

ENSAIOS DE INFECCIOSIDADE DO VÍRUS DA FEBRE AFTOSA. I. TRANSMISSÃO ENTRE BOVINOS INFECTADOS E CONTATOS E SUÍNOS

Ivo Gomes, P. Augé de Mello

Centro Pan-Americano de Febre Aftosa (OPAS/OMS)

Caixa Postal 589, 20001-970 Rio de Janeiro, Brasil

Quatro experimentos de infecção por instilação nasal dos vírus O, A e C da febre aftosa em bovinos e sua transmissão para bovinos e suínos foram realizados com a finalidade de estudar vários parâmetros indicativos da infecção. No experimento com vírus A₂₄ onde os bovinos foram inoculados por via intranasal em grupos com doses infectantes crescentes (10³, 10⁵ e 10⁷) as curvas de replicação do vírus na área faríngea estiveram condicionadas às concentrações do vírus inoculadas, principalmente nas primeiras horas pós-infecção (HPI). De nove bovinos inoculados foi possível detectar viremia em quatro, a qual antecedeu em 24 horas ao aparecimento de lesões clínicas. As lesões clínicas foram detectadas em dois bovinos às 148 HPI e em dois às 196 HPI evidenciando um retardamento já observado anteriormente em testes com o vírus A₂₄. O aparecimento das lesões em suínos também esteve relacionado com a dose do vírus inoculada nos bovinos. No teste com o vírus C₁, dois animais sem anticorpos, inoculados frente a esse vírus apresentaram curvas de replicação na área faríngea e viremia semelhantes. Em outro bovino que tinha anticorpos, houve dois ciclos de replicação do vírus na área faríngea, formação de anticorpos neutralizantes e anti-VIA, porém não houve a doença clínica. Nos bovinos em contato com os inoculados foi detectado vírus na área faríngea a partir de 48 horas pós-contato (HPC) com aparecimento de lesões clínicas entre 96 e 120 HPC. Nos suínos em contato, as lesões foram evidentes entre 96 e 144 HPC. Nos dois experimentos com vírus O₁, as curvas de replicação do vírus na área faríngea e viremia foram similares, sendo detectado vírus na área faríngea dos bovinos inoculados a partir das 5 HPI e após 48 horas nos bovinos contatos. A viremia foi detectada entre 72 e 96 HPI ou HPC antecedendo em um dia ou coincidindo com o aparecimento das lesões clínicas. Os suínos em contato evidenciaram lesões clínicas entre os 7 e 9 dias pós-contato (DPC). Embora sendo oriundos de áreas endêmicas, os bovinos apresentaram padrões de replicação do vírus da febre aftosa na área faríngea e viremia, assim como o processo de transmissão entre bovinos e suínos similares àqueles encontrados por outros pesquisadores (11, 15, 17) com animais de áreas livres.

A localização das vesículas características da febre aftosa na língua, boca, espaços interdigitais e glândula mamária dos bovinos, levou a crer que o aparecimento de lesões em uma destas áreas poderia ser o foco primário de infecção. Acreditava-

se que o vírus penetrasse por pequenas soluções de continuidade, constituindo um foco primário com subsequente generalização para áreas secundárias. Embora essa seqüência possa ocorrer, atualmente há claras evidências que a doença em bovinos sob condições naturais, ocorre com a infecção das vias respiratórias superiores através da inalação de aerossóis (13-21).

Em 1957, Korn (13) reportou a replicação do vírus nos estágios iniciais no trato respiratório

Solicitar separatas ao:
Centro Pan-Americano de Febre Aftosa (OPAS/OMS).

superior, descrevendo alterações histopatológicas, o que levou a concluir que o foco primário da multiplicação do vírus era predominantemente nas membranas mucosas das vias nasais e que o vírus replicava antes do aparecimento de viremia ou lesões detectáveis nos tecidos, quer macroscópica ou microscopicamente. Foi demonstrado em 1965 que o vírus pode ser detectado em aerossóis no ar ao redor de bovinos enfermos de febre aftosa (12) e em estudos posteriores ficou evidente que no ar ao redor de bovinos, ovinos e suínos infectados porém sem sintomatologia clínica, era possível detectar o vírus (18).

Na década de 60, vários trabalhos (3-17) registraram a recuperação do vírus da febre aftosa no material esofágico-faríngeo (E/F) de bovinos infectados experimentalmente e de outros em contato com eles, também antes do aparecimento da sintomatologia clínica. Foi reportado por Mohanty e Cottral (16), títulos infecciosos do material E/F na fase prodromica da infecção de bovinos infectados por via intradermolingual (IDL) ou faríngea. Vários outros estudos têm sugerido que a região faríngea dos bovinos é um dos principais sítios da replicação do vírus da febre aftosa quando da infecção através do trato respiratório (11-21).

O presente trabalho reuniu dados de quatro experimentos independentes, com bovinos de áreas endêmicas. Nesses experimentos foram estudados os parâmetros de replicação dos vírus prevalentes na América do Sul, subtipos A₂₄, C₃ e O₁ da febre aftosa, na região faríngea de bovinos, na fase aguda da infecção, através da titulação de materiais E/F. Foram estudados também outros indicadores de infecção, como temperatura, viremia, sinais clínicos e anticorpos circulantes (neutralizantes e anti-VIA)

MATERIAIS E MÉTODOS

Vírus e inoculação

As suspensões dos vírus O, A e C de origem bovina com três passagens em células BHK₂₁ clone 13 foram clarificadas por centrifugação, divididas

em alíquotas de 2,0 ml e conservadas a temperaturas de -196°C em nitrogênio líquido. No momento de usar, as diluições desejadas, foram processadas em meio Eagle sem soro bovino.

Nos quatro experimentos a via de inoculação foi a intranasal na dose de 5,0 ml (2,5 ml em cada narina) conforme descrito (15).

Experimento I - vírus A

Foram utilizados nove bovinos de 12 meses de idade e seis suínos sem anticorpos ou histórico de vacinação contra a febre aftosa. Os animais foram separados em três grupos de três bovinos, aos quais se juntaram dois suínos, localizados em prédios distintos dentro das instalações do Centro Pan-Americano de Febre Aftosa (PANAFTOSA). Em todos os bovinos dos grupos, foram inoculadas uma suspensão do vírus do sorotipo A, amostra A₂₄ Cruzeiro. A um grupo foi inoculado 10^{3.0} DICT50, a outro 10^{5.0} e ao terceiro 10^{7.0}. Os suínos foram mantidos em contato com os bovinos.

Experimento II - vírus C

Utilizaram-se sete bovinos de 2 anos de idade, primovacinados com uma vacina trivalente inativada e convalescentes de uma infecção com o vírus O₁ Campos há 13 meses anteriores ao início do experimento. Desses bovinos, selecionados por seus títulos de anticorpos neutralizantes frente ao vírus C₃ Resende, um com título de 2,70 (1/500) e dois com títulos de $\leq 1,20$ (1/16) foi inoculada uma suspensão do vírus C₃ Resende, contendo 10^{5.0} DICT50 (titulação em microplacas de células IB-RS2). Ficaram em contato com os bovinos inoculados os quatro bovinos restantes e três suínos, todos sem anticorpos indicativos de imunidade, frente ao vírus C₃ Resende.

Experimento III - vírus O

Foram utilizados seis bovinos com 11 meses de idade e três suínos sem anticorpos ou histórico de vacinação contra a febre aftosa. Três bovinos

foram inoculados com uma suspensão de vírus O₁ Campos, contendo 10^{4.0} DICT50. Os três bovinos restantes e os suínos ficaram em contato com os bovinos inoculados.

Experimento IV - vírus O

Quatro bovinos foram utilizados com a mesma idade e características do grupo anterior. Um bovino foi inoculado com 10^{4.0} DICT50 do vírus O₁ Campos, ficando em contato mais três bovinos e dois suínos.

No total dos quatro experimentos foram utilizados 26 bovinos, todos com características zebuínas predominantes com idade variando entre 11 e 24 meses e 14 suínos mestiços Landrace com 3 meses de idade.

Exame clínico

Um dia antes, no momento de inocular e a cada 24 horas após a inoculação (HPI) do vírus, foi tomada a temperatura de todos os animais envolvidos nos experimentos e procedeu-se ao exame de boca e patas para detecção de sinais clínicos.

Colheita de amostras: amostras de material E/F foram obtidas com o probang (19) antes e após a inoculação do vírus. O intervalo entre as colheitas variou de 3 a 24 horas, estendendo-se algumas vezes até às 120 HPI. A colheita era suspensa desde que o bovino apresentasse lesões orais.

Sangue: sangue heparinizado foi tomado com intervalos de 24 horas para estudo de viremia e a cada 7 dias para detecção de anticorpos neutralizantes e anti-VIA.

Titulações dos vírus: titulações dos vírus nos materiais E/F e no sangue heparinizado foram realizados em cultivos de células IB-RS2 conforme descrito (1), sendo os títulos expressados em UFP/ml.

Estudo de anticorpos: os anticorpos humorais neutralizantes foram estudados pelo teste de soroneutralização em microtécnica (7) e os anticorpos anti-VIA pela técnica de imunodifusão em agar (4).

RESULTADOS

Experimento I

Nesse experimento foram estudados a infecciosidade do material E/F, reações clínicas e viremia de nove bovinos após inoculação intranasal do vírus A₂₄ Cruzeiro em concentrações diferentes, a saber: 10^{3.0}, 10^{5.0} e 10^{7.0} DICT50.

Como mostra a figura 1, apenas em um animal dos três inoculados (nº 1) com 10^{3.0} DICT50 foi recuperado vírus no material E/F às 6 e 9 HPI. Nos bovinos 2 e 3 a primeira recuperação ocorreu às 12 HPI. Nos três animais houve um aumento do título do material E/F entre às 12 e 24 HPI em níveis $\geq 10^{2.5}$ UFP/ml. No animal 1 os títulos continuaram em ascensão atingindo nível acima de 10^{4.0} UFP/ml às 96 HPI. Inversamente, nos bovinos 2 e 3 houve uma queda dos títulos entre 24 e 48 HPI para em novo pico de replicação atingir valores acima de 10^{2.0} às 72 HPI e continuarem em níveis elevados. No animal 3 não foi registrado o título do material E/F às 96 HPI, pois o mesmo apresentou lesão de língua às 72 HPI, com generalização nas patas dois dias após. Os bovinos 1 e 2 só apresentaram lesões clínicas de febre aftosa às 148 HPI.

Apenas no animal 3 foi detectado título vírêmico de 10^{2.0} e 10^{0.7} UFP/ml às 72 e 96 HPI respectivamente, coincidindo com uma temperatura de 40,5°C e aparecimento de lesão na língua.

A figura 1A mostra os títulos infecciosos dos materiais E/F dos três bovinos inoculados com 10^{5.0} DICT50. Já às 3 HPI os animais 5 e 6 tinham vírus na região faríngea, enquanto no bovino 4, o primeiro isolamento do vírus foi às 6 HPI. Os bovinos 4 e 6 apresentaram títulos ascendentes de replicação de vírus, ao contrário do nº 5 que teve elevação de título às 9 HPI com picos descendentes e ascendentes às 12 e 48 e 24 e 72 HPI, respectivamente. Somente os bovinos 4 e 6 apresentaram lesões clínicas de febre aftosa ficando negativo o nº 5. A viremia só foi detectada no bovino 4 às 96 HPI antecedendo em um dia o aparecimento de lesão clínica e temperatura de 39,2°C.

Na figura 1B estão representadas as curvas de replicação do vírus na região faríngea dos três

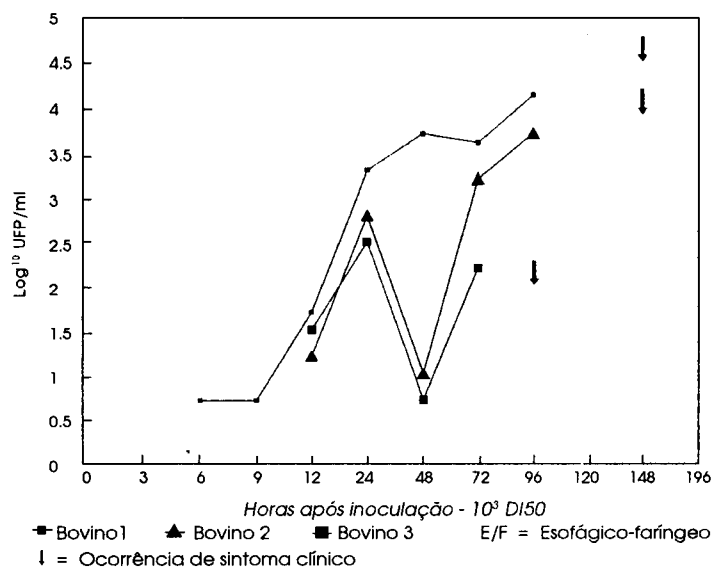


Figura 1. Vírus A₂₄ Cruzeiro. Titulação do vírus em material E/F. Bovinos 1-3

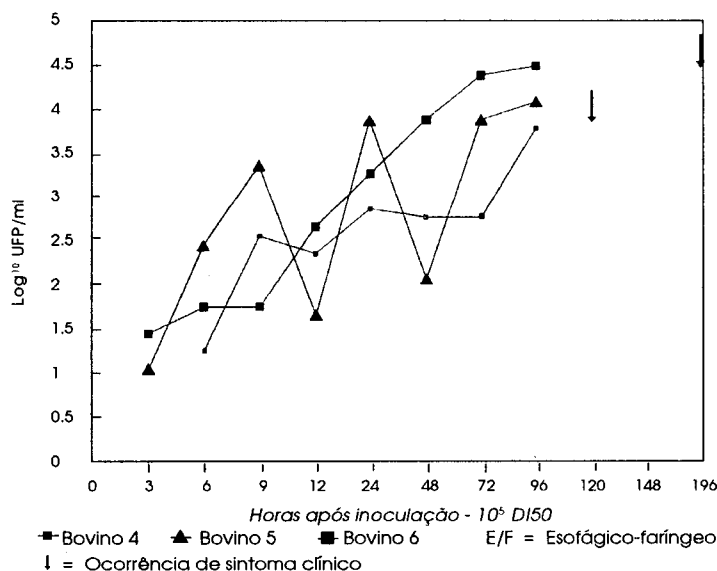


Figura 1A. Vírus A₂₄ Cruzeiro. Titulação do vírus em material E/F. Bovinos 4-6

bovinos inoculados com $10^{7.0}$ DICT50. Embora por questões de manejo não se pudesse conseguir material E/F do bovino 7, é de se prever pelo título apresentado às 12 HPI, que já às 3 HPI a exemplo dos bovinos 8 e 9 já tivesse título semelhante. Os títulos de replicação do vírus nos bovinos 8 e 9 estiveram acima de $10^{3.0}$ UFP/ml até as 72 HPI. No bovino 7 os títulos estiveram em descenso desde as 12 até as 48 HPI para daí em diante se elevarem novamente atingindo valores acima de $10^{4.0}$ UFP/ml às 96 HPI. Nos animais 7 e 8 foi detectada viremia às 72 e 96 HPI antecedendo o aparecimento de lesões clínicas às 120 HPI. No bovino 9 não foi detectada viremia e a lesão clínica observada traduziu-se apenas em descamação do epitélio de uma pata. Nos bovinos desse grupo a temperatura esteve entre 38,0 e 39,5°C durante o tempo de observação.

Dos dois suínos em contato com os bovinos inoculados com $10^{3.0}$ DICT50 somente um enfermou aos 14 dias pós-contato (DPC). Os que estiveram em contato com os bovinos inoculados com $10^{5.0}$ DICT50 enfermaram aos 11 DPC e os juntos com os bovinos de $10^{7.0}$, mostraram lesões aos 9 DPC.

Experimento II

Nos bovinos desse experimento, além das curvas de replicação do vírus nos materiais E/F e viremia, foram estudados outros indicadores de infecção, como anticorpos circulantes (neutralizantes e anti-VIA). Como mostra a figura 2, os dois

bovinos sem anticorpos que foram inoculados, as curvas de replicação começaram com títulos acima de $10^{2.5}$ UFP/ml às 5 HPI atingindo um pico de $10^{5.0}$ UFP/ml às 48 HPI. No bovino com título neutralizante de 2,70 (1/500) foi detectada replicação do vírus às 24 HPI com título de $10^{0.7}$ UFP/ml, atingindo $10^{1.9}$ UFP/ml às 96 HPI. Nos bovinos sem anticorpos foi detectada viremia às 48 HPI e às 72 HPI coincidindo com o aparecimento de lesões clínicas e temperatura acima de 40°C . No bovino com anticorpos não foi detectada viremia, ocorrência de lesões clínicas ou elevação de temperatura. Em um bovino contato foi detectado vírus na região faríngea a partir de 48 horas pós-contato (HPC) com pico às 96 HPC, em outro a partir de 72 HPC com título de $10^{4.70}$ UFP/ml e nos dois restantes somente às 96 HPC com títulos acima de $10^{2.3}$ UFP/ml (figura 2A). A viremia somente foi detectada em dois bovinos contatos, um a partir das 72 e outro às 96 HPC, coincidindo com o aparecimento de lesões clínicas e temperatura de 41°C . Nos dois contatos sem viremia as lesões clínicas apareceram às 96 e 120 HPC e a temperatura não ultrapassou os 40°C . Dos três suínos em contato, as lesões ocorreram entre 96 e 144 HPC. Aos 7 DPC anticorpos anti-VIA foram detectados nos três bovinos inoculados e em três contatos. Aos 14 dias pós-infecção (DPI) ou contato (DPC) os sete bovinos eram VIA positivos. Os suínos só foram VIA positivos a partir de 14 DPC.

O quadro 1 mostra os títulos de anticorpos neutralizantes dos bovinos inoculados e contatos frente aos vírus O_1 e C_3 até aos 14 DPI ou DPC. Para os suínos foram estudadas as respostas frente ao vírus C_3 .

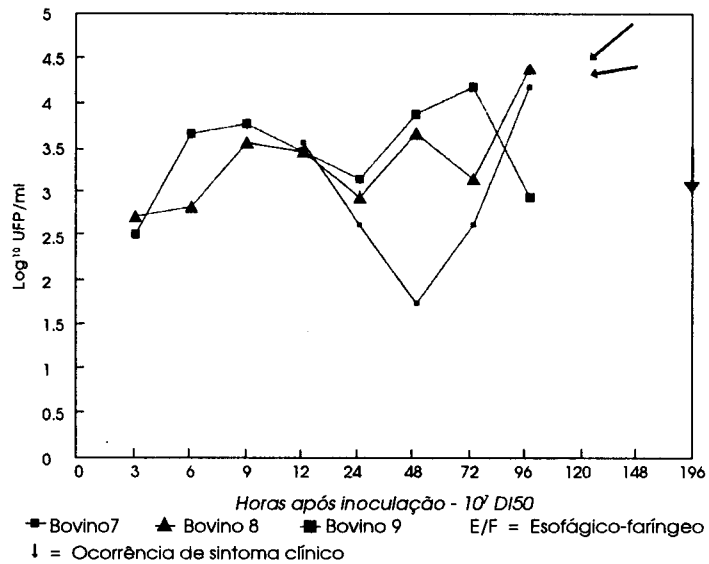


Figura 1B. Vírus A_{24} Cruzeiro. Titulação do vírus em material E/F. Bovinos 7-9

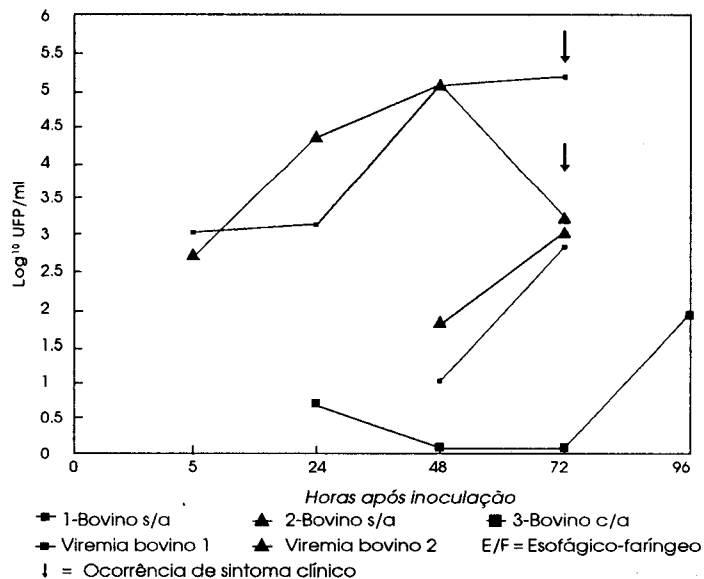


Figura 2. Vírus C_3 Resende. Titulação do vírus em material E/F

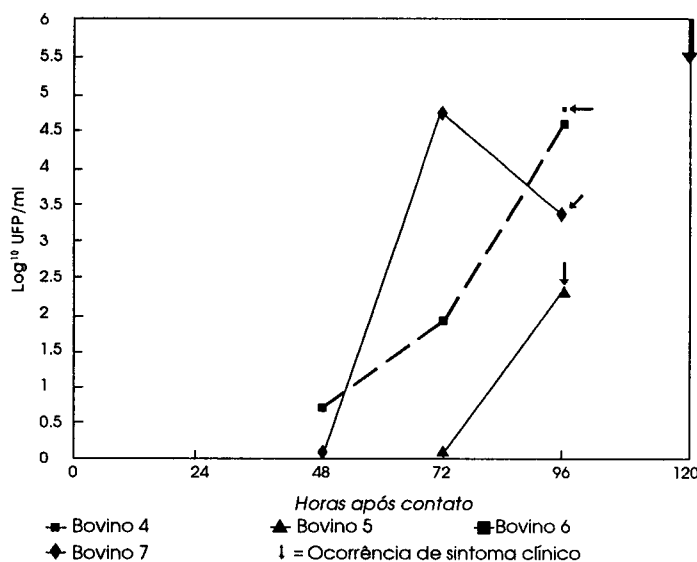


Figura 2A. Vírus C₃ Resende. Bovinos contatos

Quadro 1. Títulos de anticorpos neutralizantes e anti-VIA de bovinos e suínos infectados experimentalmente com o vírus C₃ Resende

Bovinos Inoculados	Dias pós-infecção ou contato							
	Vírus O	0	7	14				
	Vírus O	Vírus C	VIA	Vírus C	VIA	Vírus C	VIA	
1	2,85	≤ 1,20	-	2,55	+	2,10	+	
2	> 3,60	≤ 1,20	-	3,00	+	2,85	+	
3	3,15	2,70	-	3,00	+	2,70	+	
Contatos								
4	> 3,60	≤ 1,20	-	1,50	-	2,55	+	
5	3,15	1,80	-	1,35	+	≥ 3,60	+	
6	3,30	1,95	-	2,70	+	≥ 3,60	+	
7	> 3,60	≤ 1,20	-	1,80	+	2,40	+	
Suínos								
1	ND	≤ 1,20	-	≤ 1,35	-	1,80	+	
2	ND	≤ 1,20	-	≤ 1,35	-	2,10	+	
3	ND	≤ 1,20	-	≤ 1,20	-	2,55	+	

- = negativo ND = not done (não realizado) + = positivo

Experimento III

Na figura 3 estão representados os títulos de replicação do vírus na região faríngea de três bovinos inoculados por via intranasal com 10^{4,0} DICT50 de uma suspensão do vírus O₁ Campos, os títulos de viremia e o tempo do aparecimento das lesões clínicas após infecção. Nos bovinos 2 e 3 foi detectado o vírus na região faríngea às 5 HPI, sendo o primeiro isolamento no bovino 1 às 24 HPI. Enquanto a concentração do vírus continuou ascendente no bovino 2 a partir das 24 HPI, houve uma queda de títulos nos bovinos 1 e 3 de 24 para 48 HPI, elevando-se novamente a partir daí até às 96 HPI. Nos três bovinos a concentração do vírus detectada entre as 72 e 96 HPI esteve entre 10^{3,5} e 10^{5,5} UFP/ml. Nos três animais foi detectada viremia coincidindo ou antecedendo em um dia o aparecimento de lesões clínicas. Somente em um bovino a temperatura foi superior a 40°C, assim mesmo no dia da ocorrência da lesão. Em dois bovinos contatos 4 e 5 (figura 3A) a replicação do vírus foi detectada a partir das 48 HPC e no bovino 6 começou 24 horas mais tarde. Viremia só foi detectada no bovino 6 às 96 HPC, antecedendo em um dia o aparecimento de lesões clínicas. Nos três suínos em contato as lesões só foram detectadas aos 7 DPC.

O quadro 2 mostra os níveis de anticorpos neutralizantes e anti-VIA nos bovinos inoculados e bovinos e suínos contatos. Já a partir dos 7 DPI e 14 DPC nos bovinos inoculados e bovinos e suínos contatos, respectivamente, houve aumento significativo dos títulos neutralizantes dos soros frente ao vírus homólogo ao inoculado. Frente aos vírus heterólogos A e C não houve resposta imuno-

gênica. Os anticorpos anti-VIA foram detectados em um bovino inoculado nº 2 aos 7 DPI. Nos outros bovinos, inoculados ou contatos, e nos suínos contatos as reações positivas ao antígeno VIA só foram observadas a partir dos 14 DPI ou DPC.

Experimento IV

Nesse experimento também com o vírus O₁ Campos foram estudadas a replicação do vírus na região faríngea e os outros parâmetros indicativos da infecção em bovinos, como citado anteriormente. Foram colocados em coabitação com o bovino inoculado e três contatos, mais dois suínos.

A figura 4 mostra que às 24 HPI o bovino inoculado já apresentara título de $10^{3.7}$ UFP/ml decaindo para $10^{3.4}$ UFP/ml às 48 HPI. A esse tempo apareceu uma lesão na língua do animal, sendo então suspensa a colheita de material E/F. Essa lesão apareceu no mesmo dia à detecção da viremia com título de $10^{2.60}$ UFP/ml, a qual se prolongou até às 104 HPI com título de $10^{2.80}$ UFP/ml. Em dois bovinos contato se detectou vírus a partir das 48 HPC com títulos ascendentes até às 72 HPC, em torno de $10^{3.5}$ UFP/ml. No outro bovino contato somente foi isolado vírus a partir de 72 HPC porém em concentração bem elevada, ou seja, $10^{3.3}$ UFP/ml, decaindo o título para $10^{1.7}$ UFP/ml às 96 HPC. Nos três bovinos contato os títulos virêmicos antecederam em um dia o aparecimento das lesões clínicas que foram evidentes às 96 HPC. Temperaturas pouco inferiores ou acima de 40°C somente foram verificadas no dia do aparecimento das lesões. Os suínos em contato só evidenciaram lesões clínicas após 216 HPC. O bovino inoculado e os contatos apresentaram títulos

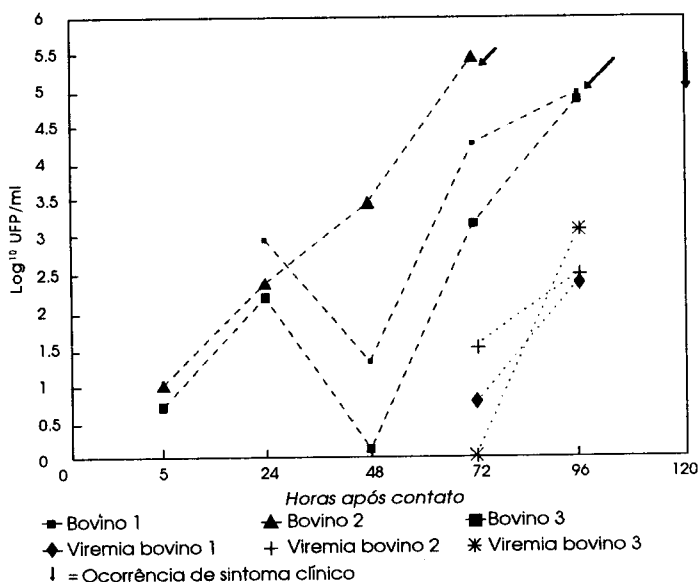


Figura 3. Vírus O₁ Campos. Titulação do vírus em material E/F

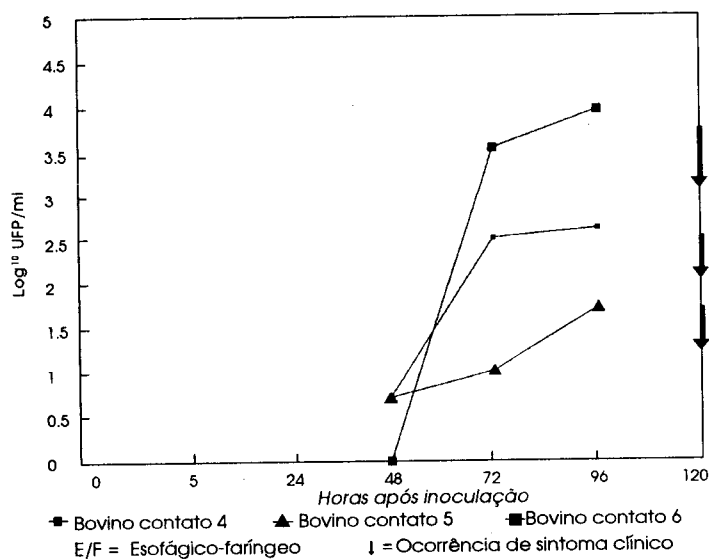


Figura 3A. Vírus O₁ Campos. Titulação do vírus em material E/F. Bovinos 4-6 contactos

Quadro 2. Títulos de anticorpos neutralizantes e anti-VIA de bovinos e suínos infectados experimentalmente com o vírus O₁ Campos

Bovinos/DPI	Dias pós-infecção ou contato								
	0		7		14		21		28
Inoculados	Vírus O ₁	VIA	Vírus O ₁	VIA	Vírus O ₁	VIA	Vírus O ₁	VIA	VIA
1	≤ 1,2	-	3,4	-	> 3,6	+	> 3,6	+	+
2	≤ 1,2	-	3,4	+	> 3,6	+	> 3,6	+	+
3	≤ 1,2	-	3,3	-	> 3,6	+	> 3,6	+	+
Bovinos	Contatos								
4	≤ 1,2	-	≤ 1,2	-	> 3,6	+	> 3,6	+	+
5	≤ 1,2	-	≤ 1,2	-	> 3,6	+	> 3,6	+	+
6	≤ 1,2	-	≤ 1,2	-	> 3,6	+	> 3,6	+	+
Suínos	Contatos								
A	≤ 1,2	-	ND	ND	≥ 3,6	+	≥ 3,6	+	+
B	≤ 1,2	-	ND	ND	≥ 3,6	+	≥ 3,6	+	+
C	≤ 1,2	-	ND	ND	≥ 3,6	-	≥ 3,6	+	+

- = negativo

ND = not done (não realizado)

+ = positivo

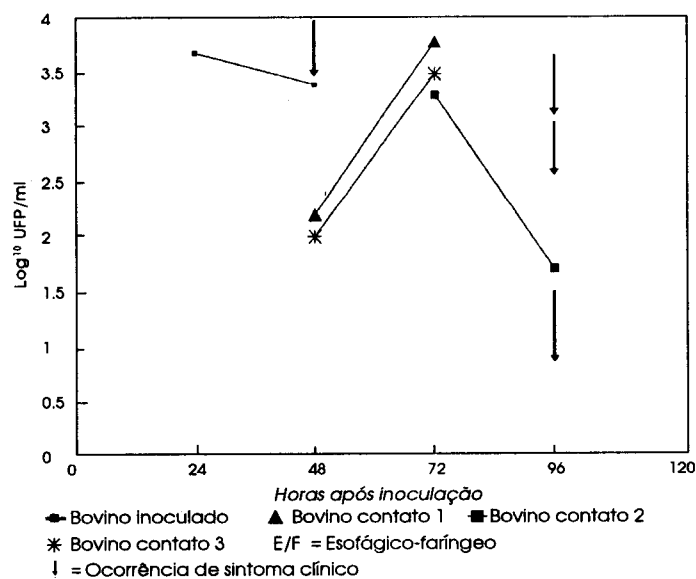


Figura 4. Vírus O₁ Campos. Titulação do vírus em material E/F

neutralizantes elevados no soro frente ao vírus homólogo a partir dos 7 DPI/DPC até aos 35 DPI/DPC, quando se encerrou a observação. Nos suínos esses títulos elevados foram evidentes a partir dos 14 DPC. Frente aos vírus heterólogos (A e C) os títulos neutralizantes foram negativos.

No bovino inoculado e nos contatos bovinos ou suínos as reações positivas anti-VIA só foram evidentes a partir dos 14 DPI ou DPC.

DISCUSSÃO

Experimento I

Como mostra as figuras 1, 1A e 1B a curva de replicação do vírus A nos bovinos esteve condicionada à concentração de vírus inoculada. Embora sejam observadas algumas diferenças, os padrões das curvas são semelhantes com títulos de replicação descendentes e ascendentes entre as 24 e 48 HPI. Porém às 96 HPI todos os bovinos apresentaram títulos de $10^{3.0}$ a $10^{4.5}$ UFP/ml. O vírus recuperado dos seis bovinos inoculados com $10^{5.0}$ e $10^{7.0}$ às 3HPI provavelmente foi resultante do inóculo. Curvas de replicação de vírus semelhantes foram encontradas por McVicar e Suttmöller (15). Dos nove bovinos inoculados só foi possível detectar viremia em quatro, entre 72 e 96 HPI. Em experimentos descritos por Cottral e Bachrach (6) em animais expostos por inoculação intramuscular ou por aerossóis a viremia foi retardada por 24 ou 48 HPI. No presente experimento, se as sangrias tivessem sido realizadas em intervalos inferiores a 24 horas, provavelmente pudéssemos detectar viremia em maior número de animais. De qualquer modo a detecção de viremia coincidiu ou antecedeu em 24 horas ao aparecimento de lesões clínicas. É interessante observar que em apenas um animal inoculado com 10^3 DICT50 houve elevação de temperatura superior a 40°C . Chama atenção que embora com alta concentração do vírus na área faríngea o aparecimento de lesões clínicas tenha sido tão tardio. Em dois bovinos as lesões só foram observadas às 148 e em outros dois às 196 HPI.

Além disso, o bovino nº 5, inoculado com $10^{5.0}$ DICT50 não apresentou nenhuma lesão, embora a observação tenha se prolongado pelo menos até os 30 DPI.

Quando utilizamos o vírus A_{24} em várias inoculações em provas de imunidade de vacinas, o aparecimento de lesões também era tardio, quando comparadas aos vírus C e O. McVicar et al. (14) registraram que os títulos do vírus do material E/F, de bovinos inoculados com o vírus A_{10} foram inferiores que os do vírus C e O, assinalando que esta cepa do vírus, segundo trabalhos de outro autor (10) é conhecido por conter alta porcentagem de partículas não infecciosas, sendo portanto lenta sua replicação em cultura de tecidos e em animais. Provavelmente o vírus A_{24} apresente características semelhantes ao vírus A_{10} em relação à velocidade de replicação. Por outro lado Vianna Filho et al. (22), trabalhando com animais selecionados em áreas endêmicas em provas de vacinas, encontraram 3% dos animais controlados que não reagiram à inoculação do vírus, o que estaria de acordo com resultados de outros investigadores trabalhando com bovinos de áreas livres.

Nos suínos em contato com os bovinos inoculados com as três doses do vírus o aparecimento de lesões também foi tardio. Este retardamento também esteve relacionado com a concentração do vírus inoculada nos bovinos, indicando que provavelmente a principal via de infecção nessa espécie seja a via digestiva, pela contaminação dos alimentos ingeridos pelos suínos. Também a lentidão de replicação do vírus A_{24} poderia explicar a sintomatologia tardia.

Experimento II

A figura 2 mostra que curvas de replicação do vírus C na área faríngea estão em concordância com o observado para os vírus A e O em bovinos sem anticorpos inoculados por instilação nasal (14). É interessante observar entretanto que no bovino com título neutralizante de 2,70, compatível com imunidade (20) foi detectada replicação às 24 e 96 HPI. Replicação do vírus na área faríngea em bovinos com títulos altos de anticorpos neutra-

lizantes também foi detectada por Augé e Suttmöller (2) em materiais E/F de bovinos vacinados. Nos dois bovinos sem anticorpos foi detectada viremia às 48 e 72 HPI, temperatura acima de 40°C e aparecimento de lesões às 72 HPI de acordo com a sequência sumarizada por Cottral (5). No bovino com anticorpos, apesar dos ciclos de replicação na área faríngea não houve elevação de temperatura, viremia e tampouco disseminação às áreas de eleição. Em dois bovinos contatos a replicação do vírus na área faríngea foi detectada a partir das 48 HPC e em outros dois às 96HPC (figura 2A). Neste caso a temperatura esteve igual ou superior a 40°C, com viremia em dois animais. A transmissão do vírus de animais infectados (evidenciado por isolamento do vírus de material E/F) ainda sem sinais clínicos da doença, para animais susceptíveis em contato corresponde aos resultados encontrados por outros investigadores (3, 11, 21).

Os bovinos utilizados nesse experimento eram convalescentes de uma infecção anterior com vírus do tipo O. No quadro 1 são mostrados os títulos de anticorpos frente ao vírus O e C. Verificou-se que mesmo com anticorpos altos para vírus O os bovinos infectaram-se e enfermaram clinicamente com o vírus C com exceção do bovino nº 3 que tinha anticorpos frente a esse vírus. A falta de imunidade cruzada entre os 7 tipos do vírus da febre aftosa é bem conhecida. É interessante observar no entanto, que o bovino 3 teve dois picos de replicação (figura 2) e não enfermou clinicamente, porém houve formação de anticorpos anti-VIA, o que está de acordo com resultados em que animais vacinados com altos títulos, submetidos à descarga do vírus não mostraram lesões, porém tornaram-se VIA positivos (8). Nos suínos em contato embora as lesões clínicas aparecessem entre 96 e 144 horas anticorpos anti-VIA só foram detectáveis aos 14 DPC o que confirma observações anteriores (9).

Experimentos III e IV

Nestes dois experimentos com o vírus O₁ Campos, os padrões das curvas de replicação do vírus na área faríngea foram semelhantes tanto nos

bovinos inoculados como nos bovinos contatos, figuras 3 e 4. Não obstante os títulos do vírus terem sido semelhantes nos dois experimentos, as lesões clínicas apareceram primeiro nos bovinos do Experimento IV (figura 4), nos quais a viremia foi detectada no dia anterior às lesões. Este fato poderia estar ligado a fatores individuais relacionados à susceptibilidade dos animais e não ao processo replicativo do vírus nos mesmos. Inversamente, nos suínos em contato com os bovinos do Experimento III as lesões clínicas foram evidenciadas aos 7 DPC enquanto naqueles em contato com os bovinos do Experimento IV, as lesões só ocorreram aos 9 DPC.

No quadro 2 onde estão representados os níveis de anticorpos neutralizantes e anti-VIA, do Experimento III, confirmaram-se observações do experimento anterior com o vírus C em que nos bovinos inoculados os títulos já são bastante elevados aos 7 DPI. Nos bovinos contatos e nos suínos, títulos semelhantes só foram observados a partir do 14 DPC. Anticorpos anti-VIA foram detectados em bovinos e suínos aos 14 DPI ou DPC. Os mesmos padrões de anticorpos neutralizantes e anti-VIA foram observados no Experimento IV. Confirmando a ausência de imunidade cruzada, os anticorpos frente aos vírus heterólogos A e C foram negativos.

Como citado anteriormente, inúmeros experimentos de transmissão do vírus da febre aftosa entre as principais espécies de animais susceptíveis têm sido realizados (11, 15, 17). Nesses trabalhos, entretanto, os animais de experimentação pertencem à áreas livres da doença nos quais as chances de encontrar algum tipo de imunidade (humoral ou celular) é praticamente nula. É interessante, portanto, observar que os padrões de replicação do vírus na área faríngea, viremia, formação de anticorpos e outros indicativos de infecção apresentam bastante semelhança, mesmo quando se utilizam animais, sem anticorpos, porém oriundos das áreas endêmicas da febre aftosa. Esta observação tem grande importância para a seleção de animais para provas de vacinas em países onde não é possível obter animais de zonas livres e estão de acordo com as observações de Vianna Filho et al. (22).

REFERÊNCIAS

1. AUGÉ DE MELLO, P. Prueba de neutralización por reducción de placas para la evaluación de anticuerpos contra la fiebre aftosa. /Plaque reduction neutralization test for the assay of antibodies against foot-and-mouth disease. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 21-22: 25-34, 1976.
2. AUGÉ DE MELLO, P., SUTMÖLLER, P. Observaciones preliminares sobre la replicación del virus en la faringe y viremia después de inoculación intradermolingual en bovinos con virus de la fiebre aftosa. /Preliminary observations of pharyngeal virus growths and viremia after intradermolingual inoculation of cattle with foot-and-mouth disease virus. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 27-28: 13-22, 1977.
3. BURROWS, R. Excretion of foot-and-mouth disease prior to development of lesions. *Vet. Rec.*, 82: 387-388, 1968.
4. CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA. El uso de las pruebas del antígeno asociado a la infección por virus (VIA) de la fiebre aftosa. Rio de Janeiro, PANAFTOSA, 1980. (Série de Monografías Científicas y Técnicas, n° 6).
5. COTTRAL, G.E. Diagnosis of bovine vesicular diseases. *J. A. V. M. A.*, 161, (11): 1293-1298, 1972.
6. COTTRAL, G.E., BACHRACH, H.L. Foot-and-mouth disease viremia. *Proc. Ann. Meet. U.S. Animal Hlt. Ass.*, 72: 383-399, 1968.
7. FERREIRA, M.E.V. Prueba de microneutralización para estudios de anticuerpos de la fiebre aftosa. /Microtiter neutralization test for the study of foot-and-mouth disease antibodies. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 21-22: 17-24, 1976.
8. GOMES, I., SUTMOLLER, P., CASAS OLASCOAGA, R. Respuesta en bovinos a la exposición del virus de la fiebre aftosa un año después de inmunizados con vacuna con adyuvante oleoso. /Response of cattle of foot-and-mouth disease (FMD) virus exposure one year after immunization with oil-adjuvanted FMD vaccine. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 37-38: 25-35, 1980.
9. GOMES, I., AUGÉ DE MELLO, P., ALONSO, A., COSTA, K.F. Vacuna antiaftosa con adyuvante oleoso para cerdos. III. Respuesta inmunitaria con vacunas emulsificadas por vibración ultrasónica o por agitación mecánica. /Foot-and-mouth disease oil vaccines for pigs. III. Immune response of vaccines emulsified by ultrasonic or mechanical equipment. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 35-36: 19-33, 1979.
10. GRAVES, J.H., COWAN, K.M., TRAUTMAN, R. Immunochemical studies of foot-and-mouth disease. II - Characterization of RNA-free virus-like particles. *Virology*, 34: 269-274, 1968.
11. GRAVES, J.H., McVICAR, J.W., SUTMÖLLER, P., TRAUTMAN, R. Contact transmission of foot-and-mouth disease from infected to susceptible cattle. *J. Infec. Dis.*, 123 (4): 386-391, 1971.
12. HYSLOP, N. St.G. Airborne infection with the virus of foot-and-mouth disease. *J. Comp. Pathol.*, 75: 119-126, 1965.
13. KORN, G. Experimentelle untersuchungen zum virusnachweis im inkubationsstadium der maul- und-klauenseuche und zu ihrer pathogenese. *Arch Exp. Veterinaermed*, 11: 637-649, 1957.
14. McVICAR, J.W., GRAVES, J.H., SUTMOLLER, P. Growth of foot-and-mouth disease virus in the bovine pharynx. *Proc. Ann. Meet. U.S. Animal Hlt. Ass.*, 74: 230, 1971.
15. McVICAR, J.W., SUTMOLLER, P. Growth of foot-and-mouth disease virus in the upper respiratory tract of non-immunized, vaccinated, and recovered cattle after intranasal inoculation. *J. Hyg.*, 76 (3): 467-481, 1976.
16. MOHANTY, G.C., COTTRAL, G.E. Immunofluorescent detection of foot-and-mouth disease virus in the oesophageal-pharyngeal fluids of inoculated cattle. *Am. J. Vet. Res.*, 31: 1187-1196, 1970.
17. SELLERS, R.F., BURROWS, R., MANN, J.A., DAWE, P. Recovery of virus from bulls affected with foot-and-mouth disease. *Vet. Rec.*, 83: 303, 1968.
18. SELLERS, R.F., PARKER, J. Air-borne excretion of foot-and-mouth disease virus. *J. Hyg.*, 67: 671-677, 1969.
19. SUTMÖLLER, P., GAGGERO, A. Foot-and-mouth disease carriers. *Vet. Rec.*, 77: 968-969, 1965.
20. SUTMÖLLER, R., COSTA, K.F., GOMES, I. Prueba de seroneutralización por microtécnica para fiebre aftosa: cálculo de la expectativa porcentual de protección. /The serum microneutralization test for foot-and-mouth disease: establishment of an expected percentage of protection. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 39-40: 31-42, 1980.

21. SUTMÖLLER, P., McVICAR, J.W., COTTRAL, G.E. The epizootiological importance of foot-and-mouth disease carriers. I. experimentally produced foot-and-mouth disease carriers in susceptible and immune cattle. *Arch. ges. Virusforsch*, 23: 227-235, 1968.
22. VIANNA FILHO, Y.L., ASTUDILLO, V., GOMES, I., FERNANDEZ, G., ROZAS, C.E.E., RAVISON, J.A., ALONSO, A. Potency control of foot-and-mouth disease vaccine in cattle. Comparison of the 50% protective dose and the protection against generalization. *Vaccine*, 11 (14): 1424-1428, 1993.

ABSTRACT

Foot-and-mouth disease virus infectivity assays. I. Transmission in infected cattle, exposed cattle and pigs

Four assays of intranasal infection by foot-and-mouth disease (FMD) viruses O, A and C and its transmission to cattle and swine were made with the purpose of studying several parameters indicating infection. In the A₂₄ virus test, groups of cattle were inoculated intranasally with increasing infective doses (10³, 10⁵ and 10⁷) and the replication curves of the virus in the pharyngeal area were conditioned to virus concentrations inoculated, mainly during the first post-infection hours (HPI). Viremia was detected 24 hours before the appearance of clinical lesions in four out of nine inoculated cattle. Clinical lesions were detected in two bovines at 148 HPI and in two at 196 HPI showing a slowdown that was already observed in tests using virus A₂₄. The manifestation of lesions in pigs was also related to virus doses inoculated to the bovines. In the assay with virus

C₃, two animals free of antibodies inoculated with the virus showed similar replication curves in the pharyngeal area and viremia. In the case of one bovine with antibodies, two cycles of virus replication occurred in the pharyngeal area, showing also neutralizing antibodies formation and anti-VIA antibodies, but failed to show clinical disease. In those animals that were in contact with the inoculated cattle, virus was detected in the pharyngeal area 48 hours post-contact (HPC) and clinical lesions could be seen between 96 to 120 HPC. In the case of contact pigs, the lesions were evident from 96 to 144 HPC. In the two assays with virus O₁, the replication curves in the pharyngeal area and the viremia were similar and virus could be detected in the pharyngeal area of the inoculated cattle starting at 5 HPI and in those bovines in contact after 48 hours. Viremia was detected between 72 to 96 HPC one day before or coinciding with the appearance of clinical lesions. The pigs in contact showed clinical lesions between the 7th and 9th day after contact (DPC). Even coming from endemic areas, the cattle showed signs of FMD virus replication in the pharyngeal area and viremia. Also, the transmission process in cattle and pigs was similar to those found by other investigators (11, 15, 17) in animals coming from free areas.

RESUMEN

Pruebas de infecciosidad del virus de la fiebre aftosa.

I. Transmisión entre bovinos infectados y contactos y porcinos

Se realizaron cuatro pruebas de infección por instilación nasal de los virus O, A y C de la fiebre aftosa en bovinos y su transmisión para bovinos y porcinos para estudiar varios parámetros indicativos de la infección. En la prueba con virus A₂₄, los bovinos fueron inoculados por vía intranasal en grupos con dosis infectantes crecientes (10³, 10⁵ y 10⁷) y las curvas de replicación del virus en el área faríngea estuvieron condicionadas a las concentraciones del virus inoculadas, especialmente en las primeras horas posinfección (HPI). Se detectó viremia en cuatro de nueve bovinos inoculados, la cual ocurrió 24 horas antes del apareamiento de lesiones clínicas. En dos bovinos aparecieron lesiones clínicas a las 148 HPI y en dos a las 196 HPI, evidenciando un retardo ya observado anteriormente en pruebas con el virus A₂₄. El apareamiento de las lesiones en porcinos también estuvo relacionado con la dosis del virus inoculada en los

bovinos. En la prueba con el virus C₃, dos animales sin anticuerpos inoculados frente a este virus presentaron curvas de replicación en el área faríngea y viremia semejantes. En otro bovino que tenía anticuerpos hubo dos ciclos de replicación del virus en el área faríngea, formación de anticuerpos neutralizantes y anti-VIA, sin ocurrencia de enfermedad clínica. En los bovinos en contacto con los inoculados se detectó virus en el área faríngea a partir de las 48 horas poscontacto (HPC), con apareamiento de lesiones clínicas entre 96 y 120 HPC. En los porcinos en contacto, las lesiones fueron evidentes entre 96 y 144 HPC. En las dos pruebas con el virus O₁, las curvas de replicación del virus en el área faríngea y la viremia fueron similares. El virus se detectó en el área faríngea de los bovinos inoculados a partir de las 5 HPI y después de las 48 horas en los bovinos contactos. La viremia apareció entre 72 y 96 HPI o HPC, un día antes o coincidiendo con el apareamiento de las lesiones clínicas. Los porcinos en contacto mostraron lesiones clínicas entre los 7 y 9 días poscontacto (DPC). Aunque provenientes de áreas endémicas, los bovinos presentaron padrones de replicación del virus de la fiebre aftosa en el área faríngea y viremia, así como el proceso de transmisión entre bovinos y porcinos, similares a los encontrados por otros investigadores (11, 15, 17) con animales de áreas libres.

Informação

A Comissão Sulamericana para a Luta contra a Febre Aftosa (COSALFA), integrada pelos Diretores de Saúde Animal dos países da América do Sul, reúne-se anualmente e serve de corpo assessor para o Diretor de PANAF-TOSA. É um órgão de promoção, coordenação e avaliação dos programas nacionais, projetos subregionais e convênios de fronteira dos países da Região, com referência à febre aftosa e outras doenças vesiculares.

Em março de 1985, a COSALFA foi institucionalizada pelos Ministros das Relações Exteriores dos países da América do Sul como Comissão Permanente Subregional, atuando o Ministério das Relações Exteriores do Brasil como depositário do Convênio. Tem também como função a adoção de normas e medidas para evitar a introdução de enfermidades exóticas na América do Sul.