

ANTICORPOS PARA O VÍRUS VACCÍNIA NA INFECÇÃO EXPERIMENTAL EM BOVINOS¹

HERMANN G. SCHATZMAYR² e YONE E SILVA DENNE³

SINOPSE.— Anticorpos para o vírus Vaccínia, formados após inoculação em bovinos usados no preparo de vacina antivariólica, foram testados. Titularam-se os anticorpos inibidores de hemaglutinação, fixadores do complemento, neutralizantes e precipitantes. A classe de globulinas a que pertenciam estes anticorpos foi determinada, através prévia filtração em gel de Sephadex G-200.

Observou-se uma rápida formação de anticorpos nos animais, aparentemente mais rápida do que a resposta em pessoas primo-vacinadas e próxima à resposta em revacinados.

O padrão de formação e o desaparecimento precoce das globulinas IgM sugere sua utilidade no diagnóstico de infecções recentes do grupo Pox, o que teria aplicação importante no diagnóstico diferencial de outras infecções vesiculares, bem como na caracterização de anticorpos devidos a antigas vacinações ou infecções por membros deste grupo de vírus.

Palavras chaves adicionais para índice: Vírus vaccínico, imunoglobulinas, respostas de anticorpos.

INTRODUÇÃO

A resposta imunológica para os vírus do grupo Pox é complexa, pelo elevado número de antígenos presentes, desenvolvendo-se anticorpos demonstráveis por diversas técnicas, como descrito, entre outros, por Downie *et al.* (1969).

Neste trabalho procurou-se estabelecer só padrões das respostas sorológicas que são obtidos após infecção maciça em bovinos, quando do preparo de vacina antivariólica. Visou-se, principalmente, determinar os tempos de aparecimento dos anticorpos e a classe de globulinas a que pertenciam, através de coletas sucessivas dos mesmos animais, submetidos a uma inoculação de vírus.

MATERIAL E MÉTODOS

Os soros utilizados neste estudo foram obtidos de dois animais (n.º 60 e 108), usados no preparo de vacina antivariólica no Instituto Oswaldo Cruz, por meio de punção venosa no dia da inoculação com vírus vaccínico (Amostra do I.O.C.) e em datas sucessivas, por cerca de quatro semanas. Inocularam-se os animais por via intradérmica.

Para a titulação de anticorpos usaram-se técnicas rotineiramente utilizadas no laboratório para as titulações dos anticorpos inibidores da hemaglutinação, fixadores do complemento, neutralizantes e precipitantes, como anteriormente descritas por Downie e Kempe (1969).

Quando aplicável foram empregadas microtécnicas em placas de Lucite. Para as provas de neutralização, através da redução do número de placas em cultura de tecidos, foi utilizada uma amostra da linhagem de células LLC-MK₂ (originária do Laboratório de Vírus Vesiculares, CDC, Atlanta, USA).

Quando se usavam as frações de imunoglobulinas, após filtração em Sephadex G-200, titulavam-se tais frações não diluídas e em diluições sucessivas à base do fator dois.

No fracionamento dos soros utilizou-se uma coluna original Sephadex, modelo 2,5 x 100 cm, equilibrando-se o gel com tampão 0,125 M NaCl e TRIS-HCl pH 8,0. Os soros (5 ml) foram dializados uma noite em 2 litros de idêntico tampão. Coletaram-se frações de cerca de 4 ml a cada 10 minutos, adicionando-se azida sódica ao tampão para evitar contaminações.

A densidade ótica das frações foi lida em espectrofotômetro Carl Zeiss modelo PMQ-II no comprimento de onda de 280 nm.

Os soros ou as frações, após filtração em Sephadex, foram tratados pelo Mercapto-etanol segundo Benatvala *et al.* (1967) e, após diálise, testados para verificar a eventual redução no título de anticorpo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os anticorpos encontrados nas diversas amostras de soros dos animais em estudo podem ser visualizados nas Fig. 1 e 2. Verifica-se uma pronta e rápida formação de anticorpos inibidores, fixadores e neutralizantes dentro da primeira semana após a infecção experimental, sendo os anticorpos precipitantes determinados no decorrer da segunda semana.

Os anticorpos neutralizantes permaneceram elevados até a última coleta realizada, declinando os demais.

¹ Aceito para publicação em 26 de abril de 1974.

Realizado no Laboratório de Vírus do Instituto Presidente Castello Branco (IPCB) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Cx. Postal 8.016, Rio de Janeiro, GB, ZC-24, com auxílio do Conselho Nacional de Pesquisas (CNPq).

² Professor de Microbiologia do IPCB e bolsista do CNPq.

³ Ex-Estagiária do Laboratório de Vírus do IPCB, bolsista do CNPq.

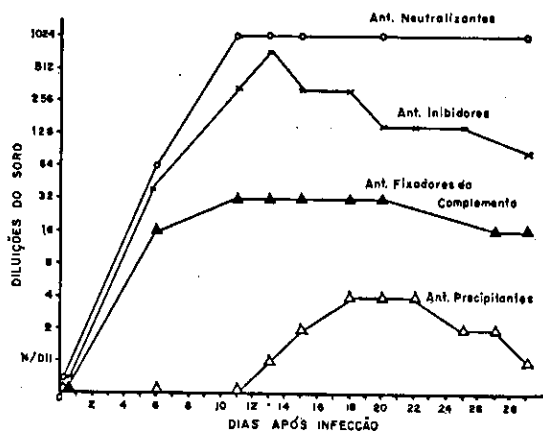


FIG. 1. Anticorpos para o vírus vaccínia no bovino n.º 60, soro não fracionado, expressos pelo maior título alcançado em cada coleta.

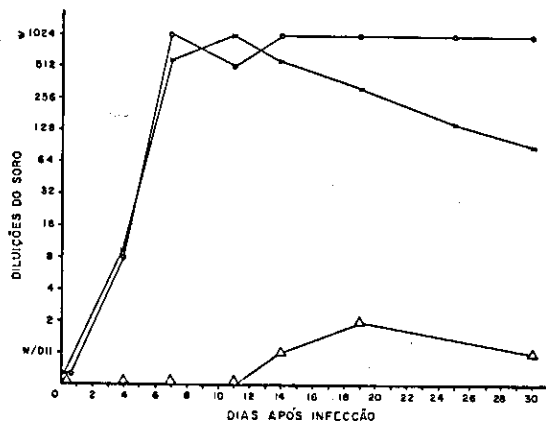


FIG. 2. Anticorpos para o vírus vaccínia no bovino n.º 108, soro não fracionado, expressos pelo maior título alcançado em cada coleta. (ver Fig. 1).

Na Fig. 3 apresentam-se os títulos máximos inibidores da hemaglutinação, alcançados nas frações representativas dos picos de IgM e IgG, após filtração em Sephadex (Piques 1 e 2 da Fig. 4). Verifica-se uma rápida formação da fração IgG, com declínio que se iniciou entre os dias 11 e 13 pós-inoculação. No animal testado (n.º 60) foi possível demonstrar um maior teor inicial de IgM em relação a IgG.

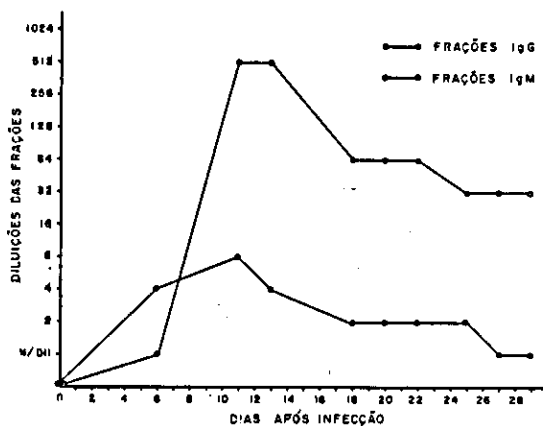


FIG. 3. Soro de bovino n.º 60. Anticorpos inibidores da hemaglutinação, de 10 coletas sucessivas após filtração em Sephadex G-200, expressos pelo maior título alcançado nas frações dos componentes 1 (IgM) e 2 (IgG) (ver Fig. 4).

Devido aos diversos fatores finais de diluição envolvidos, não é possível comparar com precisão os títulos inibidores das Fig. 1 a 3. Verificou-se que os padrões de inibição obtidos com as frações são mais bem definidos do que os obtidos com os soros não fracionados, com leituras precisas e resultados reproduzíveis.

Na Fig. 4 apresenta-se uma curva típica obtida na filtração dos soros, sendo usada a 3.ª coleta do animal n.º 60. Verifica-se formação de 3 picos identificados em função da literatura existente (Flodin & Killander 1962), confirmados pelos seguintes dados: o pique 1

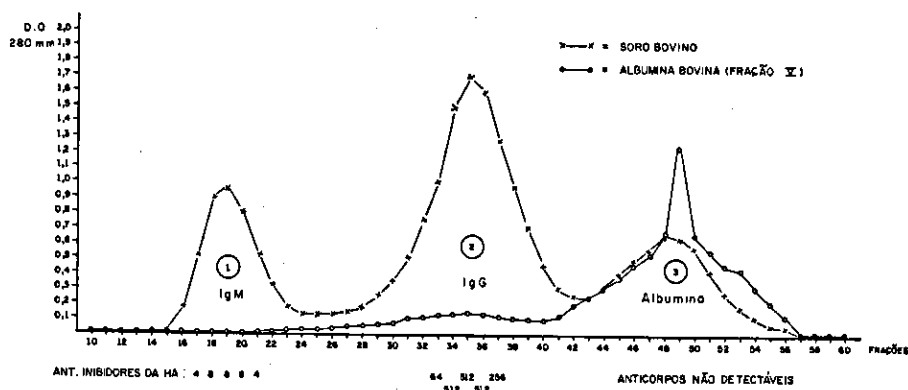


FIG. 4. Curva obtida no fracionamento em gel de Sephadex G-200, de soro bovino 11 dias após infecção com vírus Vaccínia e anticorpos inibidores da hemaglutinação. Incluída na figura curva obtida em condições comparáveis, com albumina bovina.

sofreu uma redução de título inibidor da hemaglutinação de até 4 vezes após tratamento com 2-Mercapto-etanol, demonstrando a presença de macroglobulinas nestas frações. Estas reduções não ocorreram com as frações do pique 2. O 3.º pique foi comparado com a curva obtida, em condições idênticas, com solução de albumina bovina a 1%, fração V, preparada a partir do pó, no tampão descrito, ocorrendo absoluta coincidência no aparecimento nos eluatos dos dois elementos. Verifica-se ainda que nas frações correspondentes a albumina não foram observados anticorpos.

Notória é a baixa quantidade de albumina neste soro, em relação à globulina. Como confirmação de resultados, a relação albumina/globulina foi determinada em todas as coletas deste animal, observando-se valores de 1/2,2 a 1/3, inclusive na coleta pré-infecção.

A mesma determinação realizada em 22 soros de animais adultos, obtidos em matadouro, apresentam, em 18% dos mesmos, padrões semelhantes ao animal n.º 60. O outro animal (n.º 108) apresentou uma relação 1/1 no soro pré-vacinal, passando a 1/2 e 1/3 nas coletas sucessivas.

A inoculação repetida do mesmo antígeno viral no animal de experimentação visando a obtenção de anticorpos conduz a um alargamento do espectro de anticorpos circulantes, freqüentemente dificultando a avaliação dos resultados.

No grupo Pox, pelo número de antígenos envolvidos e a relação antígeno dentro do grupo, é particularmente importante uma única inoculação do animal. Torna-se ainda desejável que a inoculação conduza a uma ampla formação de partículas virais e sua circulação intensa, bem como seja disponível suficiente soro para estudos detalhados. Estas condições foram preenchidas pelo sistema usado neste estudo, com o aproveitamento de animais de grande porte submetidos a uma infecção maciça pelo vírus vaccínico aplicado uma única vez.

Caracterizou-se pela rapidez a resposta de anticorpos encontrada, em função, talvez, da alta adaptação do vírus usado ao bovino e da quantidade inoculada. Assim, verifica-se que no 4.º e 5.º dias, em cada animal respectivamente, são observados todos os anticorpos testados exceto os precipitantes. Os títulos dos anticorpos inibidores, neutralizantes e fixadores (estes últimos testados em apenas um dos animais) vieram a alcançar o máximo em torno do 10.º dia. Downie e Mc Carthy (1959) descrevem em pessoas vacinadas títulos demonstráveis somente após o 10.º dia, em primovacinados, com títulos máximos em torno do 16.º dia. Em revacinados, no entanto, a resposta aproxima-se da obtida neste estudo em animais. A possibilidade de um contacto anterior dos animais usados com antígenos do grupo Pox não parece provável, tanto pela total ausência de anticorpos nos soros pré-vacinais, especialmente os neutralizantes, como ainda por tratar-se de animais jovens.

Os anticorpos do tipo IgM constituem resposta inicial à infecção, tendo sido demonstrada sua presença na maioria das infecções por vírus inclusive em fagos (Svehag 1964, Tao & Uhr 1966), servindo de elemento importante na resolução de problemas de diagnóstico sorológico.

No caso do grupo Pox aqui descrito, prende-se nosso interesse a problemas de diagnóstico de casos suspeitos de infecções pelo grupo Pox, os quais têm sido por nós examinados (Schatzmayr & Mesquita 1970). O recebimento, em geral, de somente uma amostra de sangue do caso suspeito tornou sempre difícil interpretar a titulação de anticorpos.

Nossos resultados (Fig. 2) mostram que os anticorpos IgM surgem precocemente e regredem a títulos mínimos cerca de 30 dias após a infecção, sugerindo sua utilidade no diagnóstico de infecção recente pelo grupo Pox.

O uso do fracionamento em gel de Sephadex nas condições descritas, como método de separação de globulinas IgM de outras frações do soro, apresentou em nossa experiência, sempre, excelentes resultados.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Biologista Arthur Steenhagen Ramos de Souza e ao Farmacêutico Clemente de Azevedo Salles, ambos do Laboratório de Vacina Antivariólica do I.O.C. pela colaboração e interesse pelo trabalho.

Agradecem ainda aos Laboratoristas Ismael da Rocha Lopes e José da Costa Farias Filho pela assistência técnica prestada.

A coluna de Sephadex foi adquirida com auxílio do Conselho Nacional de Pesquisas.

O espectrofotômetro Carl Zeiss usado neste trabalho foi doado ao Laboratório pela Fundação Alexander-von-Humboldt da República Federal Alemã.

REFERÊNCIAS

- Benatvala, J.E., Best, J.M., Kennedy, E.A., Smith, E.E. & Spence, M.E. 1967. A serological method for demonstrating recent infection by Rubella virus. *Brit.med. J.* 3:283-286.
- Downie, A.W. & Mc Carthy, K. 1959. The antibody response in Smallpox and to vaccination. *Proc. 6th Int. Congr. Trop. Med. Malar.* 5:568-582.
- Downie, A.W. & Kempe, C.H. 1969. "Pox viruses", em diagnostic procedures for viral and rickettsial infections. 4.º ed. Am. Assoc. Publ. Hlth, p. 281-320.
- Downie, A.W., Vincent, L.St., Rao, A.R. & Kempe, C.H. 1969. Antibody response following smallpox vaccination and revaccination. *J. Hyg., Camb.*, 67:603-608.
- Flodin, P. & Killander, J. 1962. Fractionation of human serum proteins by gel filtration. *Biochem. biophys. Acta* 63:403-410.
- Schatzmayr, H.G. & Mesquita, J.A. 1970. Examen de especimens para el diagnóstico de la viruela en un laboratorio del Brasil. *Boln Of. San. Panam.* 69:500-503.
- Svehag, S. 1964. The formation and properties of Poliovirus-neutralizing antibody. IV. Normal antibody and early immune antibody of rabbit origin. A comparison of biological and physicochemical properties. *J. exp. Med.* 119:517-528.
- Tao, T. & Uhr, J.W. 1966. Primary-type antibody response in vitro. *Science* 151:1096-1098.

ABSTRACT.- Schatzmayr, H.C., Denne, Y.e S. [*Vaccinia virus antibodies in calves submitted to experimental infection*]. Anticorpos para o vírus vaccinia na infecção experimental em bovinos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira, Série Veterinária* (1974) 9, 25-28 [Pt. en] IPCB, Fundação Oswaldo Cruz, Cx. Postal 8016, Rio de Janeiro, GB, ZC-24, Brazil.

Antibody formation for Vaccinia virus, after inoculation in calves, used for Smallpox vaccine preparation, have been tested. Complement-fixing, hemagglutination inhibition, neu-

tralizing and precipitating antibodies have been demonstrated. The globulin class of these antibodies has also been determined after gel filtration in Sephadex G-200.

A fast antibody formation in the animals has been observed like the one observed in human re-vaccination and faster than that observed in the human prime vaccination.

The pattern observed on formation and decrease of globulins IgM, suggest its use in the diagnosis of recent infections by Pox viruses. This is particularly important in order to make a differential diagnosis with other vesicular virus infections and older infections or vaccinations with members of Pox viruses group.

Additional index words: Pox virus.