

Pseudovaríola em Bovinos no Brasil

SIMONE FABRIS DE SOUZA

Dissertação apresentada ao Instituto Biológico, da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, como parte do processo para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de Concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Edviges Maristela Pituco

**São Paulo
2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo
Núcleo de Informação e Documentação – IB

Souza, Simone Fabris de.

Pseudovariola em bovinos no Brasil. / Simone Fabris de Souza. – São Paulo, 2015.

56 p.

Dissertação (Mestrado). Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-Graduação.

Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.
Linha de pesquisa: Gestão sanitária e ambiental na produção animal.

Orientador: Edviges Maristela Pituco.

Versão do título para o inglês: Pseudocowpox in Brazil cattle.

1. Pseudovariola 2. Isolamento viral 3. PCR 4. Coinfecção 5. Zoonose I.
Souza, Simone Fabris de II. Pituco, Edviges Maristela III. Instituto Biológico
(São Paulo). IV. Título

IB/Bibl./2015/016



**SECRETARIA DE AGRICULTURA E
ABASTECIMENTO**

AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO BIOLÓGICO
Pós-Graduação
Av. Cons. Rodrigues Alves 1252
CEP 04014-002- São Paulo – SP
secretariapg@biologico.sp.gov.br



FOLHA DE APROVAÇÃO

Simone Fabris de Souza

Título: Pseudovariola em bovinos no Brasil

Orientadora: Profa. Dra. Edviges Maristela Pituco

Dissertação apresentada ao Instituto Biológico da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de Concentração: Sanidade Animal

Aprovada em:

Banca Examinadora

Assinatura:

Prof^a Dr^a: Edviges Maristela Pituco

Instituição: Instituto Biológico

Assinatura:

Prof^a Dr^a: Alice Maria Melvile Paiva Della Libera

Instituição: FMVZ - USP

Assinatura:

Prof. Dr.: Simone Miyashiro

Instituição: Instituto Biológico

SOUZA, S. F. PSEUDOVARÍOLA EM BOVINOS NO BRASIL. SÃO PAULO. 2015. DISSERTAÇÃO (MESTRADO EM SANIDADE, SEGURANÇA ALIMENTAR E AMBIENTAL NO AGRONEGÓCIO) – INSTITUTO BIOLÓGICO DE SÃO PAULO

RESUMO

A pseudovariola bovina é causada pelo *pseudocowpox* vírus, pertencente à família *Poxviridae*, gênero *Parapoxvirus*. É caracterizada por causar lesões vesiculares nos tetos das vacas e no muflo de bezerras, podendo comprometer a cadeia produtiva do leite, uma vez que dificulta a ordenha e o contamina. Destaca-se sua importância como diferencial de doenças confundíveis com febre aftosa e por ser uma zoonose de caráter ocupacional tornando-se um problema de saúde pública. O objetivo foi avaliar a epidemiologia da pseudovariola bovina no Brasil; detectar em amostras de epitélio bovino, a presença do vírus da pseudovariola bovina pelas técnicas de isolamento em cultivo celular, microscopia eletrônica e PCR qualitativa; paralelamente realizar o diagnóstico diferencial de vaccínia bovina (detecção do vaccínia vírus) nas mesmas amostras e pelos mesmos métodos. Para tanto foram avaliadas 51 propriedades de diversas regiões do Brasil, com suspeita de doença vesicular (negativo para febre aftosa e estomatite vesicular), os quais foram encaminhados ao Laboratório de Vírus de Bovídeos do Instituto Biológico, entre 2009 a 2014 para realização do diagnóstico diferencial. Foram detectados, pela semi nested PCR, cinco propriedades positivas para pseudovariola bovina oriundas dos estados de Minas Gerais, Mato Grosso e Paraná. Coinfecção (vírus vaccínia e vírus da pseudovariola bovina) foi evidenciada no mesmo rebanho de uma propriedade do estado do Paraná pela semi nested PCR e confirmada pela ME. Detectou-se pela semi nested PCR para *Orthopoxvirus* 64,7% (33) das 51 propriedades analisadas demonstrando que a maioria dos casos de variola bovina ainda são causados principalmente pelo vírus vaccínia. A associação de métodos diagnósticos é fundamental para confirmação dos casos suspeitos de *Parapoxvirus*, *Orthopoxvirus* e coinfecção no mesmo rebanho. Esses resultados demonstram a circulação do vírus da pseudovariola em bovinos no Brasil e alertam para a necessidade de diagnóstico etiológico rápido para diminuir as consequências de medidas restritivas, bem como para planejar estratégias de combate a essas infecções que impactam a saúde pública.

Palavras-chave: pseudovariola, isolamento viral, PCR, coinfecção, zoonose

SOUZA, S. F. PSEUDOCOWPOX IN BRAZILIAN CATTLE. SÃO PAULO. 2015. DISSERTATION (MASTERS OF HEALTH, FOOD AND ENVIRONMENTAL SAFETY OF AGRIBUSINESS) – INSTITUTO BIOLÓGICO OF SAO PAULO

ABSTRACT

Pseudocowpox is caused by viruses belonging to the family Poxviridae, genus Parapoxvirus. It is characterized by vesicular lesions in the roofs of cows and nose of calves, compromising the production chain of milk, as it hampers milking and risk of contamination of milk. Its importance is emphasized because it is a differential disease confounded with FMD and for being a zoonosis of occupational character becoming a public health problem. The aim of the present study was to evaluate the epidemiology of pseudocowpox in Brazil; to detect the presence of pseudocowpox by isolation in cell culture, electron microscopy and qualitative PCR techniques from bovine epithelium samples, and to perform the differential diagnosis of bovine vaccinia (detection of vaccinia virus) in the same sample and same methods. Therefore, 51 properties from various regions of Brazil, were evaluated with suspected vesicular disease (negative for foot and mouth disease and vesicular stomatitis), which were sent to the Laboratory of Viroses de Bovideos of Instituto Biológico, between 2009 to 2014 to perform the differential diagnosis. It was detected by semi nested PCR, five positive properties for pseudocowpox from the states of Minas Gerais, Mato Grosso and Paraná. Co-infection (vaccinia virus and pseudocowpox) was observed in the same flock belonging to state of Paraná by semi nested PCR and confirmed by the ME. It was detected by *Orthopoxvirus* semi-nested PCR, 64.7% (33) of out of 51 properties showing that cases of cowpox are mainly caused by vaccinia virus in Brazil. The association of diagnostic methods is essential for confirmation of suspected cases of *Parapoxvirus*, *Orthopoxvirus* and co-infection in the same herd. These results demonstrate the circulation of Pseudocowpox in Brazil cattle and warn of the need for rapid etiologic diagnosis to decrease the consequences of restrictive measures and to plan strategies to combat these infections that impact public health.

Keywords: *pseudocowpox*, viral isolation, PCR, co-infection, zoonosis.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Ciclo de amplificação da <i>Seminested</i> PCR para <i>Parapoxvirus</i> ...	22
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Relação dos iniciadores utilizados nas reações de Semi-Nested PCR para Parapoxvirus.....	21
Tabela 2: Reagentes de amplificação SemiNested PCR.....	21
Tabela 3: Frequência de Parapoxvirus e Orthopoxvirus utilizando duas técnicas diagnósticas.....	29

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema representativo da Família <i>Poxviridae</i> : classificação segundo sub-família, gênero e espécies.....	7
Figura 2: Microscopia eletrônica dos vírions pertencentes aos gêneros <i>Orthopoxvirus</i> (A) e <i>Parapoxvirus</i> (B). Barra = 100 nm (Schatzmayr <i>et al.</i> , 2000)	8
Figura 3: Representação esquemática do genoma dos poxvírus. O genoma possui aproximadamente 200 kb, apresentando uma região central conservada e regiões terminais variáveis. (Adaptado de Smith & McFadden, 2002)	9
Figura 4: Foto de isolamento em cultivo celular. A: Controle de células da linhagem VERO; B: efeito citopático de <i>Orthopoxvirus</i>	24
Figura 5: Foto de isolamento em cultivo celular. A: Controle de células da linhagem MDBK; B: efeito citopático de <i>Parapoxvirus</i>	24
Figura 6: Detecção de <i>Parapoxvirus</i> em amostras de epitélio pela PCR.....	25
Figura 7: Detecção de <i>Orthopoxvirus</i> em amostras de epitélio pela PCR.....	26
Figura 8: Foto de um isolado de <i>Parapoxvirus</i> . ME.....	27
Figura 9: Foto de um isolado de <i>Orthopoxvirus</i> . ME.....	28

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ChPV.....	<i>Chordopoxvirinae</i>
CPXV.....	<i>Cowpoxvirus</i>
DNA.....	Ácido desoxirribonucleico
ECP.....	Efeito citopático
EnPV.....	<i>Entomopoxvirinae</i>
HSPV.....	<i>Horsepoxvirus</i>
IB.....	Instituto Biológico
kb.....	Quilobases
kpb.....	quilo pares de bases = 1.000 bp
LVB.....	Laboratório de Virose de Bovídeos
M.....	Molar
MDBK.....	Madin and Darby Bovine Kidney
ME.....	Microscopia eletrônica
MEM.....	Meio Essencial Mínimo
Min	Minutos
mM.....	Milimolar
MPXV	<i>Monkeypoxvirus</i>
n-PCR	<i>Nested-PCR</i>
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal
nm.....	Nanômetro
OPV.....	<i>Orthopoxvirus</i>
pb	Pares de bases
PBS.....	solução salina tamponada com fosfato
PCPV.....	<i>Pseudocowpoxvirus</i>
PCR.....	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial Hidrogeniônico
PPV.....	Parapoxvírus
q-PCR	PCR Tempo Real
RCNV.....	<i>Raccoonpoxvirus</i>
RNAm	Ácido ribonucleico mensageiro
RTI.....	Repetições terminais invertidas
Seg.....	Segundos
TATV.....	<i>Taterapoxvirus</i>
TBE.....	Tris- Borato-EDTA
TE.....	Tris-EDTA

UGDV.....	<i>Uasin Gishu disease virus</i>
URSS.....	União das Repúblicas Socialistas Soviéticas
VACV	<i>Vaccinia vírus</i>
VARV.....	Varíola vírus
VERO.....	Linhagem células rim de macaco verde
VM.....	Vírion maduro
VPXV.....	<i>Volepoxvirus</i>
WR.....	Western Reserve
µL	Microlitro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	6
2.1. Classificação dos poxvírus.....	6
2.2. Morfologias da partícula viral da família Poxviridae	7
2.3. Estruturas genômica da família Poxviridae.....	9
2.4. Manifestações clínicas	10
2.5. Gênero Parapoxvirus.....	11
2.5.1 <i>Pseudocowpox vírus</i>	11
2.5.2 <i>Orf vírus</i>	12
2.6. Gêneros Orthopoxvirus.....	12
2.6.1 <i>Vaccinia vírus</i>	12
2.6.2 <i>Cowpox vírus</i>	13
2.7. Ocorrência.....	13
2.8. Diagnóstico	15
2.9. Profilaxia	16
3. OBJETIVOS	17
3.1. Objetivos gerais	17
3.2. Objetivos específicos	17
4. MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1. Origem das amostras.....	18
4.2. Processamento das Amostras	18
4.3. Isolamento viral em cultura de células.....	18
4.4. Microscopia eletrônica (ME).....	19
4.5. Reação da Cadeia da Polimerase (PCR).....	19
4.5.1 Vírus Padrão.....	19
4.5.2 Extração do ácido nucleico.....	19
4.5.3 Dosagem de ácido nucleico	20
4.5.4 Amplificação do ácido nucleico.....	20
4.5.5 Eletroforese em gel de agarose.....	22
5. RESULTADOS	23
5.1. Isolamento em cultura de células.....	23
5.2. <i>Semi-nested</i> PCR.....	25
5.3. Microscopia Eletrônica.....	27
5.4. Concordância entre Métodos.....	28
6. DISCUSSÃO	30
7. CONCLUSÕES	34
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
APENDICE 1	40
ANEXO 1	42

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos maiores produtores de leite do mundo, com forte crescimento da produção com média anual nos últimos 10 anos de 4,1%, conforme dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE 2015). Contudo sem ganhos de produtividade quando comparada com outros países como EUA, Canadá e Argentina. Para obter ganhos de produtividade são necessárias melhorias na Sanidade, Assistência Técnica e Gerencial, Política Agrícola e Qualidade do Leite. No quesito sanidade deve-se implementar medidas de controle para prevenir doenças infecciosas, visando minimizar as perdas econômicas causadas por tais enfermidades e mitigar os riscos a saúde pública (BRASIL, 2015).

Dentro desse contexto, encontra-se a pseudovariola bovina, responsável pelo aumento de gastos com o tratamento de animais infectados, causa a diminuição da produção leiteira e o descarte do leite produzido por esses animais, uma vez que se torna impróprio para a comercialização, havendo ainda a possibilidade de aumento de casos de mastite no rebanho. Trata-se também de uma zoonose ocupacional conhecida como ‘nódulo do ordenhador”, acometendo profissionais que mantêm contato direto com os animais infectados, como ordenhadores e veterinários (EMBRAPA, 2013).

Além disso, as lesões de tetos e úberes em bovinos leiteiros causadas por essa doença são semelhantes às de outras doenças exantemáticas como as da febre aftosa, estomatite vesicular, vaccínia bovina, mamilite herpética bovina, papilomatose, entre outras (BRASIL, 2007).

Vale ressaltar que, de acordo com a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), um programa de vigilância da febre aftosa deve incluir um sistema de alerta precoce que abarque a produção, a comercialização e a cadeia de transformação para informar sobre casos suspeitos que deverão ser investigados, a partir da comunicação da existência de animais com quadros clínicos similares à febre aftosa por um produtor, veterinário, funcionário oficial ou terceiros, procedendo com a confirmação imediata do serviço oficial da existência ou não da enfermidade. O atraso na detecção e confirmação do agente gera um agravamento das perdas econômicas ao produtor rural, uma vez que para conter o avanço destas doenças vesiculares, se torna necessária a interdição da propriedade, vetando a comercialização dos animais e subprodutos até que seja realizado o diagnóstico diferencial para descartar principalmente a febre aftosa e confirmar o diagnóstico por meio de estudos clínicos, epidemiológicos, anatomopatológicos e análise laboratorial para identificação do agente (EMBRAPA, 2013; BRASIL, 2007; OIE, 2013).

A pseudovariola bovina é causada pelo *Pseudocowpox* vírus, pertencente à família *Poxviridae*, subfamília *Chordopoxvirinae*. Dois gêneros importantes constituem essa família: os *Parapoxvirus* (PPV), formado pelo vírus da estomatite papular bovina (BPSV), o *Orf* vírus (ORFV) e, pelo *Pseudocowpox* vírus (PCPV), que se assemelha ao vírus da estomatite papular bovina, portanto pode ser confundido. Os *Orthopoxvirus* (OPV), ao qual pertencem o *Monkeypox* vírus (MPXV), o *Cowpoxvirus* (CPX) e o *Vaccinia* vírus (VACV) (SANT'ANA et al., 2012; CANAL, 2007; MAZUR et al., 2000).

São vírus grandes, encapsulados, com genoma constituído de uma molécula de DNA linear de fita dupla com 130 kb. Os vírions possuem forma de tijolo arredondado com dimensões que variam de 170 a 260nm de largura por 300-450 nm de extensão. Sua morfologia difere de outros gêneros da família *Poxviridae* por apresentar proteínas tubulares organizadas de forma cruzada na sua superfície, o que é importante para o diagnóstico diferencial por meio da técnica de microscopia eletrônica (ME) (ABRAHÃO et al., 2009; CANAL, 2007; SINGH et al., 2007; INOSHIMA; MOROOKA; SENTSUI, 2000; HEYMANN et al., 1998).

Os poxvírus são muito resistentes ao calor e dessecação, produzem efeito citopático (EC) quando em cultivo celular e mantém sua infectividade por longo período em restos celulares e ao serem submetidos ao congelamento (WEIBLEN, 2013).

As enfermidades causadas pelos *Orthopoxvirus* (*cowpox* e *vaccinia*) e pelos *Parapoxvirus* (*pseudocowpox*) são bastante semelhantes, estando associada a lesões crostosas e papulovesiculares sobre os tetos e úberes das vacas leiteiras em lactação, menos frequente em vacas secas ou novilhas e, raramente, atingem a boca de vacas e bezerros. Encontra-se disseminada entre ruminantes domésticos e silvestres em todo o mundo (SANT'ANA et al., 2012; ABRAHÃO et al., 2009; CANAL, 2007; LEWIS-JONES, 2004; JONES et al., 2000; INOSHIMA; MOROOKA; SENTSUI, 2000; HEYMANN et al., 1998).

As lesões medem de 0,5-2,5 cm e desenvolvem-se inicialmente em eritema, pápulas doloridas com centro umbilicado, seguidas de pústulas e, posteriormente, crostas. As crostas são descamadas em poucos dias, mas podem também durar semanas. Este aspecto proliferativo da lesão, bem como as pequenas cicatrizes que aparecem após alguns dias e tem aparência anelar, de ferradura ou de círculo, são característicos da pseudovariola e pode servir para diferenciá-la das lesões causadas pelo *Orthopoxvirus*. Contaminações bacterianas secundárias podem agravar o quadro de infecção aguda e retardar a resolução, o que pode acarretar em queda importante na produção de leite do rebanho. No homem, as lesões normalmente ocorrem nas mãos, podendo acometer os braços e a face e são geralmente localizadas e auto

limitantes e na fase aguda da doença pode causar febre e aumento dos linfonodos regionais, tendo caráter leve (ABRAHÃO et al., 2010; CANAL, 2007; LOBATO, 2005; LEMOS & RIET-CORREA, 2001; KAHRS, 2001; HIRSCH & ZEE, 2000; MURPHY et al., 1999; GIBBS et al., 1970).

Abrahão et al. (2010) relataram o vírus da pseudovariola mostrando que ele está presente no Brasil. Contudo, a maioria dos trabalhos referem-se a este agente baseando-se em descrições clínicas nos animais e acometimento em humanos e, conseqüentemente induzindo a erros diagnósticos. Portanto, a aplicação de métodos moleculares possibilitando diagnóstico etiológico rápido é importante para concluir o caso clínico.

Na Inglaterra, a prevalência nos rebanhos é alta e na África do Sul, a doença tem sido implicada em perdas importantes para o rebanho leiteiro, principalmente pela redução da produção de leite, tendo sido associada a condições precárias de higiene e de manejo do gado leiteiro (CANAL, 2007).

Kahrs (2001), em Nova York (EUA), descreveu um surto de pseudovariola bovina no qual todos os animais apresentaram pelo menos uma lesão em formato de pápula, pústula ou cicatrizes nos tetos. Alguns bovinos apresentaram recorrência após a cura das lesões iniciais e muitos casos de mastite surgiram, provavelmente, em função de falta de higiene. Além disso, tratadores dos animais apresentaram lesões e cicatrizes nas mãos e braços, que não respondiam a tratamento médico.

No Japão foram descritos casos esporádicos da doença com ulcerações que progrediam para necrose nos tetos, acarretando sérios prejuízos aos produtores (INOSHIMA; MOROOKA; SENTSUI, 2000).

Na Iugoslávia também houve casos da doença após muitos anos sem a enfermidade, suspeitando-se inicialmente de vaccínia, mas confirmados como sendo causados pelo vírus da paravaccínia (MARIC et al., 2001).

Em 2010, Abrahão et al. descreveram o primeiro caso humano de coinfeção pelos vírus Vaccínia e Pseuowpox no estado de Minas Gerais, no qual um trabalhador rural que apresentava uma lesão de pele pustular ulcerada e sintomas como febre, mialgia e linfadenopatia e que manteve contato direto com animais com lesões nos tetos. Análises laboratoriais confirmaram a presença de VACV e PCPV tanto no paciente quanto nos animais.

No Brasil, um surto incomum de doença de pele em bezerros de engorda no sul do país, caracterizada pela presença de pápulas, vesículas e lesões crostosas proliferativas no focinho, confirmou a presença de partículas típicas de *Parapoxvirus* no exame de microscopia eletrônica e, após a reação em cadeia da polimerase e do sequenciamento dos amplicons gerados verificou-se uma homologia nucleotídica de

97% com *pseudocowpox* vírus e menor homologia com outros *Parapoxvirus* (CARGNELUTTI et al., 2012).

Schatzmayr et al. (2000) observaram, por meio de microscopia eletrônica, a presença de *Parapoxvirus* a partir de lesões espalhadas por diferentes partes do corpo em trabalhadores que tiveram contato com lesões de tetos, no município de Piraí, Rio de Janeiro. Sartori-Barravieira et al. (1997) conduziram um trabalho sobre nódulo do ordenhador, no qual as lesões nas mãos dos profissionais estudados foram ocasionadas não só pelo contato direto com animais, mas também com carne *in natura*, chegando a acometer açougueiros e donas de casa.

Não há variação sazonal na incidência da pseudovariola bovina e a penetração dos vírus se dá por soluções de continuidade em lesões pré-existentes nos tetos e úbere das vacas. Animais infectados introduzidos em rebanhos sadios possibilitam a entrada do agente, havendo disseminação lenta por contato direto ou indireto, muitas vezes através dos bezerros quando estão se amamentando, ou ainda, por meio de insetos (moscas), equipamentos de ordenha e pelas mãos de ordenhadores (CANAL, 2007; LEMOS & RIET-CORREA, 2001).

Ao contrário do vaccínia vírus, a infecção causada pelo vírus da pseudovariola não confere imunidade prolongada podendo haver reinfecções num mesmo rebanho, o que é mais comum, por outro lado, infecções crônicas podem ocorrer, porém com menor frequência e a infecção prévia com o vírus do gênero *Orthopoxvirus* que acometem bovinos parece não proteger os animais da pseudovariola (CANAL, 2007; KAHRS, 2001; LEMOS & RIET-CORREA, 2001).

Vale lembrar ainda que o vírus se multiplica lentamente em culturas derivadas de tecidos de bovinos, mas não em membrana corioalantóide de ovos embrionados, metodologia diferencial do vírus *vaccinia* (CANAL, 2007).

Os tratadores devem ser alertados sobre a possibilidade de transmissão da enfermidade ao ser humano, principalmente se forem portadores de algum tipo de imunodeficiência ou mesmo se estiverem em tratamento com medicamentos imunossupressores (WEIBLEN, 2013).

Medidas preventivas e de controle da enfermidade são imprescindíveis: os ordenhadores devem sempre usar luvas e lavar as mãos cuidadosamente antes e após a ordenha, animais acometidos pela doença devem sempre ser ordenhados por último, o leite deve ser descartado e as lesões tratadas com pomadas umectantes especiais e desinfetantes. Além disso, os equipamentos de ordenha devem ser aferidos e desinfetados, tomando cuidados para evitar procedimentos de limpeza e desinfecção que possam irritar tetos ou mesmo utilizar desinfetantes que não sejam

eficientes. Antes da aquisição de novos animais submetê-los um exame minucioso, visando evitar a entrada de bovinos doentes no rebanho (WEIBLEN, 2013).

O diagnóstico laboratorial deve ser realizado para uma confirmação definitiva em associação com os achados clínicos, dados epidemiológicos e anatomopatológicos, uma vez que os sinais clínicos isoladamente podem ser confundidos com diversas enfermidades vesiculares, podendo ser realizado a partir do isolamento viral, microscopia eletrônica ou mesmo por técnicas de biologia molecular, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e PCR em tempo real (TRINDADE et al., 2003; NITSCHKE et al., 2006).

Para o diagnóstico molecular da pseudovariola bovina são empregados oligonucleotídeos cujo alvo é um fragmento do gene B2L, principal proteína do envelope dos vírus pertencentes ao gênero *Parapoxvirus*, estes oligos detectam além do vírus da pseudovariola bovina também os vírus da estomatite papular e ectima contagioso, por este motivo há necessidade de se estabelecer procedimentos, tanto na área clínica quanto laboratorial, para distinguir a etiologia. Para tanto pode-se utilizar primers que detectam os três vírus e posterior sequenciamento e análise filogenética (NITSCHKE et al., 2006; CARGNELUTTI et al., 2012) para a diferenciação. Esse procedimento constitui alternativa útil em investigações epidemiológicas, pois é um meio para se entender melhor os mecanismos que influenciam a dinâmica de transmissão e a identificação dos fatores de risco em uma comunidade. Permite analisar a biodiversidade existente contribuindo para a identificação, classificação e diagnóstico (IST, 2013; KATO-MAEDA et al., 2001).

Este estudo foi realizado considerando a carência de dados no Brasil sobre o tema doença exantemática em bovinos causada pelo vírus *pseudocowpox*.

Em se tratando de enfermidade confundível com a Febre Aftosa, responsável por embargos econômicos aos produtos de origem animal por países importadores, o diagnóstico diferencial rápido e preciso para o *pseudocowpox* vírus e demais vírus do mesmo gênero, visam auxiliar os órgãos de Defesa Sanitária Animal nas tomadas de decisões que permitem a redução de perdas econômicas, tanto para o produtor quanto para o país contribuindo para a formação de um perfil confiável do Brasil frente ao mercado mundial.

A identificação de casos de pseudovariola nos rebanhos também é importante para direcionar os trabalhos de educação sanitária dos órgãos de Saúde Pública que juntamente com a Defesa Sanitária Animal realiza atendimentos destes surtos com repercussão positiva na vigilância sanitária da saúde humana e animal. Sendo assim, a rápida detecção pode abreviar as consequências de medidas restritivas em relação à febre aftosa, e também, para planejar estratégias de combate a essas infecções em

áreas endêmicas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

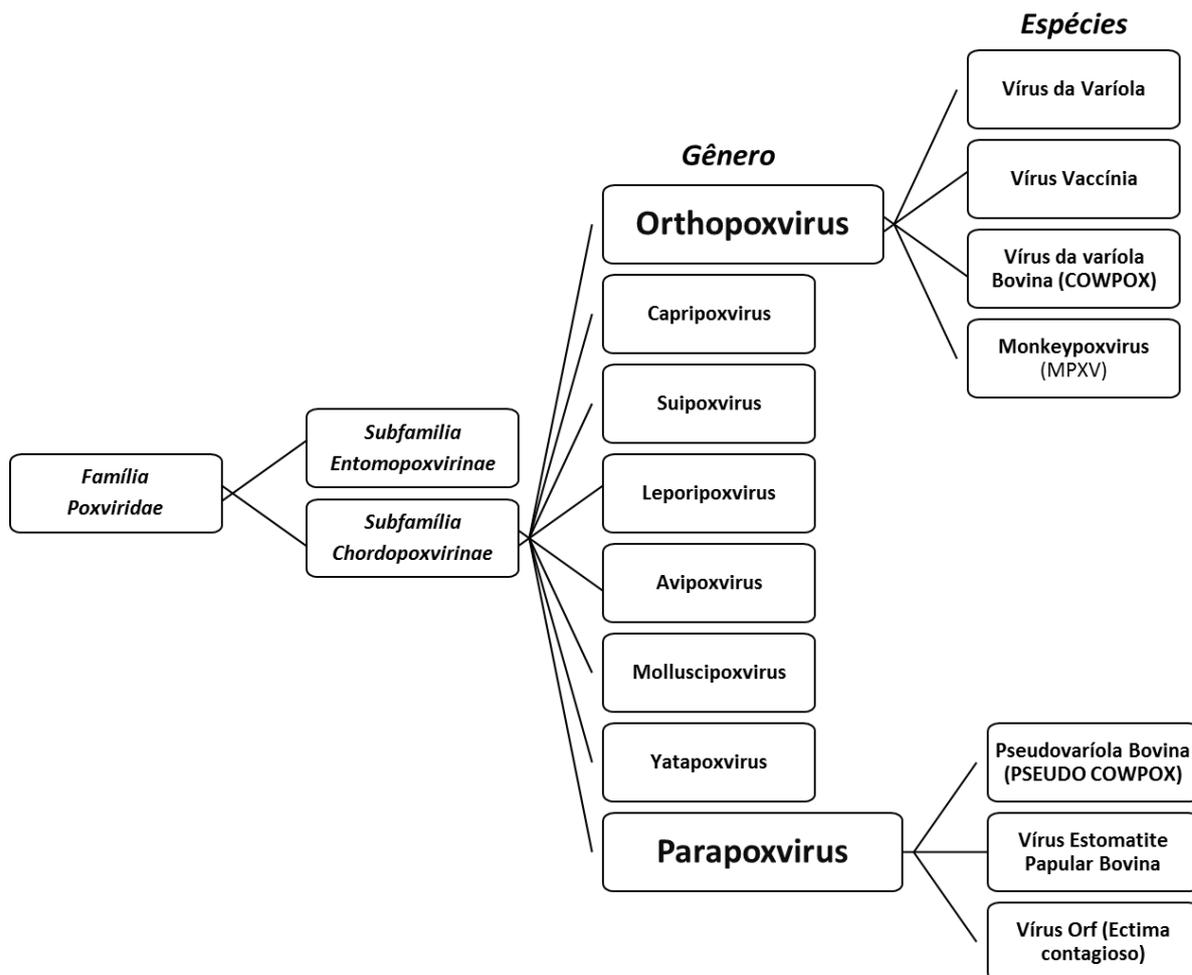
2.1. Classificação dos poxvírus

As propriedades características da família *Poxviridae* incluem a ocorrência da replicação no citoplasma e um vírion grande e complexo, que contém enzimas de síntese do mRNA e um genoma composto de uma única molécula de DNA dupla-fita de comprimento entre 130 a 300 quilobases (kb) com uma volta tipo grampo-de-cabelo em cada terminação (MOSS, 2002). Os poxvírus são agrupados em duas subfamílias: *Chordopoxvirinae* (ChPV) e *Entomopoxvirinae*(EnPV). A divisão destas duas subfamílias baseia-se no tipo de hospedeiro infectado, que consiste de vertebrados em ChPV e insetos em EnPV. A subfamília *Chordopoxvirinae* consiste de oito gêneros: *Orthopoxvirus*, *Parapoxvirus*, *Avipoxvirus*, *Capripoxvirus*, *Leporipoxvirus*, *Suipoxvirus*, *Molluscipoxviruse* *Yatapoxvirus*, (Figura 1). Membros do mesmo gênero são geneticamente relacionados, apresentando morfologia e hospedeiros similares, além de compartilharem alguma relação antigênica. Todavia, há outros poxvírus que ainda não estão bem classificados, incluindo novos vírus, como os isolados de lagartos, rãs, cervos, cangurus, entre outros (MOSS, 2002).

A pseudovariola bovina é causada pelo *Pseudocowpox* vírus, pertencente à família *Poxviridae*, subfamília *Chordopoxvirinae*. Dois gêneros importantes constituem essa família: os *Parapoxvírus* (PPV), formado pelo vírus da estomatite papular bovina (BPSV), o *Orf* vírus (ORFV) e, por sua vez, pelo *Pseudocowpox* vírus (PCPV), que se assemelha à estomatite papular bovina; Os *Orthopoxvirus* (OPV), ao qual pertencem o *Monkeypox* vírus (MPXV), o *Cowpoxvirus* (CPX) e o *Vaccinia* vírus (VACV) (SANT'ANA et al., 2012; CANAL, 2007; MAZUR et al., 2000).

As espécies *Varíola virus* (VARV), CPXV, VACV e MPXV são capazes de infectar seres humanos. Adicionalmente, além do CPXV e VACV, as espécies CMPV, ECMV, *Raccoonpoxvirus* (RCNV), *Volepoxvirus*(VPXV), *Taterapoxvirus* (TATV), *Uasin Gishu disease vírus* (UGDV) e *Horsepoxvirus*(HSPV) são patógenos de grande importância animal (MOSS, 2002).

O gênero *Orthopoxvirus* inclui vários patógenos virulentos de importância médica veterinária e humana com ampla distribuição geográfica (MOSS, 2002; PISKUREK; OKADA, 2007).



Fonte: Adaptado MOSS, 1996.

Figura 1. Esquema representativo da Família *Poxviridae*: classificação segundo subfamília, gênero e espécies

2.2 Morfologias da partícula viral da família *Poxviridae*

Comparados a maioria dos outros vírus animais, os vírions dos poxvírus são maiores e distinguíveis por microscopia eletrônica óptica. Com uma maior resolução, conseguida através da microscopia eletrônica, é possível a visualização de características ultraestruturas: um vírion retangular (OPV) ou cilíndrico (PPV), coberto irregularmente com proteínas tubulares (HAZELTON; GELDERBLUM, 2003; MERCER et al., 2007).

A forma básica de infecção dos poxvírus é o vírion maduro (VM). O vírion extracelular envelopado consiste essencialmente do VM enclausurado por uma membrana adicional.

A estrutura interna do vírion é complexa, consistindo de um cerne bicôncavo e agregados de materiais heterogêneos, denominados corpos laterais, entre as concavidades e a membrana externa. O cerne parece ser composto por duas camadas, com uma largura de 18 a 19nm. A membrana interna parece ser contínua, exceto pela presença de um pequeno número de canais. A face externa possui uma estrutura paliçada que, possivelmente, é constituída de espículas em formato de T (8nm de comprimento e 5nm de largura), que estão ancoradas em uma provável membrana inferior (Figura 2) (MOSS, 2002).

Os vírions de PPV possuem forma de tijolo arredondado com dimensões que variam de 170 a 260nm de largura por 300-450 nm de extensão. Sua morfologia difere de outros gêneros da família *Poxviridae* por apresentar proteínas tubulares organizadas de forma cruzada na sua superfície, o que é importante para o diagnóstico diferencial por meio da técnica de microscopia eletrônica (ME) (ABRAHÃO et al., 2009; CANAL, 2007; SINGH et al., 2007; INOSHIMA; MOROOKA; SENTSU, 2000; HEYMANN et al., 1998).

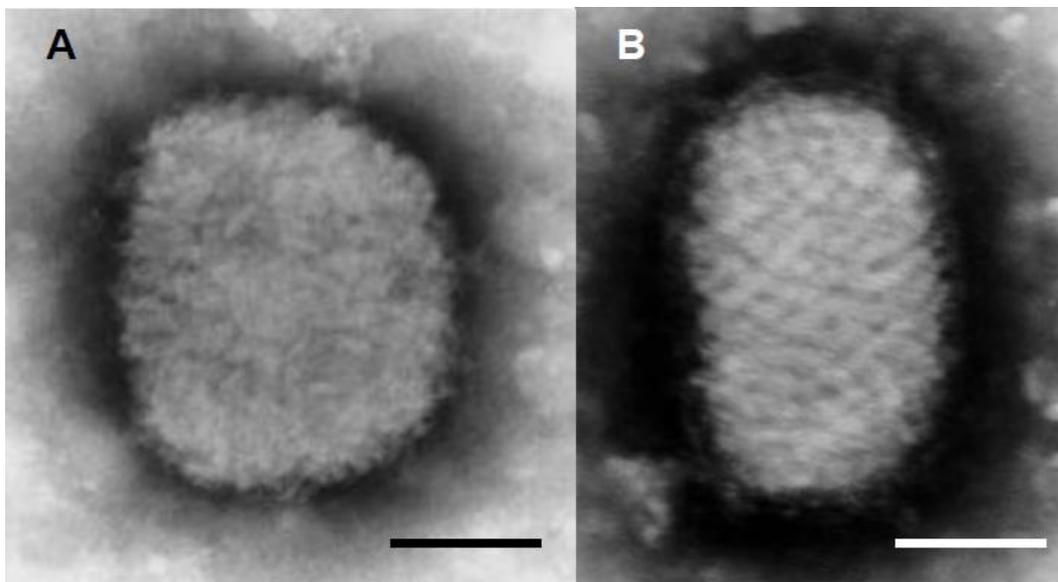


Figura 2 - Microscopia eletrônica dos vírions pertencentes aos gêneros *Orthopoxvirus* (A) e *Parapoxvirus* (B). Barra = 100nm (SCHATZMAYR et al., 2000).

2.3. Estrutura genômica da família *Poxviridae*

O genoma dos poxvírus se constitui de uma molécula de DNA dupla fita linear. As fitas são covalentemente ligadas, produzindo uma terminação do tipo grampo-de-cabelo. Estas regiões situadas nas terminações do genoma contêm repetições terminais invertidas (RTI) de tamanho variável (<0,1 - 12,4 kpb) idênticas e em orientação oposta possuindo diversas bases extra hélices e um conteúdo rico em repetições de DNA. Os mecanismos envolvidos na gênese das RTI, assim como sua manutenção, são ainda desconhecidos, porém as RTI são importantes durante a replicação do DNA viral (MERCER *et al.*, 2007). Geralmente, os genes localizados na região central do genoma são conservados, sendo em sua maioria essenciais para a replicação viral. Esta região codifica, principalmente, proteínas estruturais e enzimas envolvidas no metabolismo do ácido nucléico. Em contraste, os genes localizados próximos às regiões terminais são mais variáveis, não essenciais à multiplicação viral *in vitro* e são geralmente transcritos em direção às regiões terminais (Figura 3). Estes genes estão relacionados com o tropismo por hospedeiros, imunomodulação e virulência (MCFADDEN, 2005).

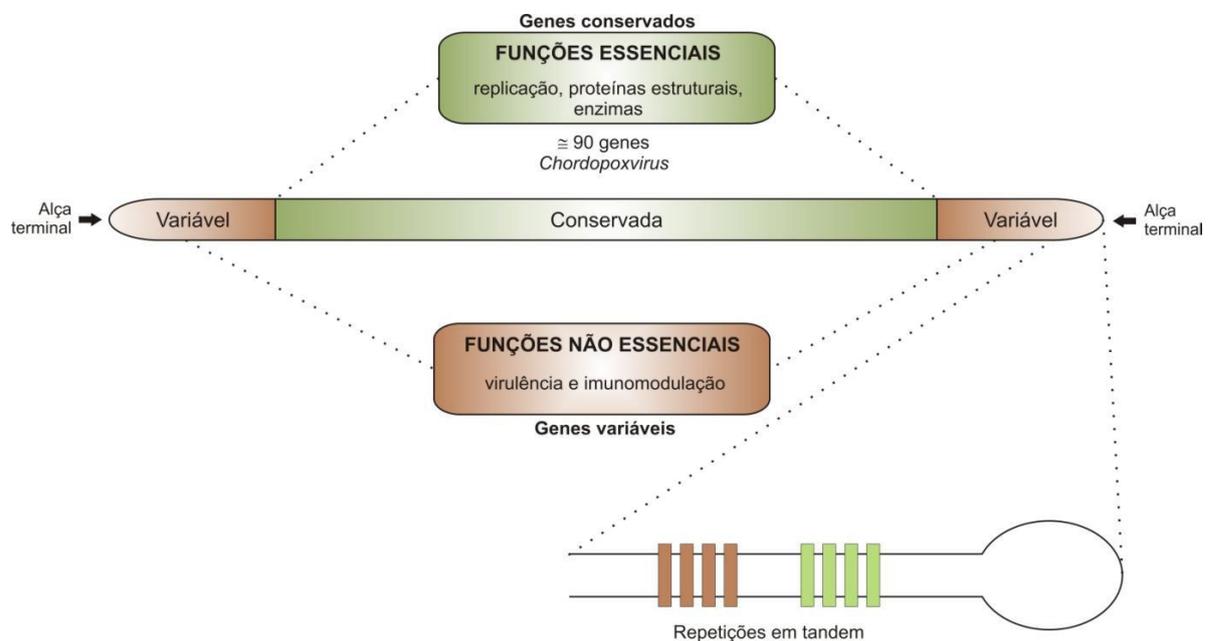


Figura 3 - Representação esquemática do genoma dos poxvírus. O genoma possui aproximadamente 200 kb, apresentando uma região central conservada e regiões terminais variáveis. (Adaptado de SMITH; MCFADDEN, 2002).

Existem, entretanto, aproximadamente 90 genes que são comuns para todos os membros da subfamília ChPVs. Estes genes estão envolvidos em funções chaves como replicação, transcrição e montagem do vírion, agrupados na região central do genoma. Em oposição, os genes que são espécie-específico ou gênero-específico estão usualmente distribuídos próximos as duas porções finais do cromossomo (GUBSER et al., 2004). Muitos destes genes terminais codificam proteínas com a função de reduzir os processos antivirais do hospedeiro que incluem apoptose, reconhecimento e apresentação de antígenos, funções de algumas citocinas e processos de sinalização do sistema imune e, assim, têm sido denominados *genes de virulência* (HUGHES; FRIEDMAN, 2005).

2.4 Manifestações clínicas

As enfermidades causadas pelos *Orthopoxvirus* (cowpox e vaccinia) e pelos *Parapoxvirus* (pseudocowpox) são bastante semelhantes, sendo essa última a mais branda estando associada a lesões crostosas e papulovesiculares sobre os tetos e úberes das vacas leiteiras em lactação, menos frequente em vacas secas ou novilhas e, raramente, atingem a boca de vacas e bezerros. Encontram-se disseminadas entre ruminantes domésticos e silvestres em todo o mundo (SANT'ANA et al., 2012; ABRAHÃO et al., 2009; LEWIS-JONES, 2004; JONES et al., 2000; INOSHIMA, Y.; MOROOKA, A.; SENTSUI, H., 2000; HEYMANN, D.L.; SZCZENIEWSKI, M.; ESTEVES, K., 1998).

As lesões medem de 0,5-2,5 cm e desenvolvem-se inicialmente em eritema, pápulas doloridas com centro umbilicado, seguidas de pústulas e, posteriormente, crostas. As crostas são descamadas em poucos dias, mas podem também durar semanas. Este aspecto proliferativo da lesão, bem como as pequenas cicatrizes que aparecem após alguns dias e tem aparência anelar, de ferradura ou de círculo, são características da pseudovaríola e podem servir para diferenciá-la das lesões causadas pelo *Orthopoxvirus*. Contaminações bacterianas secundárias podem agravar o quadro de infecção aguda e retardar a resolução, o que pode acarretar em queda importante na produção de leite do rebanho. No homem, as lesões normalmente ocorrem nas mãos, podendo acometer os braços e a face, geralmente são localizadas e auto-limitantes, já na fase aguda da doença pode causar febre e aumento dos linfonodos regionais, tendo caráter leve (ABRAHÃO et al., 2010; LOBATO et al., 2005; LEMOS; RIET-CORREA, 2001; KAHRS, 2001; HIRSCH & ZEE, 2000; MURPHY et al., 1999; GIBBS, E.P.J.; JOHNSON, R.H.; OSBORNE, A. D., 1970).

2.5 Gênero *Parapoxvirus*

2.5.1 *Pseudocowpox vírus*

Também conhecida como Paravaccínia ou Nódulo do ordenhador, a infecção por *Pseudocowpox vírus* é ocupacional em ordenhadores e veterinários, e também afeta as pessoas que manipulam o leite fresco. A infecção humana é, portanto, acidental e ocorre somente quando o homem entra em contato com animais infectados ou manipula carne e leite contaminada com o vírus. (BARRAVIEIRA, 2005). A infecção é endêmica para o gado, causando lesões no úbere, tronco, pernas e cavidade oral, levando a formação de pústulas e crostas. (BARRAVIEIRA, 2005; MERCER *et al.*, 2007). O período de incubação varia entre cinco e 15 dias. Clinicamente, as lesões manifestam-se como pápulas eritematosas achatadas, que, após alguns dias, mudam para nódulos eritematosos violáceos. A pele se torna opaca e acinzentada com pequenas crostas, e com uma depressão central. Na maioria dos casos os nódulos ocorrem em pequenas quantidades nas mãos, particularmente nos dedos e ocasionalmente na face (BARRAVIEIRA, 2005).

Não há variação sazonal na incidência da pseudovaríola bovina e a penetração dos vírus se dá por soluções de continuidade em lesões pré-existentes nos tetos e úbere das vacas. Animais infectados introduzidos em rebanhos sadios possibilitam a entrada do agente, havendo disseminação lenta por contato direto ou indireto, muitas vezes através dos bezerros quando estão se amamentando, ou ainda, por meio de insetos (moscas), equipamentos de ordenha e pelas mãos de ordenhadores (CANAL, 2007; LEMOS & RIET-CORREA, 2001).

Ao contrário da *vaccínia*, a infecção causada pelo vírus da pseudovaríola não confere imunidade prolongada podendo haver reinfecções num mesmo rebanho, o que é mais comum, por outro lado, infecções crônicas podem ocorrer com menor frequência e a infecção prévia com o vírus do gênero *Orthopoxvirus* que acometem bovinos parece não proteger os animais da pseudovaríola (CANAL, 2007; KAHRS, 2001; LEMOS & RIET-CORREA, 2001).

Os sinais clínicos desaparecem espontaneamente após seis a oito semanas, sem deixar cicatrizes. A prevenção consiste no uso de luvas e desinfetantes antes e depois da ordenha ou manipulação destes animais (BARRAVIEIRA, 2005)

2.5.2 Orf vírus

A infecção por *Orf vírus* deflagra as doenças dermatite pustular contagiosa e dermatite labial infecciosa, comuns em áreas com criação de ovelhas. A infecção pelo Orf vírus em ovelhas foi descrita primeiramente em 1787 e em cabras em 1879. O primeiro caso em humanos foi relatado em 1934 (BARRAVIEIRA, 2005). O Orf vírus é transmitido pelo contato com os animais infectados ou com fômites. A transmissão para humanos ocorre via contato com zonas da pele ferida de animais infectados. É muito frequente entre ordenhadores, veterinários, açougueiros, sendo considerada uma doença vinculada à profissão. Contaminação prévia não provê imunidade permanente, sendo que em casos de reinfecção se observa uma menor severidade da doença (BARRAVIEIRA, 2005). O período de incubação é de aproximadamente uma semana, as lesões manifestam-se sob a forma de ulcerações com formação de crostas localizadas mais comumente nas faces extremas dos lábios. Em casos mais graves, a infecção se estende até as gengivas, olhos, língua, narinas, úbere, vulva, região perianal, espaços interdigitais e coroas dos cascos. As lesões da língua, do esôfago e do rúmen são normalmente devidas a uma infecção secundária. Os cordeiros em idade de amamentação são severamente afetados e suas mães podem apresentar proliferações verrugosas nas tetas e partes vizinhas ao úbere (MOSS, 2002). Logo após o rompimento das vesículas ocorre formação das crostas. A recuperação pode ser rápida, caso não ocorram infecções secundárias. As lesões no interior da boca podem dificultar ou impedir o animal de se alimentar. Nos animais que são infectados apresentam perda de peso intensamente, devido à dificuldade de se alimentar, ao ingerir saliva com o vírus pode ocorrer à disseminação das lesões para os compartimentos estomacais, intestinos e até aos pulmões; nesses casos, pode levar o animal ao óbito (BARRAVIEIRA, 2005; MERCER *et. al.*, 2007).

2.6 Gênero *Orthopoxvirus*

2.6.1 *Vaccinia vírus*

A origem de VACV é incerta. Ele parece ter surgido do extinto *Horsepoxvirus* ou do BPV, que é antígenicamente muito semelhante ao VACV (MOSS, 2002). Existem numerosos isolados de VACV que diferem em suas propriedades biológicas e virulência em seres humanos e em outros modelos animais. Os isolados virais mais amplamente utilizados em laboratórios são Western Reserve (WR) e Copenhagen (MOSS, 2002). Não existem reservatórios naturais para o VACV, porém, recentemente

foram descritos viroses emergentes como *Cantagalo* (DAMASO et al., 2000) e *Araçatuba* (TRINDADE et al., 2003), cujos vírus associados possuem genes que compartilham 99% de homologia com genes de VACV. Acredita-se que tais vírus se originaram pelo estabelecimento de VACV em gado bovino no Brasil durante a campanha de vacinação contra varíola. As estirpes *Cantagalo* e *Araçatuba* produzem lesões cutâneas que apresentam similaridade com lesões de CPXV.

2.6.2 Cowpox vírus

Cowpox vírus (CPXV) foi denominado como resultado da associação com lesões pustulares em tetas de vacas e nas mãos de ordenhadores, entretanto, repetidos estudos demonstram que a infecção por CPXV não é uma doença comum (BULLER; PALUMBO, 1991). Esta zoonose está restrita ao Reino Unido, continente europeu e partes adjacentes a extinta URSS. Embora originalmente descrita como uma infecção adquirida por ordenhadores é raramente encontrada no gado bovino e muitos casos resultam do contato com felinos infectados. Atualmente tem sido encontrada em uma gama de hospedeiros, como ratos, gerbil e em diferentes animais de zoológicos (leões, tamanduás e elefantes) (LEWIS-JONES, 2004; VOROU et al., 2008). Além disso, estudos sorológicos corroboram a hipótese de pequenos roedores como reservatórios (VOROU et al., 2008). O período de incubação da infecção por CPXV é de aproximadamente sete dias, surgindo então sinais abruptos de febre, dor de cabeça, dor muscular, e algumas vezes náusea e vômito. As lesões cutâneas localizam-se, na maioria das vezes, nas mãos e face, iniciando como pápulas vermelhas, inicialmente solitárias, mas com rápida disseminação, seguida do surgimento de pústulas. O edema e eritema são muito mais pronunciados do que os vistos em infecções com *Orf vírus* (VOROU et al., 2008). A infecção prévia por CPXV confere alguma imunidade contra a infecção por VARV, fato explorado por Edward Jenner para suas primeiras tentativas de vacinação (LEWIS-JONES, 2004).

2.7 Ocorrência

No Brasil, casos de doença exantemática em bovinos e humanos têm sido relatados em diversas regiões, cujo agente causal é o *Pseudocowpox vírus*. Em 2010, Abrahão et al. descreveram o primeiro caso humano de co-infecção pelos vírus Vaccinia e Pseudocowpox no estado de Minas Gerais, no qual um trabalhador rural que apresentava uma lesão de pele pustular ulcerada e sintomas como febre, mialgia e linfadenopatia e que manteve contato direto com animais com lesões nos tetos.

Análises laboratoriais confirmaram a presença de VACV e PCPV tanto no paciente quanto nos animais. Um surto incomum de doença de pele em bezerros de engorda no sul do país, caracterizada pela presença de pápulas, vesículas e lesões crostosas proliferativas no focinho, confirmou a presença de partículas típicas de Parapoxvírus no exame de microscopia eletrônica e, após a reação em cadeia da polimerase e o sequenciamento dos amplicons gerados, verificou-se uma homologia nucleotídica de 97% com pseudocowpox vírus e menor homologia com outros Parapoxvirus (CARGNELUTTI et al., 2012).

Na Inglaterra, a prevalência nos rebanhos é alta e na África do Sul, a doença tem sido implicada em perdas importantes para o rebanho leiteiro, principalmente pela redução da produção de leite, estando associada a condições precárias de higiene e de manejo do gado leiteiro (CANAL, 2007). Kahrs (2001), em Nova York (EUA), descreveu um surto de pseudovaríola bovina no qual todos os animais apresentaram pelo menos uma lesão em formato de pápula, pústula ou cicatrizes nos tetos. Alguns bovinos apresentaram recorrência após a cura das lesões iniciais e muitos casos de mastite surgiram, provavelmente, em função de falta de higiene. Além disso, tratadores dos animais apresentaram lesões e cicatrizes nas mãos e braços que não respondiam a tratamento médico.

No Japão foram descritos casos esporádicos da doença com ulcerações que progrediam para necrose nos tetos, acarretando sérios prejuízos aos produtores (INOSHIMA, Y.; MOROOKA, A.; SENTSU, H., 2000). Na Iugoslávia também houve casos da doença após muitos anos sem a enfermidade, suspeitando-se inicialmente de vaccínia, mas confirmados como sendo causados pelo vírus da paravaccínia (MARIC, D.; DURICIC, B.; GLIGIC, A., 2001).

Schatzmayr et al. (2000) observaram, por meio de microscopia eletrônica, a presença de Parapoxvirus a partir de lesões espalhadas por diferentes partes do corpo em trabalhadores que tiveram contato com lesões leiteiras, no município de Piraí, Rio de Janeiro. Sartori-Barravieira et. al. (1997) conduziram um trabalho sobre nódulo do ordenhador, no qual as lesões nas mãos dos profissionais estudados foram ocasionadas não só pelo contato direto com animais, mas também com carne in natura, chegando a acometer açougueiros e donas de casa.

Por outro lado, a possibilidade do próprio bovino estar atuando como portador do vírus deve ser estudada, já que foi evidenciada a persistência de *Parapoxvirus* em bovinos naturalmente infectados (IKETANI et al., 2002).

2.8 Diagnóstico

O diagnóstico laboratorial por meio de métodos de isolamento viral, microscopia eletrônica ou mesmo por técnicas de biologia molecular, como a PCR convencional e PCR em tempo real deve ser realizado para confirmação do agente etiológico, em associação com os achados clínicos e dados epidemiológicos, uma vez que os sinais clínicos isoladamente podem ser confundidos com diversas enfermidades vesiculares (TRINDADE et al., 2003; NITSCHKE et al., 2006).

Para o diagnóstico molecular da pseudovariola bovina são empregados oligonucleotídeos com alvo o gene B2L, principal proteína do envelope dos vírus pertencentes ao gênero *Parapoxvirus*, que detecta os vírus da estomatite papular, ectima contagioso e pseudovariola bovina, por este motivo há necessidade de se estabelecer procedimentos tanto na área clínica quanto laboratorial, para distinguir a etiologia. Para tanto pode-se utilizar *primers* que detectam os três vírus e posterior sequenciamento e análise filogenética (NITSCHKE et al., 2006; CARGNELUTTI et al., 2012). Esse procedimento constitui alternativa útil em investigações epidemiológicas, pois é um meio para se entender melhor os mecanismos que influenciam a dinâmica de transmissão e a identificação dos fatores de risco em uma comunidade. Permite analisar a biodiversidade existente contribuindo para a identificação, classificação e diagnóstico (IST, 2013; KATO-MAEDA et al., 2001).

A cultura celular para isolamento do vírus é uma excelente alternativa de diagnóstico. Dependendo do poxvírus, o efeito citopático característico pode ser visualizado após 12 horas e se recomenda que somente pessoal com experiência conduza a diferenciação do vírus após cultivo celular ou em membrana corioalantóide (KURTH; NITSCHKE, 2007).

No caso do pseudocowpox vale lembrar ainda que o vírus se multiplica lentamente (em média 7 a 10 dias) em culturas derivadas de tecidos de bovinos, mas não em membrana corioalantóide de ovos embrionados, metodologia diferencial do vírus *vaccinia* (CANAL, 2007).

Uma forma de diagnóstico rápido da partícula viral consiste no exame direto do espécime clínico ao microscópio eletrônico de transmissão, possibilitando a diferenciação de uma infecção por poxvírus de outras infecções. Entretanto, todos OPV são semelhantes em tamanho e morfologia e desta forma não podem se diferenciados por esta técnica; contudo, a M.E permite discriminar OPV de PPV e herpesvírus (SCHATZMAYR et al., 2000; HAZELTON; GELDERBLUM, 2003, KURTH; NITSCHKE, 2007).

Com relação à detecção de *Parapoxvirus* pela PCR, poucos trabalhos existem

na literatura, o que denota a importância de expandir as formas de detecção destes vírus (INOSHIMA, Y.; MOROOKA, A.; SENTSU, H., 2000; NITSCHKE et al., 2006). Recentemente, mediante a amplificação de um gene altamente conservado entre 59 sequências disponíveis que codifica uma proteína do envelope viral B2L foi possível a discriminação de DNA de *Parapoxvirus*, mas não a diferenciação de espécies (NITSCHKE et al., 2006).

2.9 Profilaxia

Casos de pseudovariola são comumente associados a propriedades não tecnicizadas e que não adotam medidas de higiene e biossegurança do ambiente de ordenha, propiciando a manutenção do vírus no ambiente (LOBATO et al., 2005).

Por isso, medidas preventivas e de controle da enfermidade são imprescindíveis: os ordenhadores devem sempre usar luvas e lavar as mãos cuidadosamente antes e após a ordenha, animais acometidos pela doença devem sempre ser ordenhados por último, o leite deve ser descartado e as lesões tratadas com pomadas umectantes especiais e desinfetantes. Antes da aquisição de novos animais submetê-los a um exame minucioso, visando evitar a entrada de bovinos infectados no rebanho, os tratadores devem ser alertados sobre a possibilidade de transmissão da enfermidade ao ser humano, atentando para o fato de serem portadores de algum tipo de imunodeficiência ou mesmo se estiverem em tratamento com medicamentos imunossupressores (WEIBLEN, 2013).

Além disso, os equipamentos de ordenha devem ser aferidos e desinfetados, tomando cuidados para evitar procedimentos de limpeza e desinfecção que possam irritar tetos ou mesmo utilizar desinfetantes que não sejam eficientes.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi descrever os achados clínicos da pseudovariola e o diagnóstico de surtos de doença vesicular causados por parapoxvírus em rebanhos bovinos no Brasil

3.2 Objetivos específicos

- Analisar fragmentos de tecidos das lesões e crostas de bovino para o vírus da pseudovariola bovina por isolamento em cultivo celular, microscopia eletrônica, e PCR qualitativa;
- Analisar fragmentos de tecidos das lesões e crostas para o vírus vaccínia pelas técnicas de isolamento em cultivo celular, microscopia eletrônica e PCR qualitativa;
- Avaliar a concordância dos resultados entre os métodos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos realizados no presente projeto foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto Biológico (CETEA-IB), registrado sob o número do protocolo CETEA 66/08, aprovado em 22/08/2012 (ANEXO 1).

4.1 Origem das amostras

Foram recebidas no período de 2009 a 2014 no Laboratório de Viroses de Bovídeos do Instituto Biológico, 149 amostras de fragmento de tecidos e crostas, de 51 propriedades de criação de bovinos, que apresentavam animais com lesões compatíveis de doença vesicular, principalmente nos tetos, sendo que havia sido descartada a possibilidade de febre aftosa ou estomatite vesicular no LANAGRO Pedro Leopoldo, laboratório de referência nacional para doenças vesiculares.

4.2 Processamento das Amostras

Cada amostra (fragmento de tecidos, crostas e secreções) foi dividida em três frações, uma enviada para a análise por ME, outra para PCR qualitativa e a terceira foi submetida à maceração em solução salina tamponada com fosfato (PBS) com 1% de antibiótico, com a finalidade de isolamento viral em cultivo celular. Esta foi mantida por uma hora sob refrigeração de 2 a 8°C, para permitir a ação antimicrobiana, e em seguida congelada para lise celular e liberação do vírus. O material foi descongelado e submetido à centrifugação a 2.000 x g por 15 minutos a 5°C e o sobrenadante retirado para ser inoculado na placas de isolamento viral.

4.3 Isolamento viral em cultura de células

Foram utilizadas placas para cultura de células de 24 cavidades contendo monocamada de células da linhagem MDBK (Madin-Darby Bovine Kidney) e linhagem VERO CCL 81 na concentração de 2×10^5 células/mL. Após 24 horas de crescimento celular o meio MEM foi retirado, a monocamada lavada e cada cavidade da placa foi inoculada com 0,2 mL da suspensão da amostra, previamente preparada (item 4.2.). Após uma hora de incubação, em incubadora de a 5% CO₂ e a 37°C o inoculo foi descartado, a monocamada novamente lavada com meio MEM e, em seguida adicionados 1mL do meio de manutenção (meio MEM contendo 2% de soro fetal bovino e 1% de solução de antibióticos). A monocamada foi observada em

microscópio óptico invertido e monitorada diariamente por sete dias para visualização de efeito citopático (ECP). Este procedimento foi repetido por mais 05 vezes de sete dias cada, sendo monitorados para a produção de efeito citopático (ECP). O resultado foi considerado negativo após seis passagens sem a presença de efeito citopático. As amostras que apresentaram EPC foram submetidas a microscopia eletrônica e/ou PCR para confirmação do diagnóstico.

4.4 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Amostras de tecido (item 4.2) e de isolados em cultivo celular (item 4.3) foram submetidas à MET para identificação e confirmação do isolamento empregando a técnica de contrastação negativa, segundo metodologia descrita por (BRENNER HORNE, 1959; ALMEIDA, 1983; HAYAT; MILLER, 1990.)

As amostras de tecido foram suspensas em tampão fosfato 0,1M e pH 7,0 e colocadas em contato com grades metálicas, previamente cobertas com filme de colódio e carbono. A seguir, as telas foram drenadas com papel filtro, contrastadas negativamente com molibdato de amônio a 2% pH 5,0 e observadas ao microscópio eletrônico de transmissão Philips EM 208. As amostras isoladas de culturas celulares foram processadas diretamente nas grades metálicas seguindo os demais passos no papel filtro, contrastadas com o molibdato e observadas ao microscópio.

4.5 Reação da Cadeia da Polimerase (PCR)

4.5.1 Vírus Padrão

Como padrão positivo de reação para *Parapoxvirus*, foi utilizado a estirpe *Pseudocowpox* vírus ATCC (VR- 634) e como controle negativo de reação foi utilizado amostras de epitélio bovino sabidamente negativo para o *Parapoxvirus*.

4.5.2 Extração do ácido nucleico

Extração de DNA viral foi realizada de acordo com o protocolo do Trizol Reagent® (Invitrogen).

- 1) Misturou-se de 50 a 150mg do tecido com 800 µL de Trizol Reagent® (Invitrogen) no cadinho e com auxílio tesoura e do pistilo procedeu-se a maceração do tecido. Transferiu o conteúdo para microtubo tipo Eppendorf e completou-se o volume de Trizol® Reagent até 1 mL;

- 2) incubou-se por 5 minutos em temperatura ambiente;
- 3) adicionou-se 200 μ L de clorofórmio e homogeneizou-se em vórtex por 30 segundos; incubou-se por 15 minutos em temperatura ambiente;
- 4) centrifugou-se a 12.000 x g por 15 minutos a 4°C; descartou-se a fase aquosa com auxílio de uma micropipeta tomando cuidado para não pegar a fase intermediária;
- 5) acrescentou-se 300 μ L de etanol 100% para precipitação do DNA que foi homogeneizado por inversão; incubou-se a temperatura ambiente por 3 minutos;
- 6) centrifugou-se novamente a 12.000 x g por 5 minutos a 4°C para precipitação do DNA e desprezou-se o sobrenadante;
- 7) acrescentou-se 1mL da solução de 0,1M Citrato de Sódio em 10% de etanol (pH 8,5) ao pellet e homogeneizou por inversão e incubou-se a temperatura ambiente por 30 minutos;
- 8) centrifugou-se a 2.000 x g por 5 minutos e descartou-se o sobrenadante cuidadosamente com ajuda de uma micropipeta;
- 9) procedeu-se uma nova lavagem com 0,1M de Citrato de Sódio em 10% de etanol, conforme etapas 7 e 8;
- 10) adicionou-se 1 a 2 mL de etanol 75% e homogeneizou-se por inversão e incubou se a temperatura ambiente por 20 minutos;
- 11) centrifugou-se 2.000 x g por 5 minutos 4°C e descartou-se o sobrenadante;
- 12) secou-se o *pellet* em temperatura ambiente;
- 13) ressuspendeu-se o DNA em 150 μ L de 8mM NaOH;
- 14) centrifugou-se a 4°C, 12.000 x g por 10 minutos para remover qualquer substância insolúvel;
- 15) o sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 1,5mL; ajustou-se o pH para 7-8 com 50 μ L de tampão HEPES;
- 16) Estocou-se o DNA extraído a -20°C até o uso.

4.5.3 Dosagem de ácido nucleico

A qualidade do DNA extraído foi avaliado por dosagem por espectrofotometria (Biofotômetro-Eppendorf®), sendo que para validação do procedimento a razão entre as absorbâncias 260/280 deve estar entre 1,8 e 2,0

4.5.4 Amplificação do ácido nucleico

A *Semi-nested* PCR para identificação e caracterização de *Parapoxvirus* foi

realizada segundo INOSHIMA; MOROOKA; SENTSU (2000) e para *Orthopoxvirus* segundo Damaso et al. (2007).

A escolha dos iniciadores baseou-se na região conservada do gene B2L para *Parapoxvirus* que codificam proteínas altamente conservadas de todas as espécies do gênero *Parapoxvirus* enquanto que para o gênero *Orthopoxvirus* foi utilizado a região que codifica o gene da hemaglutinina (Tabela 01).

Tabela 1. Relação dos iniciadores utilizados nas reações de *Semi-Nested* PCR para *Parapoxvirus*.

Gênero	Oligonucleotídeo	Sequência	Tamanho do amplicon	Referência
<i>Parapoxvirus</i>	PPP-1	5' GTC GTC CAC GAT GAG CAG CT 3'	594 pb (1ª amplificação)	Inoshima; Morooka; Sentsui (2000)
	PPP-4	5' GCG AGT CCG AGA AGA ATA CG 3'		
	PPP-3	5' TAC GTG GGA AGC GCC TCG CT 3'	235 pb (2ª amplificação)	
	PPP-4	5' GCG AGT CCG AGA AGA ATA CG 3'		
<i>Orthopoxvirus</i>	EACP 1	5' ATG ACA CGA TTG CCA ATA C 3'	900 pb (1ª amplificação)	Damaso et al. (2007)
	EACP 2	5' CTA GAC TTT GTT TTC TG 3'		
	HA 80F	5' TAC GTG GGA AGC GCC TCG CT 3'	846 pb (2ª amplificação)	
	EACP 2	5' CTA GAC TTT GTT TTC TG 3'		

Para amplificação do DNA viral as amostras extraídas foram preparadas conforme a tabela abaixo:

Tabela 2. Reagentes de amplificação *Semi-Nested* PCR de *Parapoxvirus* e *Orthopoxvirus*.

1ª amplificação		2ª amplificação	
Reagentes	Volume µL	Reagentes	Volume µL
Nuclease free Water	5	Nuclease free Water	8
Primer sense 10 pmol/µL	1,25	Primer sense 10 pmol/µL	1,25
Primer anti-sense 10 pmol/µL	1,25	Primer anti-sense 10 pmol/µL	1,25
PCR Master Mix	12,5	PCR Master Mix	12,5
DNA (100 ng)	5 µL	DNA	2 µL

As amplificações foram realizadas no termociclador, modelo *Mastercycler Gradient* Eppendorf®. No Quadro 1 estão representados os ciclos de amplificação usados para o gene B2L do *Parapoxvirus* e do gene da hemaglutinina do *Orthopoxvirus*.

Quadro 1– Ciclo de amplificação da *Semi-Nested* PCR para *Parapoxvirus* e *Orthopoxvirus*.

	Gênero <i>Parapoxvirus</i>		Gênero <i>Orthopoxvirus</i>
	1ª e 2ª Amplificação		1ª e 2ª Amplificação
Desnaturação inicial	94°C por 5 minutos		
Desnaturação	94°C por 1 minuto	05 Ciclos	
Anelamento	50°C por 1 minuto		
Extensão	72°C por 1 minuto		
Desnaturação inicial	-----		95°C por 5 minutos
Desnaturação	94°C 1 por 1 minuto	25 CICLOS	95°C 1 por 1 minuto
Anelamento	55°C por 1 minuto		55°C por 1 minuto
Extensão	72°C por 1 minuto		72°C por 1 minuto
Extensão final	72°C por 5 minutos		72°C por 5 minutos
Resfriamento	4°C infinito		4°C infinito

4.5.5 Eletroforese em gel de agarose

A visualização do produto amplificado foi realizada por meio da técnica de eletroforese em cuba horizontal com tampão de corrida TBE 1X (Tris- Borato-EDTA). Os produtos das reações foram fracionados em gel de agarose 1,5% a uma voltagem constante de 100 V, por 60 minutos. Os amplicons foram evidenciados após coloração com Gel Red (Uniscience®, Brasil) diluído (1:150) em *Nuclease free water* e a visualização foi feita no transluminador sob luz ultravioleta (320nm). O tamanho dos fragmentos de DNA foi comparado com um padrão molecular apresentando incrementos de 100 pb (DNA *ladder* de 100 pb – Invitrogen®)

5. RESULTADOS

Os 51 (149 bovinos analisados) rebanhos deste estudo eram formados principalmente por bovinos de leite e de duplo propósito, apenas um era de corte, originários de 10 estados brasileiros: Minas Gerais (34), São Paulo (2), Pará (2), Maranhão (2), Rondônia (1), Paraná (2), Goiás (3), Santa Catarina (1), Tocantins (1) e Mato Grosso (3). O estado com maior número de propriedades estudadas foi Minas Gerais, sendo que os demais Estados o número de propriedades variou de 1 a 3.

A descrição das propriedades, lesões, número e idade de animais afetados, curso clínico foram extraídas do formulário de investigação de doença vesicular (FORM-IN). Foi considerada propriedade positiva quando pelo menos um animal em cada uma das 51 apresentou lesões nos tetos ou na região nasolabial e cujo agente etiológico foi identificado.

5.1 Isolamento em cultura de células

Para o isolamento viral foram utilizadas linhagens de células VERO e MDBK a fim de avaliar a sensibilidade e susceptibilidade dessas linhagens ao vírus bem como o número de passagens para se obter o isolamento. Foram consideradas negativas, as amostras que foram submetidas até a 6ª passagem em célula.

Das 51 propriedades analisadas, 72,5% (37/51) foram positivas no isolamento viral em células VERO apresentando efeito citopático característico de *Orthopoxvirus*, identificado como vaccínia vírus pela semi nested PCR. Nesta linhagem, o ECP foi observado em 48 horas pós-inoculação, na primeira passagem, caracterizado pela presença de células aglomeradas, formando sincícios que apresentavam, nessa etapa, um número maior de núcleos, além da presença de células agrupadas, sugerindo a presença do vírus (figura 4).

Paralelamente as mesmas amostras foram inoculadas em células MDBK para avaliar a sensibilidade do vírus vaccínia e pseudocowpox nesta linhagem. Foi isolado o vaccínia vírus em 76,5% (39/51) das propriedades. Ressalta-se que o isolamento de vaccínia nesta linhagem ocorreu entre a 3ª e 5ª passagem. Sugerindo a suscetibilidade deste vírus em MDBK contudo, apresenta menor sensibilidade, pois requer muitas passagens quando comparado com a VERO.

Com relação ao vírus pseudocowpox, 7,84% (4/51) amostras foram isoladas na MDBK apresentando formação de sincícios e células arredondadas e refringentes, efeito característico de *Parapoxvirus* e identificado como pseudocowpox vírus pela semi nested PCR. O isolamento foi obtido em duas amostras na terceira passagem e nas outras duas, na quarta e quinta passagem, demonstrando baixa sensibilidade, e reforçando a dificuldade de isolamento deste agente. Salienta-se que na linhagem VERO não foi possível o isolamento deste vírus, demonstrando nenhuma suscetibilidade (Figura 5).

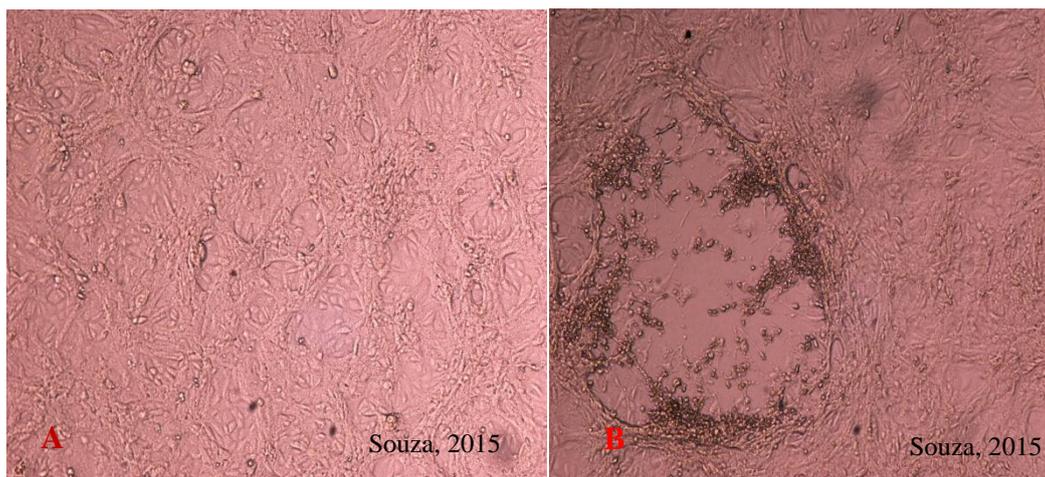


Figura 4. Isolamento de *Orthopoxvirus* em cultivo celular. A: Controle negativo de células da linhagem VERO 20X; B: Efeito citopático de *Orthopoxvirus* em célula Vero 20X. São Paulo SP-2015

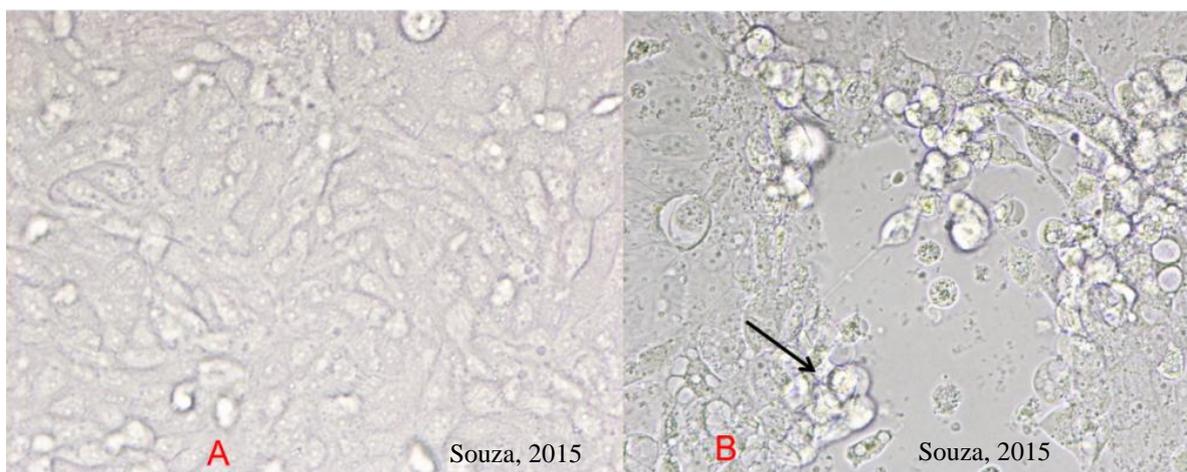


Figura 5. Isolamento de *Parapoxvirus* em cultivo celular. A: Controle negativo de células da linhagem MDBK 40X; B: Efeito citopático de *Parapoxvirus* em célula MDBK 40X São Paulo SP-2015

5.2 Semi nested PCR

A semi nested PCR para identificação do pseudocowpox vírus foi realizada a partir das amostras originais (fragmentos de tecido e crostas) bem como dos isolados em células MDBK (Figura 6). Das amostras originais apenas uma foi positiva 1,96% (1/51) para o *Parapoxvirus* pela *semi-nested* PCR, com a visualização de uma banda na altura de aproximadamente 235pb. Entretanto, quando analisou-se pela *semi-nested* PCR as quatro amostras com ECP característico de *Parapoxvirus* na célula MDBK, confirmou-se a positividade destas. Neste caso provavelmente a carga viral na amostra original estava abaixo do limiar de detecção da prova. Com as passagens em MDBK foi possível amplificar e identificar o vírus, aumentando a sensibilidade diagnóstica em 3 vezes.

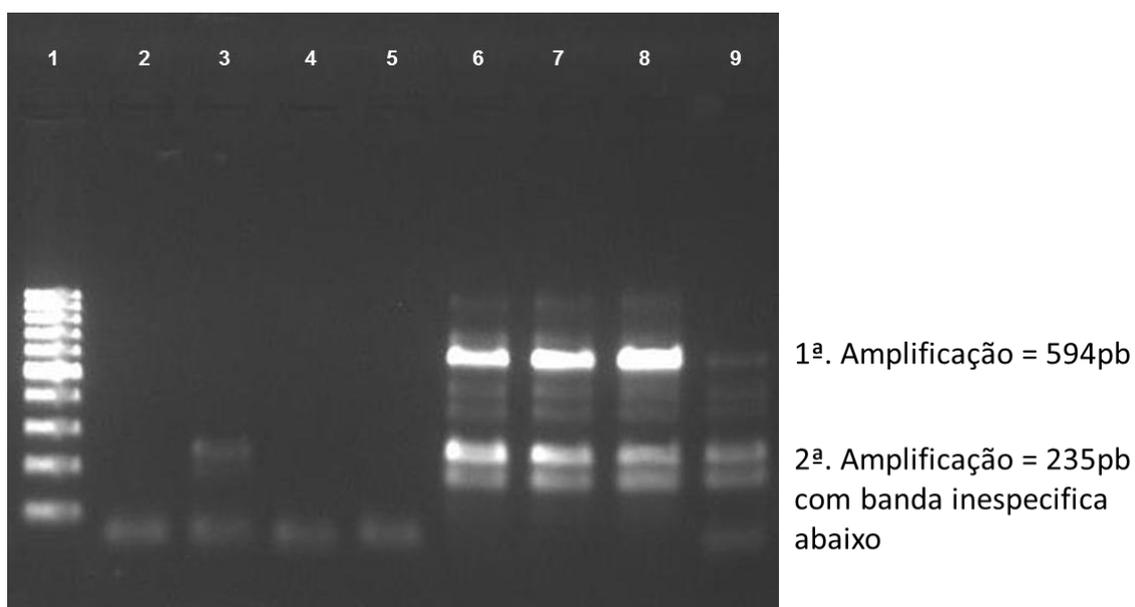


Figura 6- Detecção de *Parapoxvirus* em amostras de epitélio pela PCR.

Legenda: Canaleta 1 Marcador de 100 pb; Canaletas 3, 6,7,8 amostras positivas; canaleta 2, 4 e 5 amostras negativas, canaleta 6 controle positivo.

Das amostras submetidas à *semi-nested* PCR para pesquisa *Orthopoxvirus*, 64,7% (33/51) amostras foram positivas nas amostras originais, na altura de 846 pb.

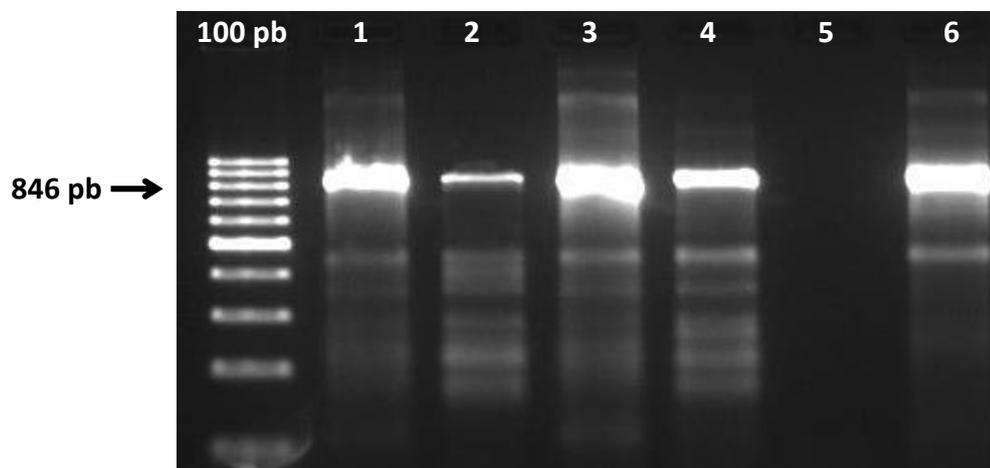


Figura 7- Detecção de *Orthopoxvirus* em amostras de epitélio pela PCR

Legenda: Canaleta 1 a 4 amostras isoladas; canaleta 5 controle negativo, canaleta 6 controle positivo.

5.3 Microscopias Eletrônica de Transmissão (MET)

Das 13 propriedades analisadas apenas uma propriedade foi considerada positiva para *Parapoxvirus*, sendo observadas partículas virais com morfologia semelhante à poxvírus características do gênero *Parapoxvirus*, de formato ovoide e estrutura helicoidal, envelopadas, medindo cerca de 260 x 160nm de diâmetro (Figura 8). Nesta mesma propriedade também foi identificada a presença do *Orthopoxvirus*.

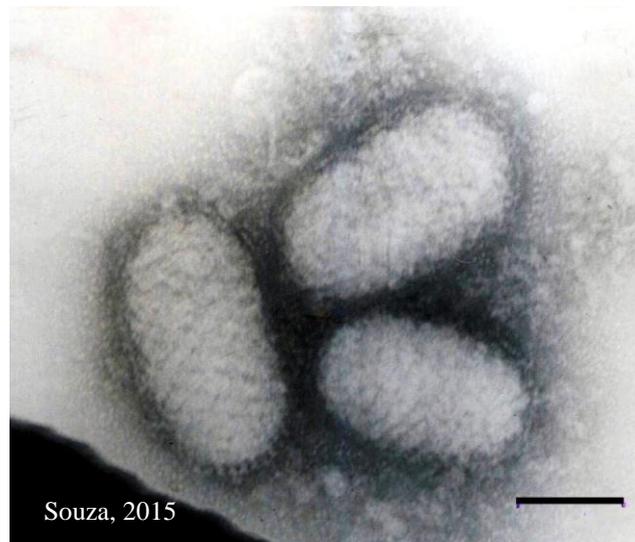


Figura 8 - Foto de um isolado de *Parapoxvirus*. MET

Em contrapartida das 13 propriedades analisadas, 12 apresentaram partículas com morfologia semelhante à poxvírus características do gênero *Orthopoxvirus*, com forma típica de “ladrilho” e disposição irregular dos túbulos sobre a membrana externa, algumas envelopadas medindo entre 250 X 300 nm de diâmetro (Figura 9).

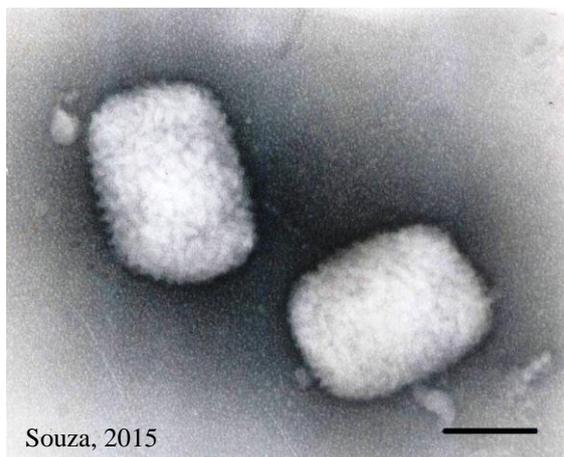


Figura 9 - Foto de um isolado de *Orthopoxvirus*. MET

5.4 Concordâncias entre os Métodos

Para avaliar a concordância entre os isolamentos em células, VERO e MDBK, com os resultados da semi nested PCR de *Orthopoxvirus* e *Parapoxvirus* adotou-se o índice kappa, com valor de $p < 0,001$ e intervalo de confiança de 95%, conforme resultado apresentado na tabela 3.

Os graus de concordância estão representados abaixo:

Valores de Kappa	Interpretação
0-0.19	Discordante
0.20-0.39	Concordância aceitável
0.40-0.59	Concordância moderada
0.60-0.79	Concordância substancial
0.80-1.00	Concordância excelente

Fonte: Landis JR, Koch GG. (1977)

Tabela 3 – Concordância entre os métodos de isolamento viral e semi nested PCR para o diagnóstico de *Parapoxvirus* e *Orthopoxvirus*. São Paulo, 2015.

Categorias	Índice kappa	Interpretação
Isolamento em célula VERO x semi nested de <i>Orthopoxvirus</i>	0.638	Concordância Substancial
Isolamento em célula MDBK x semi nested de <i>Orthopoxvirus</i>	0.325	Concordância aceitável
Isolamento em célula VERO x Isolamento em célula MDBK x semi nested de <i>Orthopoxvirus</i>	0.381	Concordância aceitável
Isolamento em célula MDBK x semi nested de <i>Parapoxvirus</i>	0.04	Discordante

A análise estatística mostrou que para o diagnóstico de *Orthopoxvirus* podem ser aplicados os métodos de isolamento viral, sendo que a linhagem mais indicada é a VERO, considerando que obteve-se isolamento na primeira passagem por volta de 48 horas. Na linhagem MDBK isolou-se o vaccínia vírus nas mesmas amostras que na VERO, contudo este isolamento só foi possível após sucessivas passagens (4^a ou 5^a passagem), demonstrando menor sensibilidade diagnóstica. Quando comparado o isolamento de vaccínia em VERO com a semi nested PCR da amostra original, observou-se concordância substancial, recomendando-se na rotina diagnóstica esta linhagem e a utilização do método molecular por ser mais rápido e preciso.

Quando associou três variáveis (isolamento em células VERO, MDBK e semi nested PCR para *Orthopoxvirus*) verificou-se concordância aceitável, demonstrando que esses métodos são recomendados para o diagnóstico de *Orthopoxvirus*.

A concordância nos resultados de *Parapoxvirus* entre o isolamento em células MDBK e a semi nested do material original foi considerada fraca.

A concordância entre o isolamento viral, semi nested PCR e microscopia eletrônica não foi realizada, pois, apenas 13 propriedades foram analisadas por essa técnica.

6. DISCUSSÃO

A doença exantemática no Brasil é causada principalmente pelo vírus vaccínia, entretanto, pseudocowpoxvirus e o vírus da estomatite papular bovina também tem sido relatadas. O quadro clínico de doença emergente causada por poxvírus é caracterizado por exantema localizado, incluindo máculas que progridem para pápulas nas tetas e úberes, formando vesículas e, posteriormente, pústulas que secam, originando crostas, que caem em aproximadamente três semanas deixando uma cicatriz (SCHATZMAYR et al., 2000; ABRAHÃO et al., 2010; CARGNELUTTI et al., 2014).

De acordo com as informações obtidas do formulário de encaminhamento de doença vesicular (FORM-IN) as lesões iniciaram como máculas e pápulas, que evoluíram para vesículas, úlceras e, em alguns casos, para crostas corroborando com os dados da literatura. Também verificou-se que a doença foi diagnosticada, principalmente, em propriedades não tecnificadas e de atividade leiteira ou mista, o que corrobora com os descritos na literatura (LOBATO et al., 2002; MEGID et al., 2008). Nem todos os formulários indicavam casos de humano envolvidos.

As lesões causadas tanto pelo vírus vaccínia como pelo pseudocowpoxvirus e vírus da estomatite papular bovina são indistinguíveis clinicamente, e cursam com lesões vesículo-pustulares que, eventualmente, evoluem para crostas, geralmente nos tetos, focinho e cavidade oral de bovinos (SCHATZMAYR et al., 2000; BUTTNER; RZIHA, 2002; FLEMMING; MERCER, 2007). Em ambos os casos, pode haver a contaminação do bezerro ou dos tetos das vacas durante a amamentação (BUTTNER; RZIHA, 2002). A sensibilidade ao toque devido às lesões dificulta a ordenha e predispõe a infecções secundárias, como mastites acarretando mais prejuízo ao produtor.

Os *Orthopoxvirus* e *Parapoxvirus* são epiteliotrópicos, portanto, há grande quantidade de partículas virais nesse tipo de material (MOUSSATCHÉ; DAMASO; MCFADDEN, 2008), de modo a garantir sucesso na identificação do agente envolvido, fato demonstrado nesta pesquisa.

No presente estudo foram utilizadas duas linhagens de células, VERO (rim de macaco) e MDBK (rim do bovino) a fim de avaliar a sensibilidade dessas linhagens frente aos *Orthopoxvirus* e *Parapoxvirus*, bem como o tempo para obtenção do isolamento. A maioria dos relatos descritos na literatura descreve a linhagem de células VERO, mais sensível as estirpes virais de *Orthopoxvirus*, enquanto que para isolamento dos *Parapoxvirus* recomenda-se a MDBK. Das 51 propriedades estudadas,

34 tiveram isolamento positivo em ambas as linhagens, entretanto, foram necessárias mais passagens para se isolar os Orthopoxvirus em células MDBK. Esse resultado demonstra que a Vero é a linhagem celular de eleição para isolamento de *Orthopoxvirus*, contudo é possível o isolamento em MDBK, em média na quarta e quinta passagens. Este resultado demonstrou que os *Orthopoxvirus* podem se adaptar nas células MDBK e o resultado do isolamento se assemelha ao obtido em células Vero.

Por outro lado, nos casos de *Parapoxvirus*, o isolamento em células MDBK mostrou-se difícil, uma vez que, esse vírus foi detectado a partir da terceira passagem, o que corrobora com Blut (2010) que sugeriu, mais do que, três passagens em célula para amostras suspeitas de poxvirus. Carneglutti et al. (2014) não obtiveram sucesso no isolamento de *Parapoxvirus* em célula MDBK, pois as amostras foram submetidas até a terceira passagem.

Foi possível concluir o diagnóstico etiológico dos animais com lesões em 64,7% (33/51). Em 18 propriedades não foi detectada a presença do vírus vaccínia e pseudocowpox. Destas foi observado ECP em amostras de 14 propriedades, contudo não foi possível identificar o agente. Este fato reforça a necessidade de realizar o diferencial para outras enfermidades confundíveis, como mamilite herpética bovina, IBR/IPV, BVDV, outros poxvirus, dentre outros agentes, este ser rápido e em tempo oportuno, para evitar as consequências de medidas restritivas, e também, para planejar estratégias de combate a essas infecções (Apêndice1). Esses dados evidenciam a necessidade de aperfeiçoar os métodos de análise a fim de torná-los cada vez mais sensíveis e precisos. Cada vez mais com o avanço no programa de erradicação da febre aftosa, a importância em se estabelecer um sistema de vigilância de enfermidades confundíveis é primordial. O diagnóstico etiológico de doenças vesiculares similares às parapoxviroses nem sempre é realizado, dificultando o conhecimento acerca dos vírus que circulam em determinadas regiões do país (SCHATZMAYR et al., 2000). Embora as lesões causadas pelo PCPV e BPSV sejam confundíveis com febre aftosa, estomatite vesicular e vaccínia bovina (RIET-CORREA et al., 1996; SANT'ANA et al., 2012), pouca importância tem sido dada a esses agentes.

Em uma propriedade do estado do Paraná (TA 2099/13 – Apêndice 1) observou-se a presença dos dois vírus (*Orthopoxvirus* e *Parapoxvirus*) mostrando a coinfeção, confirmada pela semi nested PCR específica e microscopia eletrônica. Resultado similar foi descrito por Abrahão et al. (2010) em uma propriedade do estado de Minas Gerais, que confirmou a presença de duas estirpes no mesmo rebanho. Entretanto há necessidade de se avaliar a coinfeção com cautela, pois INOSHIMA;

MOROOKA; SENTSU (2000) relataram que os iniciadores utilizados na semi nested PCR de *Parapoxvirus* apresenta cerca de 40% de identidade com o vírus vaccínia e, considerando que o Brasil é endêmico para essa estirpe, os resultados devem ser avaliados cuidadosamente. No presente estudo, a microscopia eletrônica foi fundamental para confirmar a presença das duas estirpes na propriedade do estado do Paraná, o que demonstra a importância da associação de métodos diagnósticos para confirmação dos casos de poxvirus, conforme já relatado por Simonetti (2007) e Okuda (2013).

A microscopia eletrônica é uma metodologia útil para complementar, juntamente com os resultados de outros testes diagnósticos, achados clínicos e epidemiológicos, o diagnóstico de doenças vesiculares, por diferenciar os gêneros *Orthopoxvirus* de *Parapoxvirus*. Schatzmayr et al. (2000) por meio de microscopia eletrônica confirmaram a presença de *Parapoxvirus* a partir de lesões espalhadas por diferentes partes do corpo em trabalhadores que tiveram contato com lesões leiteiras, no município de Piraí, Rio de Janeiro. No presente estudo, 14 amostras foram confirmadas por ME sendo que uma delas foi identificada a presença de partículas virais de *Orthopoxvirus* e *Parapoxvirus*. A identificação concomitante de dois diferentes gêneros de poxvirus já foi relatada em rebanhos bovinos (TRINDADE et al., 2006) infectados pelo VACV, e em bovinos com lesões nos tetos decorrentes da coinfeção por VACV e ORFV (SANT'ANA et al., 2013). A origem e o significado dessas coinfeções na patogenia das doenças ainda não estão esclarecidos, embora se acredite que a infecção associada com múltiplos vírus possa resultar em lesões mais severas e de aspecto inflamatório mais pronunciado (ABRAHÃO et al., 2010; CAMPOS et al., 2011).

Na reação de *Semi-nested* PCR foram observadas algumas bandas inespecíficas no gel de agarose (Figura 6). Apesar de novos testes terem sido realizados como otimizar a temperatura de anelamento por gradiente, as bandas inespecíficas não puderam ser eliminadas, acreditamos que isso decorre da presença de resíduos da extração. O aumento da temperatura de anelamento diminuiu a sensibilidade do teste, o que vai contra as necessidades para identificação etiológica desses importantes agentes, porém novos testes ainda devem ser realizados.

No presente estudo, os casos diagnosticados de *Parapoxvirus* demonstram a presença do vírus nos rebanhos dos estados de Minas Gerais, Paraná e Maranhão. Schmatzayr et al. (2000) já relataram a presença desse agente no estado do Rio de Janeiro e ao longo dos anos, esse vírus foi sendo subnotificado, pois somente a partir de 2010 por Abrahão et al é que os relatos sobre pseudovariola foram intensificados. Cargnelutti et al. (2012) detectaram a presença desse vírus em fazendas do Rio

Grande do Sul, bem como em 2014 no estado de Rondônia mostrando a disseminação desse agente para outros estados brasileiros. O diagnóstico etiológico de doenças vesiculares similares às parapoxviroses nem sempre é realizado, dificultando o conhecimento acerca dos vírus que circulam em determinadas regiões do país. Esses resultados demonstram a necessidade de pesquisar maior abrangência de agentes causadores de doenças vesiculares. As lesões de pseudovariola podem ser confundidas com febre aftosa, estomatite vesicular e vaccínia bovina, por esse motivo o diagnóstico diferencial deve contemplar análise para esse agente (LOBATO et al., 2002; TRINDADE et al., 2003; DAMASO et al., 2007, MADUREIRA, 2009; ABRAHÃO et al., 2010; OKUDA, 2013).

A concordância entre os métodos de isolamento viral em cultivo de células e a semi nested PCR para *Orthopoxvirus* foi de aceitável a substancial sendo portanto recomendado a utilização desses dois métodos para o diagnóstico de *Orthopoxvirus*. Não houve diferença se forem analisadas duas ou três variáveis (Tabela 03).

Entretanto a correlação entre células MDBK e semi nested PCR de *Parapoxvirus* foi considerada fraca, isso decorre da dificuldade de isolamento em cultivo celular dos *Parapoxvirus* em células MDBK.

Os resultados obtidos na amostragem disponível revelam a presença da pseudovariola no Brasil, embora em baixa frequência, quando comparado com os casos de vaccínia. Ressalta-se a importância em se aprofundar os estudos sobre essa doença, que acomete não somente os animais bem como os humanos e acarreta prejuízos econômicos e sociais bem como sua inclusão na lista de diagnóstico diferencial de doenças vesiculares.

A confirmação do agente infeccioso envolvido em tempo oportuno é primordial para evitar os prejuízos à sociedade decorrente de interdições de propriedades e outros custos envolvidos na gestão dos focos.

7. CONCLUSÕES

- A principal causa de doença exantemática nos rebanhos bovinos brasileiros é o vírus vaccínia demonstrando que é endêmica no país;
- Evidenciou-se que a pseudovariola está presente nos rebanhos bovinos brasileiros, impactando a saúde pública, com envolvimento principalmente dos ordenhadores e saúde animal. Considera-se que maior atenção deve ser dada aos casos desta zoonose, a qual se apresenta como uma doença vesicular/pustular aguda, no sentido de seu correto diagnóstico e estabelecer estratégias de contenção da doença.
- A associação de métodos diagnósticos foi fundamental para confirmação dos casos suspeitos de *Parapoxvirus*, *Orthopoxvirus* e co-infecção no mesmo rebanho;
- Para conter a doença é necessário que os profissionais que atendem os animais, orientem os pecuaristas e trabalhadores sobre as medidas higiênico-sanitárias para conter a doença.
- É necessário que este agente infeccioso seja incluído na lista de diagnóstico diferencial de doenças vesiculares e a confirmação do agente causador informada em tempo oportuno para evitar os prejuízos a sociedade decorrente de interdições de propriedades e outros custos na gestão dos focos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHÃO, J.S.; SILVA-FERNANDES, A.T; ASSIS, F.L.; GUEDES, M.I.; DRUMOND, B.P.; LEITE, J.A.; COELHO, L.F.L.; TURRINI, F.; FONSECA, F.G.; LOBATO, Z.I.P.; MADUREIRA, M.; FERREIRA, P.C.; BONJARDIM, G.S.T.; KROON, E.G. Human *Vaccinia* virus and *pseudocowpoxvirus* co-infection: clinical description and phylogenetic characterization. **Journal of Clinical Virology**, v.48, p. 69-72, 2010.

ABRAHÃO, J.S.; CAMPOS, R.K.; TRINDADE, G.S.; GUEDES, M.I.M.; LOBATO, Z.I.P.; MAZUR, C.; FERREIRA, P.C.P; BONJARDIM, C.A.; KROON, E.G. Detection and phylogenetic analysis of *Orf* virus from sheep in Brazil: a case report. **Virology Journal**, v. 47, n. 6, 2009.

ALMEIDA, J.D. Uses and abuses of diagnostic electron microscopy. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 104, p. 147-158, 1983.

BARRAVIEIRA, S.R.C.S. Diseases caused by Poxvirus – Orf and Milker's nodules – A review. **J. Venom. Anim. Toxin sincl. Trop. Dis.** v.11, n.2, p.102–108, 2005.

BLUT, A. Orthopox viruses: infections in humans. **Transfusion Medicine Hemotherapy**, v. 37, p. 351–364, 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de procedimentos para a atenção às ocorrências de febre aftosa e outras enfermidades vesiculares**. 2007.144p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Plano de ação para febre aftosa / Secretaria de Defesa Agropecuária**. 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Ministério da Agricultura quer aumentar a produção leiteira**. Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/economia-e-emprego/2015/03/ministerio-da-agricultura-quer-aumentar-a-producao-leiteira>. Acesso em ago. 2015.

BRENNER, S.; HORNE, R. W. A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. **Biochemica Biophysica Acta**, v. 34, p.103, 1959.

BULLER, R. M. L., PALUMBO, G. J. **Poxvirus Pathogenesis**. *Microbiol Reviews*.v.55, n.1, p.80-122, 1991.

BUTTNER, M.; R ZIHA, H.J. Parapoxviruses: from the lesion to the viral genome. **Journal of Veterinary Medicine B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health**, v.49, n.1, p.7-16, 2002.

CAMPOS, R.K. et al. Assessing the variability of Brazilian vaccinia virus isolates from a horse exanthematic lesion: coinfection with distinct viruses. **Archives of Virology**, v.156, n.2, p.275-283, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21080203>>. Acesso em: 05 abr. 2013. doi: 10.1007/ s00705-010-0857-z.

CANAL, C.W. Poxviridae. In____. Flores, E.F. **Virologia Veterinária**. Ed. UFSM, Santa Maria, 2007.

CARGNELUTTI, J.F.; FLORES, M.M.; TEIXEIRA, F.R.M.; WEIBLEN, R.; FLORES, E. F. An outbreak of *pseudocowpox* in fattening calves in southern Brazil. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 24, n.2, p. 437–441, 2012.

CARGNELUTTI, J.F.; SANTOS, B.S., LEBRE, S.N., SODRÉ, D.N.A., SILVA, R.M., WEIBLEN, R., FLORES, E. F. Pseudovariola e estomatite papular em bovinos no Estado de Rondônia, Brasil. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.44, n.3, p.479-485, mar, 2014.

DAMASO, C. R. A., ESPOSITO, J. J., CONDIT, R. C., MOUSSATCHÉ, N. An emergent poxvirus from humans and cattle in Rio de Janeiro State: Cantagalo Virus may derive from Brazilian smallpox vaccine. **Virology**.V.277, p.439-449, 2000.

DAMASO, C.R.A., REIS, S.A., JESUS, D. M., LIMA, P.S.F., MOUSSATCHÉ, N. A PCR based assay for detection of emerging vaccinia like viruses isolated in Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infection Disease**, v. 57, n. 01, p. 39-46, 2007.

FLEMMING, S.B.; MERCER, A.A. Genus parapoxvirus. In: MERCER, A. A. et al. (Eds.). **Poxviruses**. Berlin: Birkhauser Verlag, 2007. p.127-165.

GIBBS, E.P.J.; JOHNSON, R.H.; OSBORNE, A. D. The differential diagnosis of viral skin infections of the bovine teats. **Veterinary Record**, v. 87, n. 20, p. 602-609, 1970.

GUBSER, C., HUÉ, S., KELLAM, P., SMITH, G. L. **Poxvirus genomes: a phylogenetic analysis**. *J Gen Virol*.v.85, p.105-177, 2004.

HAYAT, M. A.; MILLER, S. E. **Negative staining**. Mc. Graw-Hill Publ. Company, 1990. 253 p.

HAZELTON, P. R., GELDERBLUM, H. R. **Electron Microscopy for Rapid Diagnosis of Emerging Infectious Agents**. *Emerging Infect. Dis.* v.9, n.3, p. 294-303, 2003.

HEYMANN, D.L.; SZCZENIEWSKI, M.; ESTEVES, K. Re-emergence of monkeypox in Africa: a review of the past six years. **British Medical Bulletin**, v. 54, p. 693-702, 1998.

HUGHES, A. L., FRIEDMAN, R. **Poxvirus genome evolution by gene gain and loss**. *Mol. Phylogenet. Evo.*v.35, p.186-195, 2005.

INOSHIMA, Y.; MOROOKA, A.; SENTSU, H. Detection and diagnosis of *parapoxvirus* by the polymerase chain reaction. **Journal of Virological Methods**, v. 84, p. 201-208, 2000.

IST. genetic variability within *Mycobacterium tuberculosis* IST. Instituto Superior Técnico. Genotipagem de bactérias. Disponível em: <http://www.e-escola.pt/ftema.asp?canal=biologia&id=161>. Acesso em jan 2013.

JONES, T.C.; HUNT, R.D.; KING, N.E. Moléstias causadas por agentes virais. Poxvirus. In:_____ *Patologia Veterinária*. 6 ed. Manole. 2000. p.211-218.

KAHRS, R. F. Herpes mammillitis and pseudo lumpy skin disease. Poxvirus infections of the teats. *Viral diseases of cattle*. 2 ed. Iowa State University Press, p.151-157, 201-208, 2001.

KATO-MAEDA, M.; BIFANI, P.J.; B.N.; SMALL, P.M. The nature and consequence of. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 107, p. 533-537, 2001.

KURTH A., NITSCHKE, A. **Fast and reliable diagnostic methods for the detection of human poxvirus infections**. *Future Medicine*. V.2, n.5, p.467-479, 2007.

LANDIS, J.R.; KOCH, G.G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, v. 33, p. 159-174, 1977. – eu inseri essa referencia

LEITE, J.A.; TRINDADE, G.S.; LOBATO, Z.I.P. et al. Emerging orthopoxvirus outbreak affecting humans and cattle in Oliveira- Minas Gerais. **Journal of the Brazilian Society for Virology**, v.8, p.78- 78, 2003.

LEMOS, R. A. A, RIET-CORREA, F. Infecções víricas da pele do úbere em bovinos. In: RIET-CORREA, F., SCHILD, A.L., MENDEZ, M. D. C., LEMOS, R.A.A Ed. **Doenças de ruminantes e eqüinos**. São Paulo: Varela, 2001. p. 113-120.

LEWIS-JONES, S. Zoonotic poxvirus infections in humans. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v.17, n. 2, p.81-89, 2004.

LOBATO, Z. I. P.; TEIXEIRA, B. M.; RIBEIRO, E. B. O. I.; DIAS, G. R. C.; LIMA, F. A.; TRINDADE, G. S.; FROIS, M. C. M.; KROON, E. G. Study on an outbreak of bovine variola due to vaccinia virus in a region of Minas Gerais. **Virus Reviews & Research**, v. 7, n. 1, p. 87, 2002. Trabalho apresentado no XIII National Meeting of Virology. SBV. CP13, 2002, Águas de Lindóia.

LOBATO, Z.I.P.; TRINDADE, G.S.; FROIS, M.C.M.; RIBEIRO, E.B.T.; DIAS, G.R.C.; TEIXEIRA, B.M.; LIMA, F.A.; ALMEIDA, G.M.F.; KROON, E.G. Surto de varíola bovina causada pelo vírus *Vaccinia* na região da Zona da Mata Mineira. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 4, p. 423-429, 2005.

MADUREIRA, M. C. **Vaccinia Bovina no Estado de Minas Gerais, 2005 – 2007**, 102f. Tese (Doutorado em Epidemiologia) – Escola de Veterinária – Universidade Federal de Minas Gerais. Minas Gerais, 2009.

MARIC, D.; DURICIC, B.; GLIGIC, A. Poxviral infections in humans and animals. **Veterinarski-Glasnik**, v. 55, n.1-2, p. 3-8, 2001.

MAZUR, C.; FERREIRA, I.I.; RANGEL FILHO, F.B.; GALLER, R. Molecular characterization of Brazilian isolates of *orf* virus. **Veterinary Microbiology**, v.73, n. 4, p.253-259, 2000.

MEGID, J.; APPOLINÁRIO, C. M.; LANGONI, H.; Short Report: Vaccinia Virus in humans and cattle in southwest region of São Paulo state, Brazil. **American Journal Medicine and Hygiene**, v.79, n.5, p.647-651, 2008.

MERCER, A. A., SCHMIDT, A., WEBER, O. (ed.). **Poxviruses**. Basel: Birkhäuser Verlag, 2007.

MCFADDEN, G. **Poxvirus tropism**. *Nat. Rev. Microbiol.* v.3, p.201-213, 2005.

MOSS, B. *Poxviridae: The viruses and their replication*. p.2849-2883. In. FIELDS, B. N., KNIPE, D. M. e HOWLEY, P. M. (ed.), **Fields Virology**. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996.

MOSS, B. *Poxviridae: the viruses and their replication*. p.2906-2943. In. Fields, B. N., KNIPE, D. M. e HOWLEY, P. M. (ed.), **Fields Virology**, 5.a ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 2002.

MOUSSATCHÉ, N.; DAMASO, C. R.; MCFADDEN, G. When good vaccines go wild: Feral Orthopoxvirus in developing countries and beyond. **Journal Infectious Developing Countries**, v. 2, n. 3, p. 156-173, 2008.

MURPHY, F.A.; GIBBS, E.P.J.; HORZINECK, M.C.; STUDDERT, M.J. **Veterinary Virology**, 3.ed. San Diego: Academic Press, 1999. p.277-291.

NAGASSE-SUGHARA, T. K. Human vaccinia-like virus outbreaks in São Paulo and Goiás states, Brazil: virus detection. Isolation and identification. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, n.46, p.315-322, 2004

NITSCHKE, A.; STERN, D.; ELLERBROK, H.; PAULI, G. Detection of Infectious Poxvirus Particles. **Emerging Infectious Diseases**, v.12, n. 7, p. 1139-1141, 2006.

OIE. Terrestrial Animal Health Code. 2014. Disponível em: <http://www.oie.int/en/international-standard-setting/terrestrial-code/access-online/> . Acesso em: set. 2014.

OKUDA, L.H. Orthopoxvirus bovino: inquérito soropidemiológico e caracterização de amostras pela técnica de PCR e RFLP, 112f. Tese (Doutorado em Ciências) – FMVZ/USP - Universidade de São Paulo. São Paulo, 2013.

PISKUREK, O., OKADA, N. Poxviruses as possible vectors for horizontal transfer of retroposons from reptiles to mammals. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** v.104, n.29, p.12046-12051, 2007.

SANT'ANA, F.J.F.; RABELO, R.E.; VULCANI, V.A.S.; CARGNELUTTI, J.F.; FLORES, E.F. Bovine papular stomatitis affecting dairy cows and milkers in Midwestern Brazil. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.24, n.2, p. 442-445, 2012.

SANT'ANA, F.J. Coinfection by vaccinia virus and an orf virus like parapoxvirus in an outbreak of vesicular disease in dairy cows in mid-western Brazil. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.25, n.2, p.267-272, 2013.

SARTORI-BARRAVIERA, S. R. C.; MARQUES, S. A.; STOLF, H. O.; SILVARES, M.R. C.; MARQUES, M. E. A. Nódulos dos ordenhadores: relato de dez casos. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v. 72, n. 5, p. 447-480, 1997.

SCHATZMAYR, H. G.; LEMOS, E. R. S.; MAZUR, C.; SCHUBACH, A.; MAJEROWICZ, S.; ROZENTAL, T.; SCHUBACH, T. M. P.; BUSTAMANTE, M. C.; BARTH, O. M. Detection of poxvirus in cattle associated with human cases in the state of Rio de Janeiro: preliminary report. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 5, p. 625-627, 2000.

SIMONETTI B.R., ABREU D.C., SIMONETTI J.P., GONÇALVES M.C.R., SILVA M.E.V., BARTH O.M., SCHATZMAYR H.G. 2007. Animal infections by vaccinia-like

viruses in the state of Rio de Janeiro:1- Northwestern region. **Virus Rev. Res.** 12:32-36.

SMITH, G. L., G. MCFADDEN. Smallpox: anything to declare? **Nat. Rev. Immunol.** v.2, p.521-527, 2002.

TRINDADE, G.S.; FONSECA, F.G.; MARQUES, J.T.; NOGUEIRA, M.L.; MENDES, L.C.N.; BORGES, A.S.; PEIRÓ, J.R.; PITUCO, E.M.; BONJARDIM, C.A.; FERREIRA, P.C.P.; KROON, E. Araçatuba virus: a *vaccinia*-like virus associated with infection in humans and cattle. **Emerging Infectious Diseases**, v.9, n.2, p.155-160, 2003.

TRINDADE, G.S. 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 orthopox viruses. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.75, p.486-490, 2006.

WEIBLEN, R. *Vaccinia* - varíola bovina e pseudovaríola. Disponível em: <http://www.br.monografias.com/trabalhos/vaccinia-variola-bovina/vaccinia-variola-bovina.shtml> . Acesso em jan. 2013.

VOROU, R. M., PAPAVALASSIOU, V. G., PIERROUTSAKOS, I. N. **Cowpox virus infection: an emerging health threat.** *Curr. Opin. Infect. Dis.* v. 21, p.153-156, 2008.

Apendice 1. Dados das propriedades extraídos do formulário FORM-IN, segundo o município, Estado, dados zootécnicos. São Paulo, 2015.

TA	N° DE AMOSTRAS POR PROPRIEDADE	MUNICIPIO	ESTADO	TIPO DE AMOSTRAS	ISOLAMENTO VIRAL			PCR DA CROSTA		PCR DO ISOLADO
					VERO	MDBK	ECP (MDBK)	<i>Orthopoxvirus</i>	<i>Parapoxvirus</i>	<i>Parapoxvirus</i>
135/14	10	Trombas	MG	Epitélio	Positivo	Positivo	4 ^a	Positivo	Negativo	Negativo
253/14	4	Itauna	MG	Crosta	Positivo	Positivo	5 ^a	Positivo	Negativo	Negativo
844/15	6	Vianópolis	MG	Crosta	Positivo	Positivo	4 ^a	Positivo	Negativo	Negativo
953/13	1	Caiapoiânia	GO	Crosta	Positivo	Positivo	4 ^a	Positivo	Negativo	Negativo
1281/13	5	Santana do Garambeu	MG	Crosta	Positivo	Positivo	4 ^a	Positivo	Negativo	Negativo
1482/13	1	Conceição da Barra	MG	Crosta	Positivo	Positivo	4 ^a	Positivo	Negativo	Negativo
1541/13	1	Conceição da Barra	MG	Crosta	Positivo	Positivo	4 ^a	Negativo	Negativo	Negativo
1910/13	6	São Francisco de Sales	MG	Crosta	Positivo	Positivo	5 ^a	Negativo	Negativo	Positivo
2099/13	1	Ivaporã	PR	Crosta	Positivo	Positivo	4 ^a	Positivo	Positivo	Positivo
2123/13	1	Cachoeira de Minas	MG	Crosta	Positivo	Positivo	4 ^a	Positivo	Negativo	Negativo
2253/13	1	São João do Araguaia	PA	Crosta	Positivo	Positivo	5 ^a	Positivo	Negativo	Negativo
2268/13	1	São Domingos do Araguaia	PA	Crosta	Positivo	Positivo	5 ^a	Positivo	Negativo	Negativo
2476/13	1	Conquista do O'este	MT	Crosta	Negativo	Positivo	5 ^a	Negativo	Negativo	Negativo
1564/12	1	Capelinha	MG	Crosta	Negativo	Positivo	4 ^a	Negativo	Negativo	Negativo
2440/12	3	Areado	MG	Crosta	Positivo	Positivo	4 ^a	Negativo	Negativo	Negativo
2442/12	3	Xambioá	TO	Crosta	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
007/11	4	Uberaba	MG	Epitélio	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
236/11	3	Vargem Bonita	MG	Epitélio	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
1041/11	5	Jesúpolis	GO	Crosta	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
1163/11	3	Pontalina	GO	Crosta	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
1474/11	6	Conselheiro Lafaiete	MG	Suabe	Positivo	Positivo	3 ^a	Positivo	Negativo	Negativo
1774/11	3	Serro	MG	Crosta	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
2016/11	3	Uberaba	MG	Crosta	Positivo	Positivo	3 ^a	Positivo	Negativo	Negativo
2782/11	4	Mariana	MG	Crosta	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
58/10	5	Monte Carmelo	SP	Epitélio	Positivo	Positivo	3 ^a	Positivo	Negativo	Negativo
142/10	5	Pedrinópolis	MG	Crosta	Negativo	Positivo	3 ^a	Positivo	Negativo	Negativo
273/10	1	Aurora	SC	Crosta	Negativo	Negativo	3 ^a	Negativo	Negativo	Negativo

TA	N° DE AMOSTRAS POR PROPRIEDADE	MUNICÍPIO	ESTADO	TIPO DE AMOSTRAS	ISOLAMENTO VIRAL			PCR DA CROSTA		PCR DO ISOLADO
					VERO	MDBK	ECP (MDBK)	<i>Orthopoxvirus</i>	<i>Parapoxvirus</i>	<i>Parapoxvirus</i>
346/10	1	São Francisco do Brejão	MG	Epitélio	Negativo	Positivo	3ª	Negativo	Negativo	Negativo
466/10	5	Veríssimo	MG	Crosta	Negativo	Positivo	3ª	Negativo	Negativo	Negativo
626/10	3	Açailândia	MA	Epitélio	Negativo	Positivo	3ª	Negativo	Negativo	Positivo
627/10	2	Tasso Fragosso	MG	Epitélio	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
721/10	5	Divina Pastora	MA	Epitélio	Negativo	Positivo	3ª	Positivo	Negativo	Negativo
803/10	1	Castanheira	MT	Epitélio	Positivo	Positivo	2ª	Positivo	Negativo	Negativo
984/10	1	Lagoa Formosa	MG	Epitélio	Positivo	Positivo	2ª	Positivo	Negativo	Negativo
1031/10	2	Santo Antonio do Aracanguá	SP	Epitélio	Positivo	Positivo	2ª	Positivo	Negativo	Negativo
1141/10	5	Itamarandiba	MG	Epitélio	Positivo	Positivo	2ª	Positivo	Negativo	Negativo
1219/10	2	Tapira	MG	Crosta	Positivo	Positivo	2ª	Positivo	Negativo	Negativo
1318/10	4	Varjão	MG	Epitélio e Crosta	Positivo	Positivo	2ª	Positivo	Negativo	Negativo
1339/10	2	Viçosa	MG	Crosta	Positivo	Positivo	2ª	Positivo	Negativo	Negativo
1380/10	1	Tombos	MG	Crosta	Positivo	Positivo	2ª	Positivo	Negativo	Negativo
1421/10	3	Medeiros	MG	Vesícula	Positivo	Positivo	2ª	Positivo	Negativo	Negativo
1452/10	1	São Roque de Minas	MG	Epitélio	Positivo	Positivo	2ª	Negativo	Negativo	Positivo
1453/10	2	Vargem Bonita	MG	Crosta	Positivo	Positivo	2ª	Negativo	Negativo	Negativo
113/09	1	Pontes e Lacerda	MT	Epitélio	Positivo	Positivo	2ª	Positivo	Negativo	Negativo
260/09	4	Andradas	MG	Epitélio	Positivo	Positivo	2ª	Positivo	Negativo	Negativo
262/09	3	Paraisópolis	MG	Epitélio	Positivo	Positivo	2ª	Positivo	Negativo	Negativo
457/09	1	Bacabal	MG	Epitélio	Positivo	Positivo	2ª	Positivo	Negativo	Negativo
705/09	1	Curitiba	PR	Crosta	Positivo	Positivo	2ª	Positivo	Negativo	Negativo
853/09	3	Belo Horizonte	MG	Epitélio	Negativo	Positivo	2ª	Negativo	Negativo	Negativo
1104/09	4	João Pinheiro	MG	Epitélio	Negativo	Positivo	2ª	Positivo	Negativo	Negativo
1603/09	4	Ji-Paraná	RO	Epitélio	Positivo	Positivo	2ª	Positivo	Negativo	Negativo

ANEXO.

Anexo1- Certificado da Comissão de Ética na Experimentação Animal (CETEA) número 66/08, aprovado em 22/08/2012



SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO BIOLÓGICO

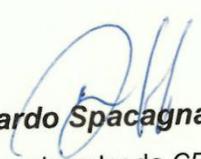
COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL – CETEA-IB

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 66/08** sobre o Projeto: “**Diagnóstico laboratorial de Variola Bovina em amostras provenientes de animais suspeitos, encaminhadas ao serviço de rotina diagnóstica do LVB do Instituto Biológico/APTA**”, sob a responsabilidade de **Edviges Maristela Pituco**, está de acordo com os princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório / Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (SBCAL/COBEA).

Protocolo inicialmente aprovado pela *CETEA-IB* em 25 de julho de 2008, renovado em 28 de julho de 2010 e 22 de agosto de 2012.

São Paulo, 22 de agosto de 2012.


Ricardo Spacagna Jordão
Coordenador da *CETEA-IB*