os animais já estavam completamente cicatrizados, três vacas se tornaram negativas para AN no PRNT e destas, duas também não apresentavam IgG total. Passados dez meses do surto, metade das vacas ainda apresentava AN; quatro com título igual a 20, e uma com título 80. Com 14 meses após o surto, quatro vacas

apresentavam AN, três com título igual a 40, e uma com título igual a 80.

Estes dados nos indicam que mesmo após dez meses da ocorrência de um surto em uma propriedade esperamos que aproximadamente 67% das vacas em lactação sejam positivas para o VACV na detecção de IgG total e que, pelo menos

50% delas tenham AN contra o vírus (Figuras 6 e 8).

Anticorpos neutralizantes contra o VACV foram detectados em vacas naturalmente infectadas por *Cowpoxvirus*, também do gênero *Orthopoxvirus* até dois anos após a infecção, em um surto descrito na Europa (Baxby e Osborne, 1979).

4.2. Perfil da resposta imune humoral de bezerros, filhos de vacas doentes, naturalmente infectadas com VACV

Considerando as amostras de vacas, e dos seus respectivos bezerros, foi possível observar que a distribuição dos títulos de IgG total dentro dos grupos foi igual, com o maior número de animais apresentando altos títulos de IgG total (≥ 540). Apenas três vacas e um bezerro foram negativos no primeiro mês mas, já na segunda coleta, foi observada a soroconversão destes animais (Figuras 6 e 9).

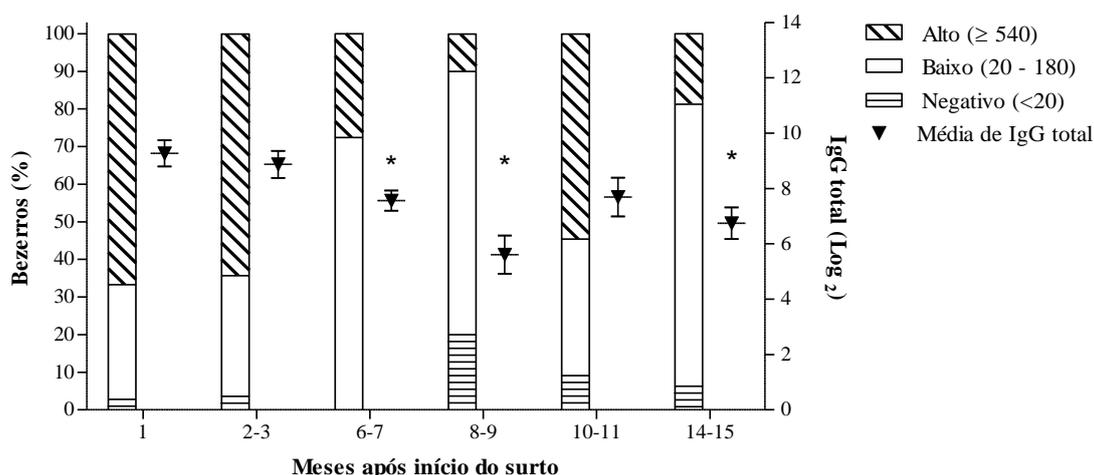


Figura 9 No eixo vertical da esquerda observa-se a distribuição, em porcentagem, dos títulos de IgG total anti-VACV (negativo, <20 ; baixos, entre 20 e 180 e altos, >540) de bezerros, filhos de vacas com lesão característica de VB nos tetos, das propriedades com surtos de VB selecionadas (48, 49, 46, 47, 40 e 59), monitoradas por até 15 meses. O eixo vertical da direita mostra a média de IgG total anti-VACV, expresso em \log_2 , dos mesmos animais – (20= 4,32; 60= 5,90; 180= 7,49; 540= 9,07; 1620= 10,66 e 4860= 12,24). Barras verticais indicam o erro padrão da média. Os tempos indicados com * representam diferença estatística em relação a média de IgG total observada no primeiro mês ($p < 0,05$).

Quando avaliado o título de IgG total anti-VACV dos bezerros ao longo do tempo (15 meses), foi possível observar que 66,7% (24/36) apresentavam altos títulos de IgG total no primeiro mês, permanecendo com a

mesma distribuição até o terceiro mês após o surto nas propriedades. Seis a sete meses depois, não foi detectado nenhum bezerro negativo e a maioria dos animais (72,4%) apresentava baixos títulos de IgG total (Figura 9).

A média do título de IgG total, após queda significativa seis a sete meses depois do surto ($p < 0,05$), subiu no décimo mês, com aumento expressivo no número de bezerros com altos títulos de anticorpos contra o VACV. Posteriormente, 14-15 meses depois do surto de VB nas propriedades, houve uma nova redução no título de anticorpos, com maioria dos animais (75%) apresentando baixos títulos de IgG total anti-VACV.

Foi observado neste estudo que, de forma geral, o pico de anticorpos contra o VACV ocorre no primeiro mês de infecção, tanto nas vacas em lactação, quanto em seus bezerros, com queda significativa a partir do sexto mês após ocorrência do surto (Figuras 6 e 9).

Os surtos de VB estudados foram os primeiros relatados nestas propriedades. E como todos os bezerros monitorados apresentaram anticorpos contra o VACV, acreditamos que estes tenham sido secretados de forma ativa, após estímulos antigênicos por contato dos bezerros com o vírus, e não derivados de transferência de imunidade passiva.

Apesar da doença clínica ter sido diagnosticada apenas em 19 dos 32 bezerros monitorados, não podemos afirmar que os demais não apresentavam lesões. Em bezerros lactentes as lesões podem se desenvolver na face, como lábios e focinho, como também na cavidade oral e língua, dificultando o exame clínico e o diagnóstico da doença nesses animais (Leite et al., 2005; Lobato et al., 2005).

O aumento significativo no título de IgG total anti-VACV entre 10-11 meses após o surto pode estar relacionado a um novo contato dos bezerros com partículas virais, como discutido anteriormente, visto que este mesmo perfil de resposta foi observado nas propriedades do grupo II (Figura 7).

O perfil da resposta humoral observada, caracterizada pela persistência de anticorpos, mesmo que em baixos títulos, na maioria dos animais, é um fator importante para o controle da doença no rebanho, que pode estar relacionado a proteção contra doença clínica nos animais, mesmo com circulação viral na propriedade. A presença de anticorpos por longos períodos também pode ser importante para a transferência de imunidade passiva, através do colostro, para novos bezerros, aumentando a proteção contra a doença.

5. CONCLUSÃO

Com este estudo foi possível verificar que o pico de anticorpos contra o VACV em vacas em lactação e bezerros lactentes ocorre no primeiro mês de infecção e que os títulos de IgG total, assim como de AN seguem em queda, apesar de serem detectados por mais de um ano nos animais infectados. Diferenças no perfil das curvas de IgG total das vacas em lactação entre as propriedades foram observadas.

CAPÍTULO III - Resposta imune humoral contra o *Vaccinia virus* em vacas lactantes experimentalmente infectadas

1. JUSTIFICATIVA

Como discutido no capítulo anterior, a resposta imune contra o VACV em bovinos ainda é pouco estudada, e não existem no mundo trabalhos que descrevem os mecanismos de controle e proteção da doença nos bovinos.

Os dados obtidos no estudo da resposta imune humoral de vacas naturalmente infectadas nos mostraram que, assim como em humanos e camundongos, a infecção pelo VACV desencadeia uma resposta imune humoral com elevados títulos de anticorpos. Porém, para maior compreensão da formação desta resposta, é necessário acompanhar os animais infectados desde o início da infecção.

A notificação da VB geralmente é tardia, e quando chegamos às propriedades a doença é encontrada em fase avançada, com lesões em fase de crosta e cicatrização. Além disso, a coleta de sangue para o estudo da resposta imune pode prejudicar o manejo das propriedades que no momento do surto já se encontram em situação complicada, com grandes prejuízos, devido à queda na produção de leite, mamites nas vacas em lactação e mudanças no manejo da ordenha.

2. OBJETIVO

Avaliar a resposta imune humoral contra o VACV, nos primeiros dias e por até dois meses, de vacas em lactação

experimentalmente inoculadas com o VACV-GP2, e estudar variações desta resposta após imunossupressão e reinfecção destes animais.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Locais dos experimentos

O experimento com os animais foi realizado no Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO), localizado no município de Pedro Leopoldo. As análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Pesquisa em Virologia Animal, Escola de Veterinária, da Universidade Federal de Minas Gerais.

3.1.1. Instalações e Manutenção dos animais

No LANAGRO, as vacas em lactação foram alojadas em quatro baias de concreto com dimensões 3,5 x 3,5 m separadas entre si por paredes. Serragem e feno foram utilizados como cama de descanso para os animais, e era trocada diariamente. Em cada baia ficaram alojadas duas vacas.

A área do experimento era telada e com acesso restrito. Os dejetos (fezes e cama) eram descartados diariamente em fossas 3,0 x 2,5m, abertas na área experimental e, em seguida, cobertos com cal e terra. Os efluentes da lavagem das baias foram descartados em fossa séptica exclusiva para as baias de inoculação (Figura 10).



Figura 10 Local de alojamento dos animais durante o experimento no LANAGRO (A) visão externa das baias; (B) visão interna do corredor que dá acesso às baias; (C) visão interna de uma das baias.

Devido ao longo período de manutenção em área fechada os animais foram suplementados com vitaminas A, D e E por via intramuscular. Eram oferecidas duas refeições diárias para os animais, compostas cada uma por 10 kg de feno de Tyfton tipo B e 1,5 kg de ração para vacas em lactação, com 22 a 24% de proteína bruta. O sal mineral foi fornecido à vontade, calculando-se aproximadamente 50 g por animal por dia. A água era fornecida *ad libidum*.

O experimento foi realizado de acordo com as normas do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), registrado sob o número CETEA - 167/2009. A marcação dos animais foi realizada por brinco na orelha direita, as vacas foram identificadas como 5, 6, 13, 14, 15, 22, 25, 58, 62 e 65.

3.2. Seleção dos animais

Para o experimento foram selecionadas dez vacas mestiças em lactação, sem bezerro ao pé e apresentando a pele dos tetos e úbere íntegra. Soros dos animais foram coletados, e previamente submetidos ao teste de soroneutralização por redução do número de placas para detecção de anticorpos neutralizantes anti-VACV, de acordo com

Leparc-Goffart e colaboradores (2005), com modificações (Capítulo I, item 3.3.1.2). Todas as vacas selecionadas eram oriundas de propriedades sem relatos de VB há pelo menos dez anos e soronegativas para VACV, pois apresentavam título de AN inferiores a 20.

3.3. Delineamento do experimento

O experimento foi dividido em duas partes: 1- infecção inicial; 2 - após infecção inicial, e total recuperação clínica, os animais foram divididos em dois grupos, sendo um re-inoculado com o VACV e outro imunossuprimido (Figura 11). Ao total, o experimento envolveu 10 animais. Na infecção inicial foram utilizadas oito vacas, e na segunda parte, as vacas foram divididas em dois grupos, o primeiro com quatro vacas (grupo da imunossupresão) e o segundo com cinco vacas (grupo da reinfeção), sendo que para tanto foram utilizadas sete vacas da primeira parte do experimento e outras duas vacas que participaram de um pré-experimento realizado nove meses antes deste.

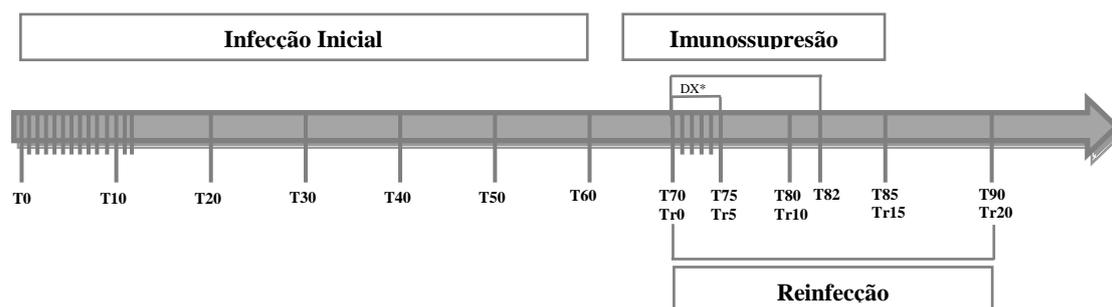


Figura 11 Delineamento experimental com infecção inicial, tratamento imunossupressor e reinfecção de vacas lactantes com VACV-GP2. *Dx: Dexametasona, Tr: Tempo após reinfecção.

3.3.1. Infecção inicial

Para a inoculação, os tetos foram limpos e então escarificados com auxílio de uma lixa do tipo esmeril número 4 (JX-41, Lixas Doble A, Argentina), a pele de três tetos foram inoculadas com 50 μ L de suspensão viral contendo 10⁶ unidades formadoras de placa (UFP) de GP2V. O teto posterior esquerdo foi reservado como controle negativo da inoculação.

3.3.2. Imunossupressão

Com 69 dias após a inoculação (d.p.i), quatro dos animais que participaram da infecção inicial foram imunossuprimidos através da administração por via intramuscular de 0,1 mg de dexametasona/kg de peso vivo durante cinco dias seguidos, conforme descrito por Iketani e colaboradores, (2002).

3.3.3. Reinfecção

No 70° d.p.i., cinco animais foram re-inoculados com o mesmo vírus e da mesma maneira como descrito para a infecção inicial no item 3.3.1. Três desses animais foram oriundos do grupo da infecção inicial, enquanto dois animais foram incorporados ao grupo da reinfecção após serem

submetidos a inoculação inicial em um pré-experimento realizado nove meses antes deste experimento. Neste pré-experimento os tetos escarificados das vacas foram escarificados o com auxílio de agulha hipodérmica em local delimitado na área central de cada teto (Rehfeld, 2011).

3.4. Coleta das amostras

As amostras de soro foram coletadas diariamente com o uso de tubo vacutainer, que foram mantidos sem refrigeração até completa coagulação. Posteriormente foram centrifugadas e divididas em alíquotas, em tubos tipo eppendorf de 1,5 mL adequadamente identificados, e posteriormente armazenados a -20°C em no Laboratório de Pesquisa em Virologia Animal, da Escola de Veterinária da UFMG.

3.5. Imunoperoxidase em Monocamada Celular (IPMC)

Todas as amostras coletadas foram testadas para detecção e titulação de IgG total contra o VACV pela técnica de IPMC (Gerber et al., 2012). Os títulos de anticorpos foram expressos em log₂, correspondendo assim: 20= 4,32; 60= 5,90; 180= 7,49; 540= 9,07; 1620= 10,66 e 4860= 12,24.

3.5.1. IPMC para detecção de IgG1 e IgG2 bovina anti-VACV

As amostras de soro coletadas no período da infecção inicial e da reinfecção foram submetidas ao teste de IPMC para detecção de IgG1 e IgG2 bovina anti-VACV. Para a realização deste teste, foi utilizado o protocolo de IPMC descrito por Gerber e colaboradores (2012) com modificações. Para detecção de IgG1 e IgG2 bovina anti-VACV, diluições seriadas dos soros, na base 3 (1:20 a 1:4860), foram realizadas em PBS-Tween 20 0,05% (PBS-T) com 0,2% de caseína, e 50µL de cada diluição foram dispensados nas placas fixadas, contendo células Vero infectadas com VACV-WR. As placas foram incubadas por 1 hora à 37°C e depois lavadas com solução PBS-T.

Posteriormente, quando pesquisadas IgG1 bovina anti-VACV, 40 µL de anticorpo policlonal ovino anti-IgG1 bovina conjugado com peroxidase (Bethyl® A101-116P), diluído 1:50 em PBS foram utilizados, e para detecção de IgG2 bovina anti-VACV, foi utilizado o anticorpo policlonal ovino anti-IgG2 bovina conjugado com peroxidase (Bethyl® A101-117P) na mesma diluição.

Os títulos de IgG1 e IgG2 anti-VACV foram expressos em \log_2 , correspondendo assim: 20= 4,32; 60= 5,90; 180= 7,49; 540= 9,07; 1620= 10,66 e 4860= 12,24.

3.6. Soroneutralização por redução do número de placas

Os AN anti-VACV foram detectados e titulados, a partir de diluições na base 2 (1:20 a 1:160) por PRNT, de acordo com Leparc e colaboradores (2005), com modificações (Capítulo I, item 3.3.1.2). Amostras com título de AN anti-VACV igual ou superior a 20 foram consideradas positivas.

3.7. Análise Estatística

O teste de normalidade Shapiro-Wilk foi utilizado para avaliar a distribuição dos dados. O teste de Kruskal-Wallis, com 95% de intervalo de confiança, foi utilizado para comparar os dados de IgG total, AN, IgG1 e IgG2 contra o VACV ao longo do período de infecção inicial. Para detectar diferenças entre os títulos de IgG1 e IgG2 no período da infecção inicial foi utilizado o teste de Friedman. Os resultados foram considerados significativos quando valor de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Infecção Inicial

Após a inoculação do VACV-GP2 nos tetos das vacas em lactação, todas desenvolveram lesões compatíveis com a infecção por VACV nos tetos (pápulas, vesículas e úlceras), e a infecção foi confirmada através do isolamento viral em cultivo de células da linhagem BSC-40, das crostas oriundas dessas lesões. O curso clínico das lesões, da formação de pápulas até a cicatrização, teve a duração média de 18 dias (Figura 12) (Rehfeld, 2011).



Figura 12 Inoculação e evolução das lesões nos tetos das vacas lactantes experimentalmente inoculadas com VACV-GP2. (A) Escarificação e inoculação do VACV GP2 no teto; (B) Vesícula e pápula (4º d.p.i.); (C) Úlcera e crosta (8º d.p.i).

A resposta imune humoral das vacas experimentalmente inoculadas com VACV-GP2 foi avaliada pela titulação de IgG total, AN, IgG1 e IgG2 anti-VACV. A presença de IgG total foi detectada em uma vaca no 8º d.p.i., e a partir do 10º d.p.i, todas

apresentavam IgG total contra o VACV. O pico de IgG total em relação ao dia 0 foi observado a partir do 16º d.p.i, e permaneceu em níveis altos até o 60º d.p.i (Figura 13).

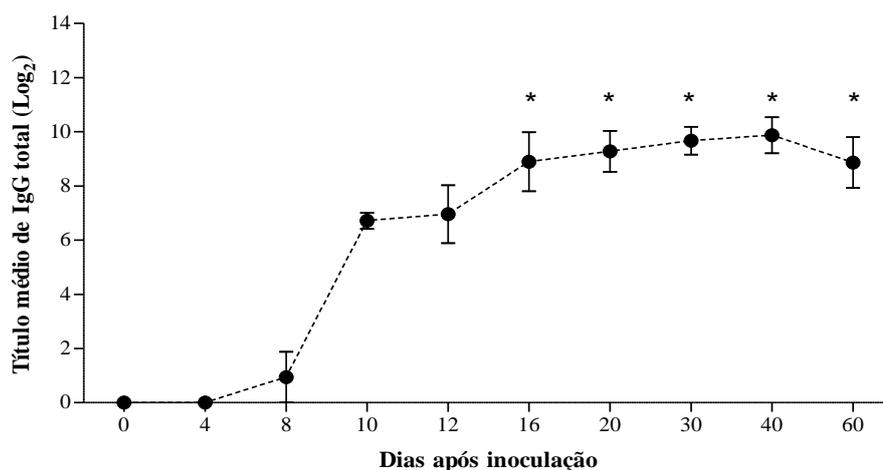


Figura 13 Média de IgG total anti-VACV das oito vacas experimentalmente inoculadas com VACV-GP2, e acompanhadas até o 60º d.p.i. As barras verticais indicam o erro padrão da média. Os tempos indicados com (*) representam diferença estatística em relação à média observada no dia 0.

Os títulos médios de IgG total detectados no primeiro e segundo meses após a infecção por VACV em vacas experimentalmente infectadas foi semelhante ao observado nas vacas naturalmente infectadas, descrito no capítulo II. Em vacas naturalmente infectadas observamos que o pico de IgG

total ocorre no primeiro mês de infecção, e que se mantém elevado até aproximadamente cinco meses após o surto (Capítulo II, Figura 6). Os dados obtidos nas vacas experimentalmente infectadas corroboram com os obtidos nas vacas naturalmente infectadas no campo.

AN anti-VACV foram detectados em sete das oito vacas inoculadas a partir do 16ºd.p.i, coincidindo com o pico inicial de IgG total. Nos demais dias, o título de AN variou entre 20 e 80 na maioria dos animais,

apenas a vaca 15, no 40ºd.p.i apresentou título de AN igual a 160. Não foi detectado AN no soro da vaca 14 até o 60ºd.p.i. (Figura 14).

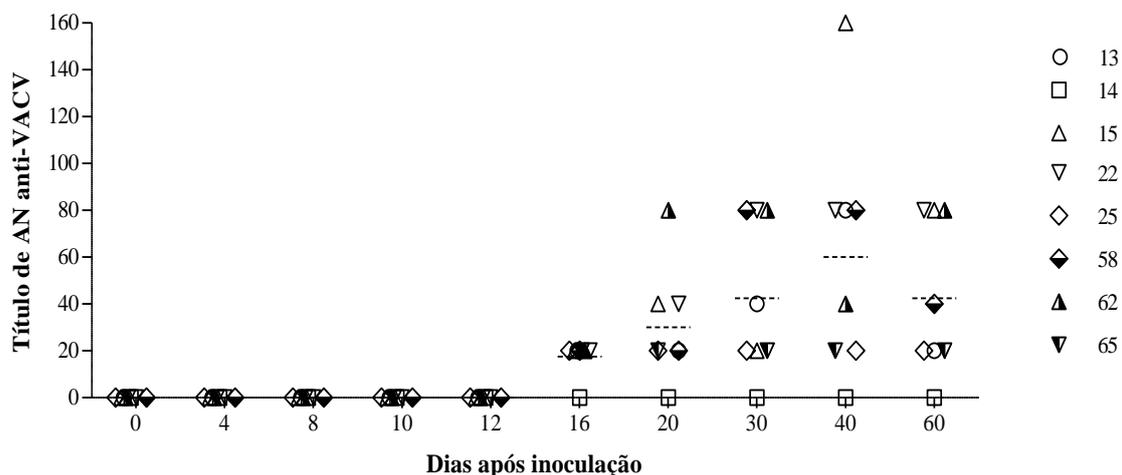


Figura 14 Título de AN anti-VACV, do dia 0 até o 60ºd.p.i, das oito vacas inoculadas experimentalmente com o VACV-GP2. Cada vaca está representada por um símbolo. Linha pontilhada demonstra a média de AN anti-VACV ao longo do período estudado.

Resultados semelhantes de IgG total e AN anti-VACV foram observados em outros estudos realizados em camundongos e humanos imunizados com vacinas de VACV atenuadas. Em camundongos a detecção de IgG ocorreu no 7º d.p.i, com pico a partir do 14ºd.p.i; AN foram identificados no 20º d.p.i e persistiram, assim como a IgG total, por mais de três meses (Spriggs et al., 1992, Xu et al., 2004, Coulibaly et al., 2005).

Em humanos foi possível detectar IgG total e AN anti-VACV a partir do 14ºd.p.i e o pico da resposta humoral foi observado no

primeiro mês após a vacinação (McClain et al., 1997, Greenberg et al., 2005). A resposta humoral em humanos é muito duradoura, sendo possível detectar AN de 20 até 75 anos após a vacinação (McCarthy et al., 1958, Hammarlund et al., 2003).

Quando avaliamos separadamente as subclasses IgG1 e IgG2, observamos que a IgG1 é detectada anteriormente à IgG2, e se mantém mais elevada até o 20ºd.p.i, quando não é mais observada diferença significativa entre o título médio de IgG1 e IgG2 (Figura 15).

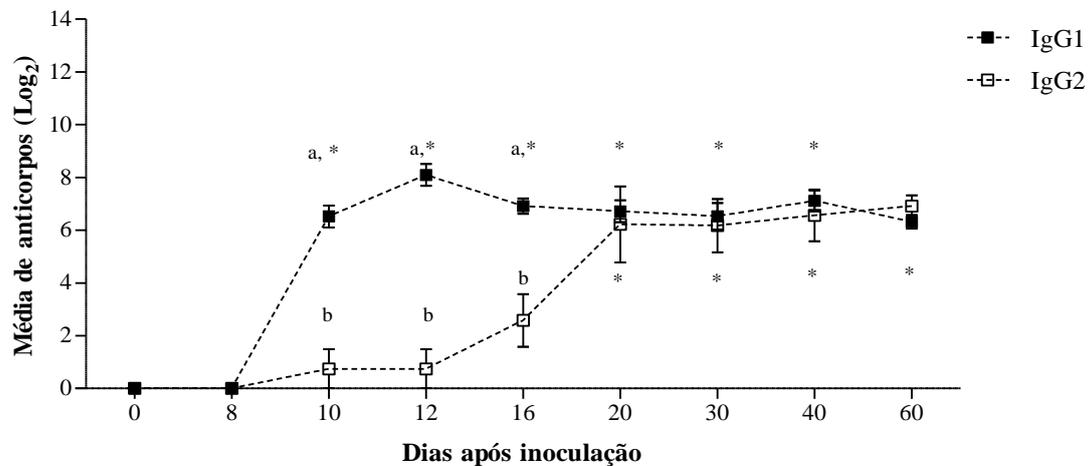


Figura 15 Título médio de IgG1 e IgG2 anti-VACV, do dia 0 até o 60ºd.p.i, de vacas experimentalmente inoculadas com o VACV-GP2. Barras verticais indicam o erro padrão da média. Letras diferentes (a,b) indicam diferença estatística entre os grupos IgG1 e IgG2. Os tempos indicados com (*) representam diferença estatística em relação à média observada no dia 0 para cada grupo.

No 10º d.p.i, todas as vacas já apresentavam IgG1, e os títulos desta imunoglobulina foram homogêneos ao longo do período estudado e entre as vacas.

Em relação a IgG2, até o 12ºd.p.i, apenas uma vaca apresentava imunoglobulina desta subclasse, e com título igual a 60. No 16ºd.p.i, quatro vacas apresentavam IgG2, e a partir do 20º d.p.i, foi detectado IgG2 em sete das oito vacas. Apenas no 60ºd.p.i, e com título baixo, igual a 20, foi detectada IgG2 anti-VACV no soro da vaca 14.

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, IgG total pode ser detectada precocemente em relação aos AN e IgG2, assim como a IgG1. O aumento do número de animais positivos para IgG2 coincidiu com a detecção de anticorpos neutralizantes nas vacas experimentalmente infectadas. A vaca 14, que não apresentou AN ao longo dos 60 d.p.i, também não apresentou IgG2

anti-VACV até o 40ºd.p.i, e quando detectado IgG2 no 60ºd.p.i, esta imunoglobulina apresentava baixo título, 20.

Entre o primeiro e o 60º d.p.i foi possível detectar, intermitentemente, DNA viral no sangue de todas as vacas experimentalmente infectadas com VACV-GP2. O período com maior frequência de detecção do DNA viral no sangue das vacas experimentalmente inoculadas foi entre o 8º e 15º d.p.i. (Rivetti Jr., 2012), período em que foi possível detectar maior número de vacas soropositivas e aumento no título de IgG total, mas ainda com ausência de AN.

A partir da detecção de AN, no 20ºd.p.i, não foi mais detectado DNA viral no sangue das vacas 13, 15, 22 e 65. DNA viral foi detectado apenas mais uma vez no sangue da vaca 25 (50º d.p.i) e mais duas vezes no sangue das vacas 58, (33º e 56º d.p.i) e 62 (25ºd.p.i e 60º d.p.i.). Apesar da não

identificação de AN no soro da vaca 14, DNA viral foi detectado apenas por quatro vezes no sangue deste animal (2°, 10°, 14° e 29° d.p.i) (Rivetti Jr., 2012).

Em relação ao desenvolvimento e cicatrização das lesões nos tetos das vacas, causadas pelo VACV-GP2, entre o 3° e 5°d.p.i, começaram a surgir vesículas e pápulas nos tetos inoculados. No 5° d.p.i todas as vacas apresentavam lesões ulcerativas em pelo menos um teto inoculado. Crostas foram observadas entre o 6° e 10° d.p.i, e a partir do 18°d.p.i., as lesões entraram no estágio de cicatrização. A resolução completa das lesões ocorreu entre o 22° e o 27°d.p.i. (Rehfeld, 2011), quando AN já eram identificados em sete dos oito animais.

Xu e colaboradores (2004) observaram em camundongos experimentalmente inoculados com VACV-WR, que após a infecção aguda, anticorpos específicos representam o mecanismo efetor mais importante para debelar a infecção e evitar a replicação viral. E como demonstrado, o estágio de cicatrização das lesões (18°d.p.i) se inicia juntamente com o aparecimento de anticorpos neutralizantes e IgG2 anti-VACV. Em bovinos, a função da IgG2 está

geralmente atribuída como a mais importante opsonina para ativação de fagocitose por neutrófilos e macrófagos (Tizard, 2008).

4.2. Imunossupressão

A imunossupressão foi realizada nos animais 14, 22, 25 e 58, a partir do 69° d.p.i. Estes animais foram acompanhados com o objetivo de estudar o comportamento viral em vacas infectadas e imunossuprimidas experimentalmente, após a recuperação dos sinais clínicos. A diminuição do número de linfócitos foi observada a partir do 1° d.p.im (dia após imunossupressão), com identificação de linfopenia a partir do 5° d.p.im, comprovando a imunossupressão (Rehfeld, 2011).

A resposta imune destes animais foi avaliada pela titulação de IgG total e AN. Os dados obtidos na infecção inicial (40° e 60° d.p.i) foram utilizados para melhor observação dos títulos de anticorpos das quatro vacas, anteriormente à imunossupressão.

Antes da imunossupressão, apenas a vaca 14 não apresentava AN específicos contra o VACV. Este resultado se manteve após os cinco dias de aplicação de dexametasona, e mesmo até o 12° d.p.im (Figura 16).

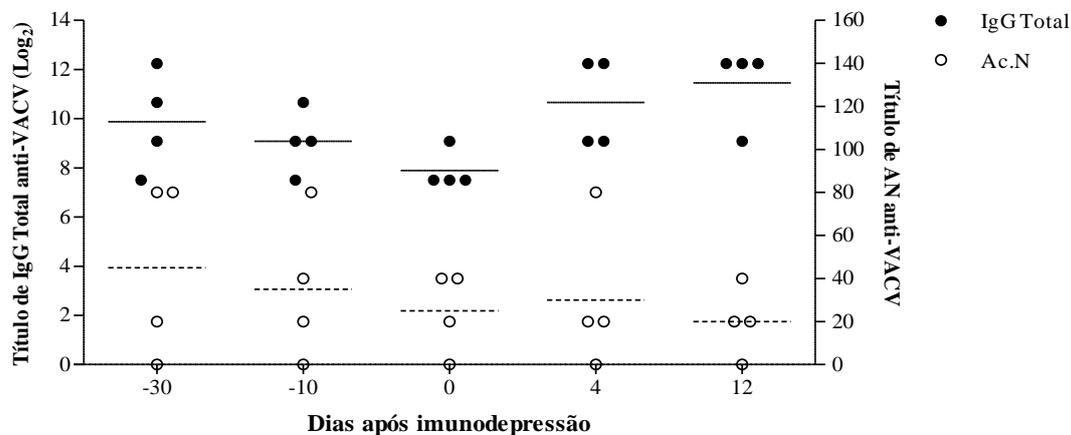


Figura 16 No eixo vertical da esquerda observa-se o título de IgG total, expresso em \log_2 das quatro vacas (14, 22, 25 e 58) inoculadas e imunossuprimidas com dexametasona. O eixo vertical da direita mostra o título de AN das mesmas vacas. Estão representados no gráfico os tempos: -30 d.p.im (40º d.p.i), -10 d.p.im (60 d.p.i), 0 d.p.im (69 d.p.i), 4 d.p.im (73º d.p.i) e 12 d.p.im (81º d.p.i). Linha cheia indica a média de IgG total anti-VACV, linha pontilhada indica a média de AN anti-VACV.

No 4º d.p.im foi observado um aumento no título de IgG total no soro das quatro vacas imunossuprimidas com dexametasona, apesar destes animais estarem com linfopenia neste período.

Não foi observada nenhuma lesão nos tetos das vacas após a imunossupressão, porém a elevação do título de IgG total anti-VACV pode indicar uma nova circulação viral, evidenciada pela detecção de DNA viral no sangue destes animais entre o 3º e o 12º d.p.im (Rivetti Jr., 2012). E para complementar estas evidências, uma lesão ulcerativa na mucosa oral das vacas 14 e 58 foi observada no 5º e 8º d.p.im, respectivamente, e o DNA viral foi detectado em suabes das lesões (Rehfeld, 2011).

Sentsui e colaboradores (1999), após a administração de interferon gama, conseguiram através de sorologia, PCR e identificação por microscopia eletrônica demonstrar a presença de um parapoxvírus

bovino no sangue de uma vaca sem sinais clínicos. Com isso, sugeriram que os parapoxvírus são capazes de causar infecção persistente em vacas sem sinais clínicos e que o vírus pode ter sua replicação ativada por fatores capazes de induzir modificações nas reações imunológicas.

Outro caso de infecção persistente por poxvírus foi relatado por Pahlitzsch e colaboradores (2006). Após infecção por CPXV, uma criança desenvolveu lesão edematosa na região da narina direita. O processo de cicatrização da lesão foi prolongado com numerosas áreas de linfadenite, e em um nódulo persistente que foi retirado dois anos após o início das lesões, onde constatou-se a presença do DNA de CPXV.

Neste trabalho podemos identificar indícios de replicação viral, por aumento no título de IgG total anti-VACV e pela presença de DNA viral no sangue e em lesões ulcerativas na mucosa oral de duas vacas após a indução

da imunossupressão, que ocorreu 69 dias após a infecção experimental com o VACV-GP2. Estes dados são sugestivos de persistência viral após cicatrização completa das lesões nos tetos, causadas pela infecção inicial, e indicam que diante de fatores como estresse e outros capazes de alterar as condições imunológicas pode ocorrer multiplicação viral, com manifestações clínicas diferentes da observada na infecção inicial.

4.3. Reinfecção

A reinoculação dos animais foi realizada da mesma maneira que a infecção inicial, descrita no item 3.3.1. Para reinfecção foram utilizados cinco animais, divididos em dois grupos. O grupo I foi formado por duas vacas (5 e 6) re-inoculadas após 270 dias da primeira infecção, e o grupo II composto por três vacas (13, 15 e 65) que foram re-inoculadas no 70º d.p.i.

Nas duas vacas do grupo I, vesículas e pápulas foram observadas no 2º dia após a reinfecção (d.p.r), e em duas vacas do grupo II (15 e 62), estas lesões foram observadas no 4º e 5º d.p.r, respectivamente. A

resolução das lesões ocorreu no 9ºd.p.r nas vacas do grupo II e no 10ºd.p.r no grupo I (Rehfeld, 2011). As lesões do grupo II foram menores e as úlceras evoluíram para crosta mais rapidamente quando comparadas com as lesões observadas no grupo I (Figura 17).

Para avaliação da resposta imune humoral destes animais diante de uma reinfecção, IgG total, IgG1, IgG2 e AN foram titulados por até 20 d.p.r. Para melhor compreensão da dinâmica da resposta imune, foram utilizados os dados da infecção inicial de cada animal, até 10 dias antes da reinfecção, o que para o grupo I representa 260 d.p.i e para o grupo II, 60 d.p.i.

Ao avaliarmos as amostras de soro do grupo I observamos que dez dias antes e no dia da reinfecção nenhuma das duas vacas apresentavam IgG total ou AN. Este resultado persistiu até o 5º d.p.r, e a partir do 10º d.p.r foram detectados IgG total e AN nas vacas do grupo I. Nos soros das vacas do grupo II, tanto IgG total como AN estavam presentes desde 10 dias antes da reinfecção. E não foram observadas diferenças significativas nos títulos destes anticorpos até o 20ºd.p.r. (Figura 18).

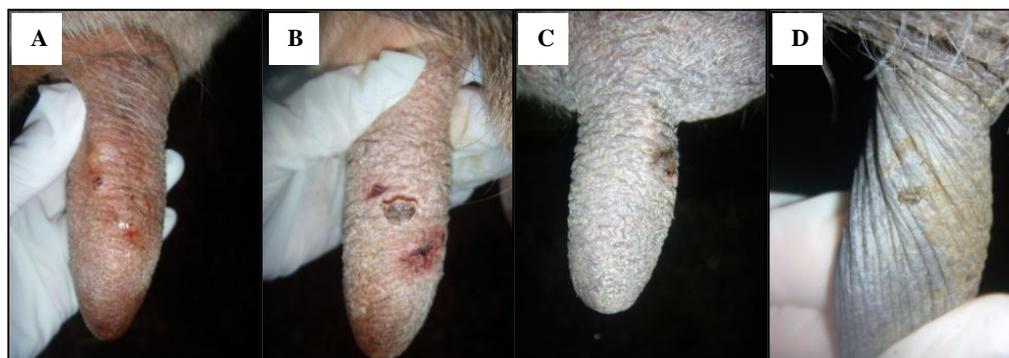


Figura 17 Lesões observadas nos tetos das vacas experimentalmente re-infectadas com VACV-GP2. Lesões nos tetos da vaca 6, do grupo I no 4º d.p.r (A) e 10ºd.p.r (B); lesões observadas na vaca 62, do grupo II no 4º d.p.r (C) e 8º d.p.r (D).

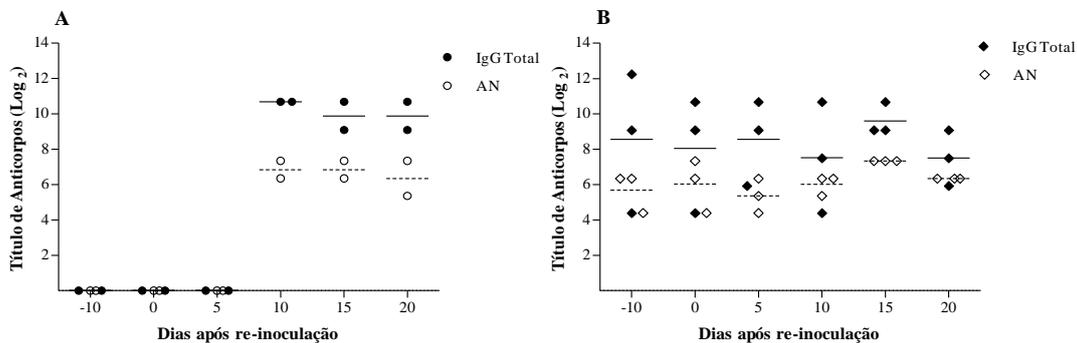


Figura 18 Título de IgG total e AN anti-VACV das vacas re-inoculadas com VACV-GP2, expressos em \log_2 . No gráfico (A) estão representadas as duas vacas do grupo I, no gráfico (B) as três vacas do grupo II. Círculos pretos mostram o título de IgG total, e círculos sem preenchimento mostram os títulos de AN. As médias de IgG ao longo do período estudado estão representadas por linhas cheias, as linhas pontilhadas representam a média de AN.

A avaliação das subclasses de IgG mostrou que, mesmo sem a presença de anticorpos no dia da reinoculação do VACV-GP2, no 5º d.p.r. IgG1 foi detectada em uma vaca do grupo I (Figura 19), mais precocemente que na infecção inicial.

No grupo II observamos a presença de IgG1 e IgG2 em títulos equivalentes até o dia da reinoculação. A média do título de IgG1 apresenta um discreto aumento no entre o 5º e 10º d.p.r, e segue em posterior declínio até o 20º d.p.r. (Figura 19). Uma observação interessante nos dados de IgG2, é que do 5º

ao 10º d.p.r no soro da vaca 13, que não apresentou lesões características nos tetos na reinfecção, não foi detectado IgG2 anti-VACV. E a partir do 15º d.p.r o título desta subclasse de IgG sobe para 60. No 20º d.p.r, IgG2 não foi detectada na vaca 15.

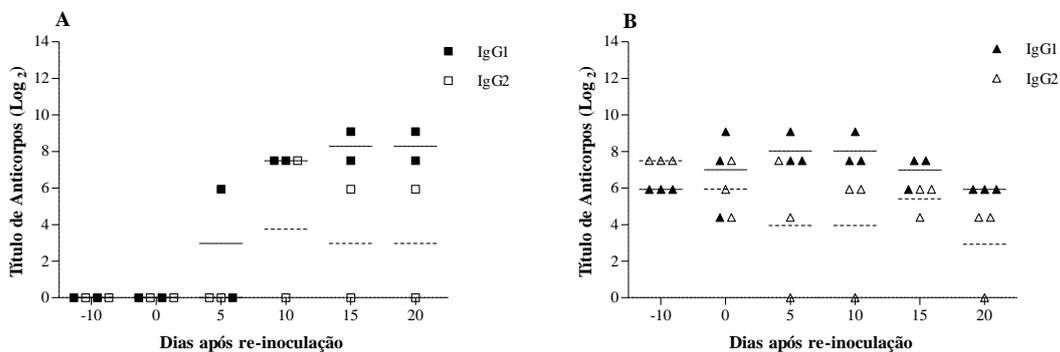


Figura 19 Título de IgG1 e IgG2 anti-VACV das vacas re-inoculadas com VACV-GP2, expressos em \log_2 . No gráfico (A) estão representadas as duas vacas do grupo I, no gráfico (B) as três vacas do grupo II. Quadrados pretos mostram o título de IgG1, e quadrados sem preenchimento mostram os títulos de IgG2. As médias de IgG1 ao longo do período estudado estão representadas por linhas cheias, as linhas pontilhadas representam a média de IgG2.

A detecção de anticorpos no grupo I, que não apresentava anticorpos no dia da reinoculação, ocorreu anteriormente à observada na infecção inicial descrita neste trabalho, o que sugere a presença de células B de memória. Quando expostas ao antígeno, estas células proliferam e se diferenciam em plasmócitos para secreção de anticorpos. DNA viral foi detectado no sangue das vacas 5 e 6 nos 3º e 2º d.p.r., respectivamente (Rivetti Jr., 2012). A expressão de IgG1 bovina é positivamente regulada pela presença de IL-4, que é secretada por linfócitos Th2, que apresentam uma resposta ótima aos antígenos apresentados pelas células dendrítica mielóides e linfócitos B (Estes et al., 1995). A detecção precoce de IgG1, a partir do 5º d.p.r., no grupo I, sugere que o contato de células de memória com o antígeno tenha ocorrido no início da reinfecção.

Independente da presença de anticorpos específicos contra o VACV, quatro das cinco vacas reinfetadas com o VACV-GP2 apresentaram lesões após a reinfecção nas

condições experimentais estudadas. Os animais reinoculados após 270 dias manifestaram lesões mais severas e mais distribuídas, que nas vacas do grupo II, reinoculadas no 70º d.p.i.

A manifestação clínica mais branda e menor período de curso da doença clínica nos animais do grupo II em relação à infecção inicial e aos animais do grupo I, pode ser explicada pelos altos níveis de IgG total e neutralizantes observados nestas vacas, que promoveram uma proteção parcial contra o vírus.

Porém, independentemente do tempo após a primeira infecção e da presença inicial de anticorpos no momento da reinfecção, em todas as vacas, as lesões observadas na reinfecção foram menores, com fase ulcerativa mais branda do que nos animais inoculados pela primeira vez (Rehfeld, 2011).

No estudo da resposta imune humoral de vacas naturalmente infectadas (Capítulo II) observamos que o perfil da resposta humoral é caracterizado pela persistência, por mais de um ano, de anticorpos mesmo que em baixos títulos, na maioria dos animais, e que como não foram observadas vacas doentes nas propriedades mesmo após 15 meses da ocorrência do surto de VB, a presença de anticorpos parece ser um fator importante para o controle da doença no rebanho, e pode estar relacionado à proteção contra a manifestação clínica clássica da VB, com lesões ulcerativas nos tetos das vacas em lactação.

Estudos realizados em camundongos e primatas demonstraram que a presença de anticorpos é importante na proteção contra uma reinfeção por OPXV. A presença de anticorpos policlonais específicos contra o VACV é capaz de prevenir a morte de camundongos e primatas inoculados com doses letais (Galmiche et al., 1999; Xu et al., 2004; Edghill-Smith et al., 2005). Estes dados corroboram com os achados clínicos e da resposta humoral de vacas em lactação observados neste trabalho.

5. CONCLUSÕES

- Foi possível identificar a presença da resposta imune humoral em vacas experimentalmente infectadas com VACV-GP2, com detecção de anticorpos da classe IgG a partir do 10º d.p.i., que persistiram até o 60ºd.p.i.
- Anticorpos da classe IgG1 foram identificados anteriormente aos da classe IgG2.
- Anticorpos neutralizantes e IgG2 foram detectados na maioria dos animais a partir do 16ºd.p.i., coincidindo com o período em que se inicia o processo de cicatrização das lesões nos tetos.
- Após a imunossupressão, foi observada uma pequena elevação no título de IgG total, o que sugere uma infecção persistente pelo VACV.
- IgG total, IgG1, IgG2 e AN foram detectados precocemente após a reinfeção em comparação com a infecção inicial, em animais re-infectados que não apresentavam estas Igs no momento da re-inoculação.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho foi dividido em três capítulos. No capítulo inicial foi descrita a padronização e validação da técnica de imunoperoxidase em monocamada celular para identificação de anticorpos da classe IgG específicos contra o VACV. O desenvolvimento desta técnica nos possibilitou realizar estudos sobre a resposta imune humoral de bovinos infectados com o VACV de forma natural e experimental.

No segundo capítulo identificamos o perfil da resposta imune humoral de vacas em lactação e seus bezerros lactentes naturalmente infectados pelo VACV em surtos ocorridos em propriedades produtoras de leite. Verificamos que o pico de anticorpos da classe IgG ocorre no primeiro mês de infecção, e que é possível detectá-los, mesmo que em títulos mais baixos, até um ano após a ocorrência dos surtos nas propriedades.

A terceira parte do trabalho, descrita no capítulo III, foi desenvolvida para avaliarmos adequadamente a resposta imune humoral contra o VACV em vacas em lactação, desencadeada nos primeiros dias até dois meses após a infecção inicial, e a resposta humoral obtida após a imunossupressão e reinfecção destas vacas. Os resultados obtidos neste experimento nos mostrou a dinâmica inicial de resposta humoral contra o VACV, a curva da resposta de AN, IgG total e das subclasses IgG1 e IgG2. Vimos ainda que a presença de anticorpos protege parcialmente as vacas imunossuprimidas e reinfetadas da manifestação clínica da VB.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABRAHÃO, J. S.; OLIVEIRA, T. M.; CAMPOS, R. K. *et al.* Bovine vaccinia outbreaks: detection and isolation of *Vaccinia virus* in milk samples. *Foodborne Path. Dis.*, n.6, p.1141-1146, 2009a.
2. ABRAHÃO, J.S., GUEDES, M.I.M.; TRINDADE, G.S. *et al.* One more piece in the VACV ecological puzzle: Could peridomestic rodents be the link between wildlife and bovine vaccinia outbreaks in Brazil? *PLoS ONE*, v.4, n.10, p.e7428, 2009b.
3. AMANNA, I.J, SLIFKA, M.K, CROTTY, S. Immunity and immunological memory following smallpox vaccination. *Immun. Rev.* v.211, p.320-337, 2006.
4. BAXBY, D.; OSBORNE, A.D. Antibody studies in natural bovine cowpox. *J. Hyg.*, v.83, p.425-428, 1979.
5. BENHIA, M.; MCCAUSLAND, M.M.; MOYRON, J. *et al.* Vaccinia virus extracellular enveloped virion neutralization in vitro and protection in vivo depend on complement. *J Virol.*, v.83, p.1201-1215, 2009.
6. BLOOD, D. C.; RADOSTITS, O. M. *Doenças causadas por vírus e clamídias*. 7a ed, Rio de Janeiro: Guanabara, 1991. In: Clínica Veterinária. cap. 21, p.1737.
7. BORGES M.B.; KATO S.E.; DAMASO C.R. *et al.* Accuracy and repeatability of a micro plaque reduction neutralization test for vaccinia antibodies. *Biologicals* v.36,p.105-110, 2008.
8. BREMAN, J.G.; HENDERSON, D.A. Diagnosis and management of smallpox. *N. Engl. J. Med.*, v.346, p.1300-1308, 2002.
9. BRUM, M.C.S.; DOS ANJOS, B.L.; NOGUEIRA, C.E.W. *et al.* An outbreak of orthopoxvirus-associated disease in horses in southern Brazil. *J. Vet. Diagn. Invest.* 22(1):143-7, 2010.
10. BULLER, R.M.; PALUMBO, G.J. Poxvirus pathogenesis. *Microbiol. Rev.*, v.55, n.1, p.80-122, 1991.
11. CAMPOS, M. A. S.; KROON, E. G. Critical period for reversible block of *Vaccinia virus* replication. *Rev. Brasil. Microbiol.*, n.24, p.104-110, 1993.
12. CAMPOS, R.K.; BRUM, M.C.S.; NOGUEIRA, C.E.W. Assessing the variability of Brazilian Vaccinia virus isolates from a horse exanthematic lesion: coinfection with distinct viruses. *Arch. Virol.*v.156, p. 275-283, 2-11.
13. CARGNELUTTI, J.F.; SCHMIDT, C.; MASUDA, E.K. *et al.*, Vaccinia viruses isolated from cutaneous disease in horses are highly virulent for rabbits, *Microb. Pathog.*, v.52, n.3, p.192-199, 2012.
14. CHAPMAN, J.L.; NICHOLS, D. K.; MARTINEZ, M. J. *et al.* Animal Models of Orthopoxvirus Infection. *Vet. Pathol.*, v. 47, p.852, 2010.
15. COHEN, M.E., XIAO, Y., EISENBERG, R.J. *et al.* Antibody against extracellular Vaccinia virus (EV) protects mice through

- complement and Fc Receptors. *Plos one*, v.6, n.6, p.e20597, 2011.
16. CONDIT, R.C.; MOUSSATCHE, N.; TRAKTMAN, P. In a nutshell: structure and assembly of the vaccinia virion. *Adv Virus Res*, v.66, p.31–124, 2006.
 17. COULIBALY, S. BRUHL, P., MAYRHOFER, J. et al. The nonreplicating smallpox candidate vaccines defective vaccinia Lister (dVVL) and modified vaccinia Ankara (MVA) elicit robust long-term protection. *Virology*, v.341, p.91-101, 2005.
 18. D'ANUNCIACÃO, L.; GUEDES, M.I.M.C. ; OLIVEIRA, T.L. et al.. Filling One More Gap: Experimental Evidence of Horizontal Transmission of Vaccinia Virus Between Bovines and Rodents. *Vector borne zoonotic dis.*, v.12 , p.61-64, 2012.
 19. DA SILVA, A. C.; REIS, B. B.; RICCI JUNIOR, J. E. R. et al. Infecção em humanos por varíola bovina na microrregião de Itajubá, Estado de Minas Gerais: relato de caso. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.41, n.5, p.507-511, 2008.
 20. DAMASO, C.R.A.; ESPOSITO, J.J.; CONDIT, R.C. et al. An emergent poxvirus from humans and cattle in Rio de Janeiro State: Cantagalo vírus may derive from Brazilian smallpox vaccine. *Virology*, v. 277, p.439-449, 2000.
 21. DAMASO, C.R.A.; REIS, S.A.; JESUS, D.M. et al. A PCR-based assay for detection of emerging vaccinia-like viruses isolated in Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis.*, v.57, n.1, p.39-46, 2007.
 22. DINIZ, S.; TRINDADE, G. S.; FONSECA, F. G. et al. Surto de varíola murina em camundongos suíços em biotérios – Relato de caso. *Arq. Med. Vet. e Zootec.*, v.53, n.2, p.152-156, 2001.
 23. DONATELE, D. M.; TRAVASSOS, C. E. P. F.; LEITE, J. A. et al. Epidemiologia da poxvirose bovina no Estado do Espírito Santo, Brasil. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v. 44, p. 275-282, 2007.
 24. DRUMOND, B. P.; LEITE, J. A.; FONSECA, C. A. et al. Brazilian Vaccinia virus strains are genetically divergent and differ from the Lister vaccine strain. *Microbes Infect.*, v.10, n.2, p.185- 197, 2008.
 25. EDGHILL-SMITH, Y.; GOLDING, H.; MANISCHEWITZ, J. et al. Smallpox vaccine-induced antibodies are necessary and sufficient for protection against monkeypox virus. *Nat Med.* v.11, p. 740–747, 2005.
 26. ESPOSITO, S.; FENNER, F. Poxviruses. In: Fields B.N.; Knipe, D.M.; HOWLEY, P.M., editors. *Fields virology*, 4o ed, vol 2. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins; p. 2885–2921, 2001.
 27. ESSBAUER, S.; PFEFFER, M.; MEYER, H. Zoonotic poxviruses. *Vet. Microbiol.* v.140, p. 229-236, 2010.
 28. ESTEBAN, D.J.; BULLER, R.M. *Ectromelia virus*: the causative agent of mousepox. *J. Gen. Virol.*, v.86, p.2645-59, 2005.
 29. ESTES, D.M.; HIRANO, A.; HEUSSLER, V.T. et al. Expression and biological

- activities of bovine interleukin 4: effects of recombinant bovine interleukin 4 on T cell proliferation and B cell differentiation and proliferation in vitro. *Cell. Immunol.*, v.163, p.268-279, 1995.
30. FENNER, F.; WITTEK, R.; DUMBELL, K.R. The Pathogenesis, pathology, and immunology of orthopoxvirus infections. In: *The Orthopoxviruses*, p 85-141. San Diego, CA: Academic Press. 1989.
 31. FERREIRA, J. M. S.; DRUMOND, B. P.; GUEDES, M. I. M. C. et al. Virulence in murine model shows the existence of two distinct populations of Brazilian Vaccinia virus strains. *PLoS ONE*, v.3, n.8, p.1-10, 2008.
 32. FLORES, E.D.; KREUTZ, L.C. Replicação viral. In: FLORES, E.D. (org.), *Virologia Veterinária*. Ed. UFSM. Santa Maria/RS, 2007, Cap. 05, p.109-134.
 33. FONSECA, F. G.; TRINDADE, G. S.; SILVA, R. L. et al. Characterization of vaccinia-like virus isolated in a Brazilian forest. *J. Gen. Virol.*, v.83, n.1, p. 223-228, 2002.
 34. GALMICHE, M.C.; GOENAGA, J.; WITTEK, R. et al. Neutralizing and protective antibodies directed against vaccinia virus envelope antigens. *Virology*, v.254, p.71-80, 1999
 35. GERBER, P.F.; MATOS, A.C.; GUEDES, M.I.M.C. et al. Validation of an immunoperoxidase monolayer assay for total anti- *Vaccinia virus* antibody titration. *J Vet Diagn Invest.*, v.24, n.2, p.355-358, 2012.
 36. GREINER, M.; GARDNER, I.A. Epidemiologic issues in the validation of veterinary diagnostic tests. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 45, p.3-22, 2000.
 37. GREENBERG, R.N.; KENNEDY, J.S.; CLANTON, D.J. et al. Safety and immunogenicity of new cell-cultured smallpox vaccine compared with calf-lymph derived vaccine: a blind, single-centre, randomized controlled trial. *Lancet*, v.365, p. 398-409, 2005.
 38. GREWAL, A.S.; ROUSE, B.T. Characterisation of bovine leukocytes involved in antibody dependent cell cytotoxicity. *Int Archs Allergy Appl Immunol*, v.60, p.169-77, 1979.
 39. HAMMARLUND, E.; LEWIS, M.W.; HANSEN, S.G. et al. Duration of antiviral immunity after smallpox vaccination. *Nat Med*, v.9, p.1131-1137, 2003.
 40. IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2009. Séries estatísticas e séries históricas. Acessado dia 10/06/2012 em: http://seriesestatisticas.ibge.gov.br/lista_tema.aspx?op=-&no=1
 41. ICTV International Committee on Taxonomy of viruses, 2012. *Poxviridae*. Acessado dia 02/07/2012 em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Index.htm>
 42. IKETANI, Y.; INOSHIMA, Y. et al. Persistent parapoxvirus infection in cattle. *Microbiol. Immunol.* v.46, n.4, p.285-291, 2002.
 43. JOHNSTON J.B.; MCFADDEN G. Poxvirus immunomodulatory strategies:

- current perspectives. *J Virol.* v.77, p.6093–6100, 2003.
44. JOHNSTON J.B., MCFADDEN G. Technical knockout: understanding poxvirus pathogenesis by selectively deleting viral immunomodulatory genes. *Cell Microbiol.* v.6, p.695–705, 2004.
 45. KROON, E.G.; MOTA, B.E.F.; ABRAHAO, J.S. et al. Zoonotic Brazilian Vaccinia virus: From field to therapy. *Antiviral Res.* v.92, n.2, p.150-163, 2011.
 46. LAUDER, I. M.; MURRAY, M.; PIRIE, H. M. Experimental vaccinia infection of cattle: a comparison with other virus infections of cow's teats. *Vet. Rec.*, v.89, n.22, p.571-578, 1971.
 47. LEITE, J.A.; DRUMOND, B.T.; TRINDADE, G.S.; LOBATO, Z.I.P. et al. Passatempo virus, a vaccinia virus strain, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.*, v.11, n.12, p. 1935-8, 2005.
 48. LEPARC-GOFFART, I.; POIRIER, B.; GARIN, D. et al. Standardization of a neutralizing anti-vaccinia antibodies titration method: an essential step for titration of vaccinia immunoglobulins and smallpox vaccines evaluation. *J Clin Virol.* v.32, n.1, p.47-52, 2005.
 49. LOBATO, Z. I. P.; FROIS, M. C. M.; TRINDADE, G. S. et al. Surto de varíola bovina causada pelo vírus Vaccinia na região da Zona da Mata Mineira. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.57, n.4, p.423-429, 2005.
 50. MADUREIRA, M.C. *Vaccínia Bovina no Estado de Minas Gerais, 2005-2007.* 2009.
 - 102f. Tese (Doutorado) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
 51. MCCARTHY, K.; DOWNIE, A.W.; BRADLEY, W.H. The antibody response in man following infection with viruses of the pox group. II. Antibody response following vaccination. *J Hyg.*, v.56, p.466–478, 1958.
 52. MCCLAIN D.J.; HARRISON S.; YEAGER, C.L. et al. Immunologic responses to vaccinia vaccines administered by different routes. *J Infect Dis.* v.175, p. 756–763, 1997.
 53. MCFADDEN, G. Poxvirus tropism. *Nat. Rev. Microbiol.*, v.3, n.3, p.201-213, 2005.
 54. MCGUIRE, T.C., MUSOKE, A.J., KURTTI, T. Functional properties of bovine IgG 1 and IgG2: interaction with complement, macrophages, neutrophils and skin. *Immunology*, v.38, p.249-56, 1979.
 55. MEDAGLIA, M.L.; PESSOA, L.C. et al. Spread of cantagalo virus to northern Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* v.15, n.7, p.1142-3, 2009.
 56. MEGID, J.; APOLINÁRIO, C. M.; LANGONI, H. et al. Short report: *Vaccinia virus* in humans and cattle in southwest region of São Paulo State, Brazil. *Am. J. Med. Hyg.*, v.79, n.5, p.647-651, 2008.
 57. MEGID, J.; BORGES, I.A.; ABRAHÃO, J.S. et al. Vaccinia Virus Zoonotic Infection, São Paulo State, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, v.18, n.1, 2012.

58. MOSS, B. *Poxviridae: The Viruses and Their Replication*. In: Knipe, D.M.H., Peter, M. (Eds.), *Fields Virology* Philadelphia, PA, 5 ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2007, p. 2906-2945.
59. MOSS, B. Smallpox vaccines: targets of protective immunity. *Immun Rev.* v.239, p.8-26, 2011.
60. NAGASSE-SHUGAHARA, T. K.; KISIELIUS, J. J.; UEDA-ITO, M. *et al.* Human vaccine-like virus outbreaks in São Paulo and Goiás states, Brazil: virus detection, isolation and identification. *Rev. Inst. Med. Trop.*, v.46, p.315-322, 2004.
61. OLIVEIRA, T. M. L.; REHFELD, I. S.; GUEDES, M. I. M.C. *et al.* Susceptibility of Vaccinia Virus to Chemical Disinfectants. *Am J Trop Med Hyg* v. 85, p.152-157, 2011.
62. PANCHANATHAN, V., CHAUDHRI, G., KARUPIAH, G.: Correlates of protective immunity in poxvirus infection: where does antibody stand? *Immunol Cell Biol*, v.86, p80-86, 2008.
63. QUIXABEIRA-SANTOS, J.C.; MEDAGLIA, M.L.G.; PESCADOR, C.A. *et al.* Animal Movement and Establishment of Vaccinia Virus Cantagalo Strain in Amazon Biome, Brazil. *Emerg Infect Dis.* v.17, n.4, p.726-729, 2011.
64. RABENAU, H.F., KESSLER, H.H., KORTENBUSCH, M., *et al.* Verification and validation of diagnostic laboratory tests in clinical virology. *J. Clin. Virol.* v.40, p.93-98, 2007.
65. REHFELD, I.S. *Estudo da Vaccinia bovina em vacas secas e lactantes experimentalmente inoculadas com o Vaccinia virus*. 2011. 96f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
66. RIVETTI JR, A.V. *Patogenia do Vaccinia virus GP2 em bovinos*. 2012. 88f. Tese (Doutorado) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
67. ROBERTS, K.L.; SMITH, G.L. Vaccinia virus morphogenesis and dissemination. *Trends Microbiol* v.16, p.472-479, 2008.
68. SAMPAIO, I. B. M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2010. 264p.
69. SASAKI, M.;LARSON, B.L.;NELSON, D.R. Kinetic analysis of the binding of immunoglobulins IgG1 and IgG2 to bovine mammary cells. *Bioch et Bioph Acta Gen Subj* v. 497, p.160-170, 1977.
70. SCHATZMAYR, H. G.; COSTAB, R.V.C.; GONÇALVES, M.C.R. *et al.* Human and animal infections by vaccinia-like viruses in the state of Rio de Janeiro: A novel expanding zoonosis. *Vaccine*. In Press, 2012.
71. SCHATZMAYR, H. G.; DE LEMOS, E. R. S.; MAZUR, C. *et al.* Detection of Poxvirus in cattle associated with human cases in the State of Rio de Janeiro: Preliminary Report.

- Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.95, n.5, p.625-627, 2000.
72. SCHATZMAYR, H.G.; COSTA, R.V.; GONÇALVES, M.C. et al. Human infections caused by vaccinia-like poxviruses in Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* v.42, p.672-676, 2009.
 73. SENTSU, H.; MURAKAMI, K.; INOSHIMA, Y et al. Isolation of parapoxvirus from a cow treated with interferon-gama. *Vet Microbiol.* v.70, p.143-152, 1999.
 74. SILVA, P.L.; VIANA, F.C.; RIBEIRO, S.C.A. et al. Surto de varíola bovina no município de Prata-MG. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.38, p.323-330, 1986.
 75. SILVA, R.A.; MORAES, L.T. Nota sobre a ocorrência da varíola bovina (cowpox) no Estado do Rio de Janeiro. I. Estudo da doença no Município de Três Rios. *Veterinária (Rio de Janeiro)*, v.14, p.31-35, 1961.
 76. SILVA-FERNANDES, A. T.; TRAVASSOS, C. E. P. F.; FERREIRA, J. M. S. et al. Natural human infections with *Vaccinia virus* during bovine vaccinia outbreaks. *J. Cli. Virol.*, n.44, p.308-313, 2009.
 77. SIMONETTI, B.R.; ABREU, D.C.; SIMONETTI, J.P. et al. Animal infections by vaccinia-like viruses in the state of Rio de Janeiro: Northwestern region. *Virus Rev. Res.* v.12, p.32-36, 2007.
 78. SMITH, S. A.; KOTWAL, G. J. Immune response to poxvirus infections in various animals. *Crit. Rev. Microbiol.*, v.28, n.3, p.149-185, 2002.
 79. SOLIMAN, A.K.; DOUGLAS, M.W.; SALIB, A.W. et al. Application of an immunoperoxidase monolayer assay for the detection of arboviral antibodies. *J. Virol. Methods.* v.65, p.147-151, 1997.
 80. SPIEGELBERG H.L. Biological activities of immunoglobulins of different classes and subclasses. *Adv. Immunol.*v.19, p.259-294, 1974.
 81. SPRIGGS, M.K., KOLLER, B.H., SATO, T. et al. Beta 2-microglobulin-, CD8+ T-cell-deficient mice survive inoculation with high doses of vaccinia virus and exhibit altered IgG responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* v.89, p-6070-6074, 1992.
 82. STANFORD, M.M., MCFADDEN, G., KARUPIAH, G. et al. Immunopathogenesis of poxvirus infections: forecasting the impending storm. *Immunol and Cell Biol.*, v.85, p.93-102, 2007.
 83. TIZARD, I.R. *Imunologia Veterinária*. Elsevier, 2008. 587 p.
 84. TRINDADE, G. S.; DA FONSECA, F. G.; MARQUES, J. T. et al. *Araçatuba virus*: a vaccinia-like vírus associated with infection in humans and cattle. *Emerg. Infec. Dis.*, n.9, p.155-160, 2003.
 85. TRINDADE, G. S.; LOBATO, Z. I. P.; DRUMOND, B. P. et al. Short Report: isolation of two *Vaccinia virus* strains from a single bovine vaccinia outbreak in rural area from Brazil: implications on the emergence of zoonotic orthopoxviruses.

- Am. J. Trop. Hyg.*, v.75, n.3, p.486-490, 2006.
86. TRINDADE, G. S.; DRUMOND, B. P.; GUEDES, M. I. M. C. *et al.* Zoonotic *Vaccinia virus* infection in Brazil: clinical description and implications for health professionals. *J. Clin. Microbiol.*, v.45, n.4, p.1370-1372, 2007.
87. TRINDADE, G. S.; GUEDES, M. I. M. C.; DRUMOND, B. P. *et al.* Zoonotic *Vaccinia virus*: clinical and immunological characteristics in a naturally infected patient. *Clin. Infect. Dis.*, v.48, n.3, p.37-40, 2009.
88. VINHOTE, W.M.S.; CAMPOS, K. F., SILVA, N. S. Bovine vaccinia outbreak affecting bovine and human in amazon region - Brazil. Anais do Congresso da WBC, 2011.
89. XU, R.; JOHNSON, A.J.; BEVAN, M.J. Cellular and humoral immunity against *Vaccinia virus* infection of mice. *J. Immunol.*, v.172, n.10, p.6265-6271, 2004.