

GRAZIELE PEREIRA OLIVEIRA

***Vaccinia virus*: avaliação da
diversidade molecular e biológica de
clones virais isolados de espécimes
clínicos humanos e bovinos**

Orientador: Prof. Jônatas Santos Abrahão

UFMG

2015

GRAZIELE PEREIRA OLIVEIRA

***Vaccinia virus*: avaliação da diversidade molecular e biológica de clones virais isolados de espécimes clínicos humanos e bovinos**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do **Grau de Mestre em Microbiologia**.

Orientador: Prof. Jônatas Santos Abrahão

UFMG

2015

Agradecimentos

Eis que mais um ciclo se fecha em minha vida, mas nada teria sido possível sozinha.

Primeiramente e acima de tudo agradeço a Deus por me amar e guiar meus pensamentos.

À minha mãe por cuidar de mim com o maior amor que alguém é capaz de oferecer: eu te amo e dedico todas as minhas conquistas a você.

Ao meu pai, pelo carinho, amor e por ter oferecido a mim e aos meus irmãos os pilares de uma família, que hoje me permitem ser quem eu sou.

Pelo amor incondicional, parceria, amizade e paciência, dedico essa vitória em especial ao meu melhor amigo, meu eterno, único e maior amor Josaphat.

Aos meus irmãos Laerte e Paulo, meu eterno amor e amizade. Ao meu irmão Humberto que apesar de não ter conhecido sei que foi um grande ser humano: esteja onde estiver rezo por você. Ao meu irmão Magela, agradeço por ser mais do que um irmão, cuidando muitas vezes de mim como um pai: você é um exemplo para mim. À minha irmã, amiga, segunda mãe e madrinha Geralda dedico minha eterna gratidão: ninguém será capaz de assumir tantos papéis em minha vida. À minha irmã e fiel amiga Cristiane que acima de tudo me ensinou o significado de “Omnia Vincit Amor”: obrigada, eu não teria conseguido sem você.

E ainda, a todos os meus irmãos e irmãs agradeço por terem me dado as melhores cunhadas e cunhados que alguém pode ter. E aos meus doces e amados sobrinhos e afilhados, em especial ao meu afilhado Iury, meu eterno príncipe, obrigada pelos maravilhosos momentos de diversão.

À minha mais do que melhor amiga, minha irmã de coração Graciele, agradeço por me mostrar que nunca estarei sozinha. E as minhas amigas amadas, especialmente Dê Anete e Dê Araújo, dedico minha eterna amizade.

Tentarei por toda a minha vida e talvez um dia eu seja capaz de retribuir um pouco de tudo que vocês são para mim, mas nada que eu diga ou faça é capaz de expressar meu amor e gratidão a vocês.

Aos meus amigos presentes e egressos do Laboratório de Vírus, em especial a Poli, juntinhas desde a graduação, e a Andreia: uma grande descoberta, agradeço pelo companheirismo. E aos recém chegados Ana, Maurício e Rafa, obrigada pelo companheirismo e por me mostrar que o Lab pode ser muito divertido. Aos demais, ressalto que admiro e gosto de cada um de um jeito especial: é muito bom fazer parte dessa equipe.

Agradeço em especial ao meu orientador, Prof. Jônatas, pela excelência ao exercer a profissão e brilhante orientação, e aos demais professores especialmente à Prof^a. Erna pelos ensinamentos e pela oportunidade de fazer parte de um excelente grupo de pesquisa.

Ao Cadu, pela companhia fiel nas madrugadas de estudo.

Aos funcionários pelo trabalho exercido, aos membros da banca pela contribuição, às agências de fomento pelo auxílio financeiro, aos animais que morreram em prol dessa pesquisa e a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a minha formação pessoal e profissional:

Meu sincero obrigada!

“OMNIA VINCIT AMOR”

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	1
LISTA DE TABELAS	4
LISTA DE ABREVIATURAS	5
RESUMO	7
ABSTRACT	8
I. INTRODUÇÃO	9
1.1. Família <i>Poxviridae</i>	9
1.1.1. Taxonomia.....	9
1.1.2 Estrutura da partícula e do genoma viral.	11
1.1.3 Ciclo de multiplicação.....	15
1.2 Gênero <i>Orthopoxvirus</i>	19
1.2.1 <i>Variola virus</i>	20
1.2.1.1 Diversidade entre amostras de <i>Variola virus</i>	22
1.2.2 <i>Monkeypox virus</i>	23
1.2.2.1 Diversidade entre amostras de <i>Monkeypox virus</i>	24
1.2.3 <i>Cowpox virus</i>	25
1.2.3.1 Diversidade entre amostras de <i>Cowpox virus</i>	26
1.2.4 <i>Vaccinia virus</i>	28
1.2.4.1 Diversidade entre clones de amostras vacinais de <i>Vaccinia virus</i>	31
1.3. Isolamentos de <i>Vaccinia virus</i> no Brasil.....	32
1.4 <i>Vaccinia</i> bovina-Aspectos clínicos e impactos na saúde e economia.....	36
1.5 Diversidade das amostras brasileiras de <i>Vaccinia virus</i>	38
1.6 Marcadores moleculares para VACV-BR: A56R, A26L e C23L.....	41
1.7 Estudos de coinfeção e recombinação de poxvirus.....	42
II. JUSTIFICATIVA	45

III. OBJETIVOS.....	47
3.1 Objetivo geral	47
3.2 Objetivos específicos	47
IV. FLUXOGRAMA DE TRABALHO	48
V. METODOLOGIA.....	50
5.1 Descrição dos espécimes clínicos	50
5.2 Processamento dos espécimes clínicos	53
5.3 Sistemas celulares	53
5.3.1 Células VERO e BSC40	53
5.4 Isolamento Viral em Células Vero	54
5.5 Purificação de placas em Células BSC40.....	54
5.6 Multiplicação viral.....	55
5.7 Titulação viral (CAMPOS e KROON, 1993)	56
5.8 Ensaio de fenótipo de placas	56
5.9 Curva de multiplicação.....	57
5.10 Ensaio de formação de cometas e titulação de partículas EEV	57
5.11 Purificação de vírus.....	58
5.12 Virulência em modelo murino.....	58
5.13 Extração de DNA pelo método de fenol clorofórmio álcool isoamílico ..	59
5.14 Reação em cadeia da polimerase.....	60
5.14.1 Gene A56R	60
5.14.2 Gene C23L	63
5.14.3 Gene A26L.....	65
5.15 Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) 8%.....	67
5.15.1 Coloração com prata	67
5.16 Eletroforese em gel de agarose	68
5.17 Purificação de DNA com PEG para sequenciamento	68
5.18 Seqüenciamento e análise das sequências	69

VI. RESULTADOS	70
6.1 Isolamento dos espécimes clínicos, seleção e purificação de clones.	70
6.2 Caracterização biológica	73
6.2.1 Fenótipo de placas.....	73
6.2.2 Formação de cometas e titulação de partículas EEV	76
6.2.3 Curva de multiplicação.....	77
6.3 Caracterização molecular	79
6.3.1 Análise do gene A56R	79
6.3.2 Análise do gene C23L.....	83
6.3.3 Análise do gene A26L.....	88
6.4 Seqüenciamento e análise das sequências	91
6.5 Virulência dos clones em modelo murino.....	100
VII. DISCUSSÃO.....	104
VIII. CONCLUSÕES.....	111
IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	112
X. PRODUÇÕES CIENTÍFICAS	130

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Morfologia das partículas dos <i>Orthopoxvirus</i>	12
FIGURA 2. Eletromicrografia de transmissão de IMV, IEV e EEV.....	13
FIGURA 3. Representação esquemática do genoma dos poxvírus.....	14
FIGURA 4. Morfogênese dos poxvírus com ênfase nos tipos de partículas.....	17
FIGURA 5. Representação esquemática do ciclo de multiplicação dos poxvírus	18
FIGURA 6. Lesões típicas da varíola.....	21
FIGURA 7. Lesões causadas por MPXV em humanos.....	23
FIGURA 8. Lesões causadas por infecção de CPXV	25
FIGURA 9. Estudo filogenético de <i>Cowpox virus</i> demonstrando separação em diferentes clados.....	27
FIGURA 10. Lesões generalizadas no peito e abdômen de uma criança de 2 anos provocadas por VACV, causada por <i>eczema vaccinatum</i>	29
FIGURA 11. Ciclo hipotético de transmissão do VACV.....	34
FIGURA 12. Estados brasileiros em que foi notificada a circulação de VACV.....	35
FIGURA 13. Lesões causadas por VACV em humanos e bovinos.....	36
FIGURA 14. Árvore filogenética evidenciando os dois grupos de VACV- BR.....	38
FIGURA 15. Árvore filogenética construída com base na sequência de nucleotídeos do gene A56R.....	40
FIGURA 16. Distribuição geográfica das amostras utilizadas nesse trabalho.....	50

FIGURA 17. Alinhamento dos iniciadores utilizados no PCR para o gene A56R.....	62
FIGURA 18. Representação esquemática da posição dos iniciadores utilizados na PCR para amplificação do gene C23L.....	64
FIGURA 19. Alinhamento dos iniciadores utilizados na PCR- semi Nested para amplificação do gene A26L	66
FIGURA 20. Visualização ao Microscópio Óptico (MO) de placas de lise em monocamada de células BSC40 durante a seleção e coleta de clones.....	71
FIGURA 21. Ensaio de fenótipo de placa em células BSC-40 demonstrando os clones das amostras BABV e GOBV.....	74
FIGURA 22. Ensaio de fenótipo de placa em células BSC-40 demonstrando clones pequenos.....	75
FIGURA 23. Ensaio de formação de cometas e titulação de partículas EEV	76
FIGURA 24. Curva de multiplicação dos clones provenientes das amostras que apresentaram apenas clones pequenos.....	77
FIGURA 25. Curva de multiplicação dos clones isolados das amostras BABV e GOBV.....	78
FIGURA 26. Amplificação do gene A56R, exemplificando clones que amplificaram apenas nas reações 1 e 2.....	80
FIGURA 27. Amplificação do gene A56R, exemplificando clones que amplificaram nas reações 1, 2 e 3.....	81
FIGURA 28. Amplificação do gene C23L, exemplificando clones que amplificaram apenas na reação 1.....	84
FIGURA 29. Amplificação do gene C23L das amostras BABV e GOBV.....	85

FIGURA 30. Amplificação do gene C23L, destacando o clone 2 da amostra MGHV.....	86
FIGURA 31. Amplificação por PCR Semi-nested de um fragmento de 145pb para o gene A26L.....	89
Figura 32. Análise filogenética baseada na sequência de nucleotídeos do gene A56R de clones isolados da amostra BABV.....	93
Figura 33. Análise filogenética baseada na sequência de nucleotídeos do gene A56R de clones isolados da amostra GOBV.....	94
FIGURA 34. Árvore filogenética baseada na sequência de nucleotídeos do gene A56R demonstrando a separação de clones pequenos dentro do grupo 1.....	96
FIGURA 35. Alinhamento da sequência de nucleotídeos obtidas do gene A56R.....	98
FIGURA 36. Árvore filogenética baseada na sequência de nucleotídeos do gene A56R demonstrando o agrupamento de todos os clones isolados nesse trabalho.....	99
FIGURA 37. Variação absoluta média diária do peso e curva de sobrevivência de camundongos Balb/C infectados com clones provenientes das amostras BABV e GOBV.....	102
FIGURA 38. Sinais clínicos observados em camundongos Balb/C infectados com clones provenientes das amostras BABV e GOBV.....	103

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Classificação da família <i>Poxviridae</i>	10
TABELA 2. Descrição das amostras analisadas, identificando a localidade, ano de coleta, a fonte e o espécime clínico coletado.....	52
TABELA 3. Iniciadores para a reação de amplificação do gene A56R.....	61
TABELA 4. Iniciadores para a reação de amplificação do gene C23L.....	63
TABELA 5: Iniciadores para a reação de amplificação do gene A26L.....	65
TABELA 6. Identificação dos clones selecionados para caracterização nesse trabalho.....	72
TABELA 7. Amplificação dos clones nas reações de PCR convencional para o gene A56R.....	82
TABELA 8. Amplificação dos clones nas reações de PCR convencional para o gene C23L.....	87
TABELA 9. Separação dos clones nos Grupos 1 e 2 de VACV-BR com base na análise dos genes A56R, A26L e C23L.....	90

LISTA DE ABREVIATURAS

µL – microlitro

ARAV – Araçatuba virus

ATCC – American type cell collection

ATI- Inclusão do tipo A (do inglês, “A-type inclusion”)

BAV –BeAN 58058 virus

CEBIO-UFMG – Centro de Bioterismo da Universidade Federal de MinasGerais

CETEA - Comitê de Ética da UFMG

CEV – vírus envelopado célula-associado

CPXV – *Cowpox virus*

CTGV – Cantagalo virus

d.p.i. – dias pós-infecção

DMEM - meio de Eagle modificado por Dulbeco

DNA – Ácido desoxirribonucleico

dNTP's: Desorribonucleotídeo trifosfatado

ECP – Efeito Citopático

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

EEV – vírus envelopado extracelular

EMBRAPA -Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

EV – vírus extracelular

FIOCRUZ – Fundação Instituto Oswaldo Cruz

GP1V –Guarani P1 virus

GP2V –Guarani P2 virus

ha – gene da hemaglutinina viral

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IBT: Isatina–β–tiossemicarbazona

ICTV – Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus

IEV – Vírus envelopado intracelular

IMA – Instituto Mineiro de Agropecuária

IMV – Vírus maduro intracelular

INDELS-Inserções e deleções

ITR – Regiões terminais invertidas

IV – Vírus imaturo

MARV-Mariana virus
MOI – multiplicidade de infecção
MCA – Membrana corioalantóide
MEM – Meio mínimo essencial
mL – mililitro
mm – milímetros
mM – milimolar
MPXV – *Monkeypox virus*
MV – Vírus maduro
nm – nanômetro
nt-nucleotídeos
OMS – Organização Mundial da Saúde
OPV – *Orthopoxvirus*
pb – Pares de bases
PBS – Tampão salina fosfato
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
PFU / UFP– Unidade Formadora de Placas
pH – Potencial de hidrogênio
pM – picomoles
PSTV –Passatempo virus
PV1-Pelotas virus 1
PV2-Pelotas virus 2
RNA – Ácido ribonucléico
SAV – SPAn 232 virus
SFB – Soro fetal bovino
SNPs- Polimorfismos de nucleotídeo único
VACV – *Vaccinia virus*
VACV-BR- *Vaccinia virus* brasileiros
VACV-WR – *Vaccinia virus* amostra Western Reserve
VARV - *Variola virus*
VBH –Belo Horizonte virus
WV – Vírus envelopado

RESUMO

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Microbiologia-Universidade Federal de Minas Gerais

VACCINIA VIRUS: AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE MOLECULAR E BIOLÓGICA DE CLONES VIRAIS ISOLADOS DE ESPÉCIMES CLÍNICOS HUMANOS E BOVINOS

GRAZIELE PEREIRA OLIVEIRA

ORIENTADOR: Jônatas Santos Abrahão

Belo Horizonte, fevereiro de 2015

O *Vaccinia virus* (VACV) desempenhou um importante papel para a humanidade devido ao seu uso durante a campanha de erradicação da varíola. Além disso, atualmente o VACV tem sido amplamente utilizado no desenvolvimento de vacinas recombinantes. Com o fim da campanha de vacinação da varíola, outros *Orthopoxvirus* têm emergido em todo o mundo, tais como *Cowpox virus*, *Monkeypox virus* e VACV. VACV é o agente etiológico da vaccínia bovina (VB), uma zoonose emergente que tem sido associada a problemas econômicos, sociais, veterinários e de saúde pública, principalmente no Brasil. Apesar da importância atual e histórica do VACV, há poucas informações sobre sua circulação, prevalência, origem e manutenção no ambiente, assim como reservatórios naturais e diversidade. Os VACV brasileiros (VACV-BR) são separados em dois grupos com base na diversidade genética e biológica: grupo 1 (G1) e grupo 2 (G2). Os vírus do G2 apresentam placas de lise de maior tamanho e são altamente virulentos em modelo murino Balb/c, ao contrário dos vírus do G1. Além disso, polimorfismos demonstrados em genes de VACV, tais como A56R, A26L e C23L, têm sido utilizados em estudos filogenéticos confirmando a dicotomia entre os vírus do G1 e G2 de VACV-BR. Neste estudo, foi investigada a diversidade clonal de amostras de campo coletadas durante surtos de VB. Os resultados demonstram que clones do G1 de VACV-BR foram mais frequentemente isolados. A análise molecular e biológica corroborou estudos anteriores, confirmando a cocirculação de duas linhagens de VACV no Brasil. Além disso, foi possível detectar a cocirculação das duas variantes (G1 e G2) na mesma amostra. Dois clones apresentaram um perfil misto, apresentando características de ambos os grupos, com base na análise molecular dos genes A56R, A26L e C23L, talvez como resultado do aumento da taxa de recombinação em uma população mista. Algumas mutações, bem como inserções e deleções em sequências de nucleotídeos do gene A56R foram observadas entre clones da mesma amostra. Estes resultados fornecem informações sobre o perfil de diversidade entre clones de VACV circulando no Brasil.

ABSTRACT

Master Thesis

Programa de Pós-Graduação em Microbiologia-Universidade Federal de Minas Gerais

VACCINIA VIRUS: ASSESSMENT OF MOLECULAR AND BIOLOGICAL DIVERSITY OF VIRAL CLONES ISOLATED FROM HUMAN AND CATTLE CLINICAL SPECIMENS

GRAZIELE PEREIRA OLIVEIRA

ADVISER: Jônatas Santos Abrahão

Belo Horizonte, February, 2015

Vaccinia virus (VACV) played an important role for humanity because of its use during the smallpox eradication campaign. Furthermore, currently VACV has been widely used as a vector of the recombinant vaccines. Following smallpox eradication, other orthopoxviruses have emerged worldwide, such as *Cowpox virus*, *Monkeypox virus* and VACV. VACV is the etiologic agent of the bovine vaccinia (BV), an emerging zoonosis that has been associated with economic, social, veterinary and public health issues, mainly in Brazil. Despite the current and historical VACV importance, there is little information about its circulation, prevalence, origins and maintenance in the environment, natural reservoirs and diversity. Brazilian VACV (VACV-BR) are grouped into two groups, based on genetic and biological diversity: group 1 (G1) and group 2 (G2). G2 strains displays higher plaque sizes and are virulent to mice, unlike G1. Moreover, polymorphisms observed in VACV genes, such as A56R, A26L and C23L genes, have been used in phylogenetic studies and further confirmed the dichotomy between G1 and G2 VACV-BR. In this study, was investigated VACV clonal diversity from field samples, during BV outbreaks. The results demonstrated that the G1 VACV-BR viruses were more frequently isolated. Molecular and biological analysis corroborated previous reports and confirmed the co-circulation of two VACV-BR lineages. Furthermore, it was co-detect the two variants (G1 and G2) in a same sample. Two clones showed a mosaic profile, with both G1 and G2 features based on the molecular analysis of A56R, A26L and C23L genes, maybe as a result of an increased recombination rate in a mixed population. Indeed, some single nucleotide polymorphism (SNPs) and insertions and deletions (INDELS) in A56R nucleotide sequences were observed among clones of a given virus population. These results provide information about the diversity profile in VACV clones.

I. INTRODUÇÃO

1.1. Família *Poxviridae*

1.1.1. Taxonomia

A família *Poxviridae* é dividida em duas subfamílias denominadas *Chordopoxvirinae* e *Entomopoxvirinae*. A subfamília *Chordopoxvirinae* agrupa dez gêneros: *Orthopoxvirus*, *Parapoxvirus*, *Avipoxvirus*, *Capripoxvirus*, *Cervidpoxvirus*, *Crocodylidpoxvirus*, *Leporipoxvirus*, *Suipoxvirus*, *Molluscipoxvirus*, *Yatapoxvirus*, além da espécie *Squirrelpox virus*, ainda não associada a nenhum gênero. Já a subfamília *Entomopoxvirinae* é constituída por três gêneros denominados *Alphaentomopoxvirus*, *Betaentomopoxvirus* e *Gammaentomopoxvirus*, sendo que as duas espécies *Diachasmimorpha entomopoxvirus* e *Melanoplus sanguinipes entomopoxvirus* ‘O’ pertencentes a essa subfamília ainda permanecem sem classificação em termos de gênero (TABELA 1) [Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV), 2013]. Essa divisão taxonômica em subfamílias foi proposta principalmente com base no hospedeiro, em que a *Entomopoxvirinae* agrupa gêneros que infectam invertebrados, ao passo que *Chordopoxvirinae* é constituída por gêneros que infectam vertebrados (MOSS, 2013).

TABELA 1. Classificação da família *Poxviridae* (ICTV, 2013).

Família <i>Poxviridae</i>			
Subfamília	Gênero	Espécie protótipo	Nº de espécies
Chordopoxvirinae	<i>Avipoxvirus</i>	<i>Fowlpox virus</i>	10
	<i>Capripoxvirus</i>	<i>Sheeppox virus</i>	3
	<i>Cervidpoxvirus</i>	<i>Mule deerpox virus</i>	1
	<i>Crocodylidpoxvirus</i>	<i>Nile crocodilepox virus</i>	1
	<i>Leporipoxvirus</i>	<i>Myxoma virus</i>	4
	<i>Molluscipoxvirus</i>	<i>Molluscum contagiosum virus</i>	1
	<i>Orthopoxvirus</i>	<i>Vaccinia virus</i>	10
	<i>Parapoxvirus</i>	<i>Orf virus</i>	4
	<i>Suipoxvirus</i>	<i>Swinepox virus</i>	1
	<i>Yatapoxvirus</i>	<i>Yaba monkey tumor virus</i>	2
	Sem gênero definido	<i>Squirrelpox virus</i>	1
Entomopoxvirinae	<i>Alphaentomopoxvirus</i>	<i>Melolontha melolontha entomopoxvirus</i>	7
	<i>Betaentomopoxvirus</i>	<i>Amsacta moorei entomopoxvirus 'L'</i>	13
	<i>Gammaentomopoxvirus</i>	<i>Chironomus luridus entomopoxvirus</i>	6
	Sem gênero definido	<i>Diachasmimorpha entomopoxvirus</i>	2
		<i>Melanoplus sanguinipes entomopoxvirus 'O'</i>	

Membros da subfamília *Chordopoxvirinae* estão relacionados com infecções em humanos, tais como *Orthopoxvirus*, *Parapoxvirus*, *Yatapoxvirus*, e *Molluscipoxvirus*. Dentre os representantes da subfamília *Chordopoxvirinae*, o gênero *Orthopoxvirus* está entre os mais estudados, agrupando uma espécie relacionada exclusivamente com infecções em humanos, o *Variola virus* (VARV) e espécies zoonóticas, destacando-se *Monkeypox virus* (MPXV), *Cowpox virus* (CPXV) e *Vaccinia virus* (VACV) (MOSS, 2013).

A família *Poxviridae* agrupa grandes vírus envelopados de DNA dupla fita e morfologia complexa que apresentam como marcante característica distintiva se comparado à maioria dos demais grupos de vírus de DNA, o fato de replicarem seu genoma no citoplasma da célula hospedeira. Além disso, os membros dessa família apresentam um extenso genoma que codifica enzimas, proteínas relacionadas à replicação do genoma, proteínas estruturais, ligantes

virais e grande quantidade de proteínas que atuam na imunomodulação da resposta do hospedeiro (MC FADDEN, 2005; MOSS, 2013).

Essas e outras características resultaram na inclusão da família *Poxviridae* em um sugerido grupo denominado grupo dos vírus gigantes núcleo citoplasmáticos de DNA, que juntamente com as famílias *Mimiviridae*, *Marseilviridae*, *Iridoviridae*, *Ascoviridae*, *Phycodnaviridae* e *Asfarviridae* poderiam compor um suposto quarto domínio da vida (BOYER *et al.*, 2010).

1.1.2 Estrutura da partícula e do genoma viral

As partículas dos poxvírus são grandes se comparadas à maioria dos outros grupos de vírus, medindo aproximadamente 360nm de comprimento, 270nm de largura e 250nm de diâmetro. Apresentam estrutura complexa em formato oval, de tijolo, ou pleomórfica. Com relação à disposição de seus componentes na partícula identifica-se uma membrana externa constituída por bicamada lipídica, onde se encontram proteínas de superfície tubulares, que por sua vez, revestem corpúsculo(s) lateral (is) dispostos lateralmente ao cerne viral. O cerne apresenta conformação bicôncava e tem a função de abrigar o genoma, enzimas e fatores transcricionais de genes precoces (FIGURA 1) (CYRCLAFF, 2005; Mc FADDEN, 2005; MOSS, 2013). Os corpúsculos laterais já foram considerados artefato de técnica, mas estudos recentes demonstram que os corpúsculos apresentam em sua composição a fosfoproteína F17, a fosfatase VH1 e uma oxirredutase denominada G4, e sugerem que tenham uma função imunomoduladora, que atua interferindo na resposta produzida por interferons do tipo II, além de apresentar importância na etapa de morfogênese (DUBOCHET *et al.*, 1994; SCHMIDT *et al.*, 2013).

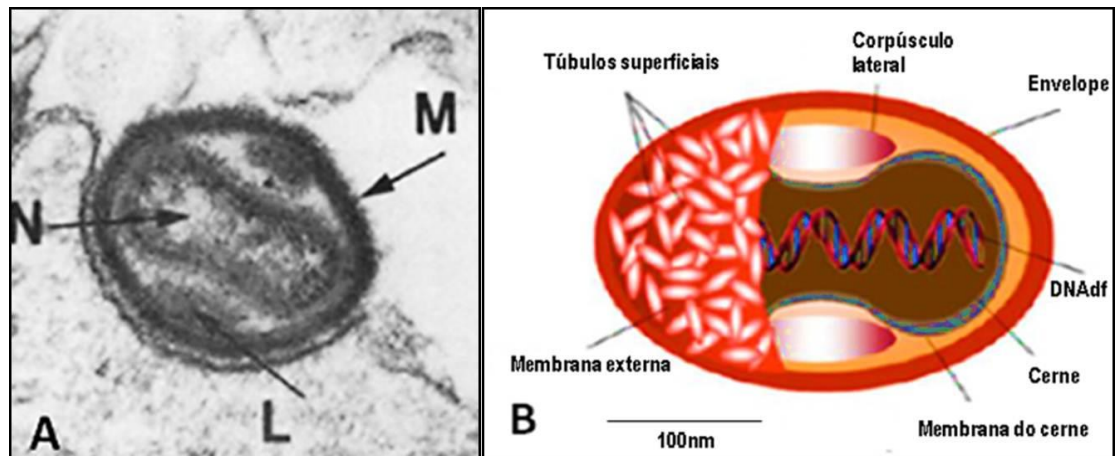


FIGURA 1. Morfologia das partículas dos *Orthopoxvirus*. A) Micrografia eletrônica de um membro do gênero *Orthopoxvirus*, evidenciando o cerne em forma de halter, os corpúsculos laterais e a membrana externa. Abreviações: N: nucleossomo; L: corpúsculo lateral; M: membrana. B) Representação esquemática da partícula dos poxvírus. Fonte: FENNER, 1989; MOSS, 2001–modificado.

Os poxvírus não apresentam uma estrutura única, pois ao longo do seu ciclo de multiplicação são geradas partículas com pequenas diferenças estruturais relacionadas principalmente ao número de membranas, e às proteínas associadas a estas membranas. Existem formas que apresentam uma única membrana denominada vírus maduros intracelulares (IMV), outras com a presença de três membranas, os chamados vírus envelopados intracelulares (IEV) e partículas extracelulares que possuem duas membranas denominadas vírus envelopado extracelular (EEV) (FIGURA 2). Além disso, podem ser formadas partículas extracelulares que permanecem associadas à membrana da célula hospedeira apresentando assim como os EEVs duas membranas, e são denominados vírus envelopados associados à célula (CEV) (MOSS, 2013).

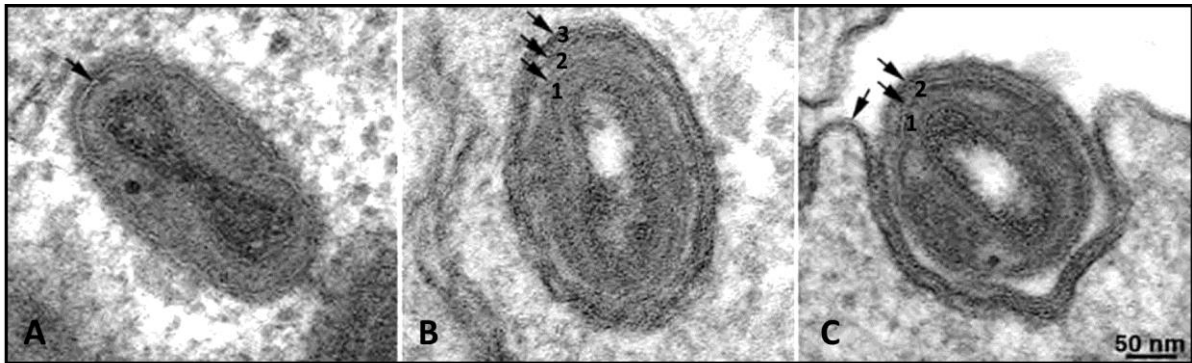


FIGURA 2. Eletromicrografia de transmissão de IMV(A), IEV(B) e EEV(C). As setas e números indicam membranas. Fonte: MOSS, 2013 – modificado

Os membros da família *Poxviridae* apresentam genoma de DNA dupla fita linear que varia de aproximadamente 140 Kpb em *Parapoxvirus* a cerca de 300Kpb em *Avipoxvirus*. A partícula contém em seu cerne elementos importantes para a replicação do genoma, tais como poli A polimerase, RNA polimerase dependente de DNA, enzima de metilação, e fatores transcricionais (FENNER, 1989; MOSS, 2013).

O genoma é dividido em duas porções principais, sendo uma região central conservada e as regiões terminais invertidas (ITRs). As ITRs estão presentes nas extremidades do genoma e consistem em sequências repetidas e idênticas porém opostas e variáveis entre os diferentes poxvírus. Além disso, as ITRs são conectadas por sequências simples de bases adenina e timina, que são conservadas e tem importante função na formação de concatâmeros durante a replicação do genoma (FIGURA 3)(MOSS, 2013).

A região central conservada apresenta entre 80Kpb e 100 Kpb com aproximadamente 90 genes que codificam para proteínas essenciais associadas à replicação do genoma e proteínas estruturais. As ITRs, com aproximadamente 50 Kpb, tem associação com a patogênese viral uma vez que codificam proteínas associadas a virulência e imunomodulação, além de apresentar deleções, repetições e transposições que conferem a cada grupo

características particulares associadas à patogênese (GUBSER *et al.*, 2004; MC FADDEN, 2005; DRUMOND *et al.*, 2007).

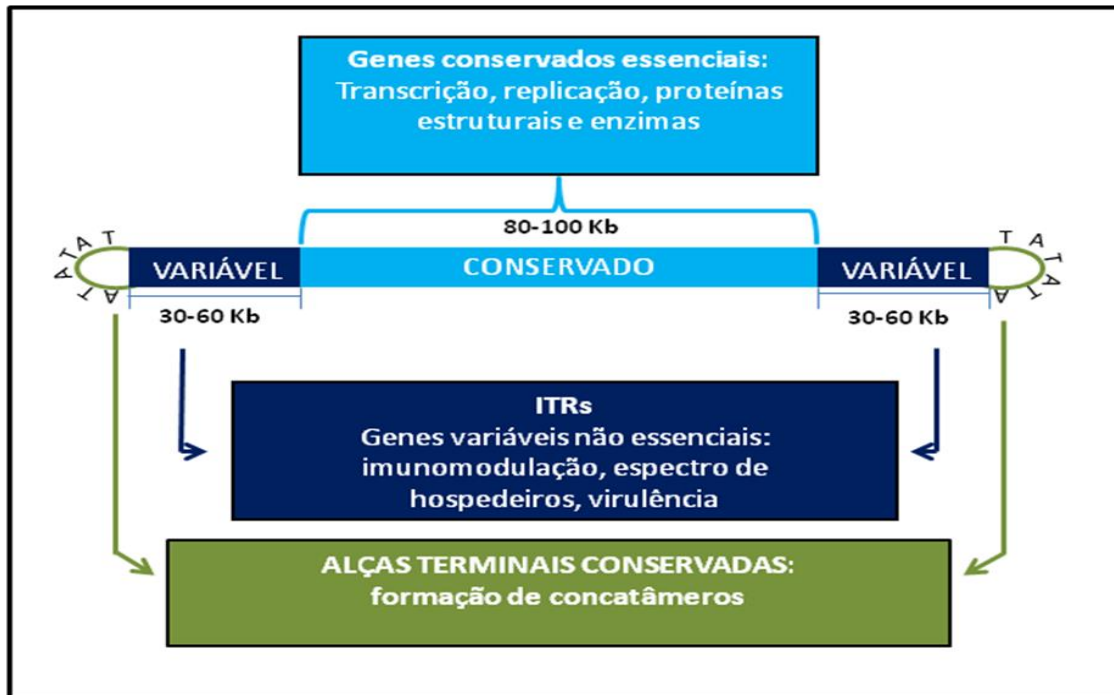


FIGURA 3. Representação esquemática do genoma dos *Orthopoxvirus*. O genoma possui aproximadamente 200 kpb que é dividido em uma região central conservada e em regiões terminais invertidas variáveis (ITRs). Nas extremidades são observadas as alças terminais. Fonte: SMITH & MACFADDEN, 2002- Adaptado

1.1.3 Ciclo de multiplicação

O ciclo de multiplicação dos poxvírus ocorre apenas no citoplasma da célula hospedeira, sendo esse um fato interessante em se tratando de vírus de DNA. O ciclo tem início quando partículas infecciosas realizam adsorção na membrana da célula hospedeira. Durante o ciclo de multiplicação diferentes tipos de partículas são produzidas, apresentando por sua vez ligantes distintos utilizados para realizar a adsorção e penetração. Apesar da não completa elucidação dos ligantes e receptores envolvidos, estudos evidenciam que proteínas da membrana do IMV se ligam a glicosaminas na superfície celular. Além disso, as proteínas H3 e A27 associam-se ao heparano sulfato, enquanto a proteína D8 se liga ao sulfato de condroitina (MCFADDEN, 2005; MOSS, 2013). Após a fase de adsorção, ocorre a fase de fusão e penetração viral, em que as principais proteínas virais envolvidas são A16, A21, F9, G3, G9, H2, I2, J5, L1 e L5. A importância de algumas dessas proteínas foi evidenciada através de estudos que demonstraram que mutantes que não as codificavam não eram capazes de multiplicar. Além disso, a proteína A28, que está presente em todas as formas infecciosas de VACV, exerce função importante nessa etapa (SENKEVICH *et al.*, 2003; SENKEVICH *et al.*, 2005; BROWN *et al.*, 2006; OJEDA *et al.*, 2006; MOSS, 2013).

Após a adsorção, a partícula penetra na célula hospedeira por fusão de membrana ou por endocitose mediada por receptor em uma via endossômica ácido dependente (TOWNSLEY *et al.*, 2006; MOSS, 2013). Além disso, um estudo realizado por MERCER e colaboradores, em 2010, evidenciou que IMVs podem penetrar na célula hospedeira através da ativação de uma complexa via de sinalização, seguida por internalização macropinocítica. (MERCER *et al.*, 2010).

Seguida da fusão ocorre a liberação do nucleocapsídeo no citoplasma da célula levando a uma expressão gênica temporal, em que inicialmente são expressos os genes precoces ativados por elementos transcricionais virais que darão início à síntese de RNAs mensageiros (mRNAs). Os mRNAs gerados

dão origem a enzimas e fatores relacionados à síntese de DNA. A expressão de genes intermediários levará à expressão de genes tardios, que por sua vez incluem proteínas estruturais, que irão compor a partícula, além de elementos enzimáticos e fatores de transcrição que serão empacotados durante a morfogênese da partícula. O amplo genoma desses vírus permite que eles sejam capazes de produzir inúmeras proteínas envolvidas na imunomodulação da célula hospedeira (BROYLES, 2003; MC FADDEN, 2005; MOSS, 2013).

Os poxvírus realizam sua morfogênese em regiões do citoplasma compostas por proteínas virais e do hospedeiro denominadas fábricas virais. Nessa etapa é importante ressaltar que diferentes partículas virais são produzidas. As partículas podem ser intracelulares ou extracelulares e podem ser infecciosas ou não. As partículas intracelulares produzidas são os IMVs e IEVs, já as partículas extracelulares são os chamados EEVs e CEVs, sendo que os CEVs são propulidos em direção às células vizinhas através da polimerização de caudas de actina formadas sob essas partículas (FIGURA 4) (McFADDEN, 2005; MOSS, 2013,). Essa interessante característica dos poxvírus de permanecerem associados à membrana celular está diretamente relacionada à disseminação célula a célula no hospedeiro e diferentes proteínas virais, tais como as proteínas A33 e A36 são associadas a esse processo (DOCEUL *et al.*, 2010).

Uma nomenclatura proposta por MOSS em 2006 denomina os vírus maduros intracelulares (IMV) como vírus maduros (MV), os vírus intracelulares envelopados (IEV), foram chamados de vírus envelopados (WV) e as partículas EEV e CEV, por se localizarem externas à célula, foram denominadas vírus extracelulares (EV) (MOSS, 2006).

Com relação à capacidade dessas partículas de infectar a célula hospedeira temos que, CEVs, EEVs e IMVs são partículas infecciosas, enquanto os IEVs não são capazes de infectar as células. Isso ocorre devido à ausência de proteínas de ligação virais expostas nas partículas dos IEVs, que por sua vez

apresentam uma membrana externa adicional quando comparado aos vírus extracelulares (SMITH *et al.*, 2002).

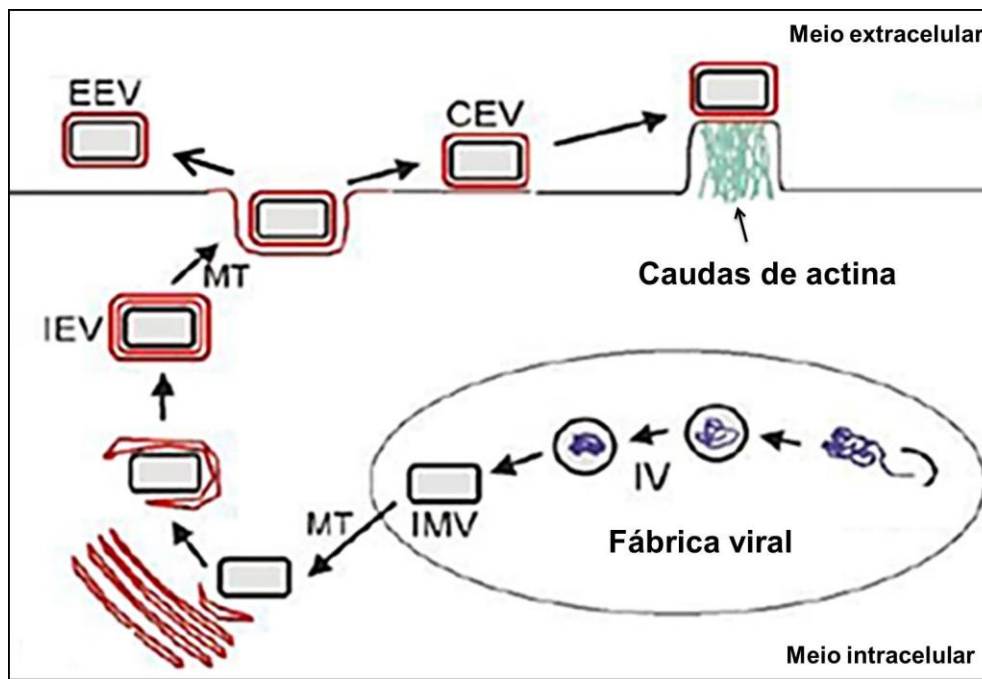


FIGURA 4. Morfogênese dos poxvirus com ênfase nos tipos de partículas produzidas durante o ciclo de multiplicação. Fonte: SMITH *et al.*, 2002-modificado.

Na etapa de morfogênese as proteínas e lipídeos se arranjam de forma a circundar o DNA viral e suas proteínas originando os vírus imaturos (IVs) que após passarem por um essencial processo proteolítico originarão os IMVs. Essas partículas constituem cerca de 90% da progênie viral infecciosa, sendo liberadas durante a lise celular. Porém, uma pequena parte dos IMVs são direcionados ao complexo de Golgi, no qual irão adquirir duas membranas originando os IEVs. Os IEVs serão então direcionados a membrana da célula hospedeira e liberadas por fusão de membrana, processo através do qual os IEVs perdem sua membrana mais externa e são liberadas originando os EEVs, que serão liberadas ou permanecerão associadas à membrana celular gerando

os chamados CEVs (SMITH *et al.*, 2002; MOSS, 2013). A FIGURA 5 ilustra o ciclo de multiplicação acima descrito.

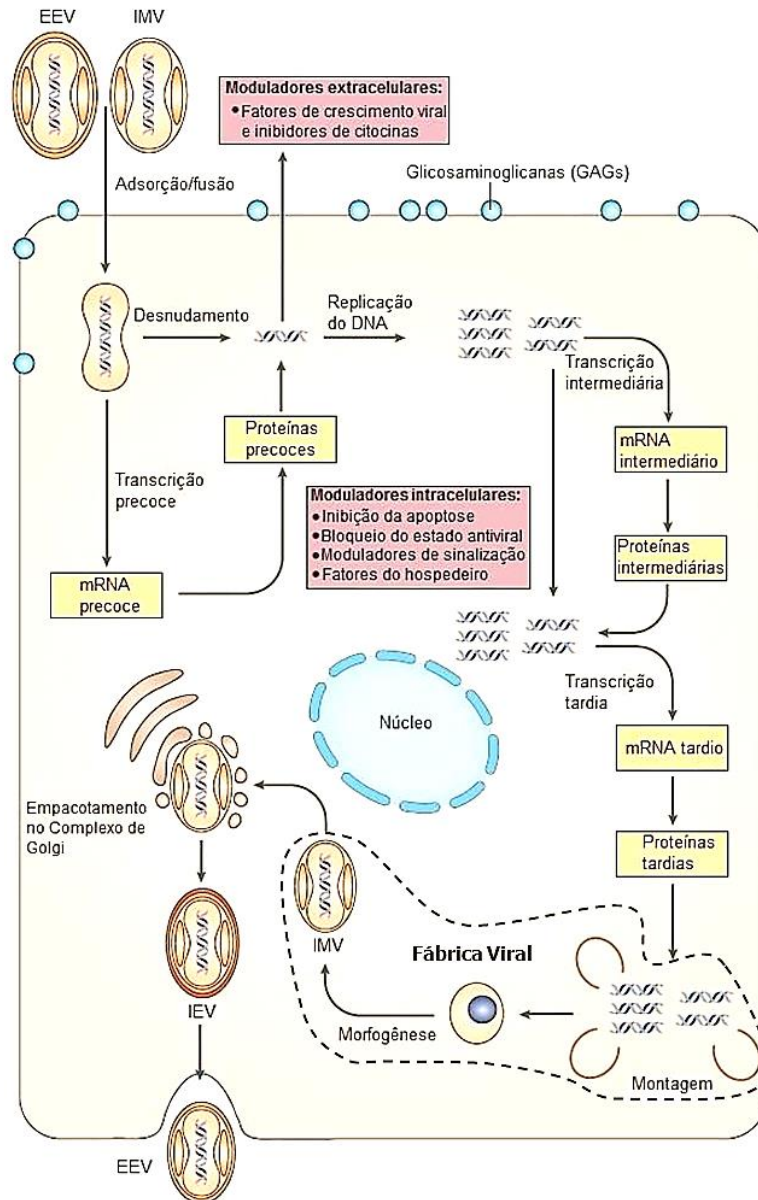


FIGURA 5. Representação esquemática do ciclo de multiplicação dos poxvírus (Fonte: McFADDEN, 2005 – modificado).

1.2 Gênero *Orthopoxvirus*

O gênero *Orthopoxvirus* (OPV) é composto por dez espécies denominadas *Camelpox virus*, *Cowpox virus*, *Ectromelia virus*, *Monkeypox virus*, *Raccoonpox virus*, *Skunkpox virus*, *Taterapox virus*, *Vaccinia virus*, *Variola virus* e *Volepox virus* (ICTV, 2013).

O grande impacto causado pela varíola no século XIX, com taxas de letalidade que variavam de aproximadamente 30% a 40% (HENDERSON *et al.*, 1999), levou a um amplo estudo do gênero OPV (MOSS, 2013).

Uma das principais características desse gênero é sua ampla gama de hospedeiros, sendo que entre os OPV que infectam humanos apenas o VARV não é zoonótico, uma vez que outras espécies que estão associadas com infecções em humanos, tais como CPXV, MPXV e VACV apresentam também outros hospedeiros animais (McFADDEN, 2005; DAMON, 2013).

A existência de diversidade entre amostras de uma mesma espécie é um fato comum no gênero OPV. As espécies desse gênero demonstram uma tendência em apresentar variantes genéticas e fenotípicas que podem estar associadas a virulência, distribuição geográfica e adaptação a novos hospedeiros.

1.2.1 *Variola virus*

A varíola foi uma doença altamente letal que influenciou a história da humanidade. As primeiras descrições de varíola foram feitas no Egito Antigo, sendo que um dos casos mais antigos relatados se refere à múmia do faraó Ramsés V, descoberta em 1898, apresentando evidências de que sua morte pode ter sido causada pela varíola em 1148 a.C. Supostamente, com o crescimento populacional, o surgimento das cidades e o aumento do comércio e das grandes navegações, os casos de varíola foram se tornando cada vez mais frequentes e a doença foi disseminada mundialmente.

Como forma de contenção da doença era realizado um procedimento denominado insulflação ou variolação, em que as pessoas inalavam ou inoculavam amostras de VARV provenientes de lesões de pessoas contaminadas. Porém esse método apresentava inúmeros efeitos colaterais que tornava seu uso extremamente inseguro (FENNER *et al.*, 1988).

Em 1796, Edward Jenner introduziu a vacinação, em que inoculou um garoto de oito anos com material proveniente de lesões causadas por CPXV, tornando-o imune a varíola. Como resultado desse novo método, os casos da doença foram reduzidos consideravelmente na Inglaterra e outros países da Europa. No entanto em outros continentes as mortes por varíola permaneciam. Assim, em 1967, a Organização Mundial de Saúde (OMS) iniciou uma campanha de vacinação mundial contra varíola, sendo utilizadas amostras de VACV como vírus vacinal (FENNER *et al.*, 1988).

Em 1980, após a intensa campanha de vacinação, a varíola foi declarada erradicada pela OMS, sendo que o último registro de um caso natural de varíola ocorreu em 1977, na Somália (FENNER *et al.*, 1988).

A infecção pelo VARV leva a uma doença exantemática febril sistêmica, incluindo sintomas tais como dor nas costas, dor de cabeça, vômitos e prostração. As lesões geralmente se manifestavam nas palmas das mãos,

plantas dos pés e face, que evoluíam de iniciais máculas e pápulas até a fase de vesículas e pústulas (HENDERSON *et al.*, 1999) (FIGURA 6).



FIGURA 6. Lesões típicas da varíola. (A) Face; (B) Membro inferior. Fonte: HENDERSON *et al.*, 1999; REYNOLDS *et al.*, 2012.

Apesar da erradicação da varíola, questões em relação a infecções causadas por esses vírus e por outros *Orthopoxvirus* permanecem em aberto. Isto ocorre porque dois laboratórios mantêm amostras de VARV: o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), nos Estados Unidos, e o Centro de Pesquisa do Estado para Virologia e Biotecnologia, na Rússia. Devido à existência desses estoques, além da possibilidade de existência de estoques clandestinos, o uso de amostras de VARV como arma bioterrorista não pode ser descartada (McFADDEN, 2005). Além disso, o aumento da população não imunizada contra OPV, uma vez que a vacinação foi suspensa há mais de três décadas, tem levado a um aumento das infecções em humanos causadas por OPV zoonóticos, como MPXV, CPXV e VACV (WOLFS *et al.*, 2002; GIULIO e ECKBURG, 2004; SCHATZMAYER *et al.*, 2009; NINOVE *et al.*, 2009; SHCHELKUNOV, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2014).

1.2.1.1 Diversidade entre amostras de *Variola virus*

Apesar de estar associada a um único hospedeiro, a diversidade entre amostras de VARV é descrita, a qual levava a duas formas de manifestação da doença clinicamente diferentes denominadas varíola *major* e varíola *minor*. A varíola *major* causava um quadro de sintomatologia mais grave, com taxas de letalidade de aproximadamente 40%, podendo ser superior em alguns surtos, enquanto a varíola *minor* resultava em manifestações mais brandas, com taxas de letalidade próximas de 1% (HENDERSON *et al.*, 1999).

As partículas do tipo EEV produzidas durante o ciclo de multiplicação dos poxvírus estão relacionadas à disseminação viral no hospedeiro (SMITH *et al.*, 2002). Foi demonstrado que diferentes amostras de VARV podem produzir diferentes títulos de EEV e conseqüente formação diferencial de cometas. Essas diferenças foram correlacionadas à filogenia e origem geográfica, mas não com o aumento das taxas de letalidade da doença. No entanto, foi demonstrado que pode haver uma associação entre tamanho de placa e taxas de letalidade. O estudo em questão evidenciou a diversidade biológica entre amostras de VARV uma vez que as vinte e cinco amostras estudadas foram divididas em três grupos com base na formação diferenciada de cometas (OLSON *et al.*, 2009).

Li e colaboradores, em 2007, realizaram um estudo filogenético em que as amostras de VARV analisadas foram divididas em dois clados que apresentavam diferenças com base na distribuição geográfica e formas clínicas da doença. Ensaios de formação de cometas foram comparados à distribuição geográfica, filogenia e taxas de letalidade (LI *et al.*, 2007; OLSON *et al.*, 2009). Em um estudo molecular utilizando 45 amostras de VARV foram encontrados mais de 1.500 polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) nas sequências de nucleotídeos. Ainda nesse estudo foi demonstrado agrupamento das espécies de VARV em diferentes clados inferidos com base na distribuição geográfica e taxas de letalidade (ESPOSITO *et al.*, 2006).

1.2.2 Monkeypox virus

Monkeypox virus (MPXV) é um OPV que circula na África e tem como reservatório natural roedores silvestres, causando uma doença com sinais clínicos muito semelhantes aos da varíola. Todavia, a linfadenopatia gerada por MPXV o distingue clinicamente da varíola (NALCA *et al.*, 2005; revisado por MCCOLLUM & DAMON, 2014) (FIGURA 7).

O MPXV foi descrito pela primeira vez associado a uma doença que causava erupção cutânea em macacos de cativeiro em um zoológico de Copenhague (ARITA *et al.*, 1976; ESSBAUER *et al.*, 2010). O primeiro relato em humanos ocorreu no Zaire em 1970 (NALCA *et al.*, 2005) e desde então outros casos vem sendo descritos (LEARNED *et al.*, 2005; RIMOIN *et al.*, 2007; RIMOIN *et al.*, 2010; REYNOLDS *et al.*, 2013)



FIGURA 7. Lesões causadas por MPXV em humanos. A seta indica linfadenopatia cervical. Fonte: REYNOLDS *et al.*, 2013; MCCOLLUM and DAMON, 2014.

1.2.2.1 Diversidade entre amostras de *Monkeypox virus*

Os MPXV estão divididos em dois clados geneticamente diferentes, com distinção geográfica. Em um dos clados estão os MPXV da África Ocidental e no outro estão os vírus isolados na Bacia do Congo. Na maioria dos casos os vírus da Bacia do Congo geram doença mais grave, com maiores taxas de letalidade, além de maiores taxas de transmissão entre humanos se comparado as amostras da África ocidental (CHEN *et al.*,2005; LIKOS *et al.*, 2005; NAKAZAWA *et al.*,2013). Apesar disso, recentemente foram realizadas análises do genoma de uma amostra de MPXV virulenta isolada de uma espécie de macaco do velho mundo que foi encontrado morto, em 2012, no Parque Nacional do Tai, localizado na Costa do Marfim. As análises demonstraram que o vírus foi agrupado junto aos MPXV da África ocidental (RADONIĆ *et al.*,2014).

Em 2014, um estudo demonstrou a existência de variabilidade genética entre vírus que pertencem ao clado da Bacia do Congo, em que foram detectadas quatro linhagens distintas, além de uma deleção que resultou na perda de genes em dez amostras e mostrou correlação com o aumento da transmissibilidade entre humanos, influenciando assim a evolução dos MPXV e consequentemente evidenciando a importância do estudo de diversidade entre amostras da mesma espécie (KUGELMAN *et al.*, 2014).

Em 2003, um surto de MPXV acometendo principalmente veterinários foi descrito nos EUA, associado à importação de roedores da África (GIULIO e ECKBURG, 2004). É interessante observar que os casos ocorridos nos EUA foram mais brandos, provavelmente devido a mutações que diminuíram a virulência da amostra, evidenciando as diferenças amostrais que podem estar presentes em uma mesma espécie e que, em geral, podem estar relacionadas com a virulência no hospedeiro (FINLAY e McFADDEN, 2006).

1.2.3 Cowpox virus

A circulação de *Cowpox virus* (CPXV) foi comprovadamente descrita apenas na Europa e em algumas regiões do oeste da Ásia. Esses vírus apresentam um amplo espectro de hospedeiros, sendo que os roedores silvestres são seus reservatórios naturais. Estudos demonstram que os felinos constituem importantes elos de transmissão entre os reservatórios naturais e humanos, além de promover a transmissão viral para animais de estimação e criação (BAXBY, 1979; MEYER, 1998; PELKONEN *et al.*, 2003; KURTH *et al.*, 2009). Estudos já demonstraram a presença de CPXV em animais selvagens, no entanto, as infecções em bovinos são pouco relatadas (BAXBY, 1979; MEYER, 1998; PELKONEN *et al.*, 2003; KURTH *et al.*, 2009; KALTHOFF *et al.*, 2014).

O número de casos de infecções humanas por CPXV tem aumentado, provavelmente devido ao surgimento de uma geração não imunizada contra os OPV (BECKER *et al.*, 2009; KURTH *et al.*, 2009; DUCOURNAU *et al.*, 2013). Casos de transmissão de CPXV para humanos a partir de roedores da espécie *Rattus norvegicus* foram descritos na Holanda, Alemanha e França (WOLFS *et al.*, 2002; CAMPE *et al.*, 2009; NINOVE *et al.*, 2009) (FIGURA 8).



FIGURA 8. Lesões faciais (A) e no membro superior (B) causadas por infecção de CPXV após contato com roedor da espécie *Rattus norvegicus*. Fonte: WOLFS *et al.*, 2002; NINOVE *et al.*, 2009.

1.2.3.1 Diversidade de amostras de *Cowpox virus*

Assim como ocorre em outras espécies do gênero OPV, CPXV apresenta mais de um genótipo. Estudos de Baxby e colaboradores, em 1975, demonstraram uma variabilidade notável no que se refere à patogenicidade de diferentes amostras de CPXVs, sugerindo uma classificação que agrupava os CPXVs em quatro clados com base em sua virulência. Além disso, estudos sugerem que amostras virais incluídas dentro da espécie CPXV apresentam grandes diferenças genotípicas e fenotípicas que não sustentam o seu agrupamento em uma única espécie. Neste sentido, com base em estudos moleculares GUBSER e colaboradores sugeriram a separação dos CPXV em espécies distintas (GUBSER *et al.*, 2004). Um estudo realizado em 2010 com base no gene A56R demonstrou uma alta diversidade genética entre amostras de CPXV provenientes de felinos, em que, a partir de 72 amostras analisadas demonstrou a presença de 21 variantes genéticas de CPXV que foram separados em quatro grupos (KAYSSER *et al.*, 2010).

Dando suporte a proposta de separação dos CPXV em diferentes espécies, Carroll e colaboradores, em 2011, sugeriram que CPXV não é uma única espécie, mas um conjunto de várias, demonstrando seu agrupamento em cinco clados com consequente separação em espécies distintas. Eles afirmam que a prática de nomear como CPXV os isolados provenientes de diferentes surtos pelo fato de apresentarem sinais clínicos semelhantes, tem prejudicado o estudo e ofuscado as verdadeiras relações taxonômicas entre os isolados de CPXV (CARROL *et al.*, 2010).

Em 2013, um estudo filogenético envolvendo o sequenciamento de 22 amostras de CPXV provenientes de humanos, gatos, roedores, e hospedeiros silvestres demonstrou agrupamento em vários clados distintos, que em muitos casos eram mais relacionados a outras espécies do gênero, tais como VACV do que as amostra de CPXV. Além disso, algumas variantes se mostraram mais proximamente relacionadas com o VARV, *Camelpox virus* e *Taterapox virus* do que a qualquer outro OPV (FIGURA 9) (DABROWSKI *et al.*, 2013).

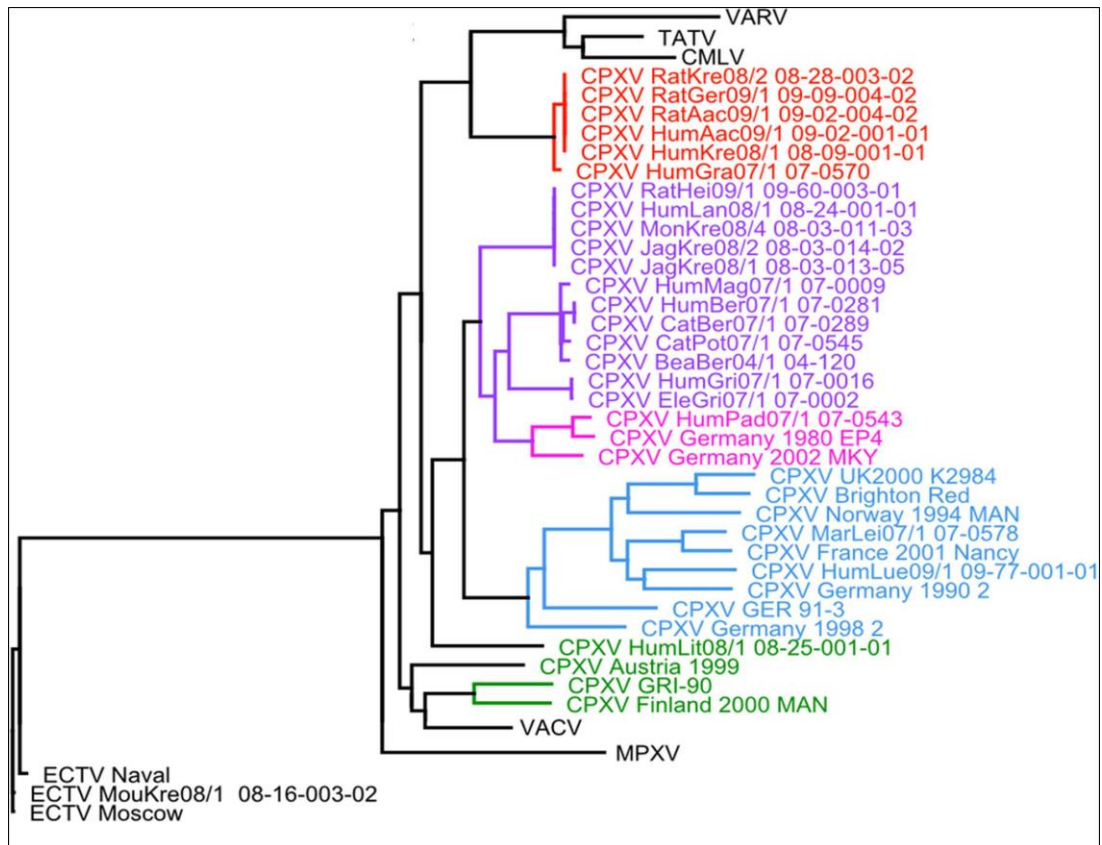


FIGURA 9. Estudo filogenético de *Cowpox virus* demonstrando separação em diferentes clados. Fonte: DABROWSKI *et al.*,2013

Okeke e colaboradores, em 2014 reforçam esses estudos demonstrando o agrupamento das espécies de CPXV com base na análise do gene A26L, em seis ou sete clados e propondo que a atual classificação de CPXV em uma única espécie deve ser reconsiderada (OKEKE *et al.*,2014). Esses estudos reforçam e ampliam os dados que defendem a separação de CPXV, uma vez que não formam um clado monofilético. Além dessa ampla diversidade, recentemente um caso envolvendo coinfeção em humanos, após contato com roedores, com duas amostras distintas de CPXV foi descrito na França (DUCOURNAU *et al.*,2013).

1.2.4 *Vaccinia virus*

O VACV é o vírus protótipo do gênero *Orthopoxvirus* (ICTV, 2013) e seu intenso estudo têm levado a muitas respostas sobre a interação vírus-hospedeiro. Devido à sua menor virulência se comparado ao CPXV, o VACV foi utilizado na produção da vacina utilizada na campanha de vacinação contra a varíola, contribuindo para a erradicação dessa doença e para estudos e formulação de conceitos básicos de doenças infecciosas e imunidade (McFADDEN, 2005; DAMON, 2013).

Devido à sua importância vacinal e sua contribuição em diversos estudos como vetor vacinal, além da sua associação com surtos em bovinos e humanos, o VACV foi e ainda tem sido um dos vírus de animais mais estudados (TRINDADE *et al.*, 2003, LEITE *et al.*, 2005; ABRAHÃO *et al.*, 2009a; SILVA-FERNANDES *et al.*, 2009; CHEN *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2013; MOSS, 2013).

Uma das principais características do VACV, assim como de outros OPV, é seu amplo espectro de hospedeiros, além de sua capacidade de modular os mecanismos de defesa do hospedeiro (McFADDEN, 2005).

Entre as amostras mais conhecidas e estudadas de VACV estão as amostras vacinais. Inicialmente, a vacinação era realizada utilizando amostras de CPXV, porém, durante a campanha de erradicação da varíola promovida pela OMS, o VACV se mostrou como um substituto eficiente e menos virulento na vacinação (FENNER *et al.*, 1988). Durante anos, a comunidade científica buscou amostras de VACV menos virulentas, mas com potencial imunogênico considerável, o que proporcionou a seleção de uma gama de amostras vacinais em diferentes partes do globo.

As amostras vacinais mais utilizadas na campanha da OMS foram as amostras Lister, originada da Inglaterra, e New York City Board of Health, oriunda dos

Estados Unidos. Além disso, outras amostras como EM-63, derivada da amostra New York City Board of Health foi utilizada na Rússia e, outras, como Copenhague e Ankara, foram produzidas na Dinamarca e Turquia, respectivamente. Já no Brasil, a amostra mais utilizada era derivada da amostra Lister, sendo denominada Lister Butantã, por ter sido produzida no Instituto Butantã em São Paulo. Porém outros tipos de vacinas foram usados no país, como New York City Board of Health e a amostra de origem não exatamente identificada, denominada VACV-IOC, produzida pelo Instituto Oswaldo Cruz no estado do Rio de Janeiro (FENNER *et al.*, 1988; HENDERSON e MOSS, 1999)

Com o sucesso da campanha de vacinação da varíola, a OMS declarou a doença erradicada em 1980. Todavia, devido aos efeitos colaterais observados em alguns pacientes em decorrência da vacinação, a mesma foi suspensa. Atualmente, apenas alguns profissionais da saúde e militares nos EUA são vacinados (FENNER *et al.*, 1988; MOSS, 2013). Porém, a vacinação pode levar a casos de transmissão intrafamiliar, como o descrito por Vora e colaboradores, em 2008, em que uma criança de dois anos desenvolveu um quadro de *eczema vaccinatum* (FIGURA 10) (VORA *et al.*, 2008).



FIGURA 10: Lesões generalizadas no peito e abdômen de uma criança de 2 anos provocadas por VACV, causando *eczema vaccinatum*. Fonte: VORA *et al.*, 2008

Alguns estudos são realizados com intuito de buscar, dentre as amostras vacinais, clones ou amostras menos virulentos, ou até mesmo o desenvolvimento de metodologias para tornar as amostras anteriormente utilizadas em vacinas mais atenuadas (WELTZIN *et al.*, 2003; DIMIER *et al.*, 2011; ZHU *et al.*, 2014).

Inúmeras amostras de VACV vêm sendo isoladas e caracterizadas no Brasil, em geral associadas a surtos de vaccínia bovina acometendo bovinos e humanos (DAMASO *et al.*, 2000; TRINDADE *et al.*, 2003; LEITE *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2013).

Além disso, evidenciando o amplo espectro de hospedeiros desses vírus, a circulação de VACV vêm sendo demonstrada em roedores, cavalos, macacos e búfalos (FONSECA *et al.*, 1998; ABRAHÃO *et al.*, 2009a; ABRAHÃO *et al.*, 2010a; BRUM *et al.*, 2010; ASSIS *et al.*, 2012b).

As amostras vacinais e brasileiras de VACV também demonstram diversidade amostral que serão apresentadas em outros tópicos desse estudo (Item 1.2.4.1 e Item 1.5).

1.2.4.1 Diversidade entre clones de amostras vacinais de *Vaccinia virus*

Além da diversidade demonstrada para outras espécies do gênero OPV, têm sido realizados diversos estudos envolvendo a pesquisa de variabilidade genética e fenotípica entre clones isolados a partir de amostras vacinais (OSBORNE *et al.*, 2007; QIN *et al.*, 2011; QIN *et al.*, 2013).

Osborne e colaboradores, em 2007, demonstraram a presença de alta variabilidade genética entre clones isolados da amostra vacinal Dryvax (OSBORNE *et al.*, 2007). Corroborando esses achados, um estudo demonstrou que existe mais diversidade genética entre clones isolados de apenas uma amostra estoque de Dryvax, do que entre as amostras de varíola *major* e *minor* (QIN *et al.*, 2011).

Variabilidade genética e fenotípica, incluindo também diferentes tamanhos das placas de lise foi demonstrada para a amostra vacinal Tian Tan. Células BSC40 foram utilizadas para o isolamento de clones a partir de um estoque dessa vacina com consequente isolamento de clones que produziam placas de lise de diferentes tamanhos. Dos 24 clones selecionados, três exibiram placas de lise grande, enquanto os demais formavam placas pequenas. Ainda nesse estudo foram realizados ensaios de curva de multiplicação a fim de comparar esses clones, sendo demonstrado que os clones pequenos multiplicavam mais lentamente se comparados aos de placa grande. Esse estudo reforça a presença de variabilidade não só molecular mas também biológica entre amostras vacinais de VACV (QIN *et al.*, 2013).

Outros estudos utilizando a amostra vacinal Lister demonstraram heterogeneidade na população clonal de VACV presente nessa amostra, em que foram desenvolvidos estudos fenotípicos *in vitro* e *in vivo* que demonstraram que os clones isolados diferem entre si (GARCEL *et al.*, 2009).

Assim, esses e outros estudos revelam que estoques de vacinas antigas podem conter uma mistura de vírus com um grande número de SNPs, além de inserções e deleções (INDELs) resultando em diversidade genética e fenotípica entre clones de amostras vacinais.

1.3 Circulação de VACV no Brasil

Os primeiros isolamentos de VACV no Brasil ocorreram entre as décadas de 60 e 70 através de um programa do governo de suporte a áreas rurais com registros de zoonoses virais desconhecidas, quando amostras clínicas foram coletadas e posteriormente caracterizadas como amostras de VACV. Entre elas, temos o BeAn58058 virus (BAV) que foi isolado em Belém, no estado do Pará, a partir de amostras de sangue de um roedor silvestre do gênero *Oryzomys* e o SPAn 232 virus (SAV), isolado de um camundongo sentinela em Cotia, no estado de São Paulo (LOPES *et al.*, 1965; FONSECA *et al.*, 1998; FONSECA *et al.*, 2002).

Anos mais tarde, em 1993, um surto acometendo camundongos suíços que haviam sido trazidos de Campinas no estado de São Paulo para o Centro de Bioterismo da UFMG causou lesões semelhantes às descritas para OPV, levando à morte alguns camundongos. Estudos biológicos levaram DINIZ e colaboradores em 2001 a caracterizá-lo como um poxvírus e denominá-lo Belo Horizonte virus (VBH) (DINIZ *et al.*, 2001). Com base em dados moleculares realizados em 2004, TRINDADE e colaboradores caracterizaram VBH como um VACV (TRINDADE *et al.*, 2004).

Desde 1999 amostras de VACV vêm sendo isoladas no Brasil durante surtos de vaccínia bovina (VB), cujo primeiro caso descrito ocorreu na cidade de Cantagalo, no estado do Rio de Janeiro (DAMASO *et al.*, 2000).

Ainda em 1999, foi isolada uma amostra de VACV a partir de bovinos em um surto exantemático que acometeu também humanos, na cidade de Araçatuba,

estado de São Paulo. Esse vírus foi denominado Araçatuba virus (ARAV) e através de análises moleculares foi proximamente relacionado à amostra de VACV anteriormente isolada denominada CTGV (TRINDADE *et al.*, 2003).

Além disso, estudos moleculares demonstraram uma deleção de 18 nucleotídeos no gene A56R desses e de outros isolados, como Passatempo virus (PSTV), isolado na cidade de Passa tempo, Minas Gerais. Essa deleção compartilhada sugere um possível ancestral comum para essas amostras (LEITE *et al.*, 2005).

Em 2001, durante um surto de VB na cidade de Guarani foram isolados os vírus Guarani P1 (GP1V) e Guarani P2 (GP2V), que demonstraram diferenças biológicas e moleculares entre si (TRINDADE *et al.*, 2006).

Em 2005 na cidade de Mariana no estado de Minas Gerais, durante um mesmo surto de VB, foram isoladas amostras de VACV de humano, bovino e de um roedor (*Mus musculus*), que foi denominado Mariana virus (MARV) (ABRAHAO *et al.*, 2009a).

Os isolamentos de VACV em roedores seguem a tendência de outras espécies de OPV, como CPXV e MPXV, que apresentam roedores como hospedeiros naturais. O ciclo de transmissão do VACV na natureza ainda não foi completamente elucidado e estudos em busca dos participantes desse ciclo, tais como reservatórios e hospedeiros naturais, indicam uma provável participação de roedores no ciclo de transmissão do VACV na natureza, como proposto por ABRAHÃO e colaboradores em 2009 (FIGURA 11) (ABRAHÃO *et al.*, 2009a).

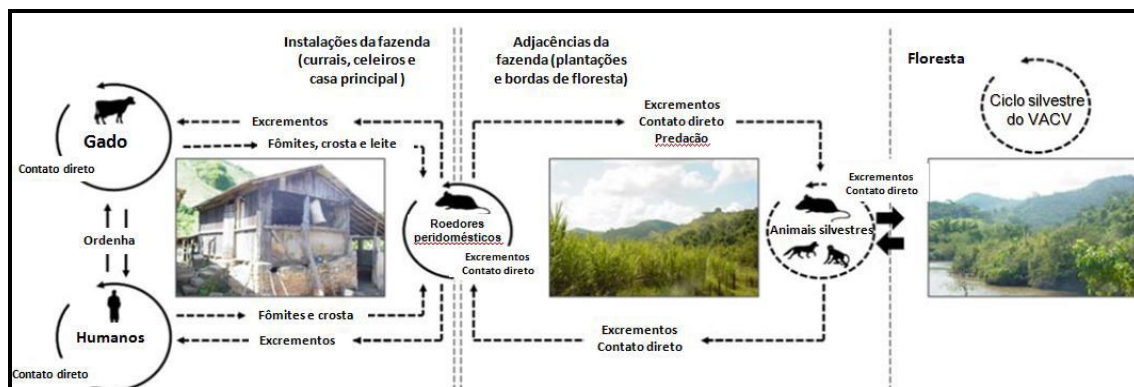


FIGURA 11. Ciclo hipotético de transmissão do VACV. Fonte: Abrahão *et al.*, 2009a

O primeiro caso descrito de coinfeção envolvendo amostras diferentes de VACV ocorreu na cidade de Pelotas, no Rio Grande do Sul, em que duas amostras denominadas Pelotas virus 1 (PV1) e Pelotas virus 2 (PV2) foram isoladas a partir de um mesmo hospedeiro, um equino (BRUM *et al.*, 2010; CAMPOS *et al.*, 2011).

Esses e outros isolamentos de VACV ocorreram no Brasil acometendo humanos e bovinos, sendo que amostras de VACV já foram isoladas em quase todos os estados brasileiros (FIGURA 12), tais como Espírito Santo, Minas Gerais, São Paulo, RS e mais recentemente no Maranhão (DONATELE *et al.*, 2007; TRINDADE *et al.*, 2003; MEDAGLIA *et al.*, 2009; MEGID *et al.*, 2008; ASSIS *et al.*, 2012a; OLIVEIRA *et al.*, 2013).

Além disso, um estudo sorológico realizado no Acre revelou alta soropositividade para OPV entre indivíduos em regiões em que não foram notificados surtos de VB (MOTA *et al.*, 2010).

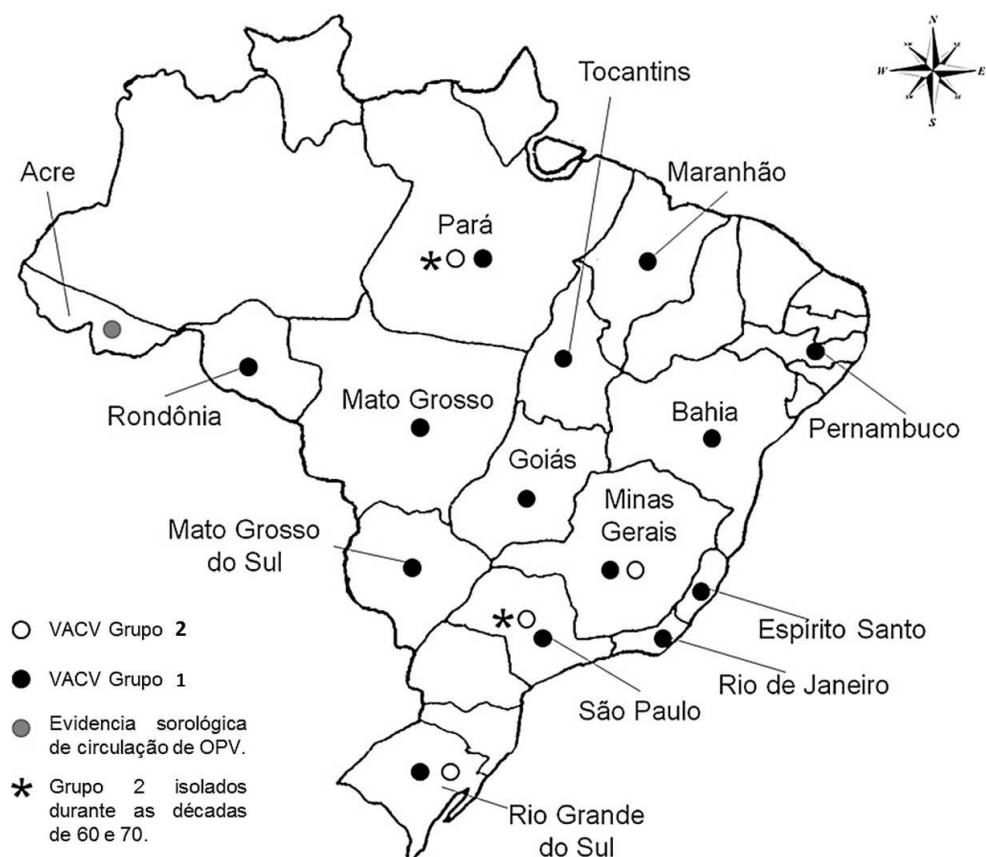


FIGURA 12. Estados brasileiros em que foi notificada a circulação de VACV (OLIVEIRA *et al.*, 2013 – modificado).

Estudos sorológicos evidenciam a presença de anticorpos anti-OPV não só entre humanos e bovinos, mas também entre outros animais (SILVA-FERNANDES *et al.*, 2009; SCHATZMAYR *et al.*, 2009; PERES *et al.*, 2013), tal como demonstrado em um estudo em que foram coletados soros de diferentes espécies de macacos e outras espécies silvestres tais como quatis e cotias entre os anos de 2001 e 2002 no estado do Tocantins, demonstrando a presença de anticorpos anti-OPV, em que alguns foram confirmados por sequenciamento (ABRAHÃO *et al.*, 2010a). Além disso, em 2012 foi demonstrada a presença de anticorpos anti-OPV em soros de búfalos coletados em regiões do estado de Minas Gerais nas quais já haviam sido notificados surtos de VB (ASSIS *et al.*, 2012b).

1.4 Vaccinia bovina- Aspectos clínicos e Impactos na saúde e economia

A vaccinia bovina (VB) é uma doença exantemática que acomete o gado leiteiro, além de estar associada a infecções em humanos, principalmente ordenhadores. Inúmeros surtos de VB associados a amostras de VACV vêm sendo descritos no país causando perdas econômicas e problemas de saúde pública (DAMASO *et al.*, 2000; TRINDADE *et al.*, 2003; LOBATO *et al.*, 2005; TRINDADE *et al.*, 2009; KROON *et al.*, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2013).

As lesões causadas por VACV, assim como por outros OPV zoonóticos, são localizadas e caracterizam-se por lesões ulcerativas que ocorrem frequentemente nos tetos e úberes das vacas, sendo comum também no focinho e cavidade oral de bezerros quando são amamentados por vacas manifestando as lesões (LEITE *et al.*, 2005; LOBATO *et al.*, 2005). Além disso, quando em humanos, as lesões ocorrem principalmente nas mãos e braços, e com menor frequência, na face (SCHATZMAYR *et al.*, 2005) (FIGURA 13).



FIGURA 13. Lesões causadas por VACV nos tetos de vacas (A e B), no focinho de bezerros (C) e no membro superior de humano (D). Fonte: LEITE *et al.*, 2005; TRINDADE *et al.*, 2007b; SCHATZMAYR *et al.*, 2011.

A doença é transmitida pelo contato direto com as lesões, que pode ocorrer tanto durante a amamentação dos bezerros como durante a ordenha manual. É fato recorrente a ordenha de diferentes animais por trabalhadores rurais sem proteção nas mãos, o que além de disseminar a doença no gado, também pode levar a infecção dos ordenhadores (LOBATO *et al.*, 2005). Além disso, têm sido descritos casos de transmissão intrafamiliar de VACV (SCHATZMAYR *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2014). As manifestações clínicas da doença iniciam-se com a formação de pápulas, que em seguida evoluem para vesículas e lesões ulceradas, que finalizam com a formação de crostas e cicatrização. Com relação a infecção em humanos os mesmos estágios das lesões são observados e, além disso, os indivíduos infectados podem desenvolver um quadro febril, com sintomas de linfadenopatia, dores no corpo e prostração (LOBATO *et al.*, 2005; SCHATZMAYR *et al.*, 2005; SIMONETTI *et al.*, 2007). O curso clínica da doença ocorre é de três semanas, sendo que as lesões causadas por VACV no gado podem acarretar o aparecimento de infecções bacterianas secundárias e mastites, gerando um agravamento da doença e impossibilidade de ordenha. Além disso, as lesões geram em muitos casos incapacidade de trabalho dos ordenhadores. Essa situação culmina na diminuição ou interrupção da produção leiteira, gerando perdas econômicas significativas. É importante considerar também que, das fazendas acometidas, muitas praticam ordenha para subsistência, o que leva a um problema não só econômico, mas também social (KROON *et al.*, 2011). Nesse contexto, é importante ressaltar que Minas Gerais é o maior produtor de leite do Brasil, sendo também local de ocorrências constantes de surtos de VB (LEITE *et al.*, 2005; LOBATO *et al.*, 2005; TRINDADE *et al.*, 2006; ASSIS *et al.*, 2012a). Além disso, ABRAHÃO e colaboradores demonstraram que o leite de animais infectados pode estar contaminado com o vírus, no entanto a transmissão através da ingestão do leite é desconhecida (ABRAHÃO *et al.*, 2009b).

1.5 Diversidade das amostras brasileiras de VACV

Até o ano de 2001, as amostras de VACV isoladas em surtos de VB apresentavam características filogenéticas muito similares. Porém, em 2001, na Zona da Mata Mineira, amostras molecularmente diferentes entre si foram isoladas durante um mesmo surto e denominadas Guarani P1 virus (GP1V) e Guarani P2 virus (GP2V) (TRINDADE *et al.*, 2006). Com base em diferenças biológicas e moleculares os VACV-BR foram divididos em dois grupos filogeneticamente distintos, denominados Grupo 1 (Cantagalo, Araçatuba, Guarani P2, outros) e Grupo 2 (Guarani P1, BeAn58058, SPAn232) (TRINDADE *et al.*, 2007; DRUMOND *et al.*, 2008) (FIGURA 14).

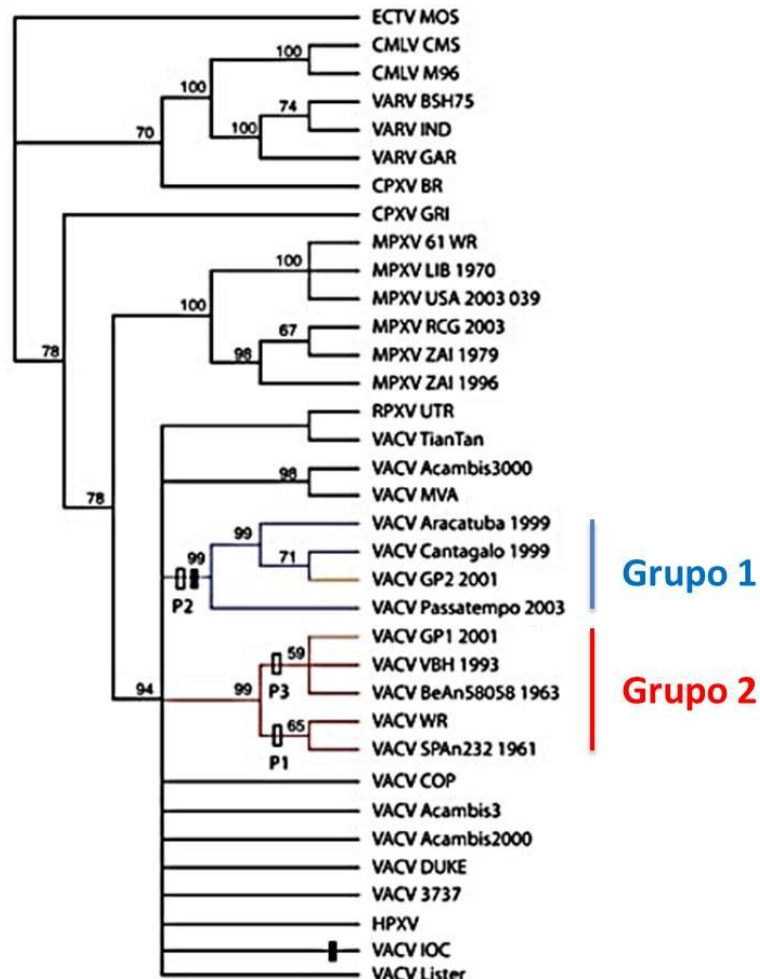


FIGURA 14. Árvore filogenética evidenciando os dois grupos de VACV-BR, construída com base nos genes B19R, E3L e A56R. Fonte: TRINDADE *et al.*, 2007.

Além disso, estudos biológicos dessas amostras demonstraram que os VACV-BR diferem também com relação ao tamanho da placa de lise e virulência em camundongos Balb/c (FERREIRA *et al.*, 2008). A amostra GP1V, por exemplo, além de gerar placas maiores em monocamada celular quando comparada a outras amostras bovinas e humanas, apresenta também virulência em modelo murino, o que não ocorre para as demais amostras. Isolamentos que reforçam a presença de duas subpopulações de VACV continuaram a ser descritos nos anos seguintes, sendo que, em 2010, houve a descrição de um surto em cavalos ocorrido em Pelotas, no Rio Grande do Sul e foi demonstrado uma coinfeção, em que duas amostras de VACV geneticamente diferentes estavam envolvidas, denominadas Pelotas virus 1 (PV1) e Pelotas virus 2 (PV2) (BRUM, *et al* 2010; CAMPOS *et al.*, 2011). Além disso, Assis e colaboradores, em 2012, caracterizaram novas amostras de VACV denominadas SH1V, SH2V e SB1V que se agrupam filogeneticamente às amostras virulentas de VACV (grupo 2) (FIGURA 15) (ASSIS *et al.*, 2012a).

Desde o isolamento da amostra CTGV, foi proposta uma origem vacinal a partir da amostra IOC para os VACV-BR devido a presença da deleção de 18 nt no gene A56R (DAMASO *et al.*, 2000). Porém, um estudo mais abrangente com análises envolvendo os genes A56R, B19R, E3L, incluindo outras regiões do genoma, além do isolamento de amostras geneticamente diferentes de VACV, levou a contestações acerca de uma origem única e/ou vacinal das amostras de VACV no Brasil, uma vez que demonstrou que as amostras de VACV-BR não se agrupam diretamente com a amostra vacinal IOC (TRINDADE *et a.*, 2007). Reforçando essa ideia, um estudo filogenético envolvendo amostras de *Buffalopox virus* (BPXV), uma variante de VACV, isolados de búfalos, bovinos e humanos na Índia demonstrou que as amostras de BPXV não estão proximamente relacionadas a amostras vacinais, sendo mais estreitamente relacionados a outros VACV, tais como PSTV e ARAV (TRINDADE *et al.*, 2003; LEITE *et al.*, 2005).

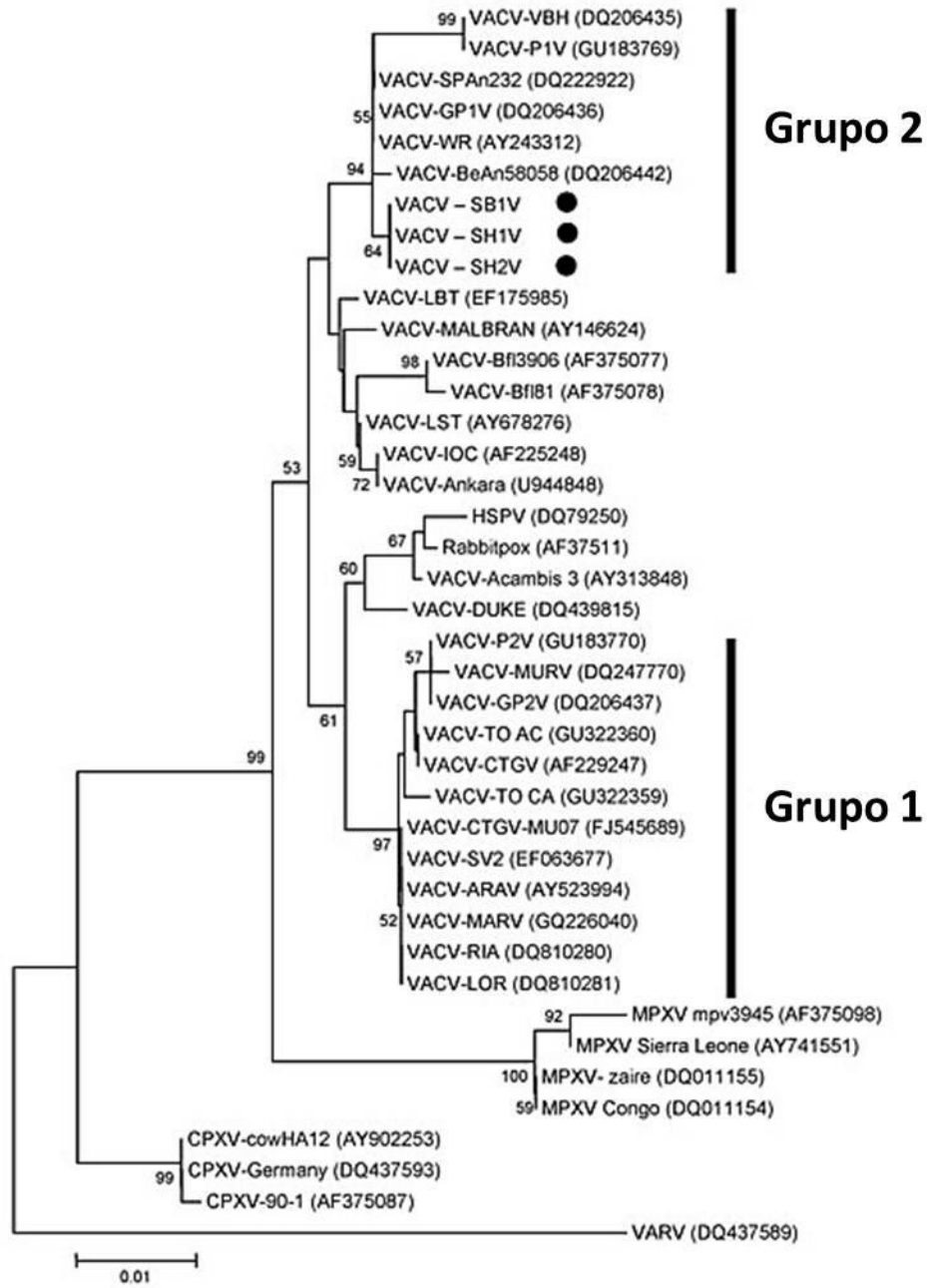


FIGURA 15. Árvore filogenética construída com base na sequência de nucleotídeos do gene A56R. Fonte: ASSIS *et al.*, 2012a.

1.6 Marcadores moleculares para VACV-BR: A56R, A26L e C23L.

Diversos genes tem sido utilizados em estudos filogenéticos envolvendo as amostras de VACV-BR, entre eles destacam-se os genes C6L, C7L, K1L, K2L, K3L, E3L, A26L, A56R, B5R and B8R, que permitem sustentar a dicotomia molecular de amostras de VACV-BR (LEITE *et al.*, 2007; TRINDADE *et al.*, 2007; DRUMOND *et al.*, 2008). No presente estudo, a utilização dos genes A56R (*ha*), A26L (*ati*) e C23L como marcadores moleculares para a separação dos grupos 1 e 2 de VACV-BR é ressaltada. Considerando o gene A56R (*ha*), que codifica a hemaglutinina viral, a caracterização é realizada principalmente com base em uma deleção de 18 nucleotídeos presente nas amostras do grupo 1 e ausente nas amostras do grupo 2 de VACV-BR. O gene A26L (*ati*), responsável por codificar a matriz proteica que forma o corpúsculo de inclusão do tipo A, é considerado um dos marcadores mais polimórficos utilizados nesses agrupamentos uma vez que se encontra quase completamente deletado nas amostras do grupo 2 de VACV-BR, tais como VBH, GP1V, P1V, BAV e outros, mas com exceção da amostra SAV e ao recentemente isolado SH2V que apresentam esse gene. Em contraste, as amostras do grupo 1 apresentam esse gene, no qual pode ser identificada a presença de dois blocos de deleções de 12 e 21 nucleotídeos (MEYER *et al.*, 1994; LEITE *et al.*, 2007). Estudos do grupo de poxvirologia do Laboratório de Vírus da UFMG demonstraram também a separação dos VACV-BR com base no gene C23L, que codifica uma proteína de ligação a quimiocinas. Essa separação é feita com base em uma deleção de 10 nucleotídeos presente nas amostras do grupo 1, que leva a produção de um códon de parada prematuro, sendo esta deleção ausente nas amostras do grupo 2 (ASSIS *et al.*, 2012c).

1.7 Estudos de coinfeções e recombinação de poxvírus

Casos de coinfeção envolvendo VACV já foram descritos (ABRAHÃO *et al.*, 2010b, CAMPOS *et al.*, 2011; SANT'ANA *et al.*, 2013). Esse evento exerce um papel fundamental na ocorrência de recombinação, uma vez que os vírus podem trocar material genético quando co infectando uma mesma célula, podendo gerar progênie ou proteômica híbrida (QIN *et al.*, 2014). A recombinação pode por sua vez levar a adaptação a novos hospedeiros, aquisição de mecanismos de evasão da resposta imune, resistência a antivirais, aumento da virulência, além de exercer uma importância fundamental na evolução viral uma vez que ajuda a aumentar a variabilidade genética e cria novos fenótipos (Nora *et al.*, 2007; HOLMES, 2013).

Estudos demonstram eventos de recombinação entre os poxvírus durante a ocorrência de coinfeção (EVANS *et al.*, 1988; BEDSON *et al.*, 1964). Estudos de coinfeção foram feitas envolvendo amostras de VACV que diferiam em cinco características: morfologia dos *pocks* em ovos embrionados, produção de hemaglutinina, resistência ao calor, neuropatologia em camundongos e produção de lesão cutânea em coelhos. Estes estudos revelaram o surgimento de clones virais que exibiam uma variedade de tipos de combinação das características das amostras parentais provavelmente resultantes de recombinação (FENNER, *et al.*, 1958).

Bedson e colaboradores (1964) avaliaram 16 clones resultantes de recombinação derivados de coinfeções entre vírus de varíola *major* e CPXV, e demonstraram que 14 apresentaram características mistas dos parentais. Nesse e em outros estudos é discutida a possibilidade de VACV ter sido originado como um híbrido de VARV e CPXV (BEDSON *et al.*, 1964).

Estudos de Katz e colaboradores de 1978 demonstraram a ocorrência de recombinação entre clones mutantes sensíveis a temperatura e clones resistentes a isatina- β -tiossemicarbazona (IBT), de VACV em que após coinfeção passaram a compartilhar essas características (KATZ *et al.*, 1978).

Em 2008, Carrillo e colaboradores desenvolveram estudos de coinfeção utilizando VACV em uma concentração estabelecida seguida da inoculação do vírus da estomatite vesicular (VSV), em diferentes tempos. Os resultados sugeriram que a presença de VACV acelerava a adaptação de VSV na célula hospedeira e que a adaptação estava relacionada às concentrações de vírus, sugerindo uma “cooperação” evolutiva entre esses vírus (CARRILLO *et al.*, 2008).

Em 2014, foi descrito um interessante estudo em que células foram coinfectadas com clones diferentes geneticamente, sendo um clone de Dryvax e um de Tian Tan. Foram avaliadas aproximadamente 1.400 SNPs que diferenciavam essas amostras e funcionavam como marcadores para rastrear as origens dos diferentes segmentos de DNA na progênie recombinante. Esse estudo trouxe muitas respostas sobre os padrões de recombinação de VACV, demonstrando, sobretudo que esses eventos podem produzir genomas que exibem um “mosaico” de fragmentos dos vírus parentais que pode ser derivada de mudanças durante o curso de um único ciclo de infecção. Esse estudo evidenciou que a recombinação de poxvírus é um processo muito preciso que gera vírus contendo material genético de ambos os progenitores. Em uma única rodada de infecção, o DNA é deslocado aproximadamente 18 vezes por genoma, misturando os genes em complexas combinações e ilustrando como a recombinação pode produzir vírus com potencial de doença muito alterado (QIN *et al.*, 2014).

Considerando a importância dos eventos de recombinação e sua associação direta com a ocorrência de coinfeções, torna-se importante os estudos que envolvem casos de coinfeção entre amostras ambientais de VACV.

Uma coinfeção envolvendo VACV e *Pseudocowpox virus* foi descrita na cidade de Resplendor no estado de Minas Gerais durante um surto de doença exantemática em bovinos e humanos. A coinfeção foi detectada em um trabalhador rural, que lidava diretamente na ordenha, e que apresentou uma lesão claramente mais grave do que as lesões observadas em casos que envolvem a presença de apenas uma espécie viral (ABRAHÃO *et al.*, 2010b). Além disso, durante um surto de doença exantemática em 2011 na cidade de Jataí, foi demonstrada a ocorrência de um caso de coinfeção por VACV e *Orf virus* em bovinos (SANT'ANA *et al.*, 2013).

Um caso natural de coinfeção envolvendo amostras de VACV (PV1 e PV2) foi descrito no estado do Rio Grande do Sul, em equinos, demonstrando heterogeneidade genética e biológica através de ensaio de fenótipo de placa, curva de crescimento, sequenciamento e perfil de virulência em modelo murino (BRUM *et al.*, 2010; CAMPOS *et al.*, 2011).

Pouco se sabe acerca de taxa de recombinação viral e suas implicações na patogênese durante coinfeções com poxvírus. Porém, considerando a importância da recombinação e o aumento do número de casos descritos envolvendo coinfeções entre espécies de poxvirus, esse tipo de estudo se faz importante.

II. JUSTIFICATIVA

O VACV exerceu uma importância fundamental para a humanidade durante o programa de erradicação da varíola, e atualmente é um dos vírus de animais mais estudados no mundo.

A varíola levou a óbito milhares de pessoas em todo o mundo influenciando a história da humanidade e, apesar da sua erradicação na década de 80, existe a preocupação acerca do uso de suas amostras em atentados terroristas. Além disso, provavelmente devido ao aumento da população não imunizada contra os OPV, tem aumentado o número de infecções causadas por outras espécies do gênero, tais como CPXV, MPXV e VACV, que, além de causar infecções em seres humanos, podem apresentar uma ampla gama de hospedeiros, o que torna sua contenção mais desafiadora.

Atualmente, surtos de VB associados a amostras de VACV têm sido relatados no Brasil, ocasionando uma queda na produção leiteira. Além disso, quando em humanos, as lesões ocorrem principalmente nas mãos, e a sintomatologia pode levar o ordenhador a afastar-se do trabalho temporariamente, o que agrava a situação econômica e evidencia a VB como um problema de saúde pública.

Durante os últimos 15 anos, o isolamento e caracterização de amostras de VACV no Brasil demonstrou a existência de variabilidade genética e molecular entre as amostras, o que permite sua separação em pelo menos dois grupos. Além disso, estudos demonstram que esses diferentes grupos podem cocircular em um mesmo surto ou até mesmo em um único hospedeiro.

Existe uma grande tendência entre as espécies do gênero OPV, como CPXV, MPVX e VARV, de apresentar variantes com diferenças genéticas, clínicas e até mesmo geográficas, com reflexos na epidemiologia, patogenia e

diagnóstico viral. Além disso, estudos investigando amostras vacinais têm demonstrado a existência de alta variabilidade genética entre clones de uma mesma amostra.

Assim, considerando que casos naturais de cocirculação e coinfeção de VACV-BR já foram descritos, além da circulação de uma grande variabilidade de clones em amostras vacinais, associado à tendência das espécies do gênero OPV apresentar variantes, o estudo da variabilidade e cocirculação clonal entre amostras naturais de VACV se faz necessário.

Nesse contexto, estudar a diversidade de amostras naturais de VACV é de extrema importância, podendo trazer respostas sobre as origens do VACV, campo em intensa discussão, além de levar a uma melhor compreensão acerca da circulação, prevalência e eventuais coinfeções envolvendo amostras dos Grupos 1 e 2 de VACV no Brasil.

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Estudar a diversidade de clones de amostras de VACV provenientes de espécimes clínicos humanos e bovinos, coletados em cinco estados brasileiros, com base em análises biológicas e moleculares.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Isolar e selecionar clones de VACV a partir de 10 amostras provenientes de lesões humanas e bovinas obtidas de surtos de VB em cinco estados brasileiros;
- ✓ Sequenciar e analisar filogeneticamente os clones isolados;
- ✓ Caracterizar biologicamente diferentes clones isolados de um mesmo espécime clínico;
- ✓ Avaliar a virulência de alguns dos clones isolados em modelo murino Balb/c.

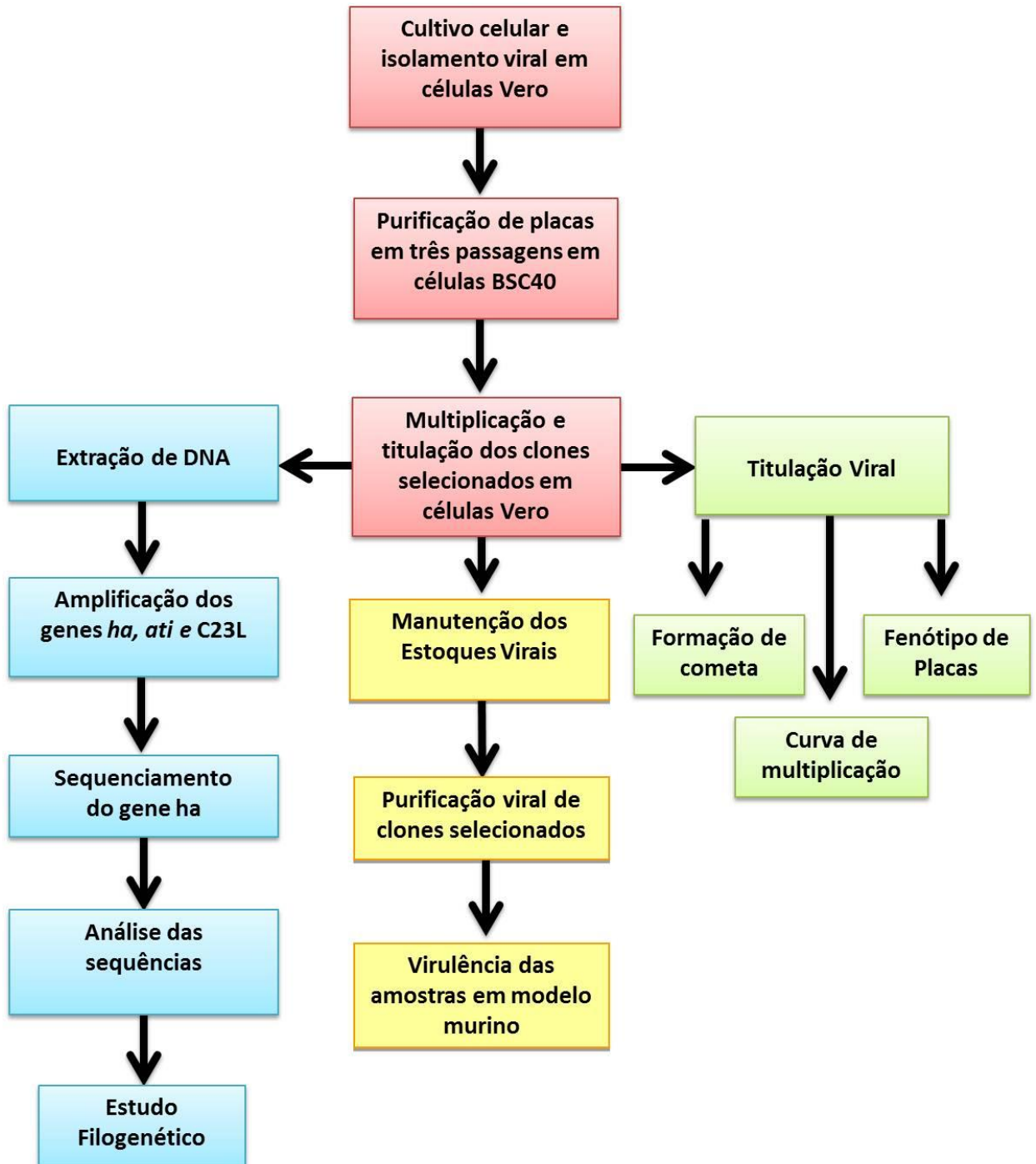
IV. FLUXOGRAMA DE TRABALHO

Para alcançar os objetivos propostos utilizamos uma metodologia que abrange técnicas biológicas e moleculares. Inicialmente foi realizado o isolamento dos espécimes clínicos em células VERO e posterior purificação de placas em células BSC-40 que teve como propósito a seleção de clones com diferentes tamanhos. Para completa purificação desses clones foram realizados três etapas de purificação em células BSC-40. Posteriormente foi realizada a multiplicação dos clones, seguida da sua titulação.

A fim de estudar a diversidade biológica entre os clones coletados foram realizados ensaios de fenótipo de placa, formação de cometas, curva de multiplicação e avaliação da virulência em modelo murino de alguns clones previamente selecionados, visto que já foram demonstradas diferenças relacionadas a esses ensaios no que se refere as amostras de VACV-BR (FERREIRA *et al.*, 2008). Os clones selecionados para ensaio em animais foram previamente purificados.

Para caracterização molecular foi realizada extração de DNA, seguida da amplificação por PCR convencional dos genes A56R, A26L e C23L, que conforme descrito na literatura constituem marcadores moleculares para os diferentes grupos de VACV-BR (TRINDADE *et al.*, 2006, 2007; LEITE *et al.*, 2007; ASSIS *et al.*, 2012c). Em seguida, foi realizado o sequenciamento do gene A56R.

O trabalho foi desenvolvido conforme o fluxograma apresentado a seguir:



V. METODOLOGIA

5.1 Descrição dos espécimes clínicos

Nesse estudo foram utilizados espécimes clínicos coletados a partir de lesões exantemáticas de humanos e bovinos, durante surtos de VB ocorridos em 5 estados brasileiros: Bahia, Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais e Pará (FIGURA 16).

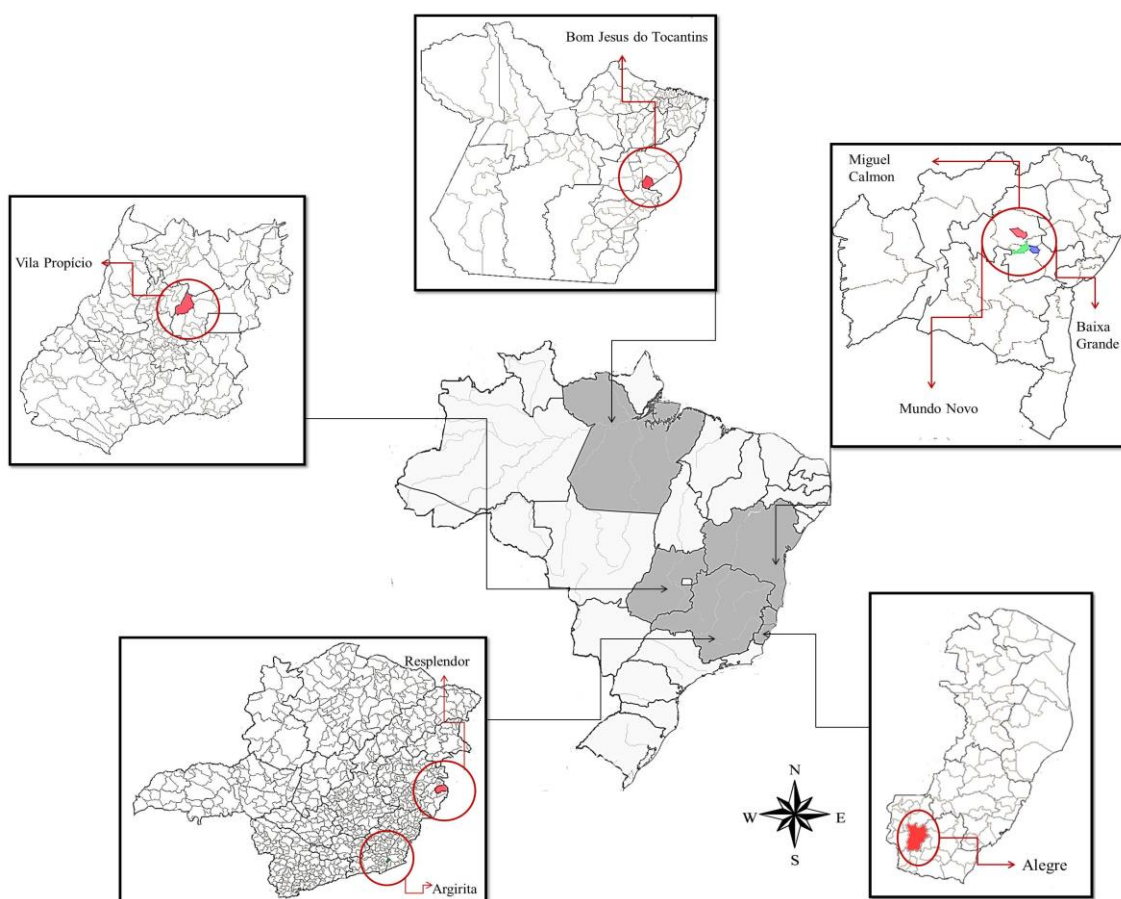


FIGURA 16: Distribuição geográfica dos espécimes clínicos utilizados nesse trabalho. Destacados em cinza os estados da Bahia, Minas Gerais, Espírito Santo, Goiás e Pará. Circulados em vermelho os municípios dos quais são provenientes os espécimes clínicos, dentre eles os municípios de Miguel Calmon, Mundo Novo e Baixo Grande na Bahia, Alegre no Espírito Santo, Argirita e Resplendor em Minas Gerais, Vila Propício em Goiás e Bom Jesus do Tocantins no estado do Pará.

É importante ressaltar que, com intuito de isolar dez amostras, foi realizada a tentativa de isolamento a partir de espécimes clínicos sabidamente positivos que haviam sido triados no trabalho de mestrado do aluno Felipe Lopes de Assis, colaborador desse trabalho. Os espécimes clínicos provenientes do estado de Minas Gerais foram coletados por equipes do Laboratório de Vírus da UFMG, em parceria com o Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) e com o Laboratório de Pesquisa em Virologia Animal da Escola de Medicina Veterinária da UFMG. Já os espécimes clínicos dos estados da Bahia, Espírito Santo e Goiás foram enviados pelos órgãos de vigilância veterinária de cada estado ou pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). Os espécimes clínicos provenientes do Estado do Pará foram coletados e encaminhados ao Laboratório de Vírus pelo estudante de Doutorado da Escola de Veterinária da UFMG, Cairo Henrique Sousa de Oliveira.

O estudo foi realizado utilizando dez espécimes clínicos, dentre eles nove biópsias de lesão (crosta) e um swab de lesão, sendo dois humanos, dos quais um é proveniente do estado da Bahia e um do estado de Minas Gerais e oito espécimes coletados de bovinos, dentre eles dois provenientes da Bahia, dois do estado do Pará, dois de Goiás, um de Minas Gerais e um do Espírito Santo conforme demonstrado na TABELA 2.

TABELA 2. Descrição das amostras analisadas, identificando a localidade, ano de coleta, a fonte e o espécime clínico coletado.

	Localidade (Município/ Estado)	Ano	Fonte	Espécime
VACV-BABV	Baixa Grande/ Bahia	2011	Bovino	Crosta
VACV-BAB2V	Miguel Calmon/ Bahia	2011	Bovino	Crosta
VACV-BAHV	Mundo Novo/ Bahia	2011	Humano	Crosta
VACV-GOBV	Vila Propício/ Goiás	2011	Bovino	Crosta
VACV-GOB2V	Vila Propício/ Goiás	2011	Bovino	Crosta
VACV-ESBV	Alegre/ Espírito Santo	2008	Bovino	Crosta
VACV-MGBV	Resplendor/ Minas Gerais	2005	Bovino	Crosta
VACV-MGHV	Argirita/ Minas Gerais	2011	Humano	Swab de lesão
VACV-PABV	Bom Jesus do Tocantins/ Pará	2011	Bovino	Crosta
VACV-PAB2V	Bom Jesus do Tocantins/ Pará	2010	Bovino	Crosta

A amostra *Vaccinia virus* Western Reserve (VACV-WR) foi gentilmente cedida pelo Dr. C. Jungwirth (Universidade de Würzburg, Alemanha). Esta amostra foi utilizada como controle nas PCRs e nos ensaios em modelo animal. A amostra GP1V foi utilizada como controle nas PCRs de VACV-BR do grupo 2 e a amostra GP2V como controle de VACV-BR do grupo 1 (TRINDADE et al, 2006). Os espécimes clínicos utilizados nesse trabalho foram armazenados no Laboratório de Vírus, a -80°C, até o processamento.

5.2 Processamento dos espécimes clínicos

As biópsias de lesão (crostas) foram maceradas com auxílio de um macerador (Politron, Littau, Switzerland) e diluídas a 1:100 p/v em solução salina tamponada (PBS 1X) acrescido de penicilina (400 U/mL), anfotericina B (5µg/mL) e gentamicina (100 µg/mL). Posteriormente, foram homogeneizadas e centrifugadas por 3 minutos a 2000 x g e estocado o sobrenadante. As amostras de *swab* foram processadas adicionando 200-300µL da mesma solução de PBS utilizada para o processamento das biópsias de lesões, e então posteriormente homogeneizadas e centrifugadas por 3 min a 2000 x g. (Abrahão et al., 2010c).

5.3 Sistemas celulares

5.3.1 Células VERO e BSC40

As células Vero e BSC-40 foram obtidas da American Type Culture Collection (ATCC), (Maryland, EUA) e são derivadas de células epiteliais de rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*). Células Vero e BSC foram cultivadas com meio mínimo essencial de Eagle (MEM) (Gibco, USA) acrescido de glutamina, gentamicina (50 µg/mL), penicilina (200 U/mL), anfotericina B (2,5 µg/mL) e 5% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Brasil), e posteriormente incubadas em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. Os subcultivos ou repiques foram realizados a cada dois dias por lavagem da monocamada celular com solução tampão fosfato salina 1X (PBS 1X) (NaCl 137mM; KCl 2,7mM; Na₂HPO₄ 1,4mM; pH 7,2) e tratamento com tripsina acrescida de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA).

5.4 Isolamento viral em células Vero

Para o isolamento viral foram utilizadas monocamadas de células Vero com 80-90% de confluência (Item 5.3.1) O meio dessas células foi desprezado e a monocamada foi lavada duas vezes com PBS 1X sendo todo o excesso retirado. Posteriormente as monocamadas foram inoculadas com 400 μ L das amostras processadas (Item 5.2.) e incubadas a 37°C para adsorção por 1 hora, sendo que durante esse tempo foram realizadas homogeneizações a cada 10 minutos. Após o intervalo de adsorção foi adicionado meio MEM suplementado com 1% de SFB e incubadas em estufa a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂ por 48 horas ou até observação do efeito citopático (ECP). Como controle negativo, a monocamada celular foi infectada com PBS 1X. Em casos em que não foi possível isolar o vírus a partir de uma única passagem, até três passagens foram feitas a fim de se concretizar o isolamento. Após observação do ECP a monocamada foi raspada com auxílio de raspadores (Scraper TTP) e armazenada em freezer -70°C.

5.5 Purificação de placas em células BSC-40

Para realizar a purificação de placas virais, os espécimes clínicos, previamente isolados (Item 5.4), foram diluídos em meio DMEM sem adição de SFB, em um volume final de 200 μ L. A célula BSC-40 foi utilizada para purificação de placas por possibilitar a visualização de placas virais pequenas e grandes, no caso de infecção por amostras de VACV dos grupos 1 e 2, respectivamente. As diluições foram então inoculadas em monocamada de células BSC-40 com 80-90% de confluência, cultivadas em placas de células de seis poços. O meio das placas foi descartado e as placas foram lavadas duas vezes com PBS 1X. Após esse procedimento, as diluições foram inoculadas e incubadas por 1 hora para adsorção, com homogeneização a cada 10 minutos. Após a adsorção, foram adicionados aos poços 2mL de meio de cultura semi-sólido. Para preparo do meio foi utilizado DMEM 2X suplementado com SFB 2% e

acrescido de antibióticos (penicilina (400 U/mL), anfotericina B (5µg/mL) e gentamicina (100 µg/mL). Paralelamente, foi preparada uma solução de agarose (Promega) 2% dissolvida em água dd e adicionada ao meio DMEM acima descrito na razão de 1:1, dando origem ao meio DMEM 1X com 1% de SFB acrescido de agarose numa concentração de 1%. Em cada placa um poço foi inoculado para adsorção apenas com meio DMEM na ausência de SFB, consistindo o controle de células. Essas células foram incubadas por um período de 48 horas em estufa a 37°C, com 5% de atmosfera de CO₂. Os clones foram visualizados e selecionados, em um total de cinco clones por amostra, contemplando os tamanhos mais variados de placas encontrados. Para demarcar as placas a serem coletadas, foi feita uma marcação com pincel na parte externa do poço, e posteriormente as placas foram coletadas com auxílio de ponteira de 10 µL com filtro. O meio foi aspirado no local marcado e dispensado em 100µL de meio DMEM acrescido de 5% de SFB, com repetidas lavagens da ponteira no meio para completa retirada das partículas contidas na mesma. Os clones selecionados foram submetidos a mais dois *rounds* de seleção clonal em células BSC40 para garantir a pureza dos mesmos. Nenhuma amostra viral, proveniente da coleção de amostras do Laboratório de Vírus da UFMG, foi manipulada durante o processo de seleção clonal.

5.6 Multiplicação viral em células Vero

Os estoques de vírus foram obtidos com a multiplicação em células Vero cultivadas a 37°C, em estufa com aporte de 5% de CO₂. Monocamadas de células Vero contendo cerca de 40 milhões de células foram lavadas duas vezes com PBS e infectadas com multiplicidade de infecção (MOI) de 0,01, diluído em 5 mL de MEM sem adição de SFB. Após 1 hora de adsorção, a 37°C, foram acrescentados 25 mL de MEM suplementado com 1% SFB. Novamente, as células foram incubadas a 37°C e monitoradas diariamente ao microscópio óptico até a detecção de 90% de ECP. Para coleta, o meio de cultivo foi desprezado, as células foram lavadas com PBS e desprendidas das garrafas com auxílio de um raspador e utilizando Tris-HCl 10mM, pH 8,0. A

suspensão obtida foi centrifugada durante 10 minutos a 2500 x g (rotor H1000B - Sorvall RT6000 B) a 4°C e o sedimento obtido foi mantido a – 70°C.

5.7 Titulação viral (CAMPOS e KROON, 1993)

A titulação foi feita em triplicata utilizando placas de seis poços em monocamada de células Vero com aproximadamente 80-90% de confluência por poço incubadas a 37°C por 16-24 horas em MEM suplementado com 5% SFB (Cultilab, Brasil). O meio das placas foi desprezado e a monocamada lavada com PBS 1X. Em seguida, foram realizadas diluições seriadas do vírus em MEM na ausência de SFB e adicionado em cinco poços da placa, sendo que um poço foi utilizado como controle da viabilidade celular, onde apenas meio foi adicionado. As células foram incubadas a 37°C durante 1 hora com homogeneização a cada 10 minutos para a adsorção e posteriormente adicionado 2 mL de MEM contendo 1% de SFB (CAMPOS e KROON, 1993). As placas foram incubadas a 37°C, e após 48 horas, fixadas com solução de paraformaldeído 3,7% durante 30 minutos e coradas com solução de cristal violeta por 15 minutos. Para cálculo do título viral, as placas de lise foram contadas na diluição que apresentou entre 30 e 300 placas de lise e multiplicada pelo inverso da diluição, finalizando com a conversão para o volume de 1 mL, com título resultante em pfu/mL.

5.8 Ensaio de fenótipo de placas

As placas purificadas (Item 5.5) foram submetidas ao ensaio de fenótipo de placas. Cada clone (purificado de placa) foi diluído seriadamente em volume final de 300µL e inoculados em monocamada de células BSC-40 com confluência de 90-95% em placas de 6 poços. A inoculação dos clones foi feita segundo o item 5.5, em que foi utilizado meio semi-sólido a fim de evitar a formação de placas satélites. Como controle da viabilidade celular e controle negativo, a monocamada celular foi infectada com PBS 1X. Após o período de

48 horas de incubação as células foram fixadas com solução de 3,7% de paraformaldeído durante 30 minutos e coradas com solução de cristal violeta por 15 minutos, sendo em seguida observadas e fotografadas.

5.9 Curva de multiplicação

Para observação de eventuais diferenças na taxa de multiplicação desses clones foi realizado ensaio de curva de multiplicação. Células BSC-40, sedimentadas em placas de seis poços com cerca de 80 % de confluência foram inoculadas com volume de 200µL, na M.O.I. de 0,01. Após 1 hora de adsorção, a monocamada foi lavada com PBS, e então foi adicionado 2 mL de MEM suplementado com 1% SFB. As placas foram incubadas a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂. Nos tempos de 0, 12, 24 e 48 horas de infecção, o meio de cultura foi descartado, as monocamadas infectadas foram lavadas duas vezes com PBS 1X, e em seguida foram raspadas e coletadas para ensaios de titulação, conforme descrito no item 5.7. Como controle da viabilidade celular e controle negativo, a monocamada celular foi infectada com PBS 1X. Este ensaio foi realizado em duplicata biológica.

5.10 Ensaio de formação de cometas e titulação de partículas EEV

Para observação da liberação de partículas EEV, foram realizados ensaios de cometas para clones selecionados. Para isto, placas de seis poços, com confluência de 80-90% de células BSC-40 foram cultivadas com meio MEM suplementado com 5% de SFB, e então lavadas com PBS. Em seguida, estas placas foram inoculadas e incubadas por 48 horas, a 37°C, 5% CO₂, e após esse período foram fixadas com solução de formaldeído a 3,7%, e coradas com cristal violeta. Além disso, a fim de quantificar e demonstrar possíveis diferenças entre clones de uma mesma amostra quanto a produção de partículas EEV, os clones selecionados para realização desse ensaio foram submetidos à titulação de partículas EEV. Para isso, após 48 horas de

infecção, as clones foram incubados durante 1 hora, a 37°C, com um anticorpo específico anti-IL1 para neutralização das partículas do tipo IMV. A titulação foi seguida conforme o item 5.7 aqui apresentado.

5.11 Purificação de vírus

O sedimento obtido durante a multiplicação viral (Item 5.6) foi homogeneizado em 8mL de Tris-HCl 10mM, pH 8,0 e centrifugado a 2.500 x g (rotor H1000B - Sorvall RT6000 B) durante 15 minutos a 4°C. O sobrenadante obtido foi mantido em banho de gelo e o sedimento celular foi lisado duas vezes em 10 mL de solução de lise (MgCl₂ 1mM; Tris10mM, pH 7,0; KCl 10mM). Após a adição desta solução, a suspensão foi incubada em banho de gelo, durante 10 minutos e as células foram lisadas mecanicamente em homogeneizador do tipo “Douncer” (Wheaton, USA) por 80 vezes. A suspensão viral resultante foi então centrifugada a 14.000 x g, 4°C, por 2 horas sobre um colchão de sacarose a 36% em Tris-HCl 10mM, pH 8,0 para separação dos restos celulares. Utilizando uma pipeta Pasteur, o sobrenadante e a interface foram coletados e desprezados e o restante foi descartado por inversão do tubo. Os sedimentos obtidos foram homogeneizados em até 500µL de Tris 10mM (pH 8,0), distribuídos em alíquotas de 2 µL-10 µL em microtubos e estocados a – 80°C (Adaptado de JOKLIK,1962).

5.12 Virulência em modelo murino

Algumas das amostras de VACV obtidas no presente estudo foram selecionadas, multiplicadas e purificadas para análise de virulência em camundongo Balb/c, segundo FERREIRA e colaboradores (2008) Os experimentos foram previamente submetidos e aprovados de acordo com as normas do Comitê de Ética Animal (CETEA) da UFMG, protocolo nº 207/2010. Os camundongos foram mantidos no biotério do Departamento de Microbiologia da UFMG, em gaiolas com microisoladores e fluxo de ar individualizado.

Camundongos Balb/c machos com quatro semanas de idade foram utilizados como modelo animal. Quatro animais em cada grupo foram anestesiados através de injeção intraperitoneal de Ketamina e Xilasina (3.2 mg e 0.16 mg/animal, em tampão fosfato salina (PBS) 0,9%, respectivamente) e inoculados por via intranasal com um volume de 10 µL, contendo 10⁶ PFU dos clones selecionados e purificados. A amostra VACV-WR, sabidamente muito virulenta, foi utilizada como amostra controle. Como controle negativo, quatro animais foram inoculados com 10 µL de PBS 1X. Os animais foram sacrificados quando ocorreu a perda de 25% do peso em relação ao peso inicial. Nos casos onde não ocorreu a perda de peso superior a 25%, os animais foram acompanhados por até 12 dias após a infecção (dpi), sendo registrada diariamente a evolução dos sinais clínicos, tais como variação de peso, letalidade, piloereção, arqueamento de dorso, alopecia periocular, presença de lesão e balanopostite (FERREIRA *et al.*, 2008).

Os animais foram sacrificados através de injeção letal de 100ul da solução anestésico-analgésica de Ketamina e Xilasina acima descrito, seguida por deslocamento cervical (FERREIRA *et al.*, 2008).

5.13 Extração de DNA pelo método de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico

O DNA total foi extraído utilizando uma solução de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (PCI), preparada na proporção de 25:24:1, respectivamente. Foram adicionados 300 µl de PCI no mesmo volume de clones multiplicados gerando uma proporção de 1:1 v/v de PCI na amostra. Essa mistura foi homogeneizada por aproximadamente 10 segundos, e centrifugada, a temperatura ambiente, a 12000 g (rotor H1000B - Sorvall RT6000 B) por 1 minuto. Após a centrifugação a fase superior foi cuidadosamente coletada, medida com o auxílio de uma micropipeta, e transferida para outro microtubo. Para a precipitação do material genético foram adicionados 2,5 vezes o volume coletado do sobrenadante de etanol (96%) gelado e 0,1 vezes o volume coletado do sobrenadante de acetato de sódio pH 5,5 a 3M. Em seguida, essa mistura foi homogeneizada por inversão e centrifugada a 12000 g (rotor H1000B - Sorvall RT6000 B) por 5 minutos a 4°C. Posteriormente, o

sobrenadante foi descartado por inversão e o microtubo foi mantido aberto a 37°C, para evaporação do etanol residual. O sedimento gerado foi então eluído em 50µL de água de injeção, quantificado em nanodrop e o DNA extraído foi utilizado como molde para as reações de PCR (Item 5.14).

5.14 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Os genes A56R (*ha*), A26L (*ati*) e C23L foram selecionados para esse estudo por apresentarem blocos de deleções ou mutações pontuais consideradas marcadores moleculares para os VACV dos grupos 1 e 2 como descrito no Item 1.6 desse trabalho e demonstrado em estudos anteriores (TRINDADE *et al.*, 2006, LEITE *et al.*, 2007; ASSIS *et al.*, 2012c).

5.14.1 Gene A56R

Para o gene A56R foram utilizados os pares de iniciadores descritos por TRINDADE e colaboradores (2008) que estão demonstrados na TABELA 3 (TRINDADE *et al.*, 2008).

TABELA 3. Iniciadores para a reação de amplificação do gene A56R.Fonte: TRINDADE *et al.*, 2008.

	Pares de iniciadores	Tamanho do fragmento	
		VACV-BR	VACV-BR
		Grupo 1	Grupo 2
PCR 1	HA-genérico F- CATCATCTGGAATTGTCACTACTAAA HA-genérico R ACGGCCGACAATATAATTAATGC	166 pb	184 pb
PCR 2	HA-BVV F- ACCGATGATGCGGATCTTTA HA-genérico R - ACGGCCGACAATATA ATTAATGC	134 pb	152 pb
PCR 3	HA BVV-nDEL F- GCGGATCTTTATGATACGTACAATG HA-genérico R- ACGGCCGACAATATAATTAATGC	0 pb	143 pb

Estes iniciadores foram idealizados para aplicação em reações de PCR em tempo real, mas nesse trabalho os mesmos foram utilizados em reações convencionais que foram por sua vez aplicadas em gel de poli-acrilamida (Item 5.15) seguido de coloração por prata (Item 5.15.1). Os iniciadores para PCR 1 foram desenhados para amplificar diferentes OPV incluindo CPXV, MPXV e ECTV; os iniciadores para PCR 2 foram desenhados para amplificar todas as amostras de VACV-BR, com exceção de algumas amostras vacinais derivadas de DRYVAX e alguns clones da amostra vacinal VACV-Lister. Os iniciadores para a PCR 3 foram desenhados para amplificar as amostras de VACV-BR do grupo 2, uma vez que essas amostras não apresentam a deleção de 18 nt no gene A56R. Com estas reações é possível identificar as amostras como sendo OPV (par de iniciadores PCR 1), diferenciar amostras de VACV-BR das amostras de VACV vacinais (par de iniciadores PCR 2) e atendendo o objetivo de distinguir as amostras de VACV-BR em dois grupos, de acordo com a presença ou não da deleção de 18 nt no gene A56R (par de iniciadores PCR 3). A posição dos iniciadores está representada na FIGURA 17.

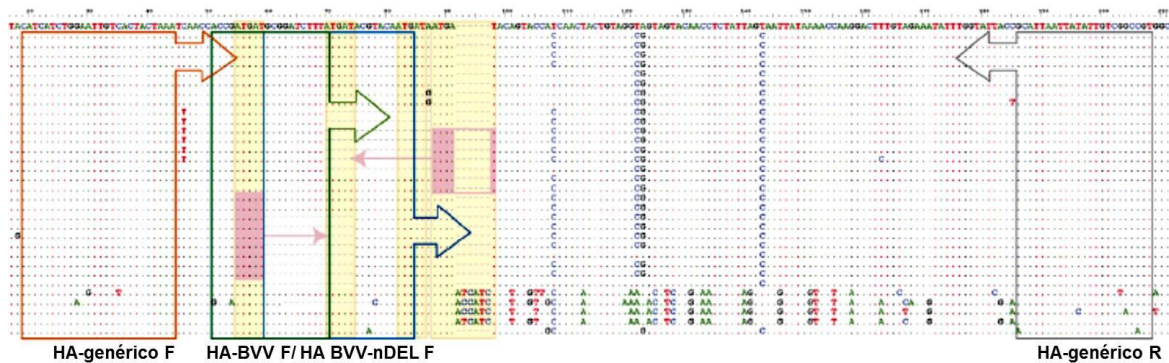


FIGURA 17: Alinhamento dos iniciadores utilizados na PCR para o gene A56R. O iniciador HA-genérico F está representado na cor laranja e o HA-genérico R na cor cinza. Os iniciadores HA-BVV F e HA BVV-nDEL F estão representados na figura na cor verde e azul respectivamente (TRINDADE *et al.*, 2008).

Cada clone foi submetido às três reações separadamente utilizando as seguintes condições químicas: solução tampão (tris 0,1M pH8.3 + KCl 0,5M + 0,1% de Triton x100) a qual foi acrescido 1 mM de cada par de iniciador, 7,5 mM cada dNTP's, 2,5 mM MgCl₂, 1U de Taq DNA polimerase e 40-50ng de DNA em um volume final de 20 µL em água de injeção. As condições térmicas foram desenvolvidas utilizando um ciclo inicial a 95 °C por 10 minutos, seguido de 30 ciclos de 95 °C por 1 min, 55°C por 1 min e 72°C por 1 min e temperatura final de extensão 72°C por 10 min (adaptado de TRINDADE *et al.*, 2008).

A fim de comparar os clones isolados através de análises filogenéticas, os clones foram submetidos a uma PCR convencional para o gene A56R, utilizando os iniciadores EACP1 (ATGACACGATTGCCAATAC) e EACP2 (CTAGACTTTGTTTTCTG (ROOP *et al.*, 1995) que flanqueiam uma região de cerca de 900 pb do mesmo gene. As condições para a reação foram as seguintes: em um volume final de 20 µL em solução tampão (tris 0,1M pH8.3 + KCl 0,5M + 0,1% de Triton x100) foram adicionados 2,0 mM de MgCl₂, 10 mM de cada dNTP, 2 mM de cada iniciador, 2 U de Taq polimerase e 40-50ng de

DNA. As condições térmicas para a reação foram: um ciclo inicial a 95 °C por 10 minutos, seguido de 30 ciclos de 95 °C por 1 min, 55°C por 1 min e 72°C por 2 min e temperatura final de extensão 72°C por 1 min e os fragmentos de DNA amplificados foram fracionados em gel de agarose 1% (Item 5.16), foram submetidas a purificação pelo método de PEG (Item 5.17) e encaminhados para sequenciamento (Item 5.18)

5.14.2 Gene C23L

Para amplificação do gene C23L foram utilizados os iniciadores idealizados pelo Dr. Gabriel Magno (Pesquisador do Laboratório Oficial de Diagnóstico de Doenças de Animais Aquáticos do Ministério da Pesca e Aquicultura) e padronizados durante a realização desse trabalho. Os iniciadores estão demonstrados na TABELA 4.

TABELA 4: Iniciadores para a reação de amplificação do gene C23L.

	Pares de iniciadores	Tamanho do fragmento	
		VACV-BR	VACV-BR
		Grupo 1	Grupo 2
PCR 1	C23L fwd: GCGTGTCCCCAGGACAAGGT C23L rev: ATGTCGCTGTCTTTCTCTTCTTCGC	124 pb	124 pb
PCR 2	C23L fwd: GCGTGTCCCCAGGACAAGGT C23L revD: CTGGATGGGTCTTG	0 pb	138 pb

Os iniciadores para PCR 1 foram desenhados para amplificar uma região conservada entre os OPV, amplificando assim todos os OPV que apresentam o gene C23L, inclusive os representantes dos Grupos 1 e 2 de VACV-BR. Os iniciadores para a PCR 2 pareiam em uma região que apresenta uma deleção

de 10 nt nesse gene, amplificando assim apenas as amostras de VACV-BR que não apresentam essa deleção, sendo essas agrupadas no VACV-BR do grupo 2. Com estas reações, é possível identificar as amostras como sendo OPV utilizando o par de iniciadores para PCR 1 e diferenciar as amostras entre os Grupos 1 e 2 de VACV com base na deleção de 10 nt presente nas amostras do grupo 1 de VACV-BR, utilizando o par de iniciadores 2. A FIGURA 18 ilustra a posição dos iniciadores utilizados nessa reação.

VACV_WR_(AY243312.1)	AAT CCG CTG ATG GAA ACA CAG TGA ATG CTA GAT TGT CCA GCG TGT CCC CAG GAC AAG GTA
VACV_Dryvax_(JN654985.1)	AAT CCG CTG ATG GAA ACA CAG TGA ATG CTA GAT TGT CCA GCG TGT CCC CAG GAC AAG GTA
VACV_VBH(JX678779.1)	AAT CCG CTG ATG GAA ACA CAG TGA ATG CTA GAT TGT CCA GCG TGT CCC CAG GAC AAG GTA
VACV_GP1V(JX678771.1)	AAT CCG CTG ATG GAA ACA CAG TGA ATG CTA GAT TGT CCA GCG TGT CCC CAG GAC AAG GTA
VACV_P1V_(JX678770.1)	AAT CCG CTG ATG GAA ACA CAG TGA ATG CTA GAT TGT CCA GCG TGT CCC CAG GAC AAG GTA
VACV_DMTV_(JX678777.1)	AAT CCG CTG ATG GAA ACA CAG TGA ATG CTA GAT TGT CCA GCG TGT CCC CAG GAC AAG GTA
VACV_MARV_(JX678775.1)	AAT CCG CTG ATG GAA ACA CAG TGA ATG CTA GAT TGT CCA GCG TGT CCC CAG GAC AAG GTA
VACV_GP2V_(JX678772.1)	AAT CCG CTG ATG GAA ACA CAG TGA ATG CTA GAT TGT CCA GCG TGT CCC CAG GAC AAG GTA
VACV_P2V_(JX678774.1)	AAT CCG CTG ATG GAA ACA CAG TGA ATG CTA GAT TGT CCA GCG TGT CCC CAG GAC AAG GTA
VACV_PSTV_(JX678773.1)	AAT CCG CTG ATG GAA ACA CAG TGA ATG CTA GAT TGT CCA GCG TGT CCC CAG GAC AAG GTA
VACV_WR_(AY243312.1)	AGG ACT CTC CCG CGA TCA CTC ATG AAG AAG CTC TGG CTA TGA TCA AAG ACT GTG AGG TGT
VACV_Dryvax_(JN654985.1)	AGG ACT CTC CCG CGA TCA CTC ATG AAG AAG CTC TGG CTA TGA TCA AAG ACT GTG AGG TGT
VACV_VBH(JX678779.1)	AGG ACT CTC CCG CGA TCA CTC ATG AAG AAG CTC TGG CTA TGA TCA AAG ACT GTG AGG TGT
VACV_GP1V(JX678771.1)	AGG ACT CTC CCG CGA TCA CTC ATG AAG AAG CTC TGG CTA TGA TCA AAG ACT GTG AGG TGT
VACV_P1V_(JX678770.1)	AGG ACT CTC CCG CGA TCA CTC ATG AAG AAG CTC TGG CTA TGA TCA AAG ACT GTG AGG TGT
VACV_DMTV_(JX678777.1)	AGG ACT CTC CCG CGA TCA CTC ATG AAG AAG CTC TGG CTA TGA TCA AAG ACT GTG AGG TGT
VACV_MARV_(JX678775.1)	AGG ACT CTC CCG CGA TCA CTC ATG AAG AAG CTC TGG CTA TGA TCA AAG ACT GTG AGG TGT
VACV_GP2V_(JX678772.1)	AGG ACT CTC CCG CGA TCA CTC ATG AAG AAG CTC TGG CTA TGA TCA AAG ACT GTG AGG TGT
VACV_P2V_(JX678774.1)	AGG ACT CTC CCG CGA TCA CTC ATG AAG AAG CTC TGG CTA TGA TCA AAG ACT GTG AGG TGT
VACV_PSTV_(JX678773.1)	AGG ACT CTC CCG CGA TCA CTC ATG AAG AAG CTC TGG CTA TGA TCA AAG ACT GTG AGG TGT
VACV_WR_(AY243312.1)	CTA TCG ACA TCA GAT GTA GCG AAG AAG AGA AAG ACA GCG ACA TCA AGA CCC ATC CAG TAC
VACV_Dryvax_(JN654985.1)	CTA TCG ACA TCA GAT GTA GCG AAG AAG AGA AAG ACA GCG ACA TCA AGA CCC ATC CAG TAC
VACV_VBH(JX678779.1)	CTA TCG ACA TCA GAT GTA GCG AAG AAG AGA AAG ACA GCG ACA TCA AGA CCC ATC CAG TAC
VACV_GP1V(JX678771.1)	CTA TCG ACA TCA GAT GTA GCG AAG AAG AGA AAG ACA GCG ACA TCA AGA CCC ATC CAG TAC
VACV_P1V_(JX678770.1)	CTA TCG ACA TCA GAT GTA GCG AAG AAG AGA AAG ACA GCG ACA TCA AGA CCC ATC CAG TAC
VACV_DMTV_(JX678777.1)	CTA TCG ACA TCA GAT GTA GCG AAG AAG AGA AAG ACA GCG ACA TCA AGA CCC ATC CAG TAC
VACV_MARV_(JX678775.1)	CTA TCG ACA TCA GAT GTA GCG AAG AAG AGA AAG ACA GCG ACA TCA AGA CCC ATC CAG TAC
VACV_GP2V_(JX678772.1)	CTA TCG ACA TCA GAT GTA GCG AAG AAG AGA AAG ACA GCG ACA TCA AGA CCC ATC CAG TAC
VACV_P2V_(JX678774.1)	CTA TCG ACA TCA GAT GTA GCG AAG AAG AGA AAG ACA GCG ACA TCA AGA CCC ATC CAG TAC
VACV_PSTV_(JX678773.1)	CTA TCG ACA TCA GAT GTA GCG AAG AAG AGA AAG ACA GCG ACA TCA AGA CCC ATC CAG TAC

FIGURA 18. Representação esquemática da posição dos iniciadores utilizados na PCR para amplificação do gene C23L. Iniciador C23L fwd (Vermelho), Iniciador C23L rev (verde) e Iniciador C23L rev D (amarelo).

Cada clone foi submetido às duas reações separadamente utilizando as seguintes condições: em um volume final de 20 µL, em solução tampão (tris 0,1M pH8.3 + KCl 0,5M + 0,1% de Triton x100) foram acrescentados 10mM de cada dNTP, 2.0 mM de MgCl₂, 2 mM de cada iniciador, 2.5 U de Taq polimerase e 40-50ng de DNA. As condições térmicas para a reação foram: um ciclo inicial à 95 °C por 10 minutos, seguido de 30 ciclos de 95 °C por 1 min,

48°C por 1 min e 72°C por 2 min e temperatura final de extensão de 72°C por 15 min. Os fragmentos de DNA amplificados foram fracionados em gel de poliacrilamida (Item 5.15), corados pelo método de prata (Item 5.15.1) e registrados.

5.14.3 Gene A26L

Para amplificação do gene A26L foi utilizada uma reação de PCR do tipo semi-nested desenvolvida por Felipe Lopes de Assis durante a realização do trabalho de mestrado (dados não publicados). Os pares de iniciadores estão demonstrados na TABELA 5 e a região de alinhamento dos mesmos na FIGURA 19. Essa reação nos permite diferenciar os grupos 1 e 2 de VACV-BR uma vez que apenas as amostras do grupo 1 apresentam essa região do gene A26L amplificada nessa reação, enquanto não se observa a amplificação desse gene para as amostras do grupo 2 quando submetidas a essa reação.

TABELA 5: Iniciadores para a reação de PCR do tipo semi-nested para amplificação do gene **A26L**.

	Pares de iniciadores para amplificação do gene A26L	Tamanho do fragmento
1° Reação	ATI-iF/1 - 5'ACCACGTCTACTCGGCGA3'	~753
	ATI-iR/2 ' 5'TGCATCGAGAGCGGAGGAGGA'3;	
2° Reação	ATI-iF/1 - 5'ACCACGTCTACTCGGCGA3'	~145
	ATI-iR/3 - 5'CGATGCCAAGTACATCGACGA3'	

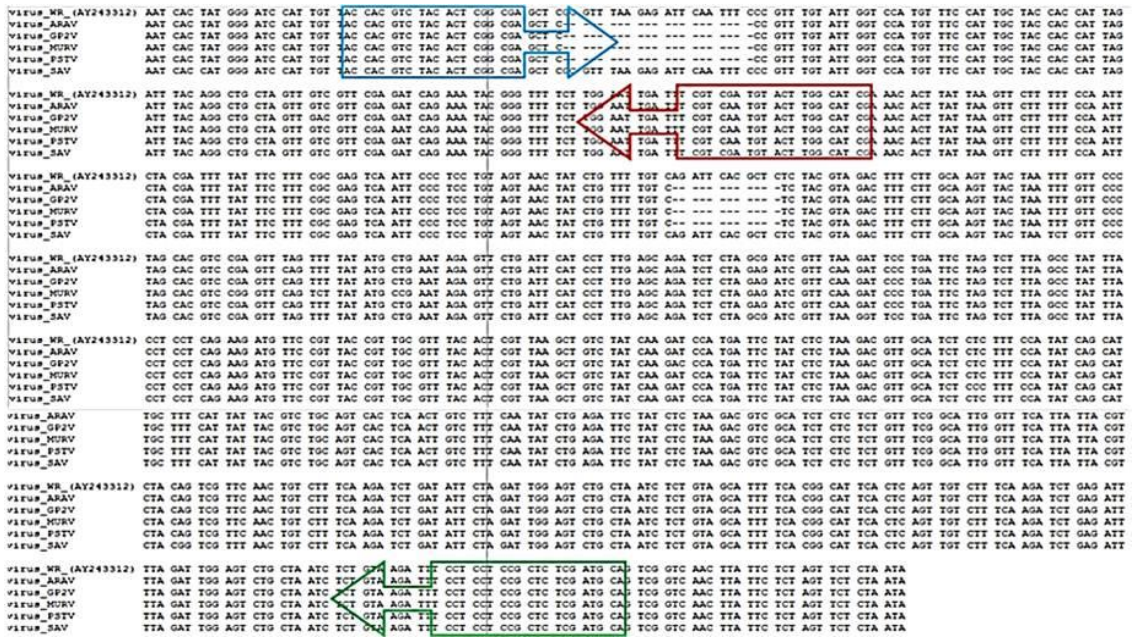


FIGURA 19: Alinhamento dos iniciadores utilizados na PCR do tipo semi-Nested para o gene A26L. O iniciador ATI iF/1 está representado na figura na cor azul, o iniciador ATI iR/2 está representado na figura na cor verde e ATI iR/1/3 na cor vermelha (ASSIS, 2012).

A primeira reação consistiu de: solução tampão 1X (tris 0,1M pH8.3 + KCl 0,5M + 0,1% de Triton x100) acrescido de 0.4 mM de cada iniciador (ATI-iF/1 e ATI-iF/2), 10 mM de cada dNTP, 2,0 mM MgCl₂, 2 U de Taq DNA polimerase (Promega), 40ng-50ng de DNA em um volume final de 20 µL. As condições térmicas utilizadas foram: um ciclo inicial a 95 °C por 10 minutos, seguido de 30 ciclos de 95 °C por 1 min, 60°C por 1 min e 72°C por 1 min e temperatura final de extensão 72°C por 10 min. A segunda reação foi feita utilizando 1µL da primeira reação como amostra, sendo utilizadas as mesmas condições químicas e térmicas da primeira reação, porém utilizando os iniciadores ATI-iF/1 e ATI-iF/3. Em seguida as reações foram fracionadas em gel de poliacrilamida (item 5.15) e coradas pelo método da prata (item 5.15.1), seguido de análise e registro.

5.15 Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)

Para visualizar os produtos das PCRs, os fragmentos amplificados foram fracionados por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) 8%. O gel de poliacrilamida 8% :TBE 5X (tampão Tris-borato EDTA 0,0445M: Tris 0,0445 M, ácido bórico 0,0445 M, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 0,001 M pH 8.0), Bis/Acrilamida 29:1, Tetrametiletilendiamina (TEMED) 0,1%, persulfato de amônio (APS) 10%, qsp H₂O dd) foi polimerizado em aparato Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio Rad) com espessura de 0.75mm, e transferido para cuba de eletroforese contendo tampão TBE 1X. Foram aplicados 15µL da amostra acrescida de 3µL de tampão de corrida 6X (10 mM Tris-HCl (pH 7.6); 0.03% azul de bromofenol; 0.03% cianol xileno; 60% glicerol; 60 mM EDTA – Fermentas Life Sciences) seguido de fracionamento eletroforético a 100V, e coloração com prata (Item 5.15.1)

5.15.1 Coloração de gel com prata

Após fracionamento por eletroforese, os géis foram corados com solução de nitrato de prata para visualização do amplificado. Para isso os géis foram retirados dos aparatos de eletroforese e transferidos para um recipiente contendo a primeira solução fixadora (metanol 40%; Ac. acético 10%; H₂O dd 50%), onde foram mantidos por 30 minutos. Em seguida, a solução fixadora foi descartada e adicionada uma segunda solução fixadora (etanol 10%; Ac. acético 5%; H₂O dd 85%) duas vezes por 15 minutos. Em seguida foi então adicionada uma solução oxidante (dicromato de potássio 0,0034 M; ácido nítrico 0,0032 M; H₂O dd q.s.p) por 5 minutos. Os géis foram submetidos a dois banhos de H₂O dd por 5 minutos e em seguida corados com solução de nitrato de prata (0,011 M) por 20 minutos e lavados duas vezes com água deionizada. Ao final foi adicionada solução reveladora (carbonato de sódio 0,28 M, paraformaldeído 0,016 M, H₂O dd) até o aparecimento das bandas. E finalmente, para interrupção da atividade da solução reveladora, foi adicionada uma solução de parada preparada a partir da mistura v/v da primeira e segunda

soluções fixadoras acima descrita. Para análise e registro os géis foram fixados em lâmina de vidro cobertos com papel celofane e mantidos a temperatura ambiente para secar completamente.

5.16 Eletroforese em gel de agarose

Para sequenciamento, foram gerados produtos de PCR contendo fragmentos do gene A56R (itens 5.14.1). Estes fragmentos foram fracionados em gel de agarose 1% dissolvida em TAE 1X (Tampão Tris-Acetato EDTA :Tris base 40 mM, ácido acético glacial 20 mM, EDTA 1 mM), sob aquecimento em micro-ondas, em seguida acrescida de SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen) na diluição 1:10.000 e distribuído em aparato apropriado. Após solidificação do gel, as amostras foram aplicadas nas canaletas e submetidas a fracionamento eletroforético a 100V utilizando tampão TAE 1X. Para visualização dos fragmentos o gel foi exposto à luz ultravioleta em transiluminador. Na presença de bandas inespecíficas as bandas de interesse (específicas) foram excisadas com o auxílio de um bisturi e o fragmento foi recuperado do gel utilizando o Kit Gel Extraction (Qiagen, Alemanha) seguindo as recomendações do fabricante. Na ausência de bandas inespecíficas o produto do PCR foi purificado diretamente pelo método utilizando PEG (Item 5.17) e submetido à reação de sequenciamento (5.18).

5. 17 Purificação de DNA com PEG para sequenciamento

Para purificação direta do produto de PCR visando o sequenciamento, foi adicionado em um volume de 50 µL de produto de PCR o mesmo volume de solução de PEG8000 20% (NaCl 2,5 M + PEG 20%) e em seguida os tubos foram vortexados durante 10 segundos. Em seguida os tubos foram incubados a 37 °C em banho-maria por 15 minutos seguido de centrifugação por 15 min a 15000 g (rotor H1000B - Sorvall RT6000 B). Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e adicionado 125 µL de etanol 80% gelado seguido de centrifugação por 5 min a 15.000 g. Novamente o sobrenadante foi desprezado com auxílio de uma micropipeta. Para melhor precipitação do DNA o passo

anterior referente à adição de etanol 80% seguido de centrifugação foi repetido uma vez. Para completa eliminação do etanol, os tubos foram submetidos a secagem em posição invertida na estufa a 37°C. Em seguida, o DNA foi eluído em 15 µL de água de injeção incubado à 37°C em banho-maria durante 15 minutos. Esse purificado foi utilizado no preparo das reações de sequenciamento (Item 5.18). O método de sequenciamento direto foi selecionado a fim de tornar as sequências nucleotídicas obtidas mais fidedignas e confiáveis, uma vez que a clonagem e a multiplicação plasmidial em bactérias podem levar ao acúmulo de erros nas sequências clonadas.

5.18 Sequenciamento e análise das sequências

O sequenciamento parcial foi realizado pelo método de SANGER, 1977 em sequenciador automático capilar “ABI 3730 DNA Analyzer” (Applied Biosystems), usando o kit “*BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing*” (Applied Biosystems), e obedecendo as condições de reação e leitura indicadas pelo fabricante. Para cada fragmento foram feitas duas reações com cada iniciador. A qualidade das sequências obtidas foram analisadas segundo a plataforma Asparagin-Cenargen (genoma.embrapa.br/phph), do qual foram obtidas as sequências consenso de sequências que apresentavam alta qualidade. Em paralelo, para assegurar a qualidade das sequências as mesma foram analisadas segundo o programa Sequence Scanner Software 2 (Applied Biosystems, 2012). As sequências obtidas foram comparadas com as depositadas no banco de dados do “National Center for Biotechnology Information” através do programa BLAST 2.0 [<http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST>.- Basic Local Alignment Tool (ALTSCHUL *et al.*, 1990)] e analisadas pelo programa BLAST N. As seqüências foram analisadas e utilizadas para a construção de árvores filogenéticas utilizando o programa MEGA 6.0 (KUMAR *et al.*, 1994). A análise de bootstrap foi feita com base em 1000 replicatas.

VI. RESULTADOS

6.1. Isolamento dos espécimes clínicos, seleção e purificação de clones

Os espécimes clínicos selecionados demonstrados na TABELA 2 do Item 5.1 foram processados de acordo com Item 5.2 e submetidos a isolamento em células Vero em até duas passagens em monocamada celular, apresentando efeito citopático (ECP) típico de uma infecção por VACV, tais como formação de vacúolo, aglomerado de células e formação de placas de lise.

Dentre os dez espécimes clínicos submetidos ao isolamento viral, seis apresentaram efeito citopático na primeira passagem, sendo denominados como amostras BABV, GOBV, ESBV, MGBV, MGHV e BAHV; e quatro espécimes denominados BAB2V, GOB2V, PABV e PAB2V foram isolados após a segunda passagem. Cada passagem teve duração de 24 a 48 horas. Controles celulares foram realizados, sendo que nenhuma placa viral foi observada na monocamada infectada com PBS. Durante essa etapa, destacamos o isolamento em primeira passagem após um curto período de 24 horas de infecção da amostra BABV que por sua vez apresentou características biológicas e moleculares peculiares que serão discutidas posteriormente.

Após o isolamento, selecionamos cinco clones de cada amostra, contemplando variados tamanhos, utilizando para isso células BSC-40, uma vez que nessas células é possível identificar a presença de placas de lise de diferentes tamanhos.

Durante a seleção de clones foi possível observar uma maior prevalência de placas de lise pequenas (que variaram de 0,3 mm a 0,9 mm). No entanto, ao longo da purificação em um mesmo tempo de infecção (48 hrs) foram encontrados clones de uma mesma amostra com variados tamanhos. A FIGURA 20 ilustra o perfil de placas de lise encontradas ao longo das purificações. É importante ressaltar que o tempo exato de incubação de 48 horas foi seguido para todos os clones e etapas de purificação, a fim de evitar

equivocos na interpretação dos tamanhos das placas devido a um tempo diferenciado de incubação.

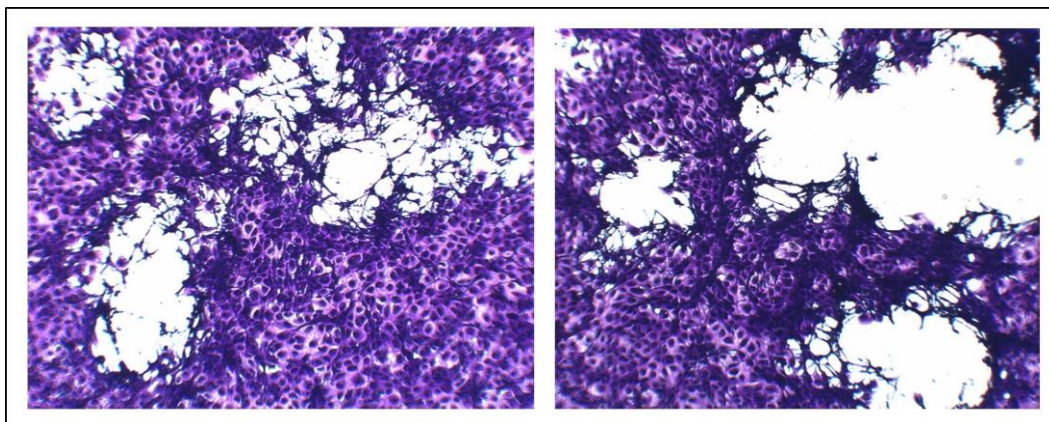


FIGURA 20. Visualização ao microscópio ótico de placas de lise geradas em monocamada de células BSC-40 durante a seleção e coleta de placas de lise de diferentes tamanhos. A imagem foi gerada após 48 hrs de incubação em MO no aumento de 100X. Demonstração de placas de lise de diferentes tamanhos no mesmo campo de visão da amostra VACV-BABV, evidenciando a presença de tamanho de placas variado em uma mesma amostra.

Um total de cinquenta clones provenientes de dez amostras (cinco clones de cada amostra) foram coletados. Porém, dois clones, dos quais um era proveniente da amostra MGBV e o outro da amostra PAB2V não puderam ser recuperados ao longo dos *rounds* de coleta para purificação de placas virais. É importante ressaltar que os clones que não puderam ser recuperados estão entre os menores clones inicialmente coletados, com tamanho médio aproximado de 0,3 mm. Assim, um total de quarenta e oito clones foram obtidos ao final da purificação (TABELA 6).

TABELA 6. Identificação dos clones selecionados para caracterização nesse trabalho

Amostra	Clones	Amostra	Clones
VACV-BABV	BABV-Clone 1	VACV-GOB2V	GOB2V-Clone 1
	BABV-Clone 2		GOB2V-Clone 2
	BABV-Clone 3		GOB2V-Clone 3
	BABV-Clone 4		GOB2V-Clone 4
	BABV-Clone 5		GOB2V-Clone 5
VACV-BAB2V	BAB2V-Clone 1	VACV-MGHV	MGHV-Clone 1
	BAB2V-Clone 2		MGHV-Clone 2
	BAB2V-Clone 3		MGHV-Clone 3
	BAB2V-Clone 4		MGHV-Clone 4
	BAB2V-Clone 5		MGHV-Clone 5
VACV-BAHV	BAHV-Clone 1	VACV-ESBV	ESBV-Clone 1
	BAHV-Clone 2		ESBV-Clone 2
	BAHV-Clone 3		ESBV-Clone 3
	BAHV-Clone 4		ESBV-Clone 4
	BAHV-Clone 5		ESBV-Clone 5
VACV-GOBV	GOBV-Clone 1	VACV-PABV	PABV-Clone 1
	GOBV-Clone 2		PABV-Clone 2
	GOBV-Clone 3		PABV-Clone 3
	GOBV-Clone 4		PABV-Clone 4
	GOBV-Clone 5		PABV-Clone 5
VACV-MGBV	MGBV-Clone 1	VACV-PAB2V	PAB2V-Clone 1
	MGBV-Clone 2		PAB2V-Clone 2
	MGBV-Clone 3		PAB2V-Clone 3
	MGBV-Clone 5		PAB2V-Clone 4

Após a purificação dos clones os mesmos foram submetidos à multiplicação. Durante as etapas de purificação de placas e multiplicação viral foi possível perceber que os clones 2, 3 e 4 da amostra BABV e o clone 2 da amostra GOBV apresentavam multiplicação mais rápida, o que nos levou a investigar esse fato através do ensaio de curva de multiplicação, que terão seus resultados expostos em seguida, no Item 6.2.3.

6.2. Caracterização biológica

6.2.1. Fenótipo de placas

Para caracterização biológica dos clones isolados, foram utilizadas técnicas de virologia básica, iniciando as caracterizações pelo ensaio de fenótipo de placas, uma vez que estudos demonstram que o tamanho da placa de lise é uma das características biológicas que torna possível a separação dos grupos 1 e 2 de VACV-BR, gerando placas de lise menores e maiores, respectivamente (TRINDADE *et al.*, 2007; CAMPOS *et al.*, 2011; ABRAHÃO *et al.*, 2009a).

O ensaio de fenótipo de placas foi desenvolvido em células BSC-40 tal como descrito no Item 5.8. Como controle de células, a monocamada celular foi inoculada com PBS 1X e nenhum ECP foi observado nos mesmos (dados não demonstrados). Dos 48 clones que foram submetidos ao ensaio de fenótipo de placas, quatro clones apresentaram placas de lise grandes (com tamanho médio variando de 1,7mm a 1,9mm), sendo eles BABV-Clone 2, BABV-Clone 3, BABV-Clone 4 e GOBV-Clone 2, similares as descritas para membros do grupo 2 de VACV (FIGURA 21- destacados em vermelho). Os demais clones obtidos a partir dessas e de outras amostras demonstraram fenótipo de placas de tamanho pequeno (com tamanho médio variando de 0,6 mm a 0,9 mm) , similares as descritas para os membros do grupo 1 (FIGURA 22).

Apesar do pequeno número de clones isolados que produzem placas grandes, um dado interessante chamou atenção: clones grandes foram isolados de amostras clínicas que também apresentavam clones pequenos. Isso ocorreu para as amostras VACV-BABV e VACV-GOBV. Foi possível identificar, a partir

dos ensaios de fenótipo de placas da amostra BABV, três clones que formam placas de lise grandes (BABV-Clone 2, Clone 3 e Clone 4) e dois clones que formam placas de lise pequenas (BABV-Clone 1 e Clone 5) (FIGURA 21A). Esse resultado pode ser associado à etapa inicial de isolamento, uma vez que essa amostra apresentou um menor tempo de isolamento se comparada as demais, sendo a única a ser isolada após apenas 24 horas de infecção na primeira passagem em monocamada celular. Essa diversidade de clones na mesma amostra foi também identificada na amostra GOBV, em que apenas um clone (GOBV-Clone 2) demonstrou placas de lise grandes e os demais clones da mesma amostra (GOBV-Clone 1, Clone 3, Clone 4 e Clone 5) apresentaram placas de lise pequenas (FIGURA 21B).

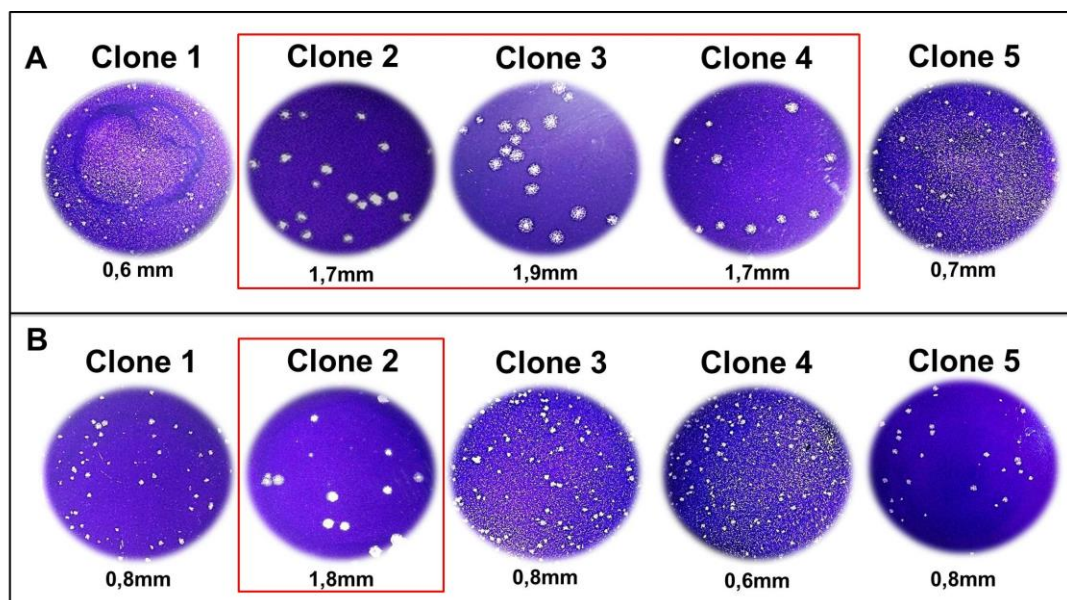


FIGURA 21. Ensaio de fenótipo de placa em células BSC-40 demonstrando os clones das amostras BABV(A) e GOBV(B). (A) BABV-Clones 2, 3 e 4, destacados em vermelho, apresentaram placa de lise grande, enquanto os clones 1 e 5 da mesma amostra apresentaram placas de lise pequena. (B) GOBV-Clone 2, destacado em vermelho, apresentou placas de lise grandes, enquanto os clones 1, 3, 4 e 5 da mesma amostra apresentaram placas de lise pequenas. Os tamanhos médios aproximados de cada clone estão demonstrados na figura.

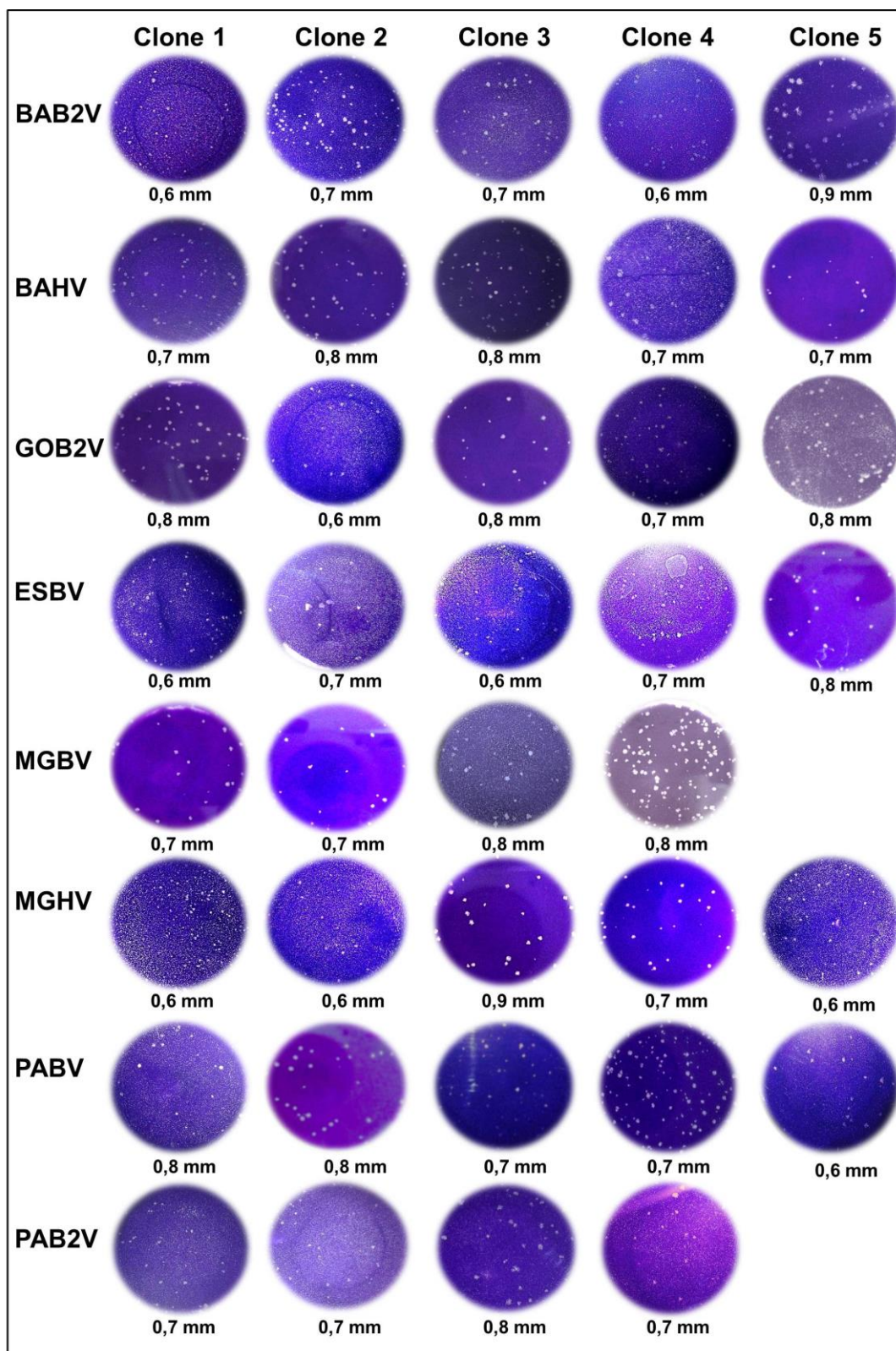


FIGURA 22. Ensaio de fenótipo de placa em células BSC-40 demonstrando clones pequenos provenientes das amostras BAB2V, BAHV, GOB2V, MGHV e PABV. Os tamanhos médios aproximados de cada clone estão demonstrados na figura.

6.2.2. Ensaio de formação de cometas e titulação de partículas EEV

A fim de comparar os clones grandes e pequenos derivados de um mesmo espécime clínico quanto à produção de partículas EEV, foi realizado um ensaio de formação de cometas seguido da titulação de EEV para os clones da amostra BABV.

Foi demonstrada a formação de cometas proeminentes para os clones grandes da amostra BABV (BABV-Clone 2, BABV-Clone 3, BABV-Clone 4) (FIGURA 23A). No entanto, não foi observado formação de cometas para os clones pequenos deste espécime clínico.

Realçando as diferenças biológicas exibidas entre clones grandes e pequenos derivados de um único espécime clínico, foi demonstrado que clones grandes do espécime BABV (Clones 2, 3 e 4) produziram de dois a três logs a mais de partículas EEV se comparado aos clones pequenos derivados do mesmo espécime (Clones 1 e 5) (FIGURA 23 B).

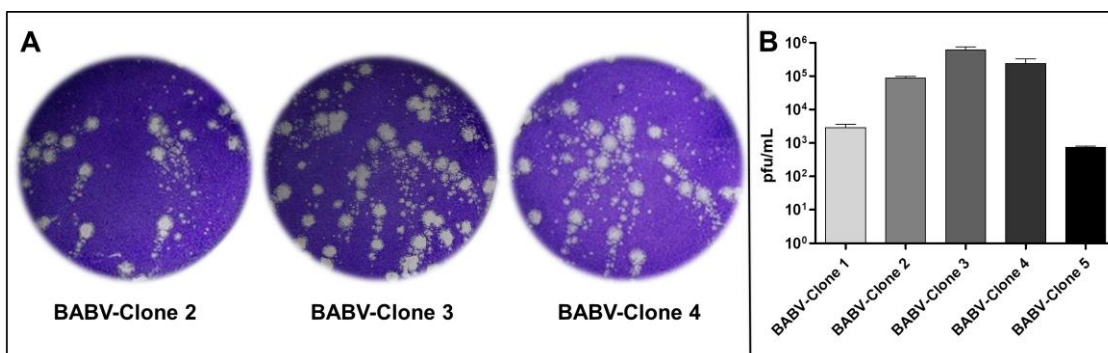


FIGURA 23. Ensaio de formação de cometas (A) e titulação de partículas EEV (B). Demonstração de proeminentes cometas formados pelos clones que geram placas de lise grandes e variação na produção de partículas EEV entre clones de placas grandes e clones de placas pequenas derivados da mesma amostra

6.2.3 Curva de multiplicação

Ensaio de curva de multiplicação foram realizados para todos os clones, utilizando M.O.I de 0,01 em células BSC-40 (Item 5.9).

Após a análise de todos os pontos coletados, foi possível observar que, de uma forma geral, clones virais de placas pequenas apresentaram taxas de multiplicação similares entre si (FIGURA 24). Todavia, clones pequenos alcançaram títulos de dois a quatro logs menores quando comparados com clones de placas grandes (BABV-Clones, 2, 3 e 4 e GOBV-Clone 2)..

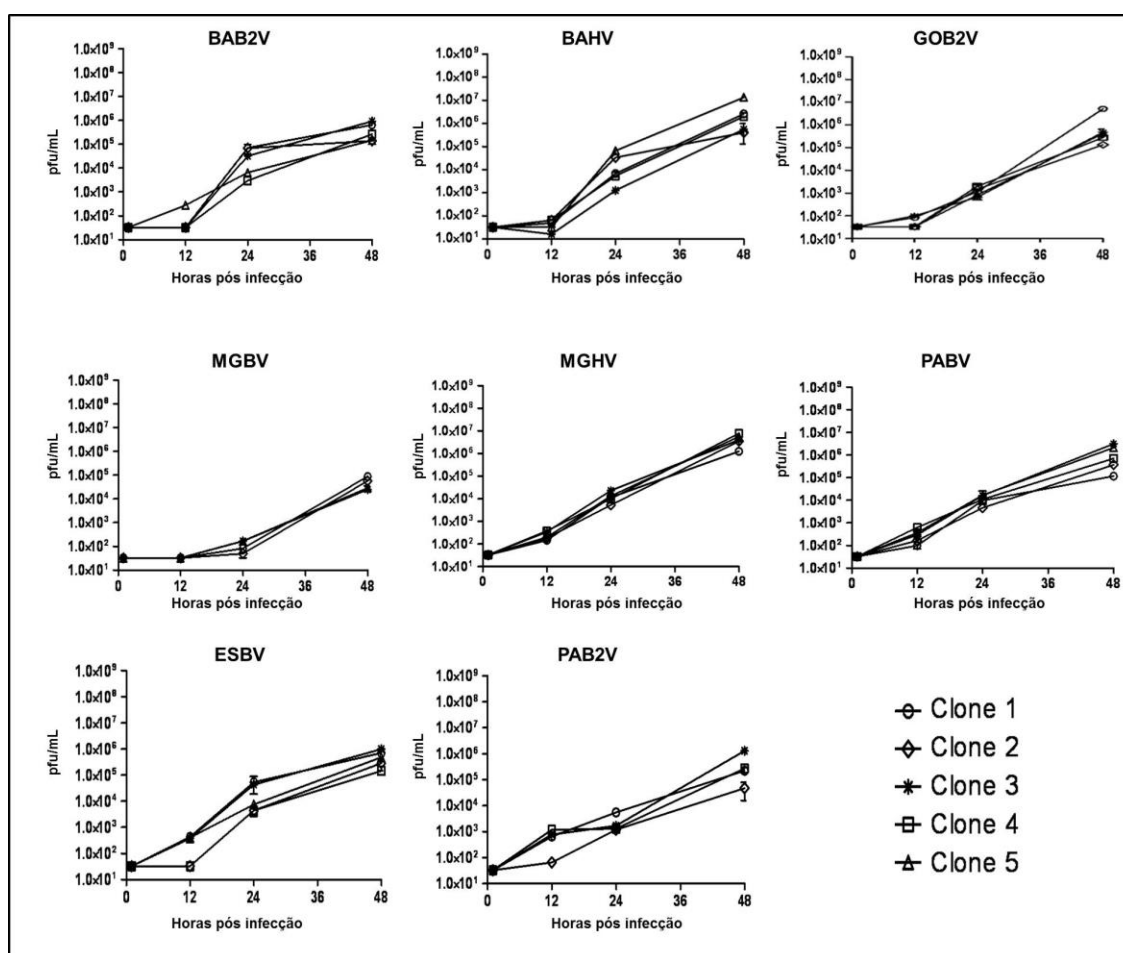


FIGURA 24. Curva de multiplicação dos clones provenientes das amostras que apresentaram apenas placas de lise pequenas. Curva de multiplicação em células BSC-40 infectadas com M.O.I:0,01 coletadas nos tempos de 0, 12, 24 e 48 hpi. A legenda demonstrada na figura é a mesma para todos os gráficos.

A FIGURA 25 destaca as curvas de multiplicação dos clones obtidos das amostras BABV e GOBV, uma vez que essas amostras apresentaram simultaneamente clones que produziam placas de lise grandes e pequenos, que demonstraram diferenças marcantes na taxa de multiplicação, com títulos variando entre 10^4 a 10^6 nos clones de placa pequena e 10^8 a 10^9 nos clones de placa grande.

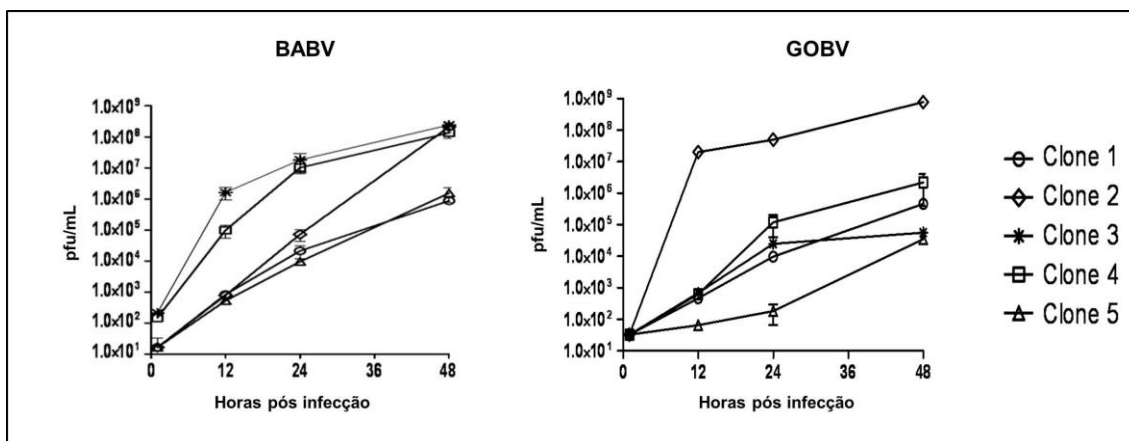


FIGURA 25. Curva de multiplicação dos clones isolados das amostras BABV e GOBV. Curvas de multiplicação dos clones da amostra BABV, demonstrando diferenças nas taxas de multiplicação entre clones de placas de lise grandes (BABV-Clone 2, Clone 3 e Clone 4) e clones de placas pequenas (BABV-Clone 1 e Clone 5). Curvas de multiplicação dos clones da amostra GOBV, demonstrando diferenças nas taxas de multiplicação entre o único clone de placas grandes (GOBV-Clone 2) e clones de placa pequena (GOBV-Clone 1, Clone 3, Clone 4 e Clone 5). A legenda demonstrada na figura é a mesma para ambos os gráficos.

Portanto, os ensaios de fenótipo de placas associados aos de curva de crescimento mostraram que clones de placas grandes apresentaram maior capacidade de multiplicação quando comparados aos clones de placa pequena. Além disso, esses diferentes perfis de multiplicação assim como as diferenças nos fenótipos de placas puderam ser encontrados entre clones isolados de uma mesma amostra clínica como demonstrado para as amostra BABV e GOBV.

6.3 Caracterização molecular

Para caracterização molecular dos clones isolados, foram utilizadas a técnica de PCR convencional para detecção dos genes A56R (*ha*), A26L (*ati*) e C23L (Item 5.14), que mesmo na ausência de sequenciamento permitiu agrupar os clones selecionados entre os grupos 1 e 2 de VACV-BR, além de identificar novos perfis genéticos entre os clones isolados. A seguir, estão apresentadas as análises de cada um destes marcadores moleculares.

6.3.1 Análise do gene A56R

Com intuito de caracterizar os clones selecionados e separá-los entre os grupos 1 e 2 de VACV-BR foi utilizada a reação descrita por TRINDADE e colaboradores em 2008 (Item 5.14.1).

Todos os 48 clones foram submetidos às três reações separadamente. Foi observado que, dentre os clones avaliados, 44 resultaram em amplificação apenas nas reações 1 e 2, indicando que esses clones apresentam uma deleção de 18 nucleotídeos nesse gene, classificando-os assim como integrantes do grupo 1 de VACV BR. É importante ressaltar que esses clones apresentam placas de lise pequenas, corroborando assim os dados biológicos discutidos anteriormente. A FIGURA 26 demonstra um gel de poliacrilamida em que foram separadas eletroforéticamente reações de clones que amplificaram apenas nas reações 1 e 2 (R1 e R2), exemplificando assim esses resultados. Conforme demonstrado na figura, nenhuma amplificação foi observada nos controles negativos das três reações (CR). A amostra VACV-WR foi utilizada como controle positivo das reações, e conforme esperado, apresentou amplificação nas reações 1, 2 e 3 (R1, R2 e R3). Os demais clones que apresentaram amplificação nas reações 1 e 2 demonstraram perfil de bandas semelhantes aos exemplificados nessa figura.

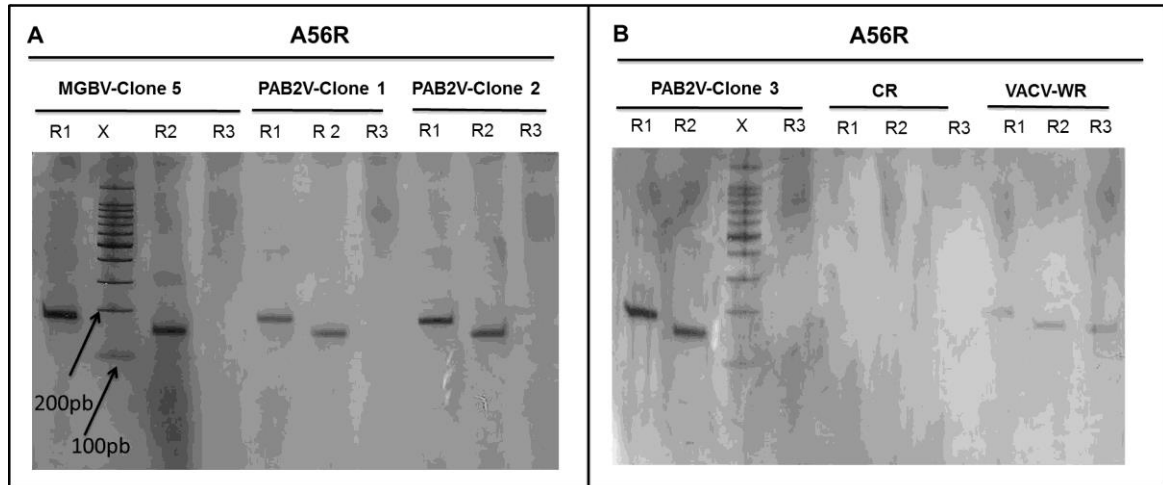


FIGURA 26. Amplificação do gene A56R, exemplificando clones que amplificaram nas reações 1 e 2, sendo assim agrupados no grupo 1 de VACV-BR. Dentre eles estão representados o clone 5 da amostra MGBV e os clones 1, 2 e 3 da amostra PAB2V (Clones que apresentam placas de lise pequenas). R1 indica Reação 1 (PCR1), R2 indica reação 2 (PCR 2), R3 indica reação 3 (PCR3), CR representa o controle de reação, VACV-WR o controle positivo para as reações 1, 2 e 3 e padrão molecular indicado por X.

Por outro lado, quatro clones submetidos a essas reações demonstraram amplificação nas reações 1, 2 e 3 o que indica a ausência da deleção de 18 nucleotídeos, uma vez que apenas as amostras que não apresentam essa deleção são amplificadas na reação 3. Dessa forma, ao analisarmos o gene A56R foram identificados quatro clones hipoteticamente pertencentes ao VACV-BR-grupo 2, sendo todos com placas de lise fenotipicamente grandes. A FIGURA 27 exemplifica essa situação, uma vez que demonstra clones tiveram amplificação nas três reações. Além disso, a FIGURA 27B demonstra a amplificação desse gene na amostra GP2V nas reações 1 e 2 que foi utilizada como controle positivo para o grupo 1.

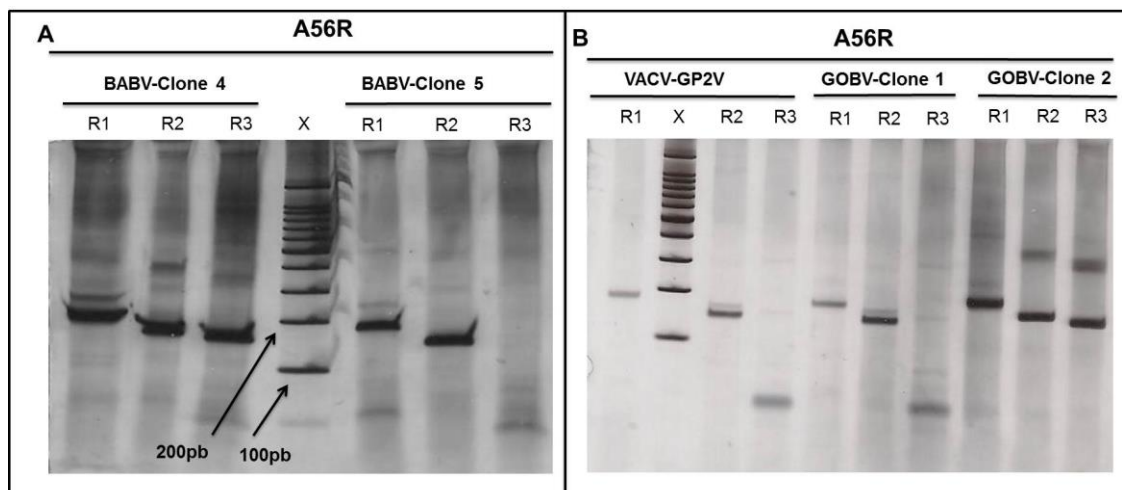


FIGURA 27. Amplificação do gene A56R, exemplificando clones que amplificaram nas reações 1, 2 e 3 sendo assim agrupados no grupo 2 de VACV-BR. (A) Dentre eles estão representados o clone 4 da amostra BABV que demonstrou amplificação nas reações 1, 2 e 3, sendo agrupado no grupo 2 e o clone 5 da mesma amostra que demonstra amplificação apenas nas reações 1 e 2, sendo agrupado no grupo 1. **(B)** Clones 1 e 2 da amostra GOBV. O Clone 2 demonstrou amplificação nas 3 reações enquanto o clone 1 demonstrou amplificação apenas nas reações 1 e 2. R1 indica Reação 1, R2 indica reação 2, R3 indica reação 3; VACV-GP2V, controle positivo para o grupo 1 que amplifica apenas nas reações 1 e 2 e padrão molecular (X).

É importante destacar que esse conjunto de reações permitiu identificar variabilidade genética entre clones provenientes de uma mesma amostra clínica, uma vez que a amostra BABV apresentou clones que tiveram amplificação apenas nas reações 1 e 2, sendo assim agrupados entre os VACV-BR do grupo 1, além de clones que resultaram em amplificação nas reações 1, 2 e 3, com conseqüente agrupamento no grupo 2 de VACV-BR. O mesmo ocorreu para a amostra GOBV, na qual o clone 2 (VACV-GOBV-Clone 2) apresentou amplificação nas reações 1, 2 e 3, agrupando-o no grupo 2, enquanto os demais clones provenientes dessa amostra foram alocados no grupo 1 com base no gene A56R. A TABELA 7 resume os resultados aqui descritos separando os clones analisados entre os grupos 1 e 2 com base no gene A56R.

TABELA 7. Amplificação dos clones nas reações de PCR convencional para o gene A56R. Em vermelho destacamos os clones que apresentaram perfil do grupo 2 segundo o padrão de amplificação desse gene.

Clones	Reações			Grupo	Clones	Reações			Grupo
	1	2	3			1	2	3	
BABV-Clone 1	+	+	-	1	GOB2V-Clone 1	+	+	-	1
BABV-Clone 2	+	+	+	2	GOB2V-Clone 2	+	+	-	1
BABV-Clone 3	+	+	+	2	GOB2V-Clone 3	+	+	-	1
BABV-Clone 4	+	+	+	2	GOB2V-Clone 4	+	+	-	1
BABV-Clone 5	+	+	-	1	GOB2V-Clone 5	+	+	-	1
BAB2V-Clone 1	+	+	-	1	ESBV-Clone 1	+	+	-	1
BAB2V-Clone 2	+	+	-	1	ESBV-Clone 2	+	+	-	1
BAB2V-Clone 3	+	+	-	1	ESBV-Clone 3	+	+	-	1
BAB2V-Clone 4	+	+	-	1	ESBV-Clone 4	+	+	-	1
BAB2V-Clone 5	+	+	-	1	ESBV-Clone 5	+	+	-	1
BAHV-Clone 1	+	+	-	1	MGHV-Clone 1	+	+	-	1
BAHV-Clone 2	+	+	-	1	MGHV-Clone 2	+	+	-	1
BAHV-Clone 3	+	+	-	1	MGHV-Clone 3	+	+	-	1
BAHV-Clone 4	+	+	-	1	MGHV-Clone 4	+	+	-	1
BAHV-Clone 5	+	+	-	1	MGHV-Clone 5	+	+	-	1
GOBV-Clone 1	+	+	-	1	PABV-Clone 1	+	+	-	1
GOBV-Clone 2	+	+	+	2	PABV-Clone 2	+	+	-	1
GOBV-Clone 3	+	+	-	1	PABV-Clone 3	+	+	-	1
GOBV-Clone 4	+	+	-	1	PABV-Clone 4	+	+	-	1
GOBV-Clone 5	+	+	-	1	PABV-Clone 5	+	+	-	1
MGBV-Clone 1	+	+	-	1	PAB2V-Clone 1	+	+	-	1
MGBV-Clone 2	+	+	-	1	PAB2V-Clone 2	+	+	-	1
MGBV-Clone 3	+	+	-	1	PAB2V-Clone 3	+	+	-	1
MGBV-Clone 4	+	+	-	1	PAB2V-Clone 4	+	+	-	1

Comparando os resultados aqui obtidos aos resultados biológicos, demonstra-se que a análise do gene A56R corroborou a variabilidade biológica aqui descrita. Os clones que se comportaram de forma semelhante aos integrantes do grupo 2, com base na análise molecular do marcador A56R (VACV-BABV-Clones 2, Clone 3, Clone 4 e VACV-GOBV-Clone2) são os mesmos que apresentaram placas de lise grandes em BSC-40, além de, formação de cometa, maior taxa de multiplicação e alta virulência em camundongos BALB/c, características comumente encontradas entre os membros do grupo 2 de VACV-BR. Da mesma forma, os demais 44 clones, que foram agrupados no grupo 1 segundo a PCR diferencial para o gene A56R, também apresentaram características biológicas típicas do grupo 1, conforme será demonstrado nos tópicos já apresentados e a seguir.

6.3.2. Análise do gene C23L

A reação de PCR convencional para amplificação do gene C23L, assim como a utilizada para o gene A56R, permite a separação dos VACV-BR quanto à presença de deleção (grupo 1) ou ausência de deleção (grupo 2). Essa reação permite a separação dos grupos sem a necessidade de sequenciamento uma vez que um dos iniciadores utilizados na reação 2 parecia na região da deleção de 10 nt, fazendo com que apenas as amostras que não apresentam essa deleção resultem em amplificação na reação 2, sendo por isso consideradas do grupo 2. Enquanto as amostras do grupo 1, que por sua vez apresentam essa deleção, não são amplificadas na reação 2. Essa reação está descrita com detalhes no Item 5.14.2. Todos os clones isolados nesse estudo foram submetidos às duas reações separadamente, em que a reação 1 (R1) amplifica todas as amostras (grupo 1 e grupo 2) e a reação 2 (R2) amplifica apenas as do grupo 2. Dos 48 clones isolados nesse estudo, 44 demonstraram amplificação apenas na reação 1, evidenciando a presença de deleção de 10 nt

característico do grupo 1. A FIGURA 28 demonstra um gel de poliacrilamida em que foram corridas reações de clones que amplificaram apenas na reação 1 (R1), exemplificando assim esses resultados.

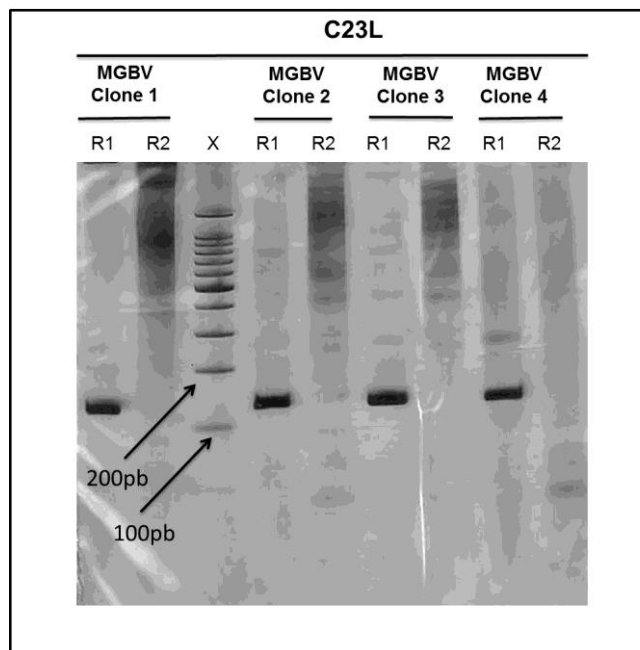


FIGURA 28. Amplificação do gene C23L, exemplificando clones que resultaram em amplificação apenas na reação 1, sendo assim agrupados no grupo 1 de VACV-BR. R1 indica reação 1 e R2 indica reação 2; padrão molecular indicado por X.

No entanto, foram observados cinco clones (BABV-Clone 2, 3 e 4, GOBV-Clone 2 e MGHV-Clone 2) que amplificaram também na reação (R2) evidenciando a ausência de deleção, sendo por isso agrupados entre os VACV-BR do grupo 2, enquanto os outros clones da mesma amostra não amplificaram, demonstrando mais uma vez variabilidade entre clones de uma mesma amostra. Era esperado que os clones 2, 3 e 4 da amostra BABV e o clone 2 da amostra GOBV amplificassem na reação 2 como ocorreu, uma vez que se tratam de clones de placas grandes, sendo assim agrupados no grupo 2 de VACV-BR. A FIGURA 29 demonstra um gel de poliacrilamida em que foram fracionadas eletroforicamente reações das amostras BABV (FIGURA 29A) e GOBV (FIGURA 29B), que apresentaram clones que amplificaram nas 2 reações (grupo 2) e de clones que amplificaram apenas na reação 1 (grupo 1).

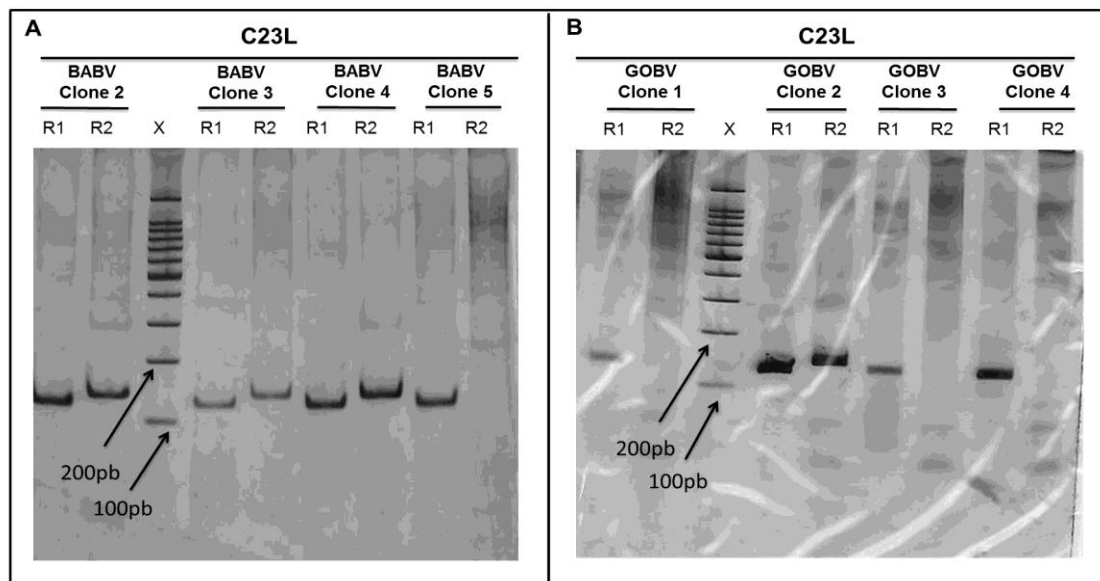


FIGURA 29. Amplificação do gene C23L, exemplificando os clones das amostras BABV e GOBV. Os clones grandes (BABV-Clone 2, 3 e 4) e GOBV-Clone 2) apresentaram amplificação nas duas reações, sendo agrupadas no grupo 2, enquanto os clones pequenos amplificaram apenas na reação 1, sendo assim agrupados no grupo 1 de VACV-BR. R1 indica reação 1 e R2 indica reação 2; padrão molecular indicado por X. Os demais clones pequenos dessas amostras, não demonstrados nas figuras acima, amplificaram apenas na reação 1 conforme esperado.

No entanto, curiosamente, o clone 2 da amostra MGHV, que apresentou placas de lise pequenas, resultou em amplificação na reação 2 conforme demonstrado na FIGURA 30 com destaque em vermelho, demonstrando assim perfil do grupo 2 para o gene C23L. Conforme demonstrado na figura, nenhuma amplificação foi observada nos controles negativos das reações (CR).

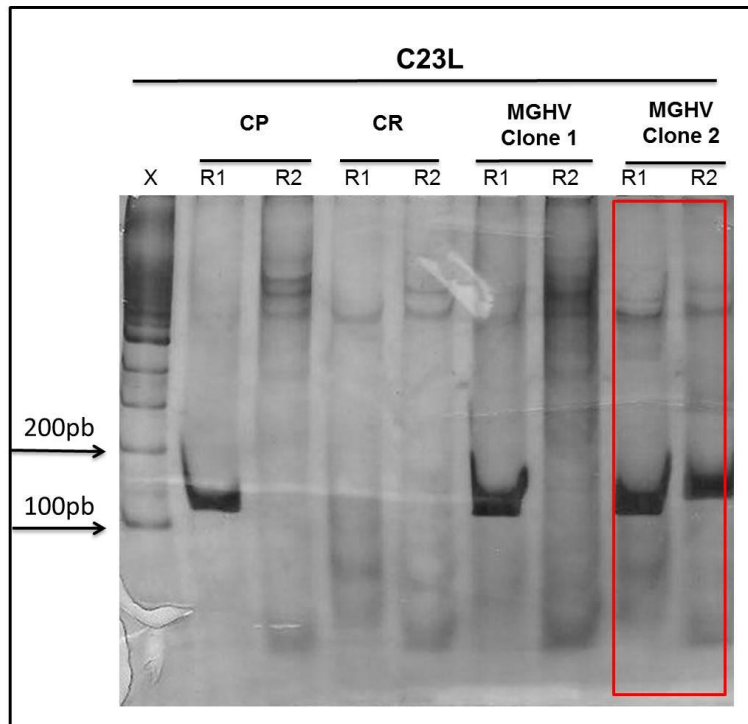


FIGURA 30. Amplificação do gene C23L, destacando o clone 2 da amostra MGHV (clone pequeno). Observa-se em vermelho a amplificação do clone 2 da amostra MGHV nas reações 1 e 2, o que a agrupa entre os membros do grupo 2, apesar de se tratar de um clone pequeno. R1 indica reação 1, R2 indica reação 2, CP indica a amplificação de um controle positivo do grupo 1, CR indica o controle negativo; padrão molecular indicado por X.

Os demais clones não apresentados aqui demonstraram perfil de bandas semelhantes aos exemplificados nas figuras. Os demais clones que apresentam placas e lise pequenas revelaram também perfil do grupo 1 segundo análises desse gene, corroborando assim os dados biológicos. A TABELA 8 resume as amplificações obtidas nas reações para amplificação do gene C23L demonstrando o grupo no qual cada clone foi inserido segundo a análise desse gene.

TABELA 8. Amplificação dos clones nas reações de PCR convencional para amplificação do gene C23L e a separação entre os grupo 1 e 2. Em vermelho destacamos os clones que apresentaram perfil do grupo 2 segundo o padrão de amplificação desse gene.

Clones	Reações		Grupo	Clones	Reações		Grupo
	1	2			1	2	
BABV-Clone 1	+	-	1	GOB2V-Clone 1	+	-	1
BABV-Clone 2	+	+	2	GOB2V-Clone 2	+	-	1
BABV-Clone 3	+	+	2	GOB2V-Clone 3	+	-	1
BABV-Clone 4	+	+	2	GOB2V-Clone 4	+	-	1
BABV-Clone 5	+	-	1	GOB2V-Clone 5	+	-	1
BAB2V-Clone 1	+	-	1	ESBV-Clone 1	+	-	1
BAB2V-Clone 2	+	-	1	ESBV-Clone 2	+	-	1
BAB2V-Clone 3	+	-	1	ESBV-Clone 3	+	-	1
BAB2V-Clone 4	+	-	1	ESBV-Clone 4	+	-	1
BAB2V-Clone 5	+	-	1	ESBV-Clone 5	+	-	1
BAHV-Clone 1	+	-	1	MGHV-Clone 1	+	-	1
BAHV-Clone 2	+	-	1	MGHV-Clone 2	+	-	1
BAHV-Clone 3	+	-	1	MGHV-Clone 3	+	-	1
BAHV-Clone 4	+	-	1	MGHV-Clone 4	+	-	1
BAHV-Clone 5	+	-	1	MGHV-Clone 5	+	-	1
GOBV-Clone 1	+	-	1	PABV-Clone 1	+	-	1
GOBV-Clone 2	+	+	2	PABV-Clone 2	+	-	1
GOBV-Clone 3	+	-	1	PABV-Clone 3	+	-	1
GOBV-Clone 4	+	-	1	PABV-Clone 4	+	-	1
GOBV-Clone 5	+	-	1	PABV-Clone 5	+	-	1
MGBV-Clone 1	+	-	1	PAB2V-Clone 1	+	-	1
MGBV-Clone 2	+	+	2	PAB2V-Clone 2	+	-	1
MGBV-Clone 3	+	-	1	PAB2V-Clone 3	+	-	1
MGBV-Clone 4	+	-	1	PAB2V-Clone 4	+	-	1

6.3.3 Análise do gene A26L

Assim como a reação utilizada para o gene A56R, a semi-nested utilizada para amplificação do gene A26L descrita no item 5.14.3 nos permitiu separar os clones isolados entre os grupo 1 e grupo 2 de VACV-BR, uma vez que apenas as amostras do grupo 1 amplificam nessa reação, salvo a amostra do grupo 2 VACV-SAV. Sendo assim as amostras que amplificam esse gene através dessa reação são consideradas do grupo 1, enquanto as que não amplificam são consideradas do grupo 2.

Dos 48 clones submetidos a essa reação, 45 amplificaram o gene A26L, sendo assim agrupados entre os membros do grupo 1 de VACV-BR, enquanto apenas três clones não amplificaram utilizando essa reação, sendo agrupadas no grupo 2 de VACV-BR. Os clones que foram agrupados no grupo 1, segundo o gene A26L, apresentaram também perfil biológico semelhante ao grupo 1, corroborando os resultados biológicos. Porém, o clone 2 da amostra BABV (BABV-Clone 2), que apresenta características do grupo 2 para todas as outras análises biológicas e moleculares, nessa análise apresentou curiosamente perfil molecular do grupo 1 para o gene A26L.

A FIGURA 31 exemplifica a reação para amplificação do gene A26L em que são observados clones positivos (grupo 1) e negativos (grupo 2) para essa reação. Conforme demonstrado na figura, nenhuma amplificação foi observada nos controles negativos das reações. Os demais clones não demonstrados aqui demonstraram perfil de bandas semelhantes aos exemplificados nessa figura.

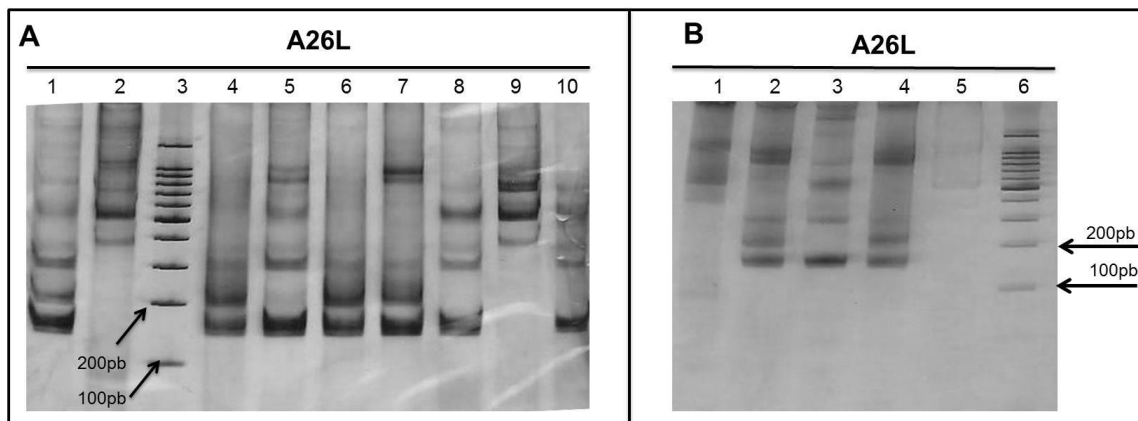


FIGURA 31. Amplificação por PCR semi-nested de um fragmento de 145 pb para o gene A26L. (A) Canaleta 1: GOBV-Clone 1/ Canaleta 2: GOBV 2-Clone 2 /Canaleta 3: padrão molecular; Canaleta 4: GOBV-Clone 3/ Canaleta 5: GOBV-Clone 4/ Canaleta 6: GOBV-Clone 5/ Canaleta 7: BABV-Clone 1 /Canaleta 8: BABV-Clone 2/ Canaleta 9: BABV-Clone 3/ Canaleta 10: CP do grupo 1-GP2V. **(B)** Canaleta 1: BABV-Clone 4 /Canaleta 2: BABV-Clone 5/ Canaleta 3: PABV-Clone 1/ Canaleta 4: PABV-Clone 4 /canaleta 5 :CN /Canaleta 6: Padrão molecular.

A amostra BABV apresentou clones com perfil do grupo 1 para o gene A56R e A26L (Clones 1 e 5), perfil do grupo 2 para os genes A56R e A26L (Clones 3 e 4) e um clone misto com perfil do grupo 2 para o gene A56R e perfil do grupo 1 para o gene A26L. Dessa forma, BABV-Clone 2 apresenta perfil biológico do grupo 2, bem como perfil molecular do grupo 2 para os genes A56R e C23L, porém apresenta perfil molecular do grupo 1 para o gene A26L. Esses resultados estão compilados na TABELA 9, que resume o perfil molecular de cada clone com base nos três genes avaliados.

TABELA 9. Separação dos clones nos Grupos 1 e 2 de VACV-BR com base na análise dos genes A56R, A26L e C23L

Clones	Genes			Clones	Genes		
	A56R	A26L	C23L		A56R	A26L	C23L
BABV-Clone 1	Grupo 1	Grupo 1	Grupo 1	GOB2V-Clone 1	Grupo 1	Grupo 1	Grupo 1
BABV-Clone 2	Grupo 2	Grupo 1	Grupo 2	GOB2V-Clone 2	Grupo 1	Grupo 1	Grupo 1
BABV-Clone 3	Grupo 2	Grupo 2	Grupo 2	GOB2V-Clone 3	Grupo 1	Grupo 1	Grupo 1
BABV-Clone 4	Grupo 2	Grupo 2	Grupo 2	GOB2V-Clone 4	Grupo 1	Grupo 1	Grupo 1
BABV-Clone 5	Grupo 1	Group 1	Grupo 1	GOB2V-Clone 5	Grupo 1	Grupo 1	Grupo 1
BAB2V-Clone 1	Grupo 1	Grupo 1	Grupo 1	ESBV-Clone 1	Grupo 1	Grupo 1	Grupo 1
BAB2V-Clone 2	Grupo 1	Grupo 1	Grupo 1	ESBV-Clone 2	Grupo 1	Grupo 1	Grupo 1
BAB2V-Clone 3	Grupo 1	Grupo 1	Grupo 1	ESBV-Clone 3	Grupo 1	Grupo 1	Grupo 1
BAB2V-Clone 4	Grupo 1	Grupo 1	Grupo 1	ESBV-Clone 4	Grupo 1	Grupo 1	Grupo 1
BAB2V-Clone 5	Grupo 1	Grupo 1	Grupo 1	ESBV-Clone 5	Grupo 1	Grupo 1	Grupo 1
BAHV-Clone 1	Grupo 1	Grupo 1	Grupo 1	MGHV-Clone 1	Grupo 1	Grupo 1	Grupo 1
BAHV-Clone 2	Grupo 1	Grupo 1	Grupo 1	MGHV-Clone 2	Grupo 1	Grupo 1	Grupo 2
BAHV-Clone 3	Grupo 1	Grupo 1	Grupo 1	MGHV-Clone 3	Grupo 1	Grupo 1	Grupo 1
BAHV-Clone 4	Grupo 1	Grupo 1	Grupo 1	MGHV-Clone 4	Grupo 1	Grupo 1	Grupo 1
BAHV-Clone 5	Grupo 1	Grupo 1	Grupo 1	MGHV-Clone 5	Grupo 1	Grupo 1	Grupo 1
GOBV-Clone 1	Grupo 1	Grupo 1	Grupo 1	PABV-Clone 1	Grupo 1	Grupo 1	Grupo 1
GOBV-Clone 2	Grupo 2	Grupo 2	Grupo 2	PABV-Clone 2	Grupo 1	Grupo 1	Grupo 1
GOBV-Clone 3	Grupo 1	Grupo 1	Grupo 1	PABV-Clone 3	Grupo 1	Grupo 1	Grupo 1
GOBV-Clone 4	Grupo 1	Grupo 1	Grupo 1	PABV-Clone 4	Grupo 1	Grupo 1	Grupo 1
GOBV-Clone 5	Grupo 1	Grupo 1	Grupo 1	PABV-Clone 5	Grupo 1	Grupo 1	Grupo 1
MGBV-Clone 1	Grupo 1	Grupo 1	Grupo 1	PAB2V-Clone 1	Grupo 1	Grupo 1	Grupo 1
MGBV-Clone 2	Grupo 1	Grupo 1	Grupo 1	PAB2V-Clone 2	Grupo 1	Grupo 1	Grupo 1
MGBV-Clone 3	Grupo 1	Grupo 1	Grupo 1	PAB2V-Clone 3	Grupo 1	Grupo 1	Grupo 1
MGBV-Clone 4	Grupo 1	Grupo 1	Grupo 1	PAB2V-Clone 4	Grupo 1	Grupo 1	Grupo 1

6.4 Sequenciamento e análise filogenética

Com intuito de confirmar e dar suporte aos dados biológicos e moleculares, que permitiram a separação dos clones aqui isolados entre os dois grupos de VACV-BR, além de buscar eventuais diferenças (SNPs e INDEIs) entre clones de uma mesma amostra e/ou entre clones de amostras diferentes, todos os clones isolados nesse trabalho foram submetidos à amplificação e sequenciamento do gene A56R (Item 5.14.1).

Foram obtidas sequências de aproximadamente 700pb que foram analisadas e utilizadas na construção de árvores filogenéticas e alinhamentos utilizando o programa MEGA 6.0.

As sequências de VACV-BR dos grupos 1 e 2, além de amostras vacinais e de outras espécies de OPVs, tais como MPXV, CPXV e VARV utilizadas nos alinhamentos e construções filogenéticas foram obtidas no GenBank e seus números de acesso estão demonstrados nas figuras a seguir, onde foram utilizadas. As sequências obtidas nesse trabalho foram depositadas no Genbank sob os seguintes números de acesso: BAB2V-Clone 1 (KP282618); BAB2V-Clone 2 (KP282619); BAB2V-Clone 3 (KP282620); BAB2V Clone 4 (KP282621); BAB2V-Clone 5 (KP282622); MGHV-Clone 1 (KP282623); MGHV-Clone 2 (KP282624); MGHV-Clone 3 (KP282625); MGHV-Clone 4 (KP282626); MGHV-Clone 5 (KP282627); BAHV-Clone 1 (KP282628); BAHV-Clone 2 (KP282629); BAHV-Clone 3 (KP282630); BAHV-Clone 4 (KP282631); BAHV-Clone 5 (KP282632); ESBV-Clone 1 (KP282633); ESBV-Clone 2 (KP282634); ESBV-Clone 3 (KP282635); ESBV-Clone 4 (KP282636); ESBV-Clone 5 (KP282637); GOB2V-Clone 1 (KP282638); GOB2V-Clone 2 (KP282639); GOB2V-Clone 3 (KP282640); GOB2V-Clone 4 (KP282641); GOB2V-Clone 5 (KP282642); MGBV-Clone 1 (KP282643); MGBV-Clone 2 (KP282644); MGBV-Clone 3 (KP282645); MGBV-Clone 4 (KP282646); PAB2V-Clone 1 (KP282647); PAB2V-Clone 2 (KP282648); PAB2V-Clone 3 (KP282649); PAB2V-Clone 4 (KP282650); BABV-Clone 1 (KP282651); BABV-Clone 2 (KP282652); BABV-Clone 3 (KP282653); BABV-Clone 4 (KP282654); BABV-Clone 5 (KP282655); GOBV-Clone 1 (KP282656); GOBV-Clone 2 (KP282657); GOBV-Clone 3

(KP282658); GOBV-Clone 4 (KP282659); GOBV-Clone 5 (KP282660); PABV-Clone 1 (KP282661); PABV-Clone 2 (KP282662); PABV-Clone 3 (KP282663); PABV-Clone 4 (KP282664); PABV-Clone 5 (KP282665).

A análise das sequências obtidas para o gene A56R nos permitiu demonstrar e corroborar a separação dos clones das amostras BABV e GOBV entre os dois grupos de VACV-BR, com base principalmente numa assinatura genética que consiste na presença de uma deleção de 18 nucleotídeos existente nas amostras do grupo 1 de VACV-BR. Os Clones 2, 3 e 4 da amostra BABV, que são também clones que geram placas de lise grandes como demonstrado anteriormente, não apresentaram essa deleção, sendo assim agrupados no grupo 2. Por outro lado, os clones 1 e 5 da mesma amostra demonstraram a presença dessa deleção, que permite seu agrupamento junto as amostras do grupo 1 (FIGURA 32).

O mesmo foi demonstrado para a amostra GOBV, em que apenas um clone (GOBV-Clone 2) não apresentou a deleção de 18 nt, como as amostras do grupo 2. Os outros clones isolados da mesma amostra (GOBV-Clone 1, Clone 3, Clone 4 e Clone 5) agruparam as amostras do grupo 1, com a presença da deleção (FIGURA 33)

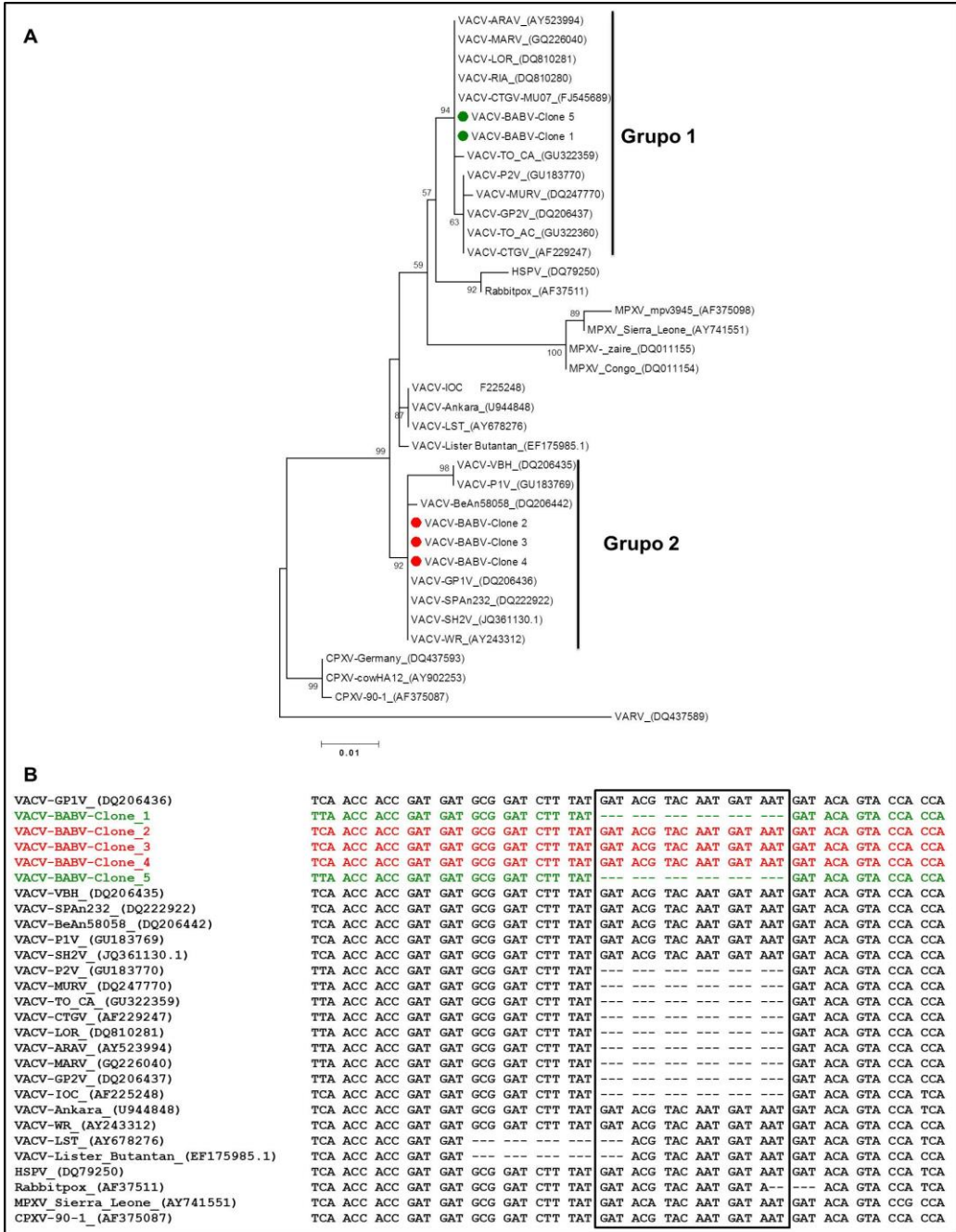


Figura 32. Análise filogenética baseada na sequência de nucleotídeos do gene A56R de clones isolados da amostra BABV. (A) Árvore filogenética construída utilizando o método *Maximum Likelihood*, modelo *Tamura Nei*, com valor de *bootstrap* de 1000. (B) Alinhamento nucleotídico demonstrando a região da deleção de 18 nt do gene A56R. A região representada corresponde ao intervalo de nucleotídeos 162898 a 162957 no genoma de VACV-WR (AY243312.1). Destacados em verde são os clones que foram agrupados no grupo 1 e em vermelho os clones agrupados no grupo 2. As análises foram desenvolvidas usando o programa MEGA 6.0

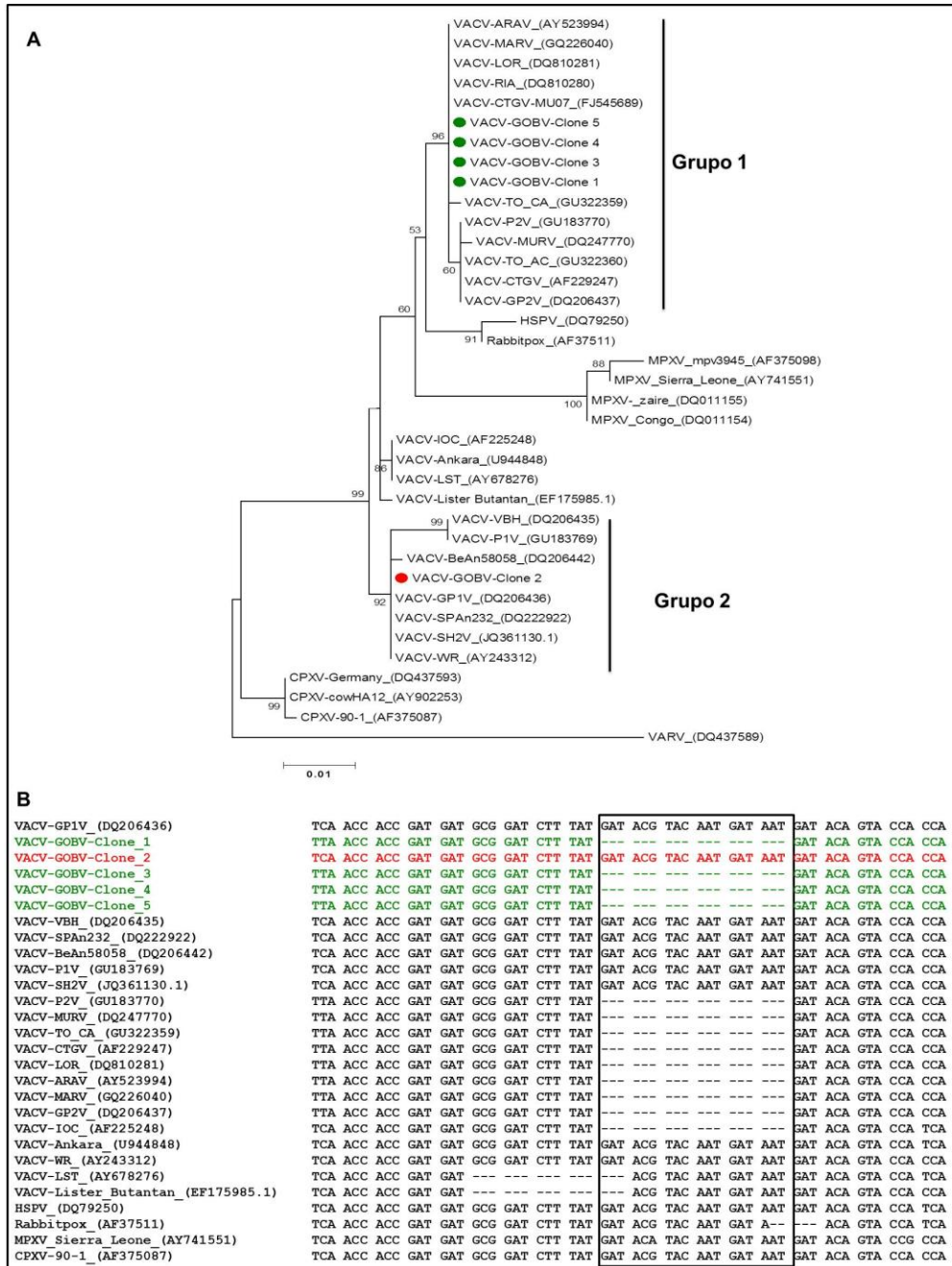


Figura 33. Análise filogenética baseada na sequência de nucleotídeos do gene A56R de clones isolados da amostra GOBV. (A) Árvore filogenética construída utilizando o método *Maximum Likelihood*, modelo *Tamura Nei* com valor de bootstrap de 1000. **(B)** Alinhamento nucleotídico demonstrando a região da deleção de 18 nt do gene A56R. A região representada corresponde ao intervalo de nucleotídeos 162898 a 162957 no genoma de VACV-WR (AY243312.1). Destacados em verde são os clones que foram agrupados no grupo1 e em vermelho os clones agrupados no grupo 2. As análises foram desenvolvidas usando o programa MEGA 6.0.

Segundo a análise das sequências, os demais clones aqui isolados (clones pequenos) foram alocados no grupo 1 de VACV-BR, apresentando a deleção de 18nt característica desse grupo e corroborando os resultados biológicos e moleculares anteriormente descritos. Porém, algumas diferenças pontuais na sequência de nucleotídeos foram observadas entre clones pequenos de uma mesma amostra e/ou entre clones de amostras diferentes. Essas diferenças pontuais ao longo do gene permitiu que os clones das amostras ESBV, PAB2V e GOB2V fossem separados em subgrupos dentro do grupo 1 de VACV-BR (FIGURA 34).

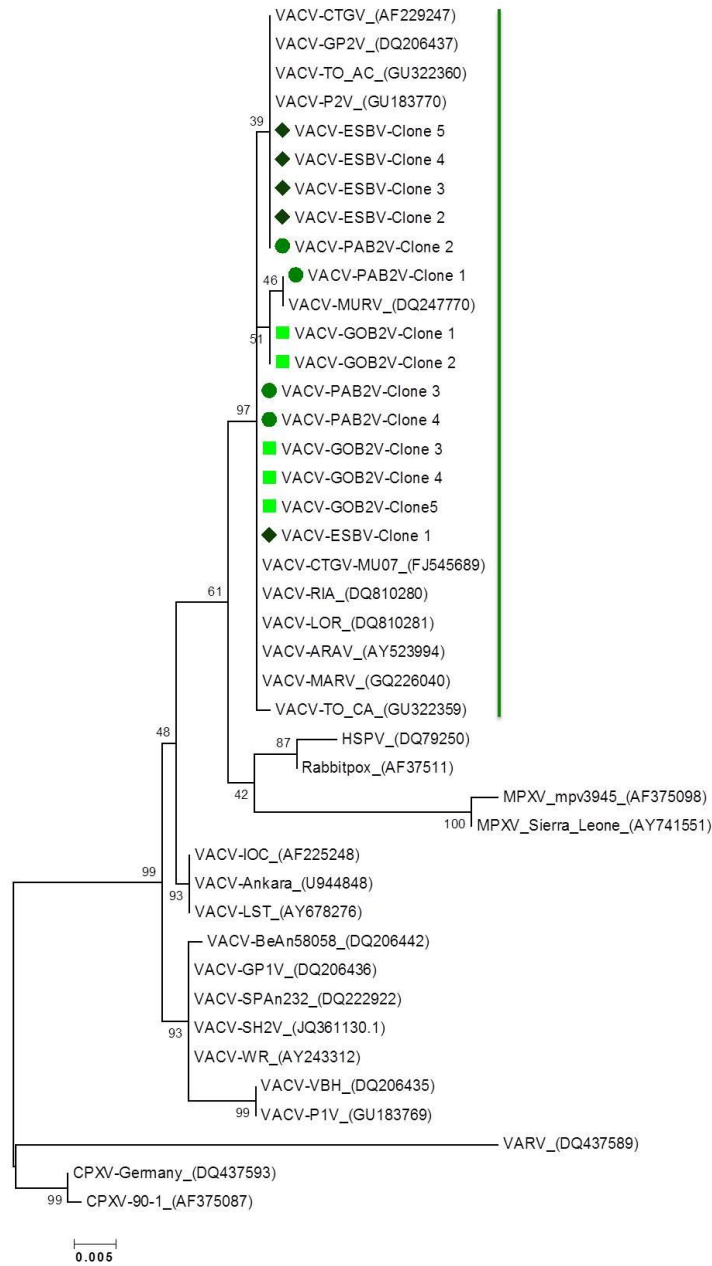


FIGURA 34. Árvore filogenética baseada na sequência de nucleotídeos do gene A56R demonstrando a separação de clones pequenos dentro do grupo 1. Árvore filogenética construída utilizando o método *Maximum Likelihood*, modelo *Tamura-Nei*, com valor de bootstrap de 1000 replicatas (MEGA 6.0). Destacados em verde são os clones das amostras PAB2V, GOB2V, ESBV. O grupo 1 foi delimitado por uma linha verde.

Essa separação em subgrupos ocorreu devido a presença de SNPs entre clones de uma mesma amostra, que os diferenciavam entre si e de clones de outras amostras. Essas mutações estão ilustradas na FIGURA 35, em que está demonstrado um alinhamento de regiões do gene A56R de todos os clones aqui isolados. O alinhamento revela substituições e deleções, entre elas, duas substituições presentes na sequência dos clones da amostra PAB2V, que os difere entre si e os aproxima mais de outras amostras do grupo1; e uma deleção de três nucleotídeos na sequência do clone 1 da mesma amostra. Além disso, as análises demonstraram uma substituição nos clones 2, 3 ,4 e 5 da amostra ESBV, que não está presente no clone 1 da mesma amostra, mas pode ser observada em outras amostras de VACV-BR anteriormente isoladas, tais como CTGV, GP2V, MURV e P2V, e ainda nos clones 1 e 2 da amostra PAB2V. Além disso, foi observada uma substituição nos clones 1 e 2 da amostra GOB2V, ausente nos demais clones da mesma amostra, mas presente no clone 1 de PAB2V e na amostra VACV-MURV isolada em outro estudo.

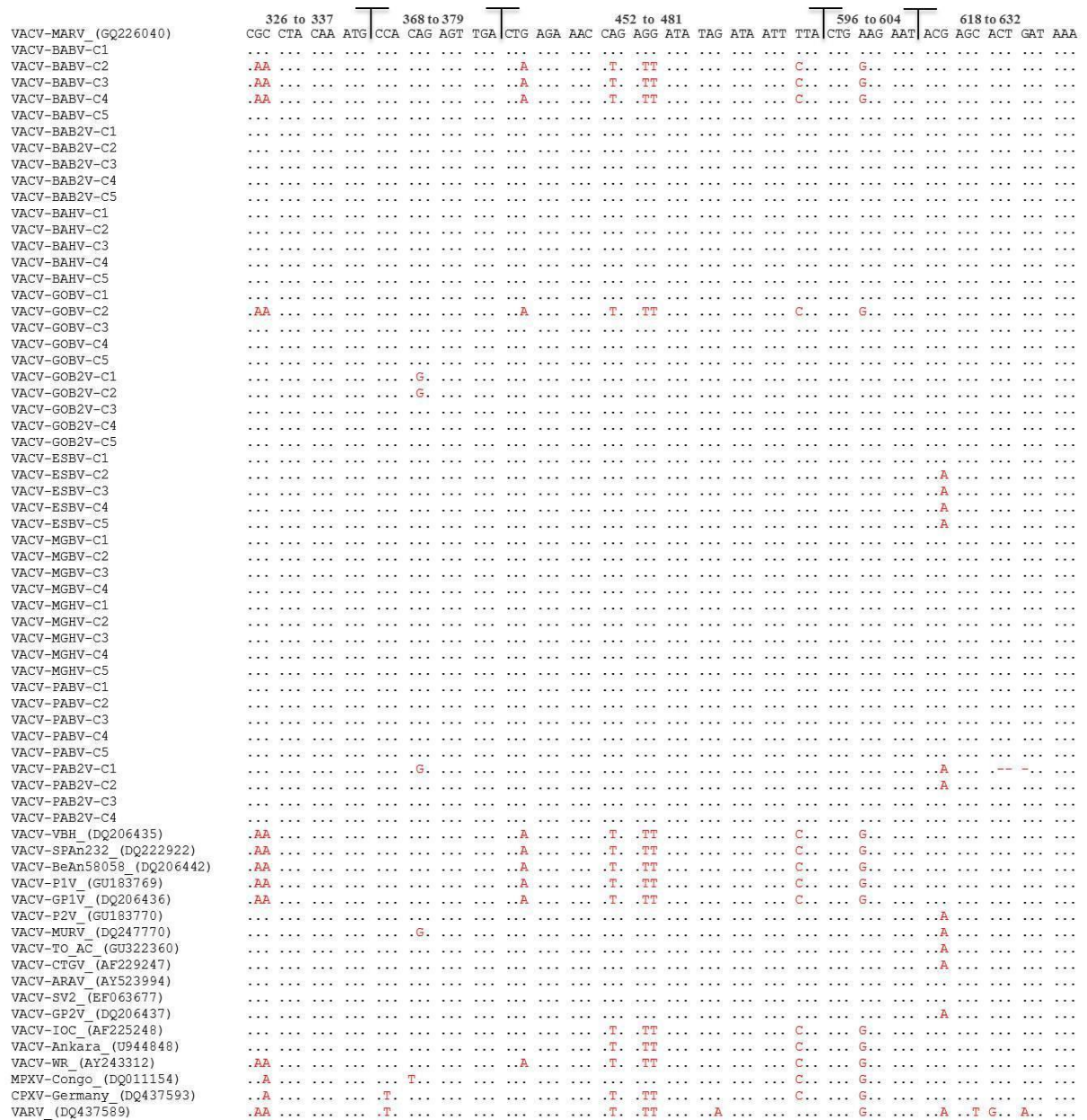


FIGURA 35. Alinhamento das sequências de nucleotídeos do gene A56R. As sequências obtidas foram alinhadas a de outros OPVs disponíveis no GenBank .Os intervalos da região do gene demonstrados nesse alinhamento correspondem a posição no genoma de VACV-WR (AY243312.1). Destacados em vermelho são as mutações e deleções.

Os clones isolados das outras amostras foram agrupados no grupo 1 de VACV-BR, corroborando os dados biológicos e moleculares, uma vez que são clones que formam placas de lise pequenas e apresentam a deleção de 18 nt característica do grupo 1. A FIGURA 36 demonstra uma árvore filogenética

para o gene A56R, reunindo todos os clones aqui isolados e amostras de OPV disponíveis no GenBank.

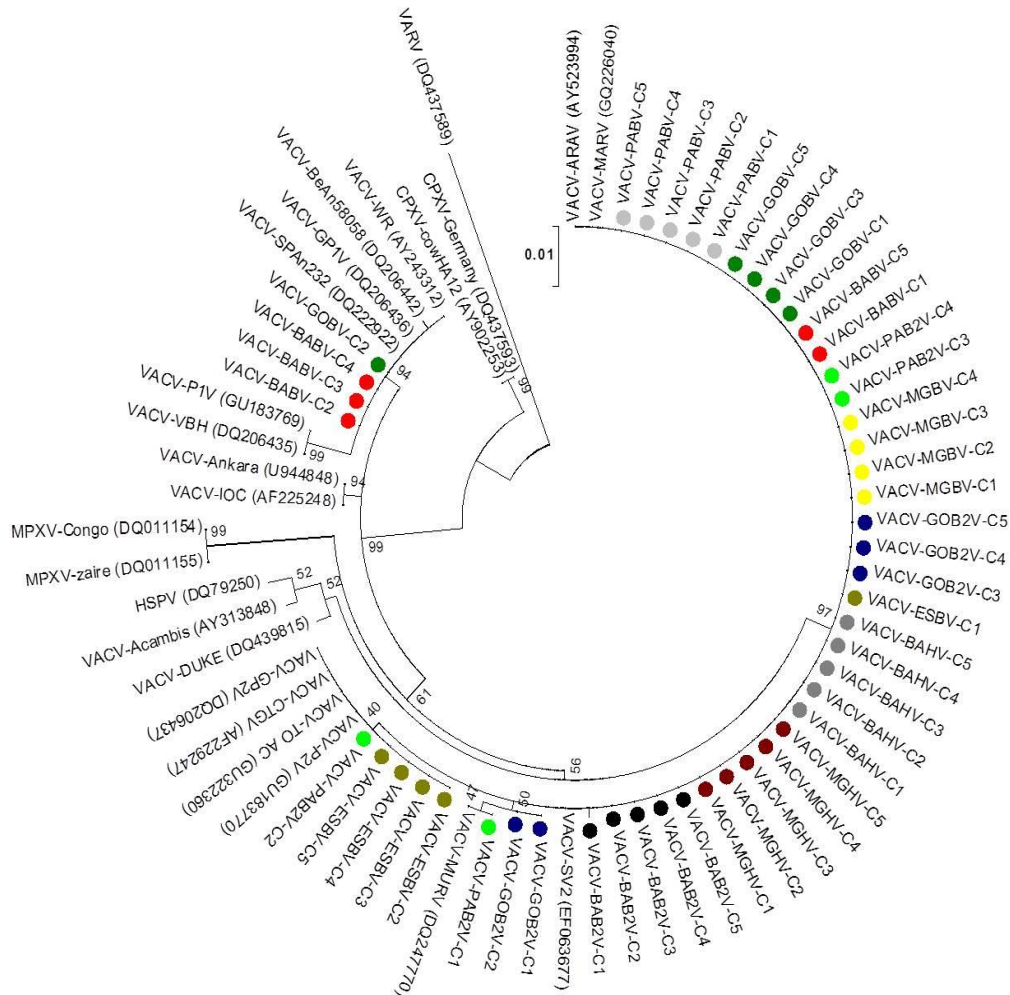


FIGURA 36. Árvore filogenética baseada na sequência de nucleotídeos do gene A56R demonstrando o agrupamento de todos os clones isolados nesse trabalho. Árvore filogenética construída utilizando o método *Maximum Likelihood*, modelo *Tamura-Nei*, com valor de bootstrap de 1000 implementado no programa MEGA 6.0. Cada cor representa os clones de uma determinada amostra que se encontram denominados na figura.

6.5 Virulência em modelo murino

Diante dos resultados encontrados nesse estudo, referentes às variabilidades genética e molecular dos clones isolados de uma mesma amostra, associados aos dados de virulência de amostras de VACV-BR anteriormente publicados (FERREIRA *et al.*, 2008), selecionamos alguns clones para ensaio de virulência em modelo murino Balb/c.

Estudos anteriores demonstraram que amostras do grupo 2 de VACV-BR são altamente virulentas em modelo murino (Balb/c), levando os animais a apresentarem perda de peso e outros sinais clínicos tais como piloereção, arqueamento de dorso, alopecia periocular e balanopostite, diferentemente do grupo 1, que é avirulento para esse modelo animal (FERREIRA *et al.*, 2008).

Conforme demonstrado pelos ensaios biológicos e moleculares desenvolvidos neste estudo, duas amostras nos chamaram a atenção por apresentar variabilidade biológica e molecular entre seus clones: BABV e GOBV. Por esse motivo, selecionamos clones grandes e pequenos provenientes dessas amostras para realizar os testes de virulência, em que foram escolhidos os clones 2 e 3 da amostra BABV (clones grandes) e o clone 1 (clone pequeno) da mesma amostra; além do clone 2 da amostra GOBV (clone grande) e o clone 3 (clone pequeno) da mesma amostra.

Camundongos Balb/C machos foram infectados com 10^6 pfu/animal de cada clone como descrito no Item 5.12 e observados por 12 dpi. A amostra sabidamente virulenta VACV-WR foi utilizada para estudos comparativos. O grupo controle foi inoculado com PBS sob as mesmas condições. Após a inoculação, os animais tiveram seu peso e sinais clínicos registrados diariamente.

Os animais infectados com clones de placa pequena (BABV-Clone 1 e GOBV-Clone 3) não apresentaram perda de peso (FIGURA 37B) e nenhum sinal clínico (FIGURA 38A e B). Além disso, foi observada uma taxa de 100% de sobrevivência nesses grupos (FIGURA 37A). O mesmo ocorreu para os animais do grupo inoculado com PBS (FIGURA 37B).

Em contrapartida, todos os animais do grupo infectado com VACV-WR apresentaram perda de peso (FIGURA 37B), arqueamento de dorso e pilo-ereção a partir do 4° d.p.i. Além disso, em alguns animais inoculados com VACV-WR foi demonstrado a presença de balanopostite (FIGURA 38E) e alopecia periocular (FIGURA 38F), sendo que esses sinais não foram observados em animais de outros grupos. Este grupo apresentou 100% de letalidade, uma vez que 50 % dos animais atingiram 25% de perda de peso inicial no 7°dpi e os 50% restantes no 8°dpi.

Os animais inoculados com clones de placa grande demonstraram perda de peso iniciando entre o 3° e o 4° dpi (FIGURA 37B), além de sinais clínicos, tais como pilo-ereção (FIGURA 38C) e arqueamento de dorso (FIGURA 38D). Houve variação na taxa de sobrevivência observada entre animais inoculados com clones grandes, em que os animais inoculados com os clones BABV-Clone 3 e GOBV-Clone 2 apresentaram 50% de sobrevivência, com mortes ocorrendo entre o 5° e 9° dpi; os animais infectados com o clone BABV-Clone 2 demonstraram 100% de letalidade, uma vez que 25% dos animais atingiram 25% de perda de peso, no 5° dpi e os 75% restantes no 7dpi (FIGURA 37A).

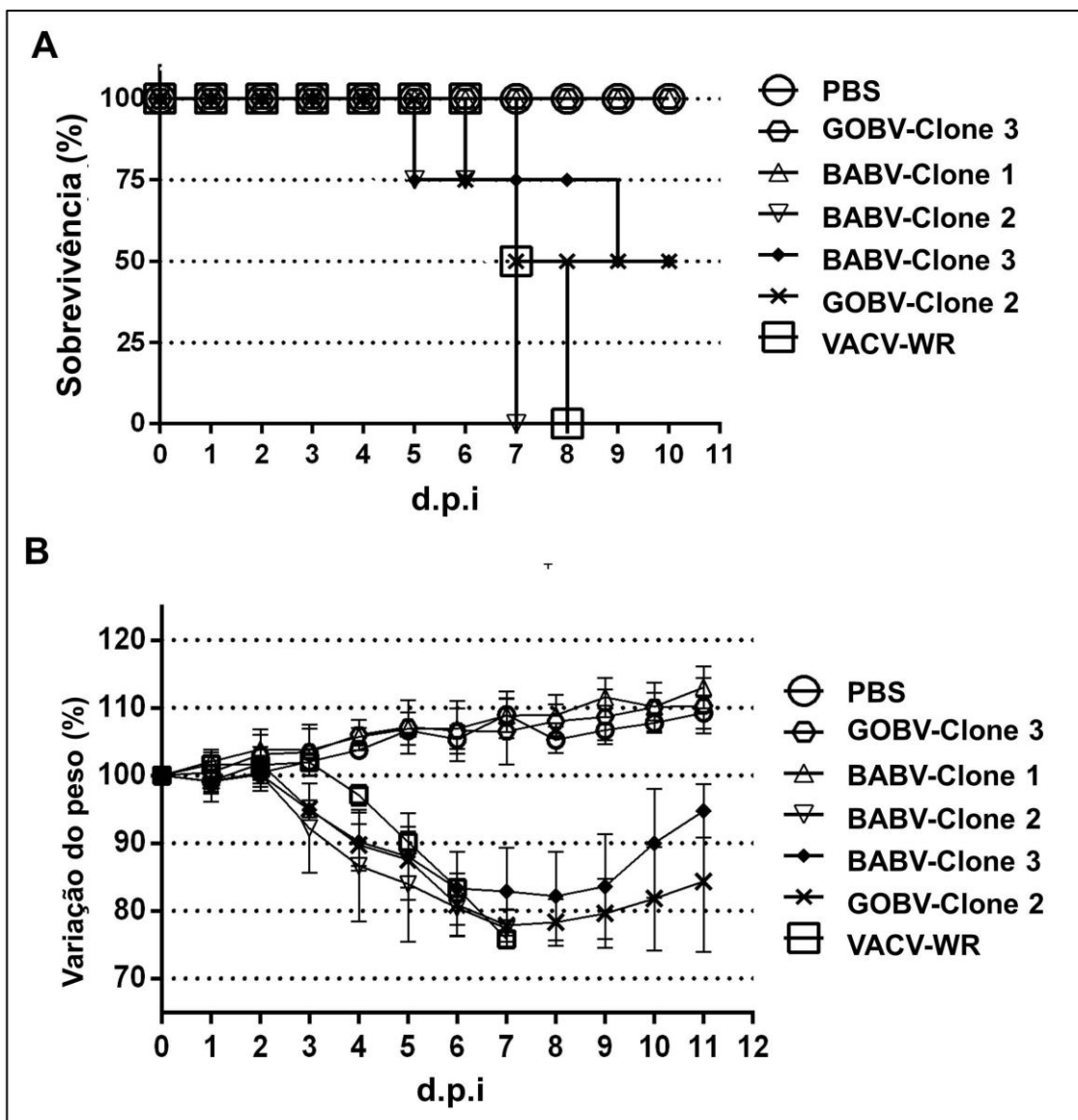


FIGURA 37. Curva de sobrevivência (A) e variação absoluta média diária do peso (B) de camundongos Balb/C infectados com clones provenientes das amostras BABV e GOBV. Grupos de quatro camundongos foram inoculados com 10^6 pfu/10uL dos clones 1 (pequeno), 2 e 3 (grandes) da amostra BABV e clone 3 (pequeno) e 2 (grande) da amostra GOBV. O peso dos animais foi monitorado por 12 dias. O grupo controle não infectado foi inoculado com PBS e um grupo foi inoculado com a amostra VACV-WR, sabidamente virulenta para camundongos.

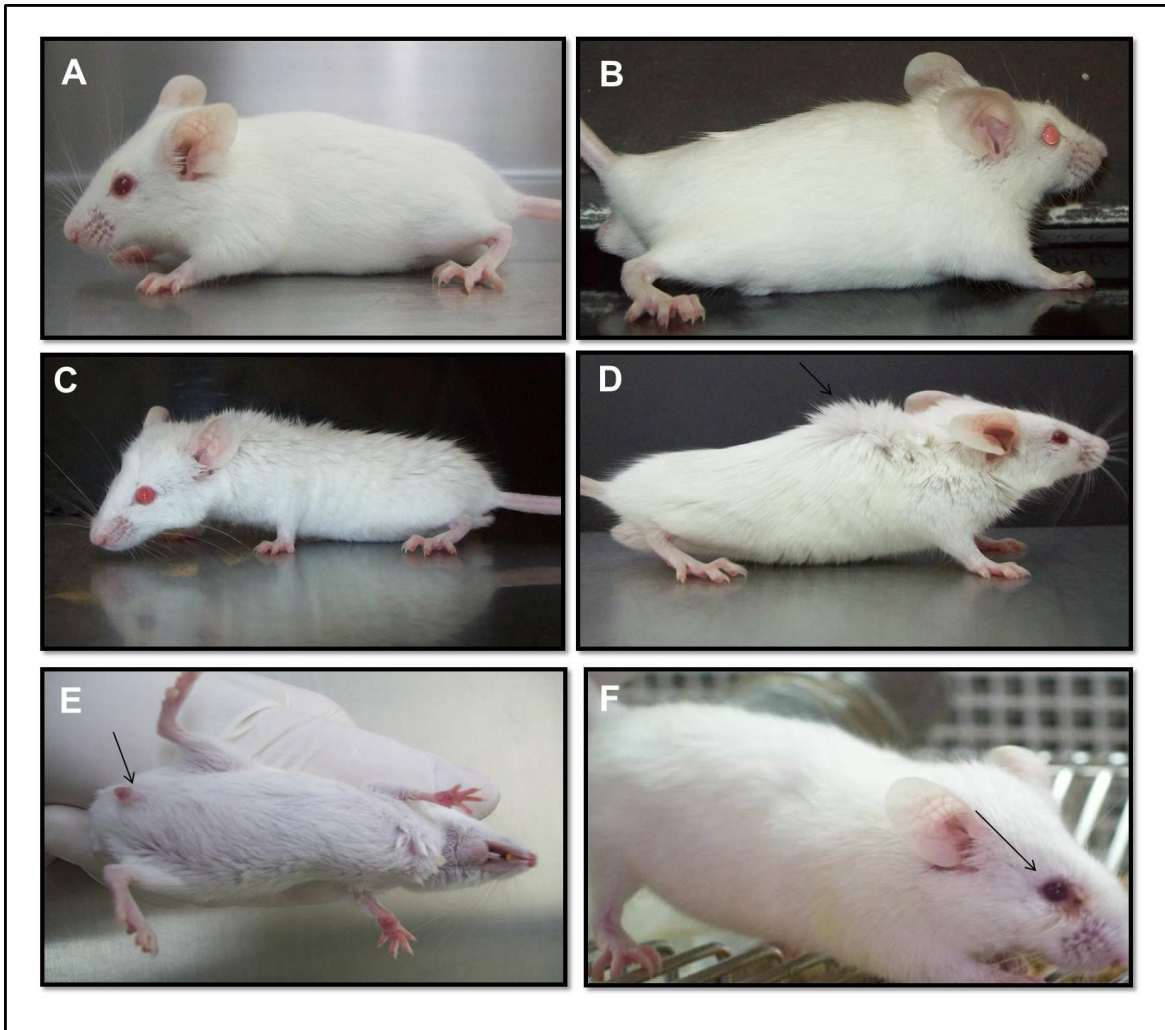


FIGURA 38: Sinais clínicos observados em camundongos Balb/C infectados com clones de VACV provenientes das amostras BABV e GOBV. (A) BABV-Clone 1; (B) GOBV-Clone 3; (C) BABV-Clone 2; (D) GOBV-Clone 2; (E) VACV-WR; (F) VACV-WR. Exemplificando aqui os sinais clínicos pilo-ereção (C), arqueamento de dorso(D), balanopostite (E) e alopecia periorcular (F).

Assim, os clones que exibiram fenótipo de placas grandes (BABV-Clone 2, BABV-Clone 3 e GOBV-Clone 2) foram altamente virulentos nesse estudo, enquanto os clones que exibiram fenótipo de placas pequenas (BABV-Clone 1 e GOBV-Clone 3) foram avirulentos. É importante ressaltar que os resultados aqui descritos demonstram que clones isolados a partir de um mesmo espécime clínico apresentaram perfis de virulência diferentes entre si, indicando mais uma vez a existência de variabilidade biológica entre clones de uma mesma amostra.

VII. DISCUSSÃO

A importância histórica da espécie VACV, adquirida principalmente devido ao seu uso no programa de erradicação da varíola da OMS e devido a sua utilização no desenvolvimento de vacinas recombinantes, o tornou um dos vírus de animais mais estudados da história da virologia (FENNER, 1988; CHEN *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2013; MOSS, 2013). Porém, esses estudos envolveram principalmente o entendimento de questões estruturais, de seu ciclo de multiplicação e do genoma, além de manipulação para construção de vetores vacinais. Assim, ao longo de muitos anos, poucos estudos foram desenvolvidos envolvendo as questões ambientais relacionadas ao VACV, tais como origem, diversidade, identificação de reservatórios e hospedeiros naturais, circulação e manutenção na natureza, além da sua prevalência e diversidade no ambiente rural e silvestre (TRINDADE *et al.*, 2007; ABRAHÃO *et al.*, 2009a).

Nos últimos quinze anos, amostras de VACV têm sido comumente isoladas no Brasil, causando surtos de vaccínia bovina (VB), uma zoonose emergente que acomete principalmente o gado leiteiro, causando problemas econômicos, de saúde pública, veterinários e sociais (DAMASO *et al.*, 2000; TRINDADE *et al.*, 2003; KROON *et al.*, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2013).

Assim, a associação do VACV aos surtos de VB demonstra que sua importância atual vai além do seu uso como vetor vacinal, e por isso os estudos que envolvem questões relacionadas à sua diversidade em ambientes naturais são importantes, uma vez que podem trazer respostas que contribuem para a prevenção e controle de surtos, além da elucidação de características biológicas desta espécie viral.

A primeira demonstração da existência de variantes de VACV cocirculando na natureza foi publicada em 2006 por TRINDADE e colaboradores, em que duas amostras com padrões biológicos e moleculares distintos foram isoladas a

partir de um mesmo surto (TRINDADE *et al.*, 2006). Foi proposta a divisão dos VACV em dois grupos: grupo 1 e grupo 2, em que as amostras do grupo 2 se mostravam altamente virulentas em modelo murino (Balb/c), geravam placas de lise grandes em células BSC-40 e apresentavam uma deleção de 18 nt no gene A56R, diferentemente das amostras do grupo 1 (DRUMOND *et al.*, 2008; FERREIRA *et al.*, 2008). Desde então, outras amostras do grupo 2 têm sido isoladas e caracterizadas, incluindo um caso de coinfeção viral envolvendo amostras dos grupos 1 e 2 em cavalos, no Rio Grande do Sul em 2010 (BRUM *et al.* 2010; CAMPOS *et al.*, 2011).

No presente estudo foram isolados quarenta e oito clones virais provenientes de dez espécimes clínicos, dos quais 43 clones foram agrupados no grupo 1 de VACV-BR, três clones foram agrupados no grupo 2 de VACV-BR, e dois clones apresentaram concomitantemente características dos grupos 1 e 2. Esse estudo reforçou dados anteriores que demonstraram a circulação autóctone dos dois grupos de VACV-BR no Brasil (TRINDADE *et al.*, 2006; CAMPOS *et al.*, 2011; ASSIS *et al.*, 2012a).

Entre os clones do grupo 2 obtidos e caracterizados no presente trabalho, todos foram isolados a partir de espécimes clínicos dos quais também foram isolados clones virais do grupo 1, reforçando a existência da cocirculação e coinfeção clonal de VACV no ambiente.

A análise do gene A56R revelou a presença de alguns polimorfismos entre os clones de uma mesma amostra (FIGURA 35). Recentemente, um estudo demonstrou a importância de alterações nucleotídicas pontuais ou em blocos na alteração do conteúdo gênico viral, associadas à geração de códons de parada prematuros, fragmentação gênica e outras alterações que podem culminar na perda de função ou na perda do gene (HATCHER *et al.*, 2014). Nesse estudo, foi demonstrado que pequenos INDELS foram os principais responsáveis pela perda de função de alguns genes. Esse estudo evidenciou a grande importância exercida por SNPs e INDELS no genoma, que resultam em influência direta na adaptação a diferentes condições e evolução dos OPV. Dessa forma, a presença de variações nucleotídicas, demonstrada nesse e em

outros estudos, exerce uma importância na evolução das espécies virais, uma vez que pode levar a importantes alterações gênicas.

Enquanto a diversidade de VACV circulando no ambiente é pouco conhecida, existem muitos estudos demonstrando variabilidade genética entre clones de VACV isolados de amostras vacinais. Esses estudos demonstram a existência de alta variabilidade genética entre clones de uma mesma amostra, revelando que as vacinas podem conter uma complexa mistura de vírus com um grande número de polimorfismos (OSBORNE *et al.*, 2007; GARCEL *et al.*, 2009; QIN *et al.*, 2011; QIN *et al.*, 2013).

Conforme mencionado anteriormente, diversidade genética, molecular, clínica e até mesmo separação geográfica são características descritas para outras espécies do gênero OPV, tais como MPXV, CPXV, e o extinto VARV (HENDERSON *et al.*, 1999; GUBSER *et al.*, 2004; LIKOS *et al.*, 2005; OLSON *et al.*, 2009; DABROWSKI *et al.*, 2013; NAKAZAWA *et al.*, 2013). Os dados aqui apresentados nos permitiram demonstrar a presença de variabilidade biológica e molecular entre clones de VACV isolados de um mesmo espécime clínico. As análises moleculares, realizadas com base nos genes A56R, A26L e C23L, corroboraram estudos anteriores no que diz respeito à relação entre tamanho das placas de lise e assinatura moleculares dos grupos 1 e 2 (LEITE *et al.*, 2007; TRINDADE *et al.*, 2007; CAMPOS *et al.*, 2011; ASSIS *et al.*, 2012b). Assim, no presente trabalho, os clones que formaram placas de lise pequenas foram alocados no grupo 1 segundo as análises moleculares (TABELA 9 e FIGURAS 34 e 36). A única exceção entre os clones de placa pequena foi o MGHV-Clone 2, que demonstrou um perfil híbrido, uma vez que se comportou como amostra do grupo 1 para os ensaios biológicos e para os genes A56R e A26L, mas apresentou característica do grupo 2 no que se refere ao gene C23L (TABELA 9). Também de acordo com a literatura, os clones que exibiram perfil de fenótipo de placa do tipo grande foram incluídos no grupo 2 com base nas análises moleculares (TABELA 9 e FIGURAS 32 e 33), com exceção de apenas um clone (BABV-Clone 2) que demonstrou perfil do grupo 2 para todas as análises, mas perfil do grupo 1 em análises do gene A26L (TABELA 9).

Uma amostra com o perfil biológico e molecular semelhante ao BABV-Clone 2 foi isolada por Assis e colaboradores em 2012, o que poderia compor um terceiro grupo de VACV-BR em expansão (ASSIS *et al.*, 2012a; LEITE *et al.*, 2007). Interessantemente, no presente trabalho esses três perfis (grupo 1, grupo 2 e híbrido) foram isolados a partir de um único espécime clínico.

Assim, no presente trabalho foram isolados dois clones (BABV-clone 2 e MGHV-Clone 2), que apresentaram características dos grupos 1 e 2, que podem ter surgido como produto de recombinação durante a multiplicação viral. Estudos anteriores demonstraram a ocorrência de recombinação durante coinfeção por poxvírus (FENNER *et al.*, 1958; BEDSON *et al.*, 1964; QIN *et al.*, 2014). A cocirculação dos clones geneticamente diferentes na mesma amostra, como aqui demonstrado, pode favorecer a recombinação genômica, gerando novas variantes virais, que também pode influenciar na evolução e na patogênese clonal. Além disso, as mudanças genéticas podem favorecer a adaptação a novos hospedeiros, tais como descritos para outros vírus do mesmo gênero, contribuindo assim para a expansão da sua gama de hospedeiros (REYNOLDS *et al.*, 2012).

Apesar da existência de dois grupos de VACV-BR circulando no Brasil, os vírus do grupo 1 (placas de lise pequenas) têm sido mais frequentemente isolados em relação aos vírus do grupo 2 (placas de lise grandes), inclusive neste estudo, no qual ~92% dos clones isolados foram agrupados no grupo 1 de VACV-BR (FIGURAS 21, 22 e 36). Similarmente, um estudo avaliando a amostra vacinal TianTan demonstrou maior taxa de isolamento de clones de placa pequena, uma vez que, dos 24 clones isolados, apenas 3 exibiram placas de lise grande, enquanto os demais formavam placas pequenas (QIN *et al.*, 2013).

O motivo pelo qual existe uma maior taxa de isolamento de amostras de VACV-BR do grupo 1 ainda não foi desvendado, mas hipóteses podem ser lançadas a partir dos resultados aqui obtidos. Acreditamos de fato que as amostras do grupo 1 são mais prevalentes na natureza, o que seria a causa principal que permite que a maioria dos grupos de pesquisa isolem somente amostras deste

grupo. Todavia, acreditamos também na existência de um filtro laboratorial, que favorece a identificação e caracterização de amostras de VACV do grupo 1, uma vez que os sistemas celulares comumente utilizados no isolamento e caracterização, como membrana corioalantóide (MCA) de ovos de galinha embrionados e células Vero, são incapazes de destacar as diferenças no tamanho das placas de lise exibidas pelos grupos 1 e 2. Em uma amostra mista (que apresenta vírus de ambos os grupos), a prevalência de placas do grupo 2 pode ser numericamente inferior às do grupo 1, o que pode dificultar a identificação de clones deste grupo. Além disso, caso a purificação de placas não seja feita previamente, a diversidade clonal pode ser negligenciada durante o diagnóstico molecular e/ou biológico. Assim, o presente estudo indica que as amostras virais descritas por estudos anteriores podem estar associadas à coinfeções envolvendo clones virais distintos, incluindo associações entre clones dos grupos 1 e 2 de VACV. Nossas descobertas levantam mais discussões sobre a origem do VACV no Brasil, reforçando a ideia de que os VACV-BR podem ter mais de uma origem. (TRINDADE *et al.*, 2007).

A diversidade clonal também foi confirmada nos ensaios de virulência em camundongos Balb/c tal como demonstrado em trabalhos anteriores (FERREIRA *et al.*, 2008). Enquanto os clones de placa pequena não causaram perda de peso, morte ou quaisquer sinais clínicos durante a infecção, a infecção com clones de placa grande levou ao aparecimento de sinais clínicos característicos da infecção por VACV do grupo 2, além de altas taxas de letalidade (FIGURAS 37 e 38). Tais dados corroboram com dados publicados por Ferreira *et al.* em 2008. Esses resultados demonstraram que clones com diferentes perfis de virulência podem estar presentes no mesmo espécime clínico. Além disso, foram demonstradas diferenças de letalidade entre os clones de placa grande aqui avaliados, além de diferenças entre esses clones e a amostra utilizada como controle, o VACV-WR (FIGURA 37).

O aumento da formação das partículas do tipo EEV durante a multiplicação de VACV foi anteriormente associado ao aumento da letalidade em um estudo

utilizando infecção intranasal de camundongos (PAYNE, 1980). Além disso, outras manipulações genéticas de VACV que interferem na produção de EEV/CEV, relacionadas, por exemplo, aos genes A33R, A36R, F12L e B5R, reforçam esta associação, apoiando a hipótese da importância de partículas EEV na patogenicidade (WOLFFE *et al.*, 1993; PARKINSON & SMITH, 1994; ZHANG *et al.*, 2000; GURT *et al.*, 2006). PAYNE (1980) discute que a amostra VACV-WR é uma exceção, pois, apesar de produzir poucos cometas apresenta alta virulência (Payne, 1980). No entanto, com os dados genômicos atualmente disponíveis, este fato pode ser explicado, uma vez que estudos de genes de virulência já demonstraram que VACV-WR é filogeneticamente distinto de outras amostras de VACV (TRINDADE *et al.*, 2007). Como uma forma adicional de distinção entre clones de placa grande e clones de placa pequena, nesse trabalho foi demonstrado que clones que formam placas de lise grandes produzem cometas evidentes (FIGURA 23), apresentando também alta virulência em modelo murino Balb/c (FIGURAS 37 e 38). A titulação de partículas EEV de clones grandes e pequenos derivados de um mesmo espécime clínico demonstrou que clones de placa grande apresentaram maiores títulos de EEV se comparados aos clones de placa pequena (FIGURA 23). Assim, produção diferencial de partículas do tipo EEV foi demonstrada entre clones de uma mesma amostra, reforçando, mais uma vez, a existência de variabilidade biológica entre clones de uma mesma amostra biológica.

Demonstramos aqui que as taxas de multiplicação viral variam entre clones de um mesmo espécime clínico, uma vez que clones de placas grandes exibiram maiores taxas de multiplicação quando comparados a clones de placas pequenas (FIGURAS 24 e 25). Um estudo de Qin e colaboradores (2013) demonstrou que isso também ocorre entre amostras vacinais (QIN *et al.*, 2013). Essas diferenças nas taxas de multiplicação podem apresentar importância para circulação e manutenção do grupo 2 na natureza. No entanto, apesar das especulações, a importância evolutiva das variações nas taxas de multiplicação para VACV necessita de mais estudos.

Apesar de estudos anteriores terem demonstrado alta variabilidade genética presente em preparações vacinais de VACV (OSBORNE *et al.*, 2007; QIN *et al.*, 2011; QIN *et al.*, 2013), este foi o primeiro estudo que comparou clones derivados de amostras autóctones de VACV, isoladas durante surtos de VB. O presente trabalho reforça mais uma vez que pelo menos dois grupos de VACV circulam no Brasil. Além disso, os nossos dados demonstram a cocirculação de populações mistas de VACV em um mesmo espécime clínico, evidenciando a ocorrência de coinfeções envolvendo os dois grupos virais, conforme já demonstrado pelo nosso grupo (CAMPOS *et al.* 2011). Além disso, clones com perfis moleculares e biológicos mistos foram isolados e caracterizados no presente trabalho, podendo estes serem resultado de recombinação entre amostras típicas dos grupos 1 e 2.

A manutenção na natureza pode representar uma das principais barreiras na corrida evolutiva das espécies virais. A ocorrência de mutações pontuais e recombinação são eventos essenciais neste contexto, que atuam na geração de progênie viral variável, que eventualmente é selecionada por forças seletivas diversas, conforme preconiza a teoria da Seleção Natural Darwiniana. O presente trabalho pretende não só contribuir para a confirmação de dados previamente publicados, demonstrando a dicotomia dos VACV-BR; mas também, pretendemos e desejamos, que os dados aqui apresentados sejam uma semente para a compreensão da complexidade na qual o VACV se apresenta na natureza. Dados a respeito da origem, circulação e modelos metodológicos devem ser repensados e analisados sem preconceitos pelos poxvirologistas brasileiros. A ciência só tem a ganhar.

VIII. CONCLUSÕES

- ✓ Nesse trabalho foram isolados e caracterizados 48 clones provenientes de 10 amostras, dos quais 44 (~92%), apresentavam placas de lise pequena, sendo agrupados no grupo 1 de VACV-BR e apenas 4 (~8%) apresentavam placas de lise grande, pertencendo ao grupo 2. Esses resultados corroboram os dados prévios de isolamento de VACV no Brasil, que demonstram que o grupo 1 é mais prevalente.
- ✓ Esse foi o primeiro estudo direcionado para o isolamento e caracterização de clones de amostras circulantes de VACV no contexto da VB, validando estudos prévios que indicam a circulação dos dois grupos de VACV no Brasil.
- ✓ Coinfecção de amostras dos grupos 1 e 2 no mesmo espécime clínico foi mais uma vez demonstrada.
- ✓ Além de confirmar as diferenças biológicas e moleculares entre os clones dos grupos 1 e 2 de VACV, foi possível demonstrar a presença de SNPs e INDELS no gene A56R desses clones, demonstrando variabilidade genética entre clones pequenos de uma mesma amostra.
- ✓ Foram caracterizados dois clones que apresentavam um perfil híbrido com características dos grupos 1 e 2, que podem ter surgido a partir de recombinação.
- ✓ Foram demonstradas diferenças nas taxas de multiplicação entre clones isolados de uma mesma amostra.
- ✓ Ensaios de virulência em camundongos Balb/C corroboraram o perfil virulento dos clones de placa grande.

IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHÃO JS, GUEDES MI, *et al.* One More Piece in 10 the VACV Ecological Puzzle: Could Peridomestic Rodents Be the Link between Wildlife and Bovine Vaccinia Outbreaks in Brazil?. *Plos one*, v. 4, Is.10, p. 1-7, 2009a.

ABRAHÃO JS, OLIVEIRA TM, *et al.* Bovine vaccinia outbreaks: detection and isolation of vaccinia virus in milk samples. *Foodborne Pathog Dis.* v.6, n.9, p.1141-6, 2009b.

ABRAHÃO JS, SILVA-FERNANDES AT, *et al.* Vaccinia Virus Infection in Monkeys, Brazilian Amazon. *Emerging Infectious Diseases*v. 16, n. 6, p 976-9, , 2010a.

ABRAHÃO JS, SILVA-FERNANDES AT, *et al.* Human Vaccinia virus and Pseudocowpox virus co-infection: Clinical description and Phylogenetic characterization. *Journal of Clinical Virology*, v. 48, p. 69–72, 2010b,

ABRAHÃO JS, DRUMOND BP, *et al.* Rapid detection of Orthopoxvirus by semi-nested PCR directly from clinical specimens: A useful alternative for routine laboratories. *J Med Virol.* v.82, n.4, p.692-9, 2010c.

ALTSCHUL SF, GISH W, *et al.* Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, v 215(3) p 403-10, 1990,

ARITA I, HENDERSON D A, *et al.* Monkeypox and whitepox viruses in West and Central Africa. *Bull World Health Organ.* v.53, n.4, p.347-53, 1976.

ASSIS FL, BORGES IA, *et al.* Group 2 *Vaccinia Virus*, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, v. 18, n. 12, p. 2035-2038, 2012a,

ASSIS FL, PEREIRA G, *et al.* Serologic evidence of *orthopoxvirus* infection in buffaloes, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, v. 18, n. 4, p 698-700, 2012b,

ASSIS FL, ALMEIDA GMF, *et al.* Characterization of a New *Vaccinia* virus Isolate Reveals the C23L Gene as a Putative Genetic Marker for Autochthonous Group 1 Brazilian *Vaccinia* virus. *PLoS ONE*, v 7, Is. 11 p 1-9, 2012c.

BAXBY D, SHACKLETON WB, *et al.* Comparison of cowpox-like viruses isolated from Europeans zoos. Brief report. *Arch Virol.* v.69, n.5, p.541-3, 1979.

BAXBY D, The identification and interrelationships of the variola/*Vaccinia* subgroup of poxviruses. *Prog. Med. Virol*, v. 19, p 215-276, 1975,

BECKER C, KURTH A, *et al.* Cowpox virus infection in pet rat owners: not always immediately recognized. *Dtsch Arztebl Int.* 106(19), pp 329-34, 2009,

BEDSON HS, DUMBELL KR, *et al.* Hybrids Derived from the Viruses of Variola Major and Cowpox. *J Hyg* 62, 147-158, 1964,

BOYER M, MADOU M-A., *et al.* Phylogenetic and Phyletic Studies of Informational Genes in Genomes Highlight Existence of a 4th Domain of Life Including Giant Viruses. *PLoS ONE*, v 5, n 12, , 2010

BROWN E, SENKEVICH TG, *et al.* Vaccinia virus F9 virion membrane protein is required for entry but not virus assembly, in contrast to the related L1 protein. *J Virol.* v.80, n.19, p.9455-64, 2006.

BROYLES SS. Vaccinia virus transcription. *J Gen Virol.* v 84, p 2293-2303, 2003,

BRUM MC, ANJOS BL, *et al.* An outbreak of orthopoxvirus-associated disease in horses in southern Brazil. *J Vet Diagn Invest.* v.22, n.1, p.143-7, 2010.

CAMPE H, ZIMMERMANN P, *et al.* Cowpox virus transmission from pet rats to humans, Germany. *Emerg Infect Dis.* v.15, n.5, p.777-80, 2009.

CAMPOS MAS, KROON EG. Critical period of irreversible block of VACV replication. *Review Microbiology.* v.28, n.2, p.474-83, 1993.

CAMPOS RK, BRUM MC, *et al.* Assessing the variability of Brazilian Vaccinia virus isolates from a horse exanthematic lesion: coinfection with distinct viruses. *Arch Virol* 156, 275-283, 2011,

CARRILLO FY, SANJUAN R, *et al.* Enhanced adaptation of vesicular stomatitis virus in cells infected with Vaccinia virus. *Infection, Genetics and Evolution,* v.8, n.5, p.614-20, 2008.

CARROLL DS, EMERSON GL, *et al.* Chasing Jenner's vaccine: revisiting cowpox virus classification. *PLoS One.* 6(8):e23086, 2011.

CHEN H, CHUAI X, *et al.* Optimisation of prime-boost immunization in mice using novel protein-based and recombinant vaccinia (Tiantan)- based HBV vaccine. *Plos one* 7, e43730, 2012,

CHEN N, LI G, *et al.* Virulence differences between monkeypox virus isolates from West Africa and the Congo basin. *Virology*. 340:46–63, 2005.

CYRKLAFF M, RISCO C, *et al.* Cryo-electron tomography of vaccinia virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. v.9, n.2, p.420, 2005.

DABROWSKI PW, RADONIĆ A, *et al.*, Genome-wide comparison of cowpox viruses reveals a new clade related to Variola virus. *PLoS One*. n 8, v 12, e79953, 2013,

DAMASO CR, ESPOSITO JJ, *et al.* An emergent poxvirus from humans and cattle in Rio de Janeiro State: Cantagalo vírus may derive from brasilian smallpox vaccine. *Virology*. v.277, n.2, p.439-49, 2000.

DAMON IK., Poxviruses., In *Fields virology*, 6th ed. Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia. p. 2160, 2013.

DIMIER J, REMBERT AF, *et al.* Deletion of major nonessential genomic regions in the vaccinia virus Lister strain enhances attenuation without altering vaccine efficacy in mice. *J Virol*. 85, 10, pp5016-26, 2011,

DINIZ S, TRINDADE G S, *et al.* An outbreak of mousepox in Swiss mice in a laboratory animal facility – case report. *Arq Braz Med Vet Zootec* . 53, pp 152–6, 2001.

DOCEUL V, HOLLINSHEAD M, *et al.* Repulsion of superinfecting virions: a mechanism for rapid virus spread. *Science*. v.327, n.87, p.873-6, 2010.

DONATELE DM; TRAVASSOS CEPF, *et al.* Epidemiologia da poxvirose bovina no Estado do Espírito Santo, Brasil. *Braz. J. vet. Res. anim. Sci*, v. 44, n. 4, p. 275-282, 2007

DRUMOND BP. Sequenciamento e análise das regiões terminais invertidas e repetidas e de genes relacionados ao tropismo e virulência de amostras brasileiras de Vaccinia virus e da amostra vacinal lister butantan. Tese de Doutorado. Departamento de Microbiologia-ICB-UFMG. 2007.

DRUMOND BP, LEITE JA, *et al.* Brazilian Vaccinia virus strains are genetically divergent and differ from the Lister vaccine strain. *Microbes Infect.* v.10, n.2, p.185-97, 2008.

DUBOCHET J, ADRIAN M, *et al.*, Structure of intracellular mature vaccinia virus observed by cryoelectron microscopy. *Journal of Virology*, 68(3):1935-41, 1994,

DUCOURNAU C, REMBERT AF, *et al.*, Concomitant Human Infections with 2 Cowpox Virus Strains in Related Cases, France, 2011. *Emerging infectious disease*, v 19, n 12, 2013,

ESPOSITO JJ, SAMMONS SA, *et al.*, Genome sequence diversity and clues to the evolution of variola (smallpox) virus. *Science*, 313(5788):807-12, 2006,

ESSBAUER S PFEFFER M, MEYER H. Zoonotic poxviruses, *Veterinary Microbiology*, v. 140, p. 229–36, 2010

EVANS DH, STUART D, *et al.* High levels of genetic recombination among cotransfected plasmid DNAs in poxvirus-infected mammalian cells. *J Virol* , 62:367–375., 1988.

FENNER, F.; COMBEN, BM. Genetic studies with mammalian poxviruses. I. Demonstration of recombination between two strains of vaccinia virus. *Virology*, 5, 530-548, 1958

FENNER R, HENDERSON DA, *et al.* Smallpox and Its Eradication. Geneva: World Health Organization. 1988.

FENNER F, WITTEK R, *et al.* The Ortopoxviruses. 1^a ed. Academic Press. San Diego, Califórnia. 1989.

FERREIRA JM, DRUMOND BP, *et al.* Virulence in murine model shows the existence of two distinct populations of Brazilian Vaccinia virus strains. *PLoS One*. v.26, n.3, e3043, 2008.

FINLAY BB, MCFADDEN G. Anti-immunology: evasion of the host immune system by bacterial and viral pathogens. *Cell*. 2006. v.124, n.4, p.767-82

FONSECA FG, LANNA MCS, *et al.* Morphological and molecular characterization of the poxvirus BeAn 58058. *Archives of Virology* v.143, n.89, p.1171-86, 1998.

FONSECA FG, TRINDADE GS, *et al.* Characterization of a vaccinia-like virus isolated in a Brazilian forest. *J Gen Virol.* v.83, n.7, p.223-8, 2002

GARCEL,A.;PERINO,J,*etal*.Phenotypic and genetic diversity ofthe traditional Lister smallpox vaccine. *Vaccine* . 27, 708-17, 2009,

GIULIO DB, ECKBURG PB. Human monkeypox: an emerging zoonosis. *Lancet Infect Dis*. v.4, n.1, p.15-25, 2004.

GUBSER C, HUE S, *et al*. Poxvirus genomes: a phylogenetic analysis. *J Gen Virol*. v.85, n.1, p.105-17, 2004.

GURT I, ABDALRHMAN I & KATZ E. Pathogenicity and immunogenicity in mice of vaccinia viruses mutated in the viral envelope proteins A33R and B5R. *Antiviral Res* 69, 158–164, 2006.

HATCHER EL, HENDRICKSON RC *et al*. Identification of nucleotide-level changes impacting gene content and genome evolution in orthopoxviruses.. *J Virol*. 88, 23, pp13651-68, 2014.

HENDERSON DA. Smallpox as a biological weapon: medical and public health management. Working Group on Civilian Biodefense. *Jama*, v.281, n.22, p.2127-37, . 1999.

HENDERSON DA & MOSS B. Smallpox and vaccinia in vaccines. PLOTKIN, S.A. & ORESTEIN, W.A. 3rd ad. W.B. Saunders Company. Philadelphia, PA-USA, 74-97, 1999.

HOLMES EC. Virus evolution., *Fields virology*, 6th ed. Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia. p. 286, 2013.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES (ICTV) 2013. The big picture Book of Viruses: Poxviridae (<http://www.ncbi.nih.gov/ICTVdb/Ictv/index.htm>). Página visitada em: 15 de janeiro de 2015.

JOKLIK WK. The purification of four strains of poxvirus. *Virology*, v.18, n.56, p.9-18, 1962.

KALTHOFF D, BOCK W, *et al.*, Fatal Cowpox Virus Infection in Cotton-Top Tamarins (*Saguinus oedipus*) in Germany. *VECTOR-BORNE AND ZOONOTIC DISEASES*, V14, N 4, , 2014.

KATZ E, MARGALITH E, *et al.* Genetic recombination between a temperature sensitive mutant and an isatin β thiosemicarbazone (IBT) resistant mutant of vaccinia virus. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 4,2, pp159-62, 1978.

KAYSSER P, VON BOMHARD W, *et al.* Genetic diversity of feline cowpox virus, Germany 2000-2008. *Vet Microbiol*. 141(3-4), pp 282-8, 2010,

KROON EG, MOTA BE, *et al.* Zoonotic Brazilian Vaccinia virus: From field to therapy. *Antiviral Research*, v 92 p 150–63, 2011,

KUGELMAN JR, JOHNSTON SC, *et al.* Genomic variability of monkeypox virus among humans, Democratic Republic of the Congo. *Emerg Infect Dis.* 20,2, pp232-9, 2014.

KUMAR S, TAMURA K, *et al.* MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software for microcomputers. *Comput Appl Biosci.* v.10, n.2, p.189-91, 1994.

KURTH A, WIBBELT G, GERBER HP, PETSCHAEELIS A, PAULI G *et al.* Rat-to-elephant-to-human transmission of cowpox virus. *Emerg Infect Dis*, 14, pp 670-1, 2008,

KURTH A, STRAUBE M, *et al.* Cowpox virus outbreak in banded mongooses (*Mungos mungo*) and jaguarundis (*Herpailurus yagouaroundi*) with a time-delayed infection to humans. *PLoS One.* v.4, n.9, p.6883, 2009.

LEARNED LA, REYNOLDS MG, *et al.* Extended interhuman transmission of monkeypox in a hospital community in the Republic of the Congo, 2003. *Am J Trop Med Hyg.* 73(2):428-34, 2005.

LEITE JA, DRUMOND BP, *et al.* Passatempo virus: A novel VACV isolated during a zoonotic outbreak in Brazil. *Emerging Infections Disease.* v.11, n.12, p.1935- 8, 2005.

LEITE JA, DRUMOND BP, *et al.* Brazilian Vaccinia virus strains show genetic polymorphism at the *ati* gene. *Virus Genes.* v 35 p 531–9, 2007.

LI Y, CARROLL D S, *et al.* On the origin of smallpox: correlating variola phylogenics with historical smallpox records. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 15787–92, 2007.

LIU, C.; DU, S *et al.* Immunogenicity analysis following human immunodeficiency virus recombinant DNA and recombinant vaccinia virus Tian Tan prime-boost immunization. *Sci China Life Sci*, 56, 531–40, 2013.

LIKOS AM, SAMMONS SA *et al.* A tale of two clades: monkeypox viruses. *J.Gen.Virol*, 2005, v 86, p 2661-72.

LOBATO ZIP, TRINDADE GS, *et al.* Surto de vaccínia bovina causada pelo vírus Vaccinia na região da Zona da Mata Mineira. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. v.32, n.54, p.45-52, 2005.

LOPES S, LACERDA JP, *et al.* Cotia virus: a new agent isolated from sentinel mice in São Paulo, Brazil. *The Am j trop med hyg*. v.210, n.1, p.67-72, 1965.

MCCOLLUM AM, DAMON IK. Human monkeypox. *Clin Infect Dis*. Jan;58(12):260-7, 2014.

MCFADDEN, G. Poxvirus Tropism. *Nature Reviews*. v.3, n.3, p.201-13, 2005.

MEDAGLIA ML, PESSOA LC, *et al.* Spread of cantagalo virus to northern Brazil. *Emerg Infect Dis*. v.15, n.7, p.1142-3, 2009.

MEGID J, APPOLINÁRIO CM, *et al.* Vaccinia virus in humans and cattle in southwest region of Sao Paulo state, Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* v.79, n.5, p.646, 2008.

MERCER J, KNÉBEL S *et al.* Vaccinia virus strains use distinct forms of macropinocytosis for host-cell entry. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107,20,pp9346-51, 2010.

MEYER H, SCHAY C, *et al.* Characterization of orthopoxviruses isolated from 5 man and animals in Germany. *Arch Virol.* , v.144(3), p. 491-501, 1998

MEYER H, PFEFFER M *et al.* Sequence alterations within and downstream of the A-type inclusion protein genes allow differentiation of orthopoxvirus species by polymerase chain reaction. *Journal of General Virology*, v. 75, p. 1975–81, 1994.

MOSS B. Poxvirus entry and membrane fusion. *Virology* . v.344, n.1, p.48-54, 2006.

MOSS, B., *Poxviridae.*, *In Fields virology*, 6th ed. Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, Pa., p. 2129, 2013.

MOTA BE, TRINDADE GS, *et al.* Seroprevalence of orthopoxvirus in an Amazonian rural village, Acre, Brazil. *Arch Virol.* v.155, n.7, p.1139-44, 2010.

NAKAZAWA Y, EMERSON GL, *et al.* Phylogenetic and ecologic perspectives of a monkeypox outbreak, southern Sudan, *Emerg Infect Dis.* 2013, 19(2):237-45, 2005.

NALCA A, RIMOIN AW, *et al.* Reemergence of monkeypox: prevalence, diagnostics, and countermeasures. *Clin Infect Dis.* v.41, n.12, p.1765-71, 2005.

NINOVE L, DOMART Y, *et al.* Cowpox virus transmission from pet rats to humans, France. *Emerg Infect Dis.* v.15, n.5, p.781-4, 2009.

NORA,T, CHARPENTIER,C, *etal.*Contribution of recombination to the evolution of human immunodeficiency viruses expressing resistance to antiretroviral treatment. *J Virol.* 81(14):7620-8, 2007.

OJEDA S, DOMI A, *et al.* Vaccinia virus G9 protein is an essential component of the poxvirus entry-fusion complex. *J Virol.* v.80, n.19, p.9822-30, 2006.

OKEKE MI, OKOLI AS, *et al.* Molecular characterization and phylogenetics of Fennoscandian cowpox virus isolates based on the p4c and atip genes. *Virology* 511:119, 2014 ,

OLSON VA, KAREM KL, *et al.* Smallpox virus plaque phenotypes: genetic, geographical and case fatality relationships. *Journal of General Virology*, 90, 792–798, 2009,.

OLIVEIRA DB; ASSIS FL *et al.* Group 1 Vaccinia virus zoonotic outbreak in Maranhão State, Brazil. *The Am J Trop Med Hyg.* v.89, n.5, 2013.

OLIVEIRA GP; FERNANDES AT, *et al* .Intrafamilial Transmission of Vaccinia virus during a Bovine Vaccinia Outbreak in Brazil: A New Insight in Viral Transmission Chain. *The Am JTMHn*, v.91, p.1021-23, 2014.

PARKINSON, J. E. & SMITH, G. L. Vaccinia virus gene A36R encodes a Mr 43–50 K protein on the surface of extracellular enveloped virus. *Virology*, 204, 376–390, 1994,

PAYNE, L. G. Significance of extracellular enveloped virus in the in vitro and in vivo dissemination of vaccinia. *J Gen Virol*. 50, 89–100, 1980,

PELKONEN PM, TARVAINEN K, *et al*. Cowpox with severe generalized eruption, Finland. *Emerg Infct Dis*. v.9, n.11, p.1458-61, 2003.

PERES MG; BACCHIEGA TS, *et al*. Serological study of Vaccinia virus reservoirs in areas with and without official reports of outbreaks in cattle and humans in São Paulo, Brazil. *Archives of Virology*, v.158, n.12, p.2433-41, 2013

QIN L, UPTON C, *et al*. Genomic analysis of the vaccinia virus variants found in Dryvax vaccine. *J Virol* . 85, 13049-60, 2011.

QIN L, LIANG M, *et al*. Genomic analysis of vaccinia virus strain TianTan provides new insights into the evolution and evolutionary relationships between Orthopoxviruses. *Virology* 442, 59-66, 2013.

QIN L; EVANS DH, *et al*. Genome scale patterns of recombination between coinfecting vaccinia viruses. *J Virol* 88, 5277-86, 2014.

RADONIĆ A, METZGER S, et al. Fatal monkeypox in wild-living sooty mangabey, Côte d'Ivoire, 2012. *Emerg Infect Dis.* 20, 6, pp 1009-11, 2014.

RIMOIN AW, KISALU N, *et al.* Endemic human monkeypox, Democratic Republic of Congo, 2001-2004. *Emerg Infect Dis.* 13,6,pp937-9, 2007.

RIMOIN AW, MULEMBAKANI PM, *et al.* Major increase in human monkeypox incidence 30 years after smallpox vaccination campaigns cease in the Democratic Republic of Congo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* v.14, n.58, p.16262-7, 2010.

REYNOLDS MG, CARROLL DS , *et al.* Factors affecting the likelihood of monkeypox's emergence and spread in the post-smallpox era *Current Opinion in Virology*, v 2,n 3, p335 – 34e, 2012,

REYNOLDS MG, EMERSON GL, *et al.* Detection of human monkeypox in the Republic of the Congo following intensive community education. *Am J Trop Med Hyg.* 88, 5, pp 982-5, 2013.

ROOP SL, JIN Q, *et al.* PCR strategy for identification and differentiation of small pox and other orthopoxviruses. *J Clin Microbiol.* v.33, n.8, p.2069-76, 1995.

SANGER F, NICKLEN S, *et al.* DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Biotechnology*. v.24, n.54, p.104-8, 1977.

SANT'ANA FJF, LEAL FAA, *et al.* Coinfection by *Vaccinia virus* and *Orf virus*-like parapoxvirus in an outbreak of vesicular disease in dairy cows in Midwestern Brazil. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.25, n.2, p.267-72, 2013.

SCHATZMAYR HG, ROMJIN PC, *et al.* An outbreak of vesicopustular disease in humans and dairy cattle in the state of Rio de Janeiro in 2006. *Virus Reviews & Research*, v 10 p 61-3, 2005.

SCHATZMAYR HG, COSTA RVC, *et al.* Human infections caused by vaccinia-like poxviruses in Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v 42 ed 6, p 672-6, 2009.

SCHATZMAYR HG, COSTA RVC, *et al.* Human and animal infections by vaccinia-like viruses in the state of Rio de Janeiro: A novel expanding zoonosis. *Vaccine*, v 29, n4, p 65-9, 2011,

SCHMIDT FI; BLECK CKE *et al.* Vaccinia Virus Entry Is Followed by Core Activation and Proteasome-Mediated Release of the Immunomodulatory Effector VH1 from Lateral Bodies. *Cell Reports*. v.4, n.3, p.464-76, 2013.

SHCHELKUNOV SN. An increasing danger of zoonotic orthopoxvirus infections. *PLoS Pathog*. v 12, n 9, e1003756, 2013.

SENKEVICH TG, OJEDA S, *et al.* Poxvirus multiprotein entry-fusion complex. Proc Natl Acad Sci U S A. v.102, n.51, p.18572-7, 2005.

SENKEVICH TG, WARD BM, *et al.* Vaccinia Virus Entry into Cells Is Dependent on a Virion Surface Protein Encoded by the A28 Gene. Journal of Virology. v.78, n.5, p.2357-66, 2003.

SILVA-FERNANDES AT, TRAVASSOS CE, *et al.* Natural human infections with Vaccinia virus during bovine vaccinia outbreaks. J Clin Virol. v.44, n.4, p.308-13, 2009.

SIMONETTI B.R., *et al.* Animal infections by vaccinia-like viruses in the State of Rio de Janeiro: 1- northwestern region. Virus Reviews & Research., v. 12, n. 1-2, p. 32-6, 2007.

SMITH GL, MCFADDEN G. Smallpox: anything to declare? Nat Rev Immunol. v.2, n.7, p.521-7, 2002.

SMITH GL, VANDERPLASSCHEN A., *et al.* The formation and function of extracellular enveloped VACV. Journal of General Virology. v.86, n.5, p.1279-90, 2002.

TOWNSLEY AC, WEISBERG AS, *et al.* Vaccinia virus entry into cells via a low-pHdependent endosomal pathway. J Virol, v.80, n.18, p.8899-908, . 2006.

TRINDADE GS, DA FONSECA FG, *et al.* Araçatuba virus, a vaccinia-like virus associated with infections in humans and cattle. *Emerg Infect Dis.* v.9, n.2, p.155-60, 2003.

TRINDADE GS, DA FONSECA FG, *et al.* Belo Horizonte virus: a vaccinia-like virus lacking the A-type inclusion body gene isolated from infected mice. *J. Gen Virol.* v.434, n.54, p.56-9, 2004.

TRINDADE GS, LOBATO ZI, *et al.* Short report: Isolation of two vaccinia virus strains from a single bovine vaccinia outbreak in rural area from Brazil: Implications on the emergence of zoonotic orthopoxviruses. *Am J Trop Med Hyg.* v.75, n.3, p.486-90, 2006.

TRINDADE GS; EMERSON GL, *et al.* Brazilian Vaccinia Viruses and Their Origins. *Emerg Infect Dis* ,13, 965-972, 2007.

TRINDADE GS, DRUMOND, B. P.; *et al.* Zoonotic Vaccinia virus infection in Brazil: Clinical description and implications for health professionals. *Journal of Clinical Microbiology*, v.45, n.4, p.1370-72, 2007b.

TRINDADE G.S., *et al.* Zoonotic Vaccinia Virus: Clinical and Immunological Characteristics in a Naturally Infected Patient. *Clinical Infectious Diseases*, v 48, p 37-40, 2009.

VORA S, DAMON I, *et al.* Severe eczema vaccinatum in a household contact of a smallpox vaccine. *J. Clin Infect Dis.* v.15, n.54, p.1555-61, 2008.

WELTZIN R, LIU J *et al.* Clonal vaccinia virus grown in cell culture as a new smallpox vaccine. *Nature Medicine*. v 9, p 1125 – 30, 2003.

WOLFS TF, WAGENAAR, JA, *et al.* Rat-to-human transmission of cowpox infection. *Emerg Infect Dis*. v.8, n.12, p.1495-3, 2002.

ZHANG, W. H., WILCOCK, D. & SMITH, G. L. Vaccinia virus F12L protein is required for actin tail formation, normal plaque size, and virulence. *J Virol*, 74, 11654–62, 2000.

ZHU R, LIU Q, HUANG W, *et al.* Comparison of the replication characteristics of vaccinia virus strains Guang 9 and Tian Tan in vivo and in vitro. *Arch Virol*. 159, 10, pp 2587-9, 2014.

X. PRODUÇÕES CIENTÍFICAS

ANEXOS

**ARTIGOS DIRETAMENTE
RELACIONADOS AO TRABALHO DE
MESTRADO
(SUBMETIDOS_EM FASE DE REVISÃO)**

Article

From lesions to viral clones: biological and molecular diversity amongst autochthonous Brazilian *Vaccinia virus*

Graziele Oliveira¹, Felipe Assis¹, Gabriel Almeida², Jonas Albarnaz¹, Maurício Lima¹, Ana Cláudia Andrade¹, Rafael Calixto¹, Cairo Oliveira³, José Diomedes Neto⁴, Giliane Trindade¹, Paulo César Ferreira¹, Erna Geessien Kroon¹ and Jônatas Abrahão^{1,*}

¹ Laboratório de Vírus, Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil; E-Mails: graziufmg@yahoo.com.br (G.O.); felipelopeassis@gmail.com (F.A.); jonasalbarnaz@yahoo.com.br (J.A.); maurili15@hotmail.com (M.L.); ana.andrade2008@hotmail.com (A.C.A.); calixtomicro@yahoo.com.br (R.C.); gitrindade@yahoo.com.br (G.T.); peregrinopcp@hotmail.com (P.C.F.); ernagkroon@gmail.com (E.K.).

² Laboratório Oficial de Diagnóstico de Doenças de Animais Aquáticos do Ministério da Pesca e Aquicultura, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil; E-mail: gabriel.magno@gmail.com (G.A.).

³ Laboratório de Retrovírus dos Animais, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil; E-mail: cairo_henrique@yahoo.com.br

⁴ Centro Agropecuário, Departamento de Ciência Animal, Universidade Federal do Pará, Pará, Brasil; E-mail: diomedes@ufpa.br

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: jonatas.abrahao@gmail.com (J.A.); Tel.: + 55 31 3409 2539 (J.A.).

Abstract

Vaccinia virus (VACV) played an important role for humanity because of its use during the smallpox eradication campaign. VACV is the etiologic agent of the bovine vaccinia (BV), an emerging zoonosis that has been associated with economic, social, veterinary and public health problems, mainly in Brazil and India. Despite the current and historical

VACV importance, there is little information about its circulation, prevalence, origins and maintenance in the environment, natural reservoirs and diversity. Brazilian VACV (VACV-BR) are grouped into at least two groups based on genetic and biological diversity: group 1 (G1) and group 2 (G2). In this study, we went to the field and investigated VACV clonal diversity directly from exanthemous lesions, during BV outbreaks. Our results demonstrate that the G1 VACV-BR were more frequently isolated. Furthermore, we were able to co-detect the two variants (G1 and G2) in the same sample. Molecular and biological analysis corroborated previous reports and confirmed the co-circulation of two VACV-BR lineages. The detected G2 clones presented exclusive genetic and biological markers, distinct to reference isolates, including VACV-Western Reserve. Two clones presented a mosaic profile, with both G1 and G2 features based on the molecular analysis of A56R, A26L and C23L genes. Indeed, some SNPs and INDELS in A56R nucleotide sequences were observed among clones of the same virus population, maybe as a result of an increased mutation rate in a mixed population. These results provide information about the diversity profile in VACV populations, highlighting its importance to VACV evolution and maintenance in the environment.

Keywords: *Vaccinia virus*; clones; diversity; evolution.

Introduction

Vaccinia virus (VACV) had an important role in human history due to its use as vaccine during the smallpox vaccination campaign, resulting on the eradication of this deadly disease in 1980 (Fenner R, 1988). More recently, VACV has been widely used as a vector of the recombinant vaccines (Chen H, 2012; Deng Y, 2009; Liu C, 2013). Following Smallpox eradication, other zoonotic orthopoxviruses (OPV) have emerging worldwide, such as *Cowpox virus* (CPXV), in Europe, *Monkeypox virus* (MPXV), endemic in many African countries and recently introduced in the USA, and finally VACV, endemic in Brazil and India (Reynolds MG, 2012; Pahlitzsch R, 2006; Karem KL, 2005; Rimoin AW, 2007; Rimoin AW, 2010; Singh RK, 2007; Kalthoff D, 2014; Trindade GS, 2009; Kroon EG, 2011; Oliveira DB, 2013). VACV is the causative agent of bovine vaccinia (BV), an exanthemous disease responsible for outbreaks that affect both bovines and humans, causing public health impacts and economic losses in South America and India. (Trindade GS, 2009; Silva-Fernandes AT, 2009; Kroon EG, 2011; Megid J, 2008; Oliveira DB, 2013). The clinical prognosis of BV involves the appearance of papules that progress to vesicles and growing scabs mainly on teats and udder of infected bovines. In humans, the lesions occur primarily on milkers hands and arms. Other symptoms, such as fever, myalgia, headache, arthralgia and lymphadenopathy are also frequently reported (Damon, IK, 2013; Kroon EG, 2011). During outbreaks, the direct contact with infected animals is the main transmission route to humans, but it may also occur by contact with contaminated fomites (Damon, IK, 2013; Assis FL, 2013;). Furthermore, reports suggested a possible human-to-human route for the VACV transmission (Batista VH, 2009; Oliveira GP, 2013). In Brazil, VACV was first isolated from rodents in the 60's and since 1999 BV outbreaks have been consistently reported

(Lopes S, 1965; Da Fonseca FG, 2002; Fonseca FG, 1998; Trindade GS, 2004 Damaso CR.,2000; Megid J, 2008; Trindade GS, 2009; Assis, FL,2012; Oliveira DB, 2013). A few years later, some reports have shown a great genetic and biologic heterogeneity among Brazilian VACV (VACV-BR) isolates. This variability allowed clustering of VACV-BR into at least two distinct groups (Group 1 – G1 and Group 2- G2), demonstrating a dichotomy sustained by molecular and biological diversity such as virulence in the BALB/c mouse model and plaque phenotype in BSC-40 cells. Group 2 strains displays higher plaque sizes and are virulent to mice, unlike Group 1. (Ferreira JM, 2008; Trindade GS, 2006; Drumond BP, 2008; Campos RK, 2010; Assis FL, 2012). Moreover, polymorphisms observed in specific VACV genes, such as hemagglutinin gene (A56R), A-type inclusion body gene (A26L) and chemokine binding protein gene (C23L), have been used in phylogenetic studies and further confirmed the dichotomy between G1 and G2 VACV-BR (Leite JA, 2007; Drumond BP, 2008; Damaso CR, 2000; Assis FL, 2012).

The VACV-BR G2 is comprised by the viral isolates Guarani P1 virus (GP1V), Pelotas 1 virus (P1V), Belo Horizonte virus (VBH), the newest virus Serro human isolate (SH2V) and others, while G1, the group most frequently reported during BV outbreaks, is comprised by the isolates Araçatuba virus (ARAV), Cantagalo virus (CTGV), Mariana virus (MARV), Guarani P2 virus (GP2V), Pelotas 2 virus (P2V) and others (Damaso CR, 2000; Trindade GS, 2003; Trindade, 2004; Abrahão JS, 2009; Assis FL, 2012; Trindade GS, 2006; Campos R.K,2011). It is worth mentioning that the GP1V and GP2V were isolated during a same outbreak (co-circulation), while P1V and P2V were isolated from the same clinical sample (co-infection) (Trindade GS, 2006; Campos R.K,2011).

Several studies have demonstrated genetic and biological diversity among isolates of the same species of a given OPV, including *Variola virus* (VARV), CPXV and MPXV. Diversity studies among MPXV isolates have revealed the existence of a dichotomy supported by differences in epidemiological and clinical features, while CPXV is clustered in four or more groups. Furthermore, studies about VARV variability have demonstrated the existence of at least two groups with distinct virulence profiles: variola major and variola minor. Taken together, these studies showed a great biological and genetic diversity amongst isolates from different OPV species. (Kugelman JR, 2014, Okeke, M.I 2014, Gubser, C, 2004; Chen N, 2005; Emerson GL, 2009; Esposito JJ, 2006; Gubser C, 2010; Reed KD, 2004).

Osborne and colleagues in 2007 have shown high genetic variability among clones of the smallpox vaccine strain Dryvax. Moreover, other studies reveals that old vaccines were a complex mixture of viruses with a large number of single-nucleotide polymorphisms (SNPs) besides insertions and deletions (INDELS), resulting in genetic and phenotypically distinct clones (Garcel A, 2009; Morikawa S, 2005; Qin L, 2013; Qin L, 2011). Besides, recombination events can occur among OPVs since it has been observed in VACV co-cultures and between VARV and CPXV (Fenner F, 1958; Bedson HS, 1964; Qin L, 2014). Together these studies suggest that poxviruses from a same species exists as distinct genetical groups and can recombine inside co-infected hosts, which increases the importance of studying the genetic variability among strains and clones of poxviruses circulating in environment. Even though studies using vaccine strains clones shows that VACV can recombine, there is an absence of data concerning VACV clones from field samples. This work aims to contribute with the understanding about the biological and genetic variability among field VACV clones by using genetic and biological analyses to study the diversity of VACV populations isolated during BV outbreaks.

2. Materials and Methods

2.1 Ethics Approval

The study was approved by the Committee of Ethics in Animal Use from the Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA/UFMG). The animals were anesthetized by intraperitoneal injection of ketamine and xylazine before the infection and those ones that had lost more than 25% of their initial body weight were euthanized with an overdose of anesthetics.

2.2 Cells and Viruses

African green monkey kidney BSC-40 and VERO cells were maintained in 5% CO₂ atmosphere with 37°C in Eagle's Minimum Essential Medium (MEM) (Gibco BRL, Invitrogen, Carlsbad, California, USA) supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS) (Cultilab, Brazil), 25 µg/mL fungizone (Amphotericin B) (Cristália, São Paulo, Brazil), 500 U/mL penicillin and 50 µg/mL gentamicin (Schering-Plough, São Paulo, Brazil). VERO cells were used for viral isolation and replication. The BSC-40 cells were used for viral plaque purification, plaque phenotype, comet phenotype and growth curve assays. The VACV Western Reserve (VACV-WR) was gently provided by Dr C. Jungwirth (Universität Würzburg, Germany) and was used as a virulent control in mice assays.

2.3 Clinical samples

Clinical samples, consisting of swabs of vesicular fluids and scabs obtained from cattle' teats and milkers' hands, were collected during BV outbreaks that occurred between 2005 and 2011 in five Brazilian states: Minas Gerais, Bahia, Goiás, Espírito Santo and Pará. Sample collection procedures were performed by veterinarians, following institutional recommendations. Two viruses were isolated from human samples, obtained at Bahia and Minas Gerais states; and eight viruses were isolated from bovine samples, two obtained from Bahia state, two from Para state, two from Goiás state, one from Minas Gerais state and one from Espírito Santo state. The counties and states where the samples were isolated are shown in Table 1 and Figure 1.

Table 1. Identification of viral clones isolated from clinical samples.

VACV-BR isolates (abbreviation)	Isolated Clones	Source	Isolation State	Isolation Year
VACV-BABV	VACV-BABV Clone 1 to Clone 5	<i>Bos taurus</i>	Bahia	2011
VACV-BAB2V	VACV-BAB2V Clone 1 to Clone 5	<i>Bos taurus</i>	Bahia	2011
VACV-BAHV	VACV-BAHV Clone 1 to Clone 5	<i>Homo sapiens</i>	Bahia	2011
VACV-GOBV	VACV-GOBV Clone 1 to Clone 5	<i>Bos taurus</i>	Goiás	2011
VACV-GOB2V	VACV-GOB2V Clone 1 to Clone 5	<i>Bos taurus</i>	Goiás	2011
VACV-ESBV	VACV-ESBV Clone 1 to Clone 5	<i>Bos taurus</i>	Espírito Santo	2008
VACV-MGBV	VACV-MGBV Clone 1 to Clone 4	<i>Bos taurus</i>	Minas Gerais	2005
VACV-MGHV	VACV-MGHV Clone 1 to Clone 5	<i>Homo sapiens</i>	Minas Gerais	2011
VACV-PABV	VACV-PABV Clone 1 to Clone 5	<i>Bos taurus</i>	Pará	2011
VACV-PAB2V	VACV-PAB2V Clone 1 to Clone 4	<i>Bos taurus</i>	Pará	2010

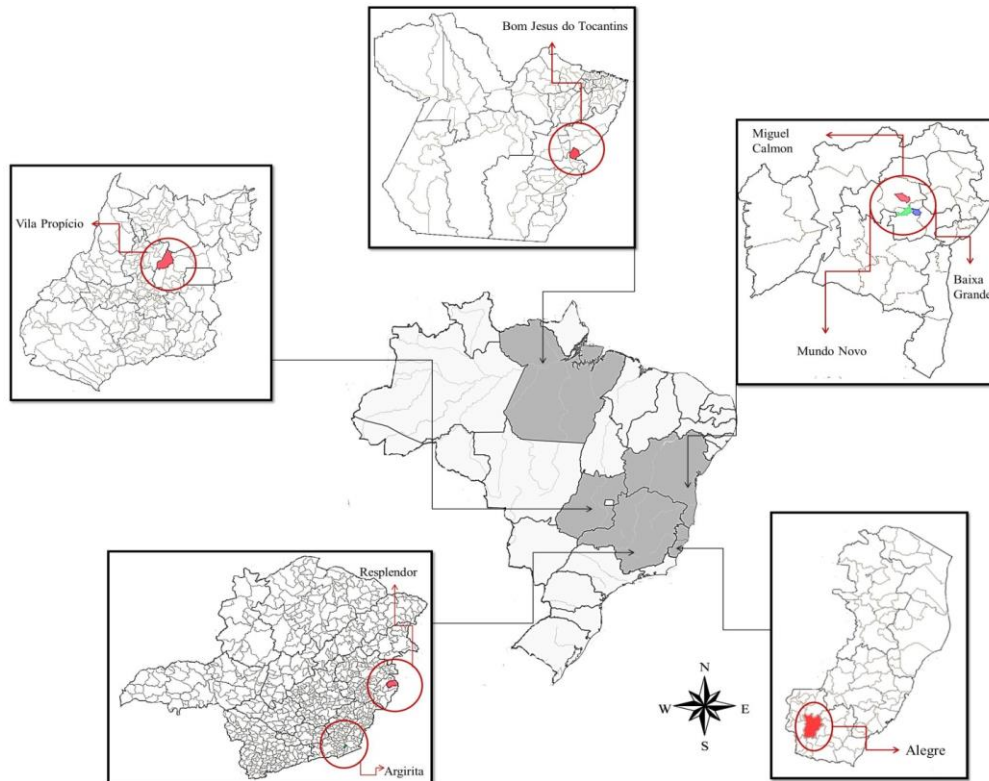


Figure 1. Map displaying Brazilian states and counties from which the clinical samples used for *Vaccinia virus* clone isolation were collected. The red circles indicate the counties where the samples were collected: Miguel Calmon, Baixa Grande and Mundo Novo counties localized in Bahia state, Vila Propício county localized in Goiás state, Bom Jesus do Tocantins county localized in Pará state, Resplendor and Argirita counties localize in Minas Gerais States and Alegre county in Espírito Santo state.

2.4 Sample Processing and Virus Isolation

Scabs were macerated using a homogenizer (Politron, Littau, Switzerland) in phosphate buffer saline (PBS) (0.1 g scab/0.9 mL PBS) containing 200 U/mL penicillin, 4 µg/mL amphotericin B and 100 µg/mL gentamicin, and then clarified by centrifugation at 2000 x g for 3 minutes(min). To the swabs, 200 µL of PBS were added, followed by a centrifugation at 2000 x g for 3 min. (Abrahão JS, 2009). For virus isolation, 200µL of supernatant were added to VERO cells monolayers which were incubated after adsorption at 37°C for 72 hours or until detection of cytopathic effect (CPE).

2.5 Viral Clone Plaque Purification

BSC-40 cells were used for viral plaque purification as described elsewhere (Campos e Kroon, 1993). After isolation, each virus isolate was serially diluted (log₁₀) and inoculated into BSC-40 cells monolayers cultured in 6-well plates for clone selection and viral plaque purification. After 1h of incubation (at 37°C, 5%CO₂), culture medium was removed, cell monolayers were washed twice with PBS and solid medium (MEM supplemented with 1% FBS + agarose 1%) was added. After 48 hours, five viral plaques from each sample were collected and purified in BSC40 cells with solid medium. The criteria used to choose the clones was the plaque size: after measurement, small and large viral plaques, ranging from 0.3 mm to 2 mm, were collected from each sample. Individual clones were then isolated by serial plaque-purifications in three passages in BSC40 cells using 1% agarose overlay. The resulting clones were propagated in Vero cells monolayers, purified and titrated as described (Joklik WK, 1962; Campos e Kroon, 1993). Isolated VACV strains and clones are shown in Table 1.

In two clinical samples, only four viral clones were kept after the three passages (Table 1).

2.6 Biological Assays:

2.6.1 Plaque Phenotype

For plaque phenotype assays, BSC40 cells seeded in 6-well plates at 90–95% confluence were infected with specific clones. After 1h of adsorption (37°C, 5%CO₂), monolayers were washed twice with PBS and overlaid with solid medium prepared by mixing equal proportion (1:2) of 1% agarose and 2X Eagle's minimum essential medium (MEM) supplemented with 2% FBS. After 48h of incubation (37°C, 5%CO₂), cells were fixed with formaldehyde and stained with crystal violet for plaque size analysis.

2.6.2 Comet Phenotype Assay

For comet phenotype assays, BSC40 cells seeded in 6-well plates at 90–95% confluence were infected with the large plaque clones. After 1 hour of adsorption (37°C, 5%CO₂), the medium was removed, monolayers were washed twice with PBS and fresh MEM supplemented with 1% FBS was added. After 48 hours of incubation (37°C, 5% CO₂), the cells were fixed with paraformaldehyde and stained with crystal violet.

2.6.3 Growth curve assays

BSC-40 cells were grown in 24-well plates and infected with VACV clones in biological duplicates. Infection was carried out at a MOI (multiplicity of infection) of 0,01 for 0, 12, 24 and 48 hours post infection (hpi). Infected monolayers were then harvested, frozen (-70°C) and thawed (37°C) three

times and titrated in BSC-40 cells as described. Statistical analysis was performed with GraphPad Prism software.

2.7 Virulence in BALB/c Mice

To compare the virulence profile of these new clonal VACV isolates, five clones were selected for virulence assays. Mice were housed in filter-top microisolator cages and provided with commercial mouse food and water *ad libitum*. All the animal experiments were carried out in accordance with regulations and guidelines of the Committee of Ethics in Animal Use of the Universidade Federal de Minas Gerais/Brazil. BALB/c mice were anesthetized by intraperitoneal injection of ketamine and xylazine (3.2 mg and 0.16 mg/mice in 0.9% PBS, respectively) before the procedure. Groups of four-week old male BALB/c mice (n=4) were inoculated intranasally with 10 μ L of viral suspensions containing 10^6 plaque forming units (pfu). VACV-WR was used as positive control, given its virulence for mice, and the negative control group was inoculated with 10 μ L of PBS. Mice were weighed daily, and clinical signals were recorded for 10 days post infection (dpi) (Ferreira et al, 2008). Mice that lost more than 25% of their initial weight were euthanized.

2.8 Molecular assays

2.8.1 Amplification of A56R, A26L and C23L genes and phylogenetic analyses.

For the clones molecular characterization, DNA extractions were carried out using phenol-chloroform-isoamyl alcohol (PCI) (Sambrook J, 1989) and used as template for Polymerase chain reaction (PCR) amplification of the viral genes A56R (hemagglutinin), C23L (chemokine binding protein) and A26L (A-type inclusion body). These genes are traditionally used for OPV phylogenetic studies, including Brazilian VACV strains (Drumond BP, 2008; Assis FL, 2013; Leite JA, 2007).

Two different reactions were made for C23L: reaction 1 was made using the primer pair 5'GCGTGTCCCCAGGACAAGGT3' 5' ATGTCGCTGTCTTTCTCTTCTTCGC 3', amplifying a 124 base pairs (bp) DNA fragment found in both VACV-BR groups. Reaction 2 was made with the primer pair 5'GCGTGTCCCCAGGACAAGGT3' and 5'CTGGATGGGTCTTG3', amplifying a 138 bp DNA fragment of VACV-BR Group 2 viruses but not from VACV-BR Group 1 viruses. This is possible since the reverse primer anneals to a region present on group 2 but deleted in group 1. PCR conditions were 94 °C for 10 min, 30 cycles of 94 °C for 30 seconds, 50 °C for 30 seconds and 72°C for 30 seconds, followed by 72 °C for 10 min. A semi-nested PCR was made for A26L, using the primer pair 5'ACCACGTCTACTCTCGGCGA3' and 5'TGCATCGAGAGCGGAGGAGGA'3 for the first reaction and the primer pair 5'ACCACGTCTACTCTCGGCGA3' and 5'CGATGCCAAGTACATCGACGA3' for the second reaction. Amplicon sizes are 750bp and 160bp respectively, and reaction conditions were: 95 °C for 10 min. 30 cycles of 95 °C for 1 min, 60 °C for 1 min and 72°C for 1 min, followed by 72 °C for 10 min. Reactions were carried out using 10-50 ng of DNA as template with 0,4 mM of each primer; 0,1M tris-HCl (pH 8.4); 0,5M KCl; 2.5 mM MgCl₂; 10 mM of each dNTPs and 2U Taq DNA polymerase to a final volume of 20 μ L. Brazilian isolates GP1V and GP2V were used as positive controls. Reactions for the A56R gene were made as

previously described (Trindade GS, 2008.) PCR products were electrophoresed in 8%-PAGE and silver stained (Sambrook. 2001).

For sequencing, the A56R gene was amplified with primers and conditions described elsewhere (Ropp et al., 1995), resulting in amplicons of approximately 900 bp. The A56R fragments were sequenced in both orientations and in duplicate in an automated DNA sequencer (ABI PRISM, Applied Biosystems). The sequences were aligned with previously published OPV sequences from GenBank (accession numbers can be found in the figures) using MEGA software version 6.1 (Arizona State University, Phoenix, AZ, USA). The phylogenetic tree based on the A56R gene sequences was constructed by the Maximum Likelihood method based on the Tamura-Nei model implemented in MEGA6.1. A56R sequences from clonal VACV-BR obtained in this study were deposited in GenBank. (BAB2V-Clone 1:KP282618; BAB2V-Clone 2: KP282619; BAB2V-Clone 3:KP282620; BAB2V Clone 4: KP282621; BAB2V-Clone 5: KP282622; MGHV-Clone 1: KP282623; MGHV-Clone 2: KP282624; MGHV-Clone 3: KP282625; MGHV-Clone 4: KP282626; MGHV-Clone 5: KP282627; BAHV-Clone 1: KP282628; BAHV-Clone 2: KP282629; BAHV-Clone3: KP282630; BAHV-Clone 4: KP282631; BAHV-Clone 5: KP282632; ESBV-Clone 1: KP282633; ESBV-Clone2: KP282634; ESBV-Clone 3: KP282635; ESBV-Clone 4: KP282636; ESBV-Clone 5: KP282637; GOB2V-Clone 1: KP282638; GOB2V-Clone 2: KP282639; GOB2V-Clone 3: KP282640; GOB2V-Clone 4: KP282641; GOB2V-Clone 5: KP282642; MGBV-Clone 1: KP282643; MGBV-Clone 2: KP282644; MGBV-Clone 3: KP282645; MGBV-Clone 4: KP282646; PAB2V-Clone 1: KP282647; PAB2V-Clone 2: KP282648; PAB2V-Clone 3: KP282649; PAB2V-Clone 4: KP282650; BABV-Clone 1: KP282651; BABV-Clone 2:KP282652; BABV-Clone 3: KP282653; BABV-Clone 4: KP282654; BABV-Clone 5: KP282655; GOBV-Clone 1: KP282656; GOBV-Clone 2: KP282657; GOBV-Clone 3: KP282658; GOBV-Clone 4: KP282659; GOBV-Clone 5: KP282660; PABV-Clone 1: KP282661; PABV-Clone 2: KP282662; PABV-Clone 3:KP282663; PABV-Clone 4: KP282664; PABV-Clone 5: KP282665.

3. Results

3.1 Viral clones isolation and biological assays

Upon inoculation onto Vero cells, the ten clinical samples presented typical OPV CPEs, such as lysis plaques, cell agglomerates and formation of vacuoles were observed. No changes were observed in negative control. Then, a total of 48 viral clones (isolated lysis plaques) from the ten clinical samples were selected. It is important to emphasize that a higher prevalence of small plaques was observed during plaque selection. After three rounds of plaque purification, the selected clones were expanded and purified in sucrose cushion. Biological assays such as plaque phenotype, comet phenotype and growth curve assays, were performed to compare the isolated clones. Plaque phenotype assays showed that the clones produced distinct plaques size (Figure 2 and Supplementary Figure 1). The VACV-BABV and VACV-GOBV revealed interesting results. Three clones isolated from the VACV-BABV (BABV-Clone 2, BABV-Clone 3 and BABV-Clone 4) showed a large-plaque profile, while two other clones (BABV-Clone 1 and BABV-Clone 5) presented a small-plaque profile; and the VACV-GOBV showed a single clone (GOBV-Clone 2) with a large-plaque profile and four clones (GOBV-Clone 1, GOBV-Clone 3, GOBV-Clone 4 and GOBV-Clone 5) with the small-plaque

profile. These results demonstrate the co-circulation of VACV with at least two distinct plaque-size phenotypes in the same VACV population. The clones obtained from the other isolations showed only small plaque phenotype.

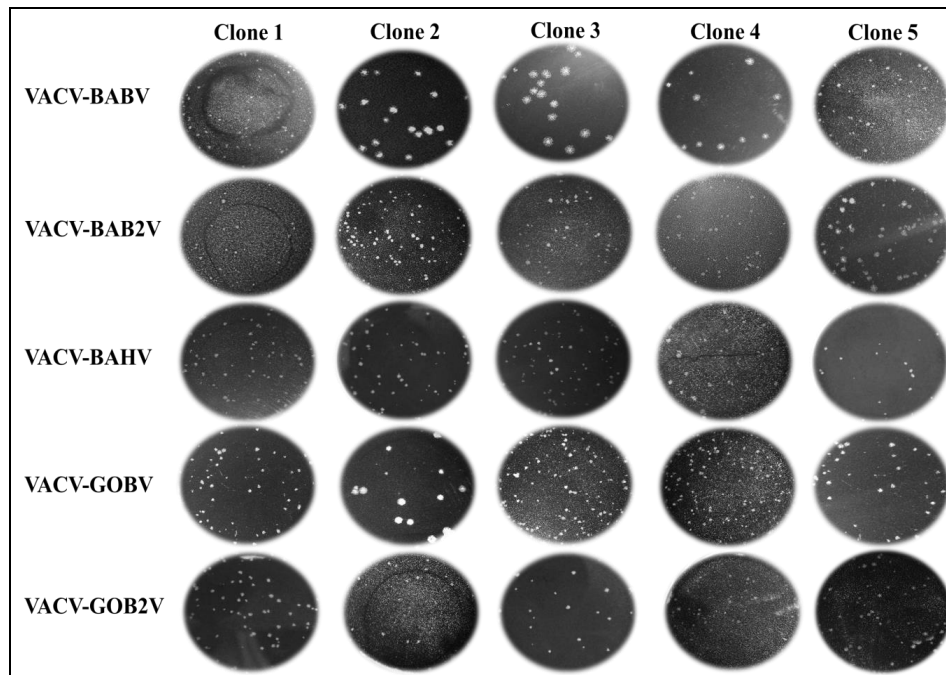
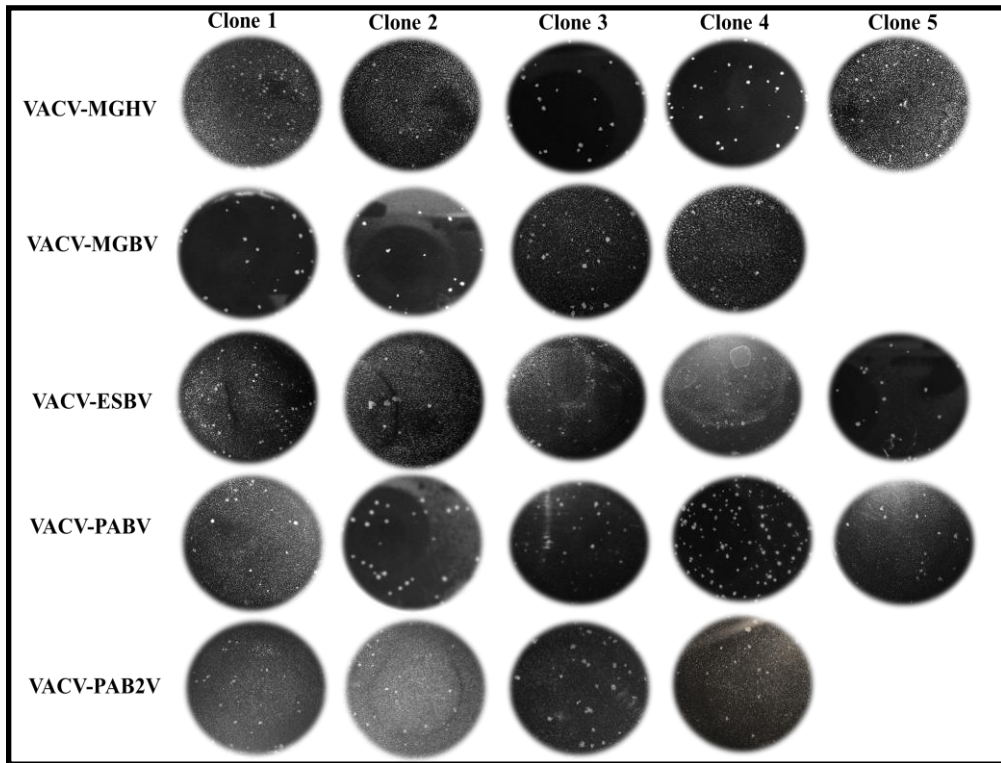


Figure 2. Viral clone plaque phenotype assays. BSC40 cells were cultured in a 6-well dish and then infected with VACV clones. Infection was carried out in the presence of 0.5% agarose for 48 h, followed by fixation and staining. All clones of the VACV-BAB2V, VACV-BAHV and VACV-GOB2V presented only small plaques, while VACV-BABV and VACV-GOBV strains presented small plaque clones as well as large plaque clones. VACV-BABV presented two small plaque clones (clone 1 and 5) and three large plaque clones (clone 2, 3 and 4). VACV-GOBV presented four small plaque clones (clone 1, 3, 4 and 5) and one large plaque clone (clone 2). Twenty-five clones from five VACV were showed.



Supplementary Figure 1. Viral clone plaque phenotype assays. In this figure are displayed the remainder 23 clones (Figure 2 continuation). BSC40 cells were cultured in a 6-well dish and then infected with VACV clones. Infection was carried out in the presence of 0.5% agarose for 48 h, followed by fixation and staining. All clones presented small plaques.

To proceed with the biological characterization, the comet phenotype assays for clones were done. Prominent comets were observed only in the four large plaque clones (data not shown). In order to compare the growth of VACV clones, we performed a growth curve assay showing that small-plaque clones presented a similar replication profile, but distinct from that observed for large plaque clones, that exhibited an increase of 2-4 logs when compared to the small plaque clones (Figure 3). Thereby, plaque phenotype and growth curve assays showed that large plaque clones display higher replication capacity when compared to small plaque clones and that those different profiles can be found in clones of a same sample.

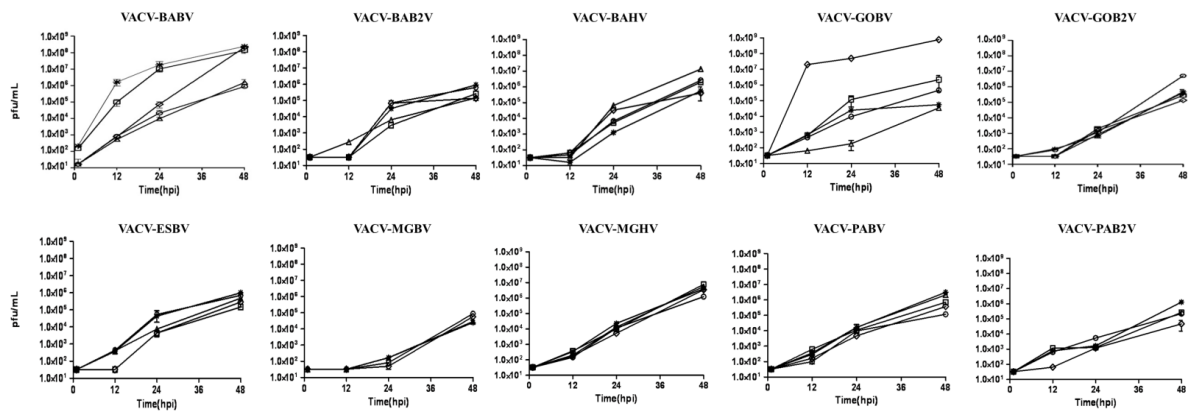


Figure 3. Growth curves assay of VACV-BR clones in BSC-40 cells. Cells were infected at an MOI of 0.01. Viral replication was determined by measuring the viral titer at 0, 12, 24 and 48 h after viral adsorption. The legend is the same for all the graphics: clone 1(O), clone 2 (\diamond), clone 3 (*), clone 4(\square), and clone 5(Δ) when present. Each data point represents the average of two independent experiments. The analysis was performed by using GraphPad Prism 6.0 software.

3.2 Virulence of VACV-clones in Balb/c mice

For virulence assays, we selected the large plaque clones 2 and 3, and the small plaque clone 1 from VACV-BABV, and the large plaque clone 2 and small plaque clone 3 from VACV-GOBV. This selection was based on previous studies that correlated VACV plaque size and virulence in Balb/c mice (Ferreira JMS, 2008). Four-week-old BALB/c mice ($n = 4$) were intranasally infected with 1×10^6 pfu of each VACV clone and observed during ten days for weight change, survival rate and clinical signs. The VACV-WR and PBS were used as virulence-positive and negative controls, respectively. We observed clinical signs, such as ruffling fur and arching back in mice inoculated with large plaque clones and VACV-WR within 3–7 dpi, similar to what has been previously reported for the virulent G2 VACV-BR (Ferreira JMS, 2008). However, some clinical signs, such as balanopostitis and periocular alopecia, were only observed in animals infected with VACV-WR (Figure 4C). Survival rates of mice inoculated with large plaque clones ranged from 0 % (BABV-clone 2) to 50 % (VACV-BABV-clone 3 and VACV-GOBV-clone 2), showing a variation in survival rate among virulent clones (Figure 4A). All mice inoculated with large plaque clones lost weight, while mice inoculated with small-plaque clones and with PBS gained weight over the 10-day experiment (Figure 4B). Moreover, mice inoculated with small-plaque clones, as well as the negative control group, did not present clinical signs and stayed alive during the ten days of observation similar to what has been previously reported for the non-virulent VACV-BR group 1 (Ferreira JMS, 2008).

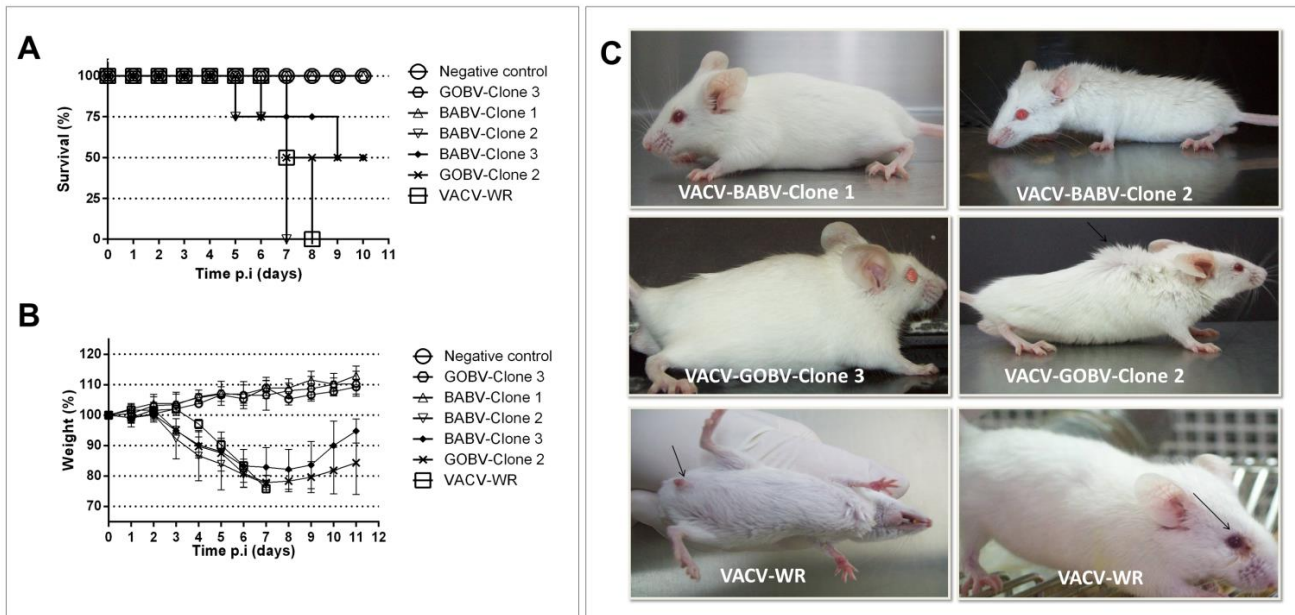


Figure 4. Virulence assays in a BALB/c mice model. Groups of four-week-old mice ($n = 4$) were inoculated by intranasal route with 10^6 PFU/ $10 \mu\text{L}$ of VACV-BABV strain clones 2 and 3 (large-plaque) and clone 1 (small plaque), and VACV-GOBV clone 2 (large plaque) and clone 3 (small plaque). VACV-WR was used as virulent control, and the negative control group was inoculated with PBS. No mice infected with small plaque clones died while the mice infected with large plaque clones had survival rates of 0% and 50%, showing variations in survival rates between the clones (A). Uninfected mice (negative control) and animals infected with small plaque clones gained weight, while mice infected with large plaque clones lost weight similarly to mice infected with virulent control VACV-WR (B). Ruffling fur and arching back were observed in mice infected with large plaque clones on day 4 p.i. No clinical signals were observed in mice infected with small plaque clones from the same strain. Balanopostitis and periocular alopecia were observed only in mice infected with virulent control VACV-WR on day 3 p.i. No clinical signals were observed in control mice inoculated with PBS.

3.4 Phylogeny

For molecular comparison of the clones, we sequenced a partial segment of the genes A56R, C23L and A26L. Large plaque clones presented a typical G2 VACV-BR profile while the small plaque clones presented a profile similar to G1, which was corroborated by our biological data. However, two exceptions were found: large plaque clone 2 from VACV-BABV showed a G2 VACV-BR profile for the A56R and C23L genes and G1 profile for the A26L gene, and the small plaque clone 2 from the

VACV-MGHV strain showed a G1 VACV-BR profile for the A56R and A26L genes and G2 profile to C23L gene. Table 2 summarizes these results. For phylogeny, we sequenced a partial fragment (900bp) of the A56R gene of all VACV clones and the obtained sequences were compared to other VACV sequences available at NCBI nucleotide database. Phylogenetic analyses clustered the large plaque clones into G2 VACV-BR branch, while the small plaque clones were branched with G1 VACV-BR, further confirming the biological data (Figure 5). The branches were statistically supported by high bootstrap values, mainly due the presence of a molecular signature of 18-bp deletion in A56R gene from G1 of VACV-BR (Figure 6). Moreover, small plaque clones sequences showed specific polymorphisms that reflected the separation of some clones into different branches within this group (Figure 5 and Supplementary Figure 2).

Table 2. VACV-BR group 1 or 2 profile of the isolated clones based on A56R, A26L and C23L genes.

Clones	Genes			Clones	Genes		
	A56R	A26L	C23L		A56R	A26L	C23L
BABV-Clone 1	Group 1	Group 1	Group 1	GOB2V-Clone 1	Group 1	Group 1	Group 1
BABV-Clone 2	Group 2	Group 1	Group 2	GOB2V-Clone 2	Group 1	Group 1	Group 1
BABV-Clone 3	Group 2	Group 2	Group 2	GOB2V-Clone 3	Group 1	Group 1	Group 1
BABV-Clone 4	Group 2	Group 2	Group 2	GOB2V-Clone 4	Group 1	Group 1	Group 1
BABV-Clone 5	Group 1	Group 1	Group 1	GOB2V-Clone 5	Group 1	Group 1	Group 1
BAB2V-Clone 1	Group 1	Group 1	Group 1	ESBV-Clone 1	Group 1	Group 1	Group 1
BAB2V-Clone 2	Group 1	Group 1	Group 1	ESBV-Clone 2	Group 1	Group 1	Group 1
BAB2V-Clone 3	Group 1	Group 1	Group 1	ESBV-Clone 3	Group 1	Group 1	Group 1
BAB2V-Clone 4	Group 1	Group 1	Group 1	ESBV-Clone 4	Group 1	Group 1	Group 1
BAB2V-Clone 5	Group 1	Group 1	Group 1	ESBV-Clone 5	Group 1	Group 1	Group 1
BAHV-Clone 1	Group 1	Group 1	Group 1	MGHV-Clone 1	Group 1	Group 1	Group 1
BAHV-Clone 2	Group 1	Group 1	Group 1	MGHV-Clone 2	Group 1	Group 1	Group 2
BAHV-Clone 3	Group 1	Group 1	Group 1	MGHV-Clone 3	Group 1	Group 1	Group 1
BAHV-Clone 4	Group 1	Group 1	Group 1	MGHV-Clone 4	Group 1	Group 1	Group 1
BAHV-Clone 5	Group 1	Group 1	Group 1	MGHV-Clone 5	Group 1	Group 1	Group 1
GOBV-Clone 1	Group 1	Group 1	Group 1	PABV-Clone 1	Group 1	Group 1	Group 1
GOBV-Clone 2	Group 2	Group 2	Group 2	PABV-Clone 2	Group 1	Group 1	Group 1
GOBV-Clone 3	Group 1	Group 1	Group 1	PABV-Clone 3	Group 1	Group 1	Group 1
GOBV-Clone 4	Group 1	Group 1	Group 1	PABV-Clone 4	Group 1	Group 1	Group 1
GOBV-Clone 5	Group 1	Group 1	Group 1	PABV-Clone 5	Group 1	Group 1	Group 1
MGBV-Clone 1	Group 1	Group 1	Group 1	PAB2V-Clone 1	Group 1	Group 1	Group 1
MGBV-Clone 2	Group 1	Group 1	Group 1	PAB2V-Clone 2	Group 1	Group 1	Group 1
MGBV-Clone 3	Group 1	Group 1	Group 1	PAB2V-Clone 3	Group 1	Group 1	Group 1
MGBV-Clone 4	Group 1	Group 1	Group 1	PAB2V-Clone 4	Group 1	Group 1	Group 1

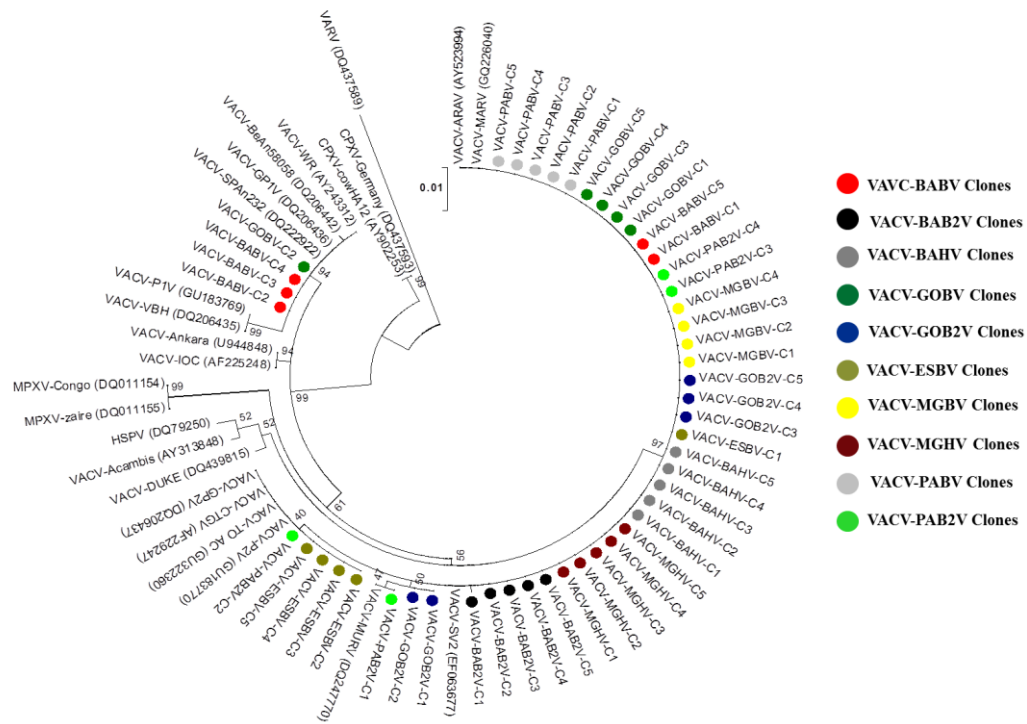


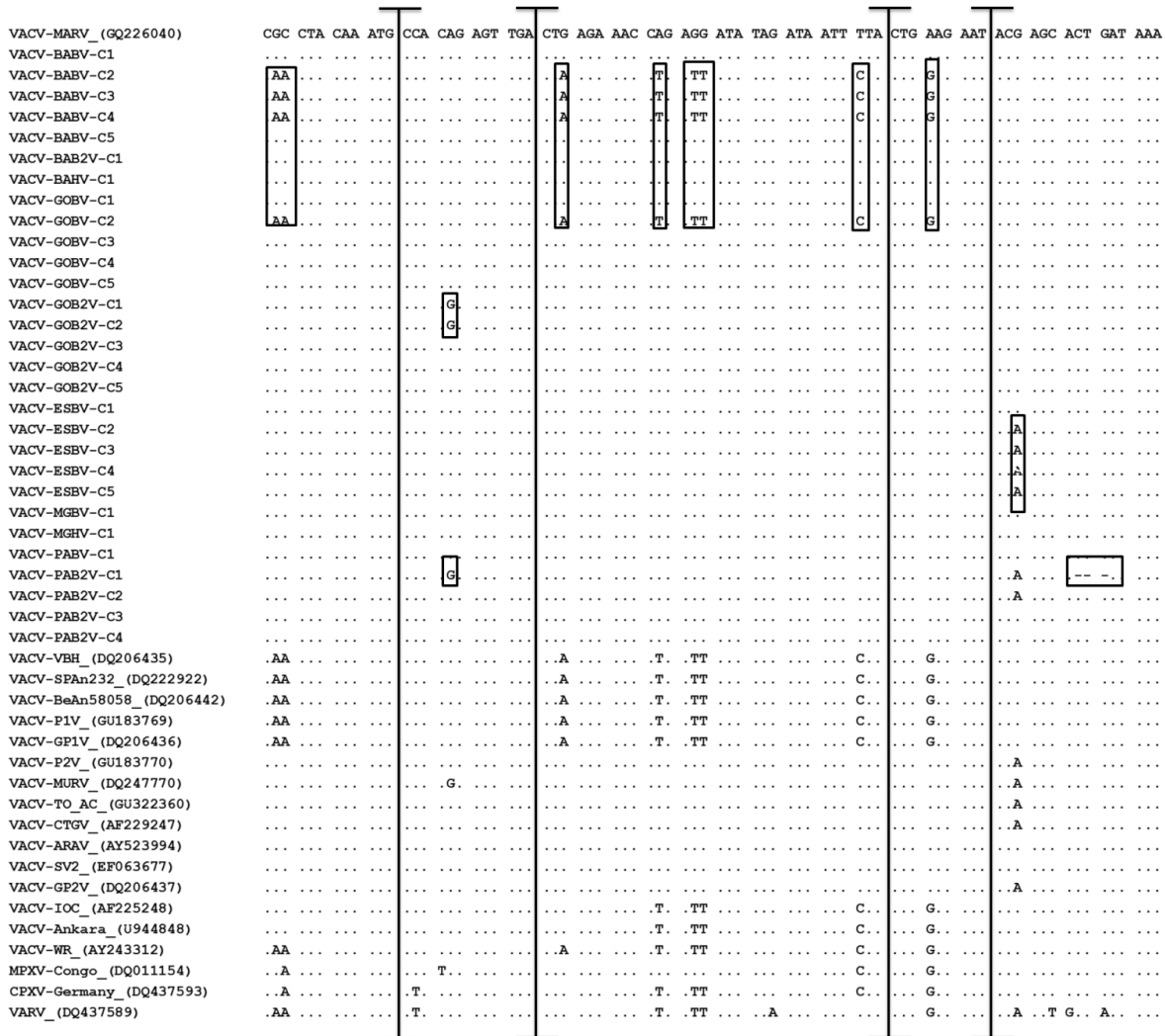
Figure 5. Phylogenetic analysis of viral clones based on the nucleotide sequences of *Orthopoxvirus A56R* gene. The tree was constructed by the Maximum Likelihood method with 1,000 bootstrap replicates based in Tamura-Nei model implemented in MEGA6.1 software program (www.megasoftware.net). Bootstrap confidence intervals are shown on branches. Nucleotide sequences were obtained from GenBank. Distinct colors indicates a strain and its clones as shown in the legend. Clones isolated from the same clinical sample were grouped in separate branches (Groups 1 and 2). Most of the clones were grouped in G1 and subgroups within the G1 were observed.

```

VACV-MARV_(GQ226040)      TTA ACC ACC GAT GAT GCG GAT CTT TAT --- --- --- --- --- GAT --- --- ACA GTA CCA CCA ACT ACT GTA GGC
VACV-BABV-C1             .....
VACV-BABV-C2             .C. .... GAT ACG TAC AAT GAT AAT .....
VACV-BABV-C3             .C. .... GAT ACG TAC AAT GAT AAT .....
VACV-BABV-C4             .C. .... GAT ACG TAC AAT GAT AAT .....
VACV-BABV-C5             .....
VACV-BAB2V               .....
VACV-BAHV                .....
VACV-GOBV-C1             .....
VACV-GOBV-C2             .C. .... GAT ACG TAC AAT GAT AAT .....
VACV-GOBV-C3             .....
VACV-GOBV-C4             .....
VACV-GOBV-C5             .....
VACV-GOB2V               .....
VACV-ESBV                .....
VACV-MGBV                .....
VACV-MGHV                .....
VACV-PABV                .....
VACV-PAB2V               .....
VACV-BeAn58058_(DQ206442) .C. .... GAT ACG TAC AAT GAT AAT .....
VACV-GP1V_(DQ206436)    .C. .... GAT ACG TAC AAT GAT AAT .....
VACV-P1V_(GU183769)     .C. .... GAT ACG TAC AAT GAT AAT .....
VACV-VBH_(DQ206435)     .C. .... GAT ACG TAC AAT GAT AAT .....
VACV-SPAn232_(DQ222922) .C. .... GAT ACG TAC AAT GAT AAT .....
VACV-Ankara_(U944848)    .C. .... GAT ACG TAC AAT GAT AAT ..... T. ....
VACV-CTGV_(AF229247)    .....
VACV-GP2V_(DQ206437)    .....
VACV-MURV_(DQ247770)    .....
VACV-ARAV_(AY523994)    .....
VACV-P2V_(GU183770)     .....
VACV-IOC_(AF225248)     .C. .... T. ....
VACV-SV2_(EF063677)     .....
VACV-To_AC_(GU322360)   .....
VACV-WR_(AY243312)      .C. .... GAT ACG TAC AAT GAT AAT .....
MPXV-Congo_(DQ011154)   .C. .... GAT ACA TAC AAT GAT AAT ..... .G ..... T
CPXV-Germany_(DQ437593) .C. .... GAT ACG TAC AAT GAT AAT .....
VARV_(DQ437589)         .C. ... G. A. .... GAT ACG CAC AAT GAT AAT ...A CCA TCT ..T ..G T. ....A .... AAA

```

Figure 6: Alignment of a fragment of viral clones A56R gene nucleotide sequences with other *Orthopoxvirus* sequences. The sequences were obtained from GenBank and aligned using the standard parameters of CLUSTAL W. Nucleotide positions are shown according to the VACV-MARV (G1 VACV-BR isolate). (.) indicates identity and (-) indicates deletion of nucleotides. The box highlights significant variations among clones from the same sample in which the clones 1 and 5 from the VACV-BABV showed a deletion of the 18 nucleotides observed in the A56R gene sequence of G1 VACV-BR, while clones 2, 3 and 4 from the same clinical sample did not show this deletion (G2). This alignment displays only representative clones from each sample, except to VACV-VACV and VACV- GOVB, in which all clones are represented.



Supplementary Figure 2. Alignment of different variable regions of A56R nucleotide sequence regions. The sequences were obtained from GenBank and aligned using the default parameters of CLUSTAL W. The nucleotide positions are shown according to the VACV-MARV (G1 member). (.) indicates identity and (-) indicates deletions of nucleotides. The boxes highlight nt substitutions and INDELs amongst studied clones.

4. Discussion

Bovine vaccinia outbreaks have been increasingly reported in Brazil since 1999 causing economic, social, veterinary and public health problems (Kroon EG, 2011). Despite the current and historical importance of VACV, little information is available about its circulation, prevalence, origins, maintenance in environment and natural reservoirs. In this study we were able to demonstrate the genetic and biologic variability among VACV and even among clones isolated from the same sample. Previous studies have demonstrated the genetic variability present into vaccine preparations of VACV, but in this study we evidenced the same profile among viruses isolated during BV outbreaks. Our study reinforced the circulation of the two groups (G1 and 2) of VACV-BR , as previously reported

(Trindade GS, 2006; Drumond BP, 2008; Campos RK, 2010; Assis FL, 2012). In addition, our data demonstrate the co-circulation of mixed VACV populations in the same sample, as well as a great genetic diversity among VACV-BR G1 clones in the same sample. In addition, we isolated two clones (VACV-BABV-clone 2 and VACV-MGHV clone 2) that presented a mosaic profile, with both G1 and G2 features based on the molecular analysis of A56R, A26L and C23L genes. These clones may have arisen as product of a recombination event. Previous studies have shown a high recombination rate during a poxvirus co-infection (Fenner F, 1958; Bedson HS, 1964; Qin L, 2014). Co-circulation of the genetically different clones in the same sample as shown here may favor the recombination generating new genetic variants which can also influence in virus evolution and pathogenesis. Moreover, genetic changes can favor adaptation to new hosts, such as described for other viruses of the same genus (Reynolds MG, 2012) contributing to expand its circulation and host range. Despite the existence of two VACV groups circulating in Brazil, generally G1 viruses has been more frequently isolated when compared to G2 viruses, including this study in which 92% of the isolated clones were grouped in VACV-BR-G1 while only 8 % were grouped in VACV-BR-G2 based on A56R gene. However, we believe that in addition to the higher prevalence of G1 VACV-BR there is a laboratory filter that favors the isolation and characterization of G1 VACV-BR, since the cellular systems commonly used in isolation and characterization, like embryonated chicken eggs and Vero cells, are unable to highlight differences between G1 and 2 such as plaque size variations. Probably, in a mixed sample (which has G1 and 2 viruses), the prevalence of G2 may be lower as was demonstrated in the case of VACV-GOBV sample, that would not allow the identification of the G2 viruses if the sample is directly processed and characterized by conducting PCR from VACV without previous plaque purification in an appropriate cellular system for the identification of both groups. Thus, we suggest that the viruses that have been isolated represent a small part of the diversity of VACV present in the natural environment. Our findings raise more discussions about the origin of VACV in Brazil, reinforcing that VACV-BR viruses may have more than one origin. We confirmed the virulence differences between large plaque and small plaque viruses as demonstrated previously (Ferreira JMS, 2008; Campos RK, 2010). While small plaque viral clones did not cause weight loss or death during infection in BALB/c mice, large plaque clones caused weight loss, clinical signs and death of infected BALB/C mice, showing that virulent and nonvirulent clones may be present in the same sample. Here we also showed that the replication rates varies among clones of the same sample with large plaque clones showing a higher replication rates when compared to small plaque clones isolated from the same sample in BSC40 cells. The importance of the higher replication rates for VACV evolution and maintenance in the environment needs further studies. Taken together, data regarding G2 clones show exclusive biological and molecular features (including genes profiles, plaque phenotype and mouse clinical signs) distinct to other known large plaque reference samples, including VACV-Western Reserve. In summary, our study demonstrated the genetic and biological variability between clones isolated from natural circulating VACV-BR in BV, evidencing that VACV can contain viral clones subpopulations. These results raise new questions about the diversity and origin of VACV circulating in Brazilian natural and rural environments. Nevertheless, all real implications of different VACV clones co-circulation are unknown but we can suggest its importance in the evolution and maintenance of these viruses in the environment.

Acknowledgments

We thank colleagues from Laboratório de Vírus (ICB-UFMG). For assistance in collection of clinical specimens we thank Instituto Mineiro de Agropecuária(IMA), Laboratório de Virologia Animal da Escola de Medicina Veterinária of UFMG and Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

(EMBRAPA). We thank Juliano Leal de Paula from Núcleo de Análise de Genoma e Expressão Gênica (NAGE)-Departamento de Bioquímica e Imunologia (ICB – UFMG). We thank Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (PRPq-UFMG) and support agencies (CNPq, CAPES and FAPEMIG) for the financial support.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: GO, FA, GA, GT, EK, JA. Performed the experiments: GO, ML, ACA, RC. Analyzed the data: GO, JA, JA. Contributed reagents/materials/analysis tools: FA, PCF, EK. Wrote the paper: GO, JA. All authors read and approved final manuscript.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References and Notes

Fenner, F.; Henderson, D.A.; Arita, I.; Jezek, A.; Ladnyi, I.D.;. Smallpox and its eradication. 1988, Geneva: World Health Organization Press. 49 p.

Chen, H.; Chuai, X.; Deng, Y.; Wen, B.; Wang, W.; Xiong, S.; Ruan, L.; Tan, W. Optimisation of prime-boost immunization in mice using novel protein-based and recombinant vaccinia (Tiantan)-based HBV vaccine. *PloS one*. 2012, 7, e43730

Deng, Y.; Zhang, K.; Tan, W.; Wang, Y.; Chen, H.; Wu, X.; Ruan, L. A recombinant DNA and vaccinia virus prime-boost regimen induces potent long-term T-cell responses to HCV in BALB/c mice. *Vaccine*. 2009, 27, 2085–2088.

Liu, C.; Du, S.; Li, C.; Wang, Y.; Wang, M.; Li, Y.; Yin, R.; Li, X.; Ren, D.; Qin, Y.; Ren, J.; Jin, N. Immunogenicity analysis following human immunodeficiency virus recombinant DNA and recombinant vaccinia virus Tian Tan prime-boost immunization. *Sci China Life Sci*.2013, 56, 531–540.

ICTVdB Management. Vaccinia virus. In: ICTVdB - The Universal Virus Database, version 4. Buchen-Osmond, C. 2013. Columbia University, New York, USA.

Damon, I.K.; Poxviruses. In *Fields virology*, 6th ed. B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley, (ed.), Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia. 2013, Vol 2, p. 2160.

Kalthoff, D.; Bock, W.I.; Hühn, F.; Beer, M.; Hoffmann, B. Fatal cowpox virus infection in cotton-top tamarins (*Saguinus oedipus*) in Germany. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2014;14, 303-5.

Pahlitzsch, R.; Hammarin, A.L.; Widell, A. A case of facial cellulitis and necrotizing lymphadenitis due to cowpox virus infection. *Clin Infect Dis.* 2006, 43, 737–742.

Rimoin, A. W.; Mulembakani, P. M.; Johnston, S. C.; Lloyd Smith, J. O.; Kisalu, N. K.,

Kinkela, T. L.; Blumberg, S.; Thomassen, H. A.; Pike, B. L.; Fair, J. N., Wolfe, N. D., Shongo, R. L., Graham, B. S., Formenty, P., Okitolonda, E., Hensley, L. E., Meyer, H., Wright, L. L. & Muyembe, J. J. Major increase in human monkeypox incidence 30 years after smallpox vaccination campaigns cease in the Democratic Republic of Congo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010, 107, 16262-16267

Karem, K.L.; Reynolds, M.; Braden, Z.; Lou, G.; Bernard, N. Characterization of acute-phase humoral immunity to monkeypox: use of immunoglobulin M enzyme-linked immunosorbent assay for detection of monkeypox infection during the 2003 North American outbreak. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2005,12, 867–872.

Kroon, E.G.; Mota, B.E.; Abrahão, J.S.; da Fonseca, F.G.; de Souza Trindade, G. Zoonotic Brazilian Vaccinia virus: from field to therapy. *Antiviral Res.* 2011, 92, 150-63.

Silva-Fernandes, A.T.; Travassos, C.E.; Ferreira, J.M.; Abrahao, J.S.; Rocha, E.S.; Viana-Ferreira, F.; dos Santos, J.R.; Bonjardim, C.A.; Ferreira, P.C.; Kroon, E.G. Natural human infections with Vaccinia virus during bovine vaccinia outbreaks. *J Clin Virol.* 2009, 44, 308–313.

Megid, J.; Appolinário, C.M.; Langoni, H.; Pituco, E.M.; Okuda, L.H. Vaccinia virus in humans and cattle in southwest region of Sao Paulo state, Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 2008, 79, 647–665.

Trindade, G.S.; Emerson, G.L.; Carroll, D.S.; Kroon, E.G.; Damon, I.K. Brazilian Vaccinia Viruses and Their Origins. *Emerging Infectious Diseases.* 2007. 13, 965-972.

Brum, M. C. S.; dos Anjos, B. L.; Nogueira, C. E. W.; Amaral, L. A.; Rudi, W.; Flores, E. F. An outbreak of orthopoxvirus-associated disease in horses in southern Brazil. *J Vet Diagn Invest.* 2010, 22, 143–147.

Singh, R.K.; Hosamani, M.; Balamurugan, V.; Bhanuprakash, V.; Rasool, T.J.; Yadav, M.P.; Buffalopox: an emerging and re-emerging zoonosis. *Anim Health Res Rev.* 2007,8,105-114.

Trindade, G.S.; Guedes, M.I.; Drumond, B.P.; Mota, B.E.; Abrahao, J.S.; Lobato, Z.I.; Gomes, J.A.; Corrêa-Oliveira, R.; Nogueira, M.L.; Kroon, E.G.; da Fonseca, F.G. Zoonotic vaccinia virus: clinical and immunological characteristics in a naturally infected patient. *Clin Infect Dis* 2009;48,37-40.

Oliveira, D.B.; Assis, F.L.; Ferreira, P.C.; Bonjardim, C.A.; de Souza Trindade, G.; Kroon, E.G.; Abrahão, J.S. Short Report: Group 1 Vaccinia virus Zoonotic Outbreak in Maranhão State, Brazil *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2013, 89, 1142–1145.

Damaso, C.R.; Esposito, J.J.; Condit, R.C.; Moussatche, N. An emergent poxvirus from humans and cattle in Rio de Janeiro State: cantagalo virus may derive from Brazilian smallpox vaccine. *Virology* 2000,277,439-449.

Lopes, O.S.; Lacerda, J.P.; Fonseca, I.E.; Castro, D.P.; Forattini, O.P.; Rabello, E.X. CotiaVirus: A New Agent Isolated from Sentinel Mice in Sao Paulo, Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 1965, 14, 156–157

Da Fonseca, F.G.; Trindade, G.S.; Silva, R.L.; Bonjardim, C.A.; Ferreira, P.C.; Kroon, E.G. Characterization of a vaccinia-like virus isolated in a Brazilian forest. *J Gen Virol.* 2002, 83, 223–228.

Fonseca, F.G.; Lanna, M.C.; Campos, M.A.; Kitajima, E.W.; Peres, J.N.; Golgher, R.R.; Ferreira, P.C.; Kroon, E.G. Morphological and molecular characterization of the poxvirus BeAn 58058. *Arch Virol.* 1998, 143, 1171–1186.

Trindade, G.S.; da Fonseca, F.G.; Marques, J.T.; Nogueira, M.L.; Mendes, L.C.; Borges, A.S.; Peiró, J.R.; Pituco, E.M.; Bonjardim, C.A.; Ferreira, P.C.; Kroon, E.G. Araçatuba virus: a vaccinia-like virus associated with infection in humans and cattle. *Emerg Infect Dis.* 2003, 9, 155-60.

Trindade, G.S.; da Fonseca, F.G.; Marques, J.T.; Diniz, S.; Leite, J.A.; De Bodt, S.; Van der Peer, Y.; Bonjardim, C.A.; Ferreira, P.C.; Kroon, E.G. Belo Horizonte virus: a vaccinia-like virus lacking the A-type inclusion body gene isolated from infected mice. *J Gen Virol.* 2004, 85, 2015–2021.

Trindade, G.S.; Lobato, Z.I.; Drumond, B.P.; Leite, J.A.; Trigueiro, R.C.; Guedes, M.I.; da Fonseca, F.G.; dos Santos, J.R.; Bonjardim, C.A.; Ferreira, P.C.; Kroon, E.G.; Short report: Isolation of two vaccinia virus strains from a single bovine vaccinia outbreak in rural area from Brazil: Implications on the emergence of zoonotic orthopoxviruses. *Am J Trop Med Hyg.* 2006, 75, 486–490.

Drumond, B.P.; Leite, J.A.; da Fonseca, F.G.; Bonjardim, C.A.; Ferreira, P.C.; Kroon, E.G. Brazilian Vaccinia virus strains are genetically divergent and differ from the Lister vaccine strain. *Microbes Infect.* 2008, 10, 185–197.

Qin, L.; Liang, M.; Evans, D.H.; Genomic analysis of vaccinia virus strain TianTan provides new insights into the evolution and evolutionary relationships between Orthopoxviruses. *Virology.* 2013, 442, 59–66.

Assis, F.L.; Almeida, G.M.; Oliveira, D.B.; Franco-Luiz, A.P.; Campos, R.K.; Guedes, M.I.; Fonseca F.G.; Trindade, G.S.; Drumond, B.P.; Kroon, E.G.; Abrahão, J.S. Characterization of a new Vaccinia virus isolate reveals the C23L gene as a putative genetic marker for autochthonous Group 1 Brazilian Vaccinia virus. *PLoS One.* 2012, 11, e50413.

Assis, F.L.; Borges, I.A.; Ferreira, P.C.; Bonjardim, C.A.; Trindade, G.S.; Lobato, Z.I.; Guedes, M.I.; Mesquita, V.; Kroon, E.G.; Abrahão, J.S.; Group 2 vaccinia virus, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2012, 18, 2035–2038.

Batista, V.H.; Scremin, J.; Aguiar, L.M.; Schatzmayr, H.G.; Vulvar infection and possible human-to-human transmission of bovine poxvirus disease. *Virus Res.* 2009, 14, 1–10.

Oliveira, G.P.; Silva Fernandes, A.T.; Assis, F.L.; Alves, P.A.; Franco Luiz, A.P.M.; Figueiredo, L.B.; Costa de Almeida, C.M.; Travassos, C.E.P.F.; Trindade, G.S.; Abrahão, J.S.; Kroon, E.G. Intrafamilial transmission of Vaccinia virus during a bovine Vaccinia outbreak in Brazil: a new insight in viral transmission chain. *Am J Trop Med Hyg.* 2014, 90, 1021–1023.

Campos, R.K.; Brum, M.C.; Nogueira C.E.; Drumond, B.P.; Alves, P.A.; Siqueira-Lima, L.; Assis, F.L.; Trindade, G.S.; Bonjardim, C.A., Ferreira, P.C., Weiblen, R., Flores, E.F.; Kroon, E.G.; Abrahão,

J.S. Assessing the variability of Brazilian Vaccinia virus isolates from a horse exanthematic lesion: coinfection with distinct viruses. *Arch Virol.* 2011, 156, 275-283.

Cargnelutti, J.F.; Schmidt, C.; Masuda, E.K.; Nogueira, P.R.; Weiblen, R.; Flores, E.F. Vaccinia viruses isolated from skin infection in horses produced cutaneous and systemic disease in experimentally infected rabbits. *Res Vet Sci.* 2012, 93, 1070-1075.

Abrahão, J.S.; Guedes, M.I.; Trindade, G.S.; Fonseca, F.G.; Campos, R.K.; Mota, B.F.; Lobato, Z.I.; Silva-Fernandes, A.T.; Rodrigues, G.O.; Lima, L.S.; Ferreira, P.C.; Bonjardim, C.A.; Kroon, E.G.; One more piece in the VACV ecological puzzle: could peridomestic rodents be the link between wildlife and bovine vaccinia outbreaks in Brazil? *PLoS One.* 2009,19; e7428.

Qin, L.; Evans, D.H.; Genome scale patterns of recombination between coinfecting vaccinia viruses. *J Virol.* 2014, 88, 5277-5286.

Abrahão, J.S.; Silva-Fernandes, A.T.; Lima, L.S.; Campos, R.K.; Guedes, M.I.; Cota, M.M.; Assis, F.L.; Borges, I.A.; Souza-Júnior, M.F.; Lobato, Z.I.; Bonjardim, C.A.; Ferreira, P.C.; Trindade G.S.; Kroon, E.G.; Vaccinia virus infection in monkeys, Brazilian Amazon. *Emerg Infect Dis.* 2010, 16, 976-979.

Okeke, M.I.; Okoli, A.S.; Nilssen, Ø.; Moens, U.; Tryland, M.; Bøhn, T.; Traavik T. Molecular characterization and phylogenetics of Fennoscandian cowpox virus isolates based on the p4c and atip genes. *Virol J.* 2014,11, 119.

Chen, N.; Li, G.; Liszewski, M.K.; Atkinson, J.P.; Jahrling, P.B.; Feng, Z.; Schriewer, J.; Buck, C.; Wang, C.; Lefkowitz, E.J.; Esposito, J.J.; Harms, T.; Damon, I.K.; Roper RL, Upton, C.; Buller, R.M. Virulence differences between monkeypox virus isolates from West Africa and the Congo basin. *Virology.* 2005;340:46–63.

Gubser, C.; Hue, S.; Kellam, P.; Smith, G.L.; Poxvirus genomes: a phylogenetic analysis. *J Gen Virol.*2004;85:105–117.

Emerson, G.L.; Li, Y.; Frace, M.A.; Olsen-Rasmussen, M.A.; Khristova, M.L.; Govil, D.; Sammons, S.A.; Regnery RL, Karem, K.L.; Damon, I.K.; Carroll, D.S. The phylogenetics and ecology of the orthopoxviruses endemic to North America. *PLoS ONE.* 2009, 4, e7666.

Esposito, J.J.; Sammons, S.A.; Frace, A.M.; Osborne, J.D.; Olsen-Rasmussen, M.; Zhang, M.; Govil, D.; Damon, I.K.; Kline, R.; Laker, M.; Li, Y.; Smith, GL.; Meyer, H.; Leduc, J.W.; Wohlhueter,

R.M.; Genome sequence diversity and clues to the evolution of variola (smallpox) virus. *Science*. 2006, 313, 807–812.

Gubser, C.; Hue, S.; Kellam, P.; Smith, G.L.; Hendrickson, R.C.; Wang, C.; Hatcher, E.L.; Lefkowitz, E.J. Orthopoxvirus genome evolution: the role of gene loss. *Viruses*. 2010,2,1933–1967.

Reed, K.D.; Melski, J.W.; Graham, M.B.; Regnery, R.L.; Sotir, M.J.; Wegner, M.V.; Kazmierczak, J.J.; Stratman, E.J.; Li, Y.; Fairley, J.A.; Swain, G.R.; Olson, V.A.; Sargent, E.K.; Kehl, S.C.; Frace, M.A.; Kline, R.; Foldy, S.L.; Davis, J.P.; Damon, I.K. The detection of monkeypox in humans in the Western Hemisphere. *N Engl J Med*. 2004, 350, 342–350.

Weltzin, R.; Liu, J.; Pugachev, K.V.; Myers, G.A.; Coughlin, B.; Blum, P.S.; Nichols, R.; Johnson C.; Cruz, J.; Kennedy, J.S.; Ennis, F.A.; Monath, T.P. Clonal vaccinia virus grown in cell culture as a new smallpox vaccine. *Nat Med*. 2003, 9, 1125-1130.

Garcel, A.; Perino, J.; Crance, J.M.; Drillien, R.; Garin, D.; Favier, A.L. Phenotypic and genetic diversity of the traditional Lister smallpox vaccine. *Vaccine*. 2009,27, 708-717.

Morikawa, S.; Sakiyama, T.; Hasegawa, H.; Saijo, M.; Maeda, A.; Kurane, I.; Maeno, G.; Kimura J.; Hiram, C.; Yoshida, T.; Asahi-Ozaki, Y.; Sata, T.; Kurata, T.; Kojima, A. An attenuated LC16m8 smallpox vaccine: analysis of full genome sequence and induction of immune protection. *J Virol*. 2005, 79, 11873-11891.

Osborne, J.D.; Da Silva, M.; Frace, A.M.; Sammons, S.A.; Olsen-Rasmussen, M.; Upton, C.; Buller, R.M.; Chen, N.; Feng, Z.; Roper, R.L.; Liu, J.; Pougatcheva, S.; Chen, W.; Wohlhueter, R.M.; Esposito, J.J. Genomic differences of Vaccinia virus clones from Dryvax smallpox vaccine: the Dryvax-like ACAM2000 and the mouse neurovirulent Clone-3. *Vaccine*. 2007. 25, 8807–8832.

Qin, L.; Upton, C.; Hazes, B.; Evans, D.H. Genomic analysis of the vaccinia virus strain variants found in Dryvax vaccine. *J Virol*. 2011, 85, 13049-13060.

Fenner, F.; Comben, B.M. Genetic studies with mammalian poxviruses. I. Demonstration of recombination between two strains of vaccinia virus. *Virology*. 1958,5,530-548.

Bedson, H.S.; Dumbell, K.R. Hybrids Derived from the Viruses of Variola Major and Cowpox. *The Journal of hygiene*. 1964, 62, 147-158.

Kugelman, J.R.; Johnston, S.C.; Mulembakani, P.M.; Kisalu, N.; Lee, M.S.; Koroleva, G.; McCarthy, S.E.; Gestole, M.C.; Wolfe, N.D.; Fair, J.N.; Schneider, B.S.; Wright, L.L.; Huggins, J.; Whitehouse, C.A.; Wemakoy, E.O.; Muyembe-Tamfum, J.J.; Hensley, L.E.; Palacios, G.F.; Rimoin, A.W.; Genomic variability of monkeypox virus among humans, Democratic Republic of the Congo. *Emerg Infect Dis*. 2014, 20, 232-239.

Joklik, W.K.; The purification of four strains of poxvirus. *Virology*. 1962. 18: 9–18

Campos, M.A.S.; Kroon, E.G. Critical period for reversible block of vaccinia virus replication. *Rev Braz Microbiol*. 1993, 24, 104–110.

Ferreira, J.M.; Drumond, B.P.; Guedes, M.I.; Pascoal-Xavier, M.A.; Almeida-Leite, C.M.; Arantes, R.M.; Mota, B.E.; Abrahão, J.S.; Alves, P.A.; Oliveira, F.M.; Ferreira, P.C.; Bonjardim, C.A.; Lobato, Z.I.; Kroon, E.G. Virulence in Murine Model Shows the Existence of Two Distinct Populations of Brazilian Vaccinia virus Strains. *PLoS ONE*. 2008, 3, e3043.

Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2nd Edn, Edited by C. Nolan, N. Ford, & M. Ferguson. 1989, pp. E.3-E.4.

Leite, J.A.; Drumond, B.P.; de Souza Trindade, G.; Bonjardim, C.A.; Ferreira, P.C.; Kroon, E.G. Brazilian Vaccinia virus strains show genetic polymorphism at the *ati* gene. *Virus Genes*. 2007, 35, 531–539.

de Souza Trindade, G.; Li, Y.; Olson, V.A.; Emerson, G.; Regnery, R.L.; da Fonseca, F.G.; Kroon, E.G.; Damon, I.K. Real-time PCR assay to identify variants of Vaccinia virus: Implications for the diagnosis of bovine vaccinia in Brazil. *J Virol Methods*. 2008, 152, 63-71.

Sambrook, J.; Russell, D.W., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 3rd Edn, Edited by C. Nolan, N. Ford, & M. Ferguson. 2001, pp. E.3-E.4.

Ropp, S.L.; Jin, Q.; Knight, J.C.; Massung, R.F.; Esposito, J.J. PCR strategy for identification and differentiation of small pox and other *Orthopoxviruses*. J Clin Microbiol. 1995, 33, 2069–2076.

Reynolds MG, Carroll DS, Karem KL. Factors affecting the likelihood of monkeypox's emergence and spread in the post-smallpox era. Curr Opin Virol. 2012, 2, 335–343.

© 2014 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Title

Horizontal Study of *Vaccinia virus* infections in an Endemic Spot: Epidemiologic, Phylogenetic and Economic Aspects

Authors

Felipe L. Assis^a, Luis M. Paim^b, Ana Paula M. Franco-Luiz^a, Grazielle, P. Oliveira^a, Alexandre F. Pereira^a, Giliane S. Trindade^a, Paulo P. Ferreira^a, Erna G. Kroon^a and Jônatas S. Abrahão^a

Affiliations

a. Laboratório de Vírus do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

b. Agência Estadual de Defesa Agropecuária da Bahia, Salvador

Address correspondence to Jônatas Santos Abrahão, Laboratório de Vírus, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Minas Gerais. Av. Antônio Carlos 6627, Caixa Postal 486, 31270-901, Belo Horizonte, MG/Brazil E-mail: jonatas.abrahao@gmail.com, Phone number: + 55 31 3409 2539.

Abstract

Vaccinia virus, the etiological agent of the bovine vaccinia (BV), is currently wide spread in Brazil, including the most of milk producing regions. We conducted a horizontal study of BV in Bahia, a growing milk producing state of Brazil. During 2011, human and bovine samples were collected during exanthemous outbreaks for BV diagnosis, virus isolation and molecular analysis. Besides, we collected data for epidemiological inferences. VACV was detected in 87,7% of the analyzed outbreaks, highlighting the effective circulation of VACV in Bahia state. Molecular data showed the spreading of group 1 Brazilian VACV to Bahia. We observed a seasonal profile of BV, with its peak at drier and cooler season. The manual milking was observed in 96% of the visited properties showing its importance to viral spread in herds. The BV under-notification, ineffective animal trade surveillance associated with bad milking practice, have contributed to VACV spread in Brazil.

Keywords: *Vaccinia virus*; Outbreak; Phylogeny; Epidemiology; Bovine vaccinia.

Introduction

The *Vaccinia virus* (VACV) is member of *Poxviridae* family and *Orthopoxvirus* (OPV) genus, that also comprises others zoonotic agents, such as *Monkeypox virus* (endemic Africa) and *Cowpox virus* (endemic in Europe); and also the exclusive human-associated pathogen *Variola virus* (worldwide), etiologic agent of the eradicated smallpox, one of the most maleficent pathogens in the humankind history [1-3]. Like others OPV's, VACV is a double stranded DNA virus (194.711 bp (VACV-WR [AY243312]), encoding to several structural proteins, besides immunomodulatory and regulatory proteins in order to subvert the cellular environment [3]. VACV has been associated with bovine vaccine (BV) outbreaks in Brazil, causing ulcerative lesions in cattle and humans, economical losses and social impact [4]. Although VACV had been isolated from Brazilian rain forests during the 1960's and 1970's, this virus became a public health problem in Brazil since 1999, when frequent exanthematous outbreaks have been reported [5]. Since then, great efforts has been carried to uncover some unknown VACV features, such as its origin(s), host range, environmental maintenance and spread, epidemiology and phylogeny of VACV Brazilian strains (VACV-BR) [6-9]. In the Bahia State, Brazil, previous VACV-like outbreaks has been reported since 2002 (unpublished), but no investigation had been conducted to confirm the VACV involvement, as such as it biological and genetic features, in these cases. In this work we horizontally evaluate epidemiologic data collected during BV-like outbreaks in Bahia State, northeast of Brazil, from January to December 2011. We also conducted a phylogenetic study comparing viruses isolated in those outbreaks to other VACV-BR isolated in Brazil in the last years. Our data reinforce the idea that BV outbreaks are influenced by weather conditions and raise new questions regarding VACV origins in this State.

Materials and Methods

Case description

This work was conducted in association with the Agência de Defesa Agropecuária of Bahia State (Veterinary Surveillance Organ) (ADAB) and the Laboratório de Vírus of Universidade Federal de Minas Gerais (LV-UFMG). The epidemiologic data was collected during a Foot and Mouth Disease (FMD) active surveillance conducted by the ADAB, in the year 2011. After exanthemous notifications, veterinarians went to the farms to perform clinical and epidemiological investigations (forms of disease research (FDR)), sample collection and to advise farms about how manage the disease.

During the study, January to December, 2011, 57 BV-like outbreaks from 22 counties of Bahia state were reported to ADAB. Bovine samples such as sera, scabs, swabs and vesicular fluid, besides samples from affected farm workers were

collected and stocked at -70°C until final destination. Thereafter, the collected samples were routed to LV-UFGM and diagnosed by serologic (ELISA or PRNT) and/or molecular (PCR) methods. Based on FDR's informations and laboratorial results, some epidemiological inferences were taken. We also conducted viral isolation, sequencing and a phylogenetic characterization.

Serological diagnosis

For ELISA, purified and inactivated VACV-WR was diluted to optimized concentrations in 0.01M carbonate buffer at pH 9.6 and added into each well of a 96-well ELISA plates (NUNC Maxisorb, USA) and the plates were incubated at 4°C for 18 hours. The plates were washed with phosphate buffer containing 0.05% Tween 20 (PBS-T) and then blocked with 5% of nonfat dried milk for 2 hours. After the wash procedures, serum samples were used at a dilution of 1:100, were added into each well. After 60 minutes at 37°C , the plates were washed again and rabbit anti-cow IgG peroxidase conjugate (Sigma–Aldrich, Germany) diluted 1:10.000 in PBS-T was added per well and incubated at 37°C for 30 minutes. After this, the plates were washed four times and the substrate (citrate buffer 0.1 M pH 5.0, containing 0.3 mg/ml of ortho-phenylenediamine (OPD) and 0.03% hydrogen peroxide) was added and incubated in dark for 10 minutes. The reaction was stopped by addition of a 2N sulfuric acid solution and the optical densities were measured at 492 nm [10].

For plaque-reduction neutralization test (PRNT), were previously inactivated at 56°C for 30 minutes, diluted 1:20 in minimum essential medium and incubated at 37°C for 16 hours with the same volume of minimum essential medium containing 10^2 PFU/mL of VACV-WR. At the same time, the viral suspension was also incubated with a 1:20 dilution of fetal calf serum (FCS) in minimum essential medium to serve as a virus control. After that, 0,4 ml of this mixture was added onto BSC-40 cells monolayers at 6-wells plates, incubated for one hour at 37°C and 5% CO_2 atmosphere and then 2 ml of the medium were added to each well and further incubated at the same conditions for 48 hours. The cells were then stained with a solution of crystal violet for 20 minutes and the viral plaques were counted [11]. The results are expressed as the serum that was able to neutralize at least 50% (PRNT_{50}) of viral plaques compared with negative controls. Bovine serum samples were used as positive and negative controls. The specificity (98.4%) and sensitivity (93.5%) of the OPV-PRNT were confirmed using receiver-operating characteristic analysis as described previously [10].

Molecular diagnosis

The sera and scab samples were diluted in phosphate buffer saline (PBS) (NaCl 137mM; kCl_2 7mM; Na_2HPO_4 1,4mM; pH 7,2) (0,1 mL sera/0,9 mL PBS). The scabs were macerated using a homogeniser (Politron, Littau, Switzerland) in PBS, which contained 200 U/mL penicillin, 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ amphotericin B, and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ gentamicin (0.1 g scab/0.9 mL PBS), and

clarified by centrifugation at $2000 \times g$ for 3 min [13]. The scab's supernatant and diluted sera were used for diagnostic purposes, viral isolation, and molecular assays. The diluted samples were used as a template for a nested PCR that targeted a partial region of C11R (viral growth factor - *vgf*) gene. This gene is widely used as an OPV diagnostic tool by our group. The reactions were carried out by adding 2 μL of the template to 18 μL of the PCR reaction mixture that contained 0.4 mM of *vgf* primers, as previously described. The PCR products were electrophoresed in 8%-PAGE gels and silver stained [12,13].

Virus isolation and Phylogenetic analysis

For viral isolation, 200 μL of a positive *vgf* samples was added to BSC-40 cell monolayers that were grown in a six-well plate and incubated at 37°C for 72 hours or until detection of the cytopathic effect (CPE) [13]. For the molecular characterisation, the viral genes A56R (hemagglutinin) and A26L (A-type inclusion body) were amplified and sequenced [14,15]. These genes are traditionally used for this purpose. The PCR fragments obtained from this study were directly sequenced in both orientations and in triplicate (Mega-BACE 1000 sequencer) (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). The sequences were aligned with previously published OPV sequences from GenBank using the ClustalW method, and the alignments were manually checked with the MEGA version 4.0 software (Arizona State University, Phoenix, AZ, USA). Accession numbers for the analysed sequences can be found in the respective figures. The phylogenetic trees were constructed with the neighbour-joining method using the Tamura-Nei model of nucleotide substitutions and 1,000 bootstrap replicates, as implemented in the MEGA 4.0 program.

Results

Throughout the study period, we visited 57 outbreak areas of 22 Counties in Bahia (**Supl. Tab 1**). The episodes were mainly reported from northern of Bahia State, with some isolated focus from south and southeast, besides one focus from western region. During the outbreaks, VACV-like exanthematous umbilicated lesions could be frequently observed from dairy cattle's teats and udder, besides worker's fingers, hands and forearms (**Fig 1**). The outbreaks occurred mainly in drier and cooler season, from July to September (**Supl. Fig 1**). The VACV circulation was serological or molecularly detected in 87,7% (50/57) of the studied properties. Only 8,7% (5/57) among the studied properties were free of viral circulation. The sampling was not performed in 2/57 properties due technical problems (**Fig 2A**). The majority of outbreaks were reported by third-party complaint (53%) such as neighbor farmers and autonomous milkers, followed by their own farmers (28%) and by active surveillance (19%) (**Fig 2B**). In 81% of the visited properties both humans and bovines were affected. In the remaining cases, only the cattle became sick (**Fig 2C**). About the origin of the animals in the herds, 34/57 (59,6%) of the properties reported to have only native cattle in their herds, whereas the remaining 14% (8/57) farmers reported to have both native and imported animals, mainly from Minas Gerais State, a State that present a high incidence of VACV

outbreaks. From 26,3% of the properties (15/57) no information about the animal's origin was informed (**Fig 2D**). Among the studied herds, 76% were exclusively comprised by dairy cattle, 19% by dairy and beef cattle, 5% only by beef cattle (**Fig 2E**). The manly cattle's category observed among the affected properties was the weaning (59,6%) (**Fig 2F**). The manual milking was observed in 96% of the properties (**Fig 2G**).

The samples routed to LV-UFGM were comprised by bovine (172/183) and human (11/183) samples. The bovine samples were comprised by sera (137/172), scabs (25/172) and swabs (10/172). The human samples were comprised by sera (4/11), scabs (5/11) and swabs (2/11). All the samples sent to LV-UFGM were molecular and serologically diagnosed (see Methods). PCR amplification of a conserved OPV gene (C11R – viral growth factor) were obtained from 73/183 (40%) samples, being 19/73 scabs (5 humans and 14 bovines), 43/73 sera (only bovines) and 11/73 swabs (2 humans and 9 bovines) samples. The serological analysis performed in 141 (4 humans and 137 bovines) sera samples, reveled a positivity of 85,8% (3 humans and 118 bovine samples).

Also, we were able to perform virus isolation from a scab human sample of Mundo Novo, the County most affected by VACV outbreaks during the studied period (**Supl. Tab 1**). So, we amplified fragments of *ha* and *ati* genes (728bp and 1537bp, respectively) to molecular analysis. The sequences are deposited in genbank (accession nos. JQ361135.1 and JQ361144.1 to *ha* and *ati*, respectively). The alignment with others viral sequences already available at data base reveled deletion signatures in *ha* and *ati* genes (deletion of 18nt and 21 nt, respectively). These molecular signatures are present also in VACV sequences from Brazilian VACV isolates of Group 1 (VACV-BR-G1) (**Supl. Fig 2**). We also constructed a phylogenetic tree from alignment of the obtained sequences. As suggested by the previous molecular analysis, this virus isolate, named *Mundo novo virus* (MUNV), grouped with others VACV-BR-G1 in both HA and ATI trees (**Fig 3**).

Discussions

We conducted a horizontal study about VACV circulation in Bahia state during 2011. During this period, we investigated 57 BV-like outbreaks in 22 different Counties. These episodes were reported mainly during drier and cooler season (Jul-Sep), although some reports also occurred throughout all period of study. Some previous studies have pointed rats and mice as important agents in VACV transmission chain once they are in constant contact with wildlife, humans and farm animals [8]. During dry and cold season, these rodents are frequently sighted in BV-affected farms at same places where cows and calfs feed. During the sampling for this study, the presence of rodents in barns and silos was frequently observed. Moreover, during dry and cold clime the virus infection may be facilitated by frequently observed lesions in cows's teats due the climate condition itself and wounds caused by dry grass.

The VACV serologic and/or molecular diagnosis pointed to viral circulation in 87,7% of the visited properties, suggesting an active circulation and/or introduction of VACV in the Bahia State. The VACV spread to other Brazilian states, such as Rondônia, Maranhão, Rio Grande do Sul, has been frequently reported [15,16]. However, the mechanisms of the VACV spreading are not completely understood. Effective BV surveillance may be hampered mainly due unawareness about the disease by farmers in rural areas. Some farmers simply do not report BV outbreaks for fear of trade embargoes. In our study, 53% of the cases were reported by third-party complaint. This represents the main obstacle for an effective surveillance of BV in Brazil.

The origin of the affected animals is another important issue. About 40% of the visited properties harbored animals from Minas Gerais State, an endemic area for VACV circulation or from an unknown source suggesting an unregulated trade, which can contribute to the VACV introduction in some herds. It is worth mentioning that as Minas Gerais State, other Bahia's Border States have also reported VAVC outbreaks. Previous studies have shown that a unique animal source is sufficient to rapidly initiate a VACV outbreak (Carangola). Therefore, the inadvertent introduction of a sick animal in Bahia's dairy herd may have been the cause of current VACV spreading.

The high rate of human and cattle infection in a same farm (81%) indicates that, after viral introduction in the herd regardless of the source, the manual contact during the milking seems to be the main mechanism during BV outbreaks. Adding, we observed that in 96% of visited properties, the milking was manually performed without any protection or pre asepsis. Also, outbreaks seem to affect mainly dairy cattle once infection wasn't observed at farms dedicated to beef exploration. But, the role of these animals in a mixed herd is not well established.

The molecular diagnosis revealed a low presence of viral DNA in sera sample (30,5%) and a higher presence in scabs (63,3%) and in swabs (91,6%). It was to be expected once the skin tissue cells are the main infection sites and virus multiplication. We have compared *ha* and *ati* gene sequences of MUNV isolate with other VACV-BR isolates and observed deletion signatures founded in sequences from isolates of VACV-BR-C1, the most prevalent group circulating in Brazil and involved in BV outbreaks in Bahia neighbors States. This new isolate indicates the spreading of this viral groupe to Bahia, affecting humans, cattle and possible wild life.

Acknowledgments

We thank colleagues from the Laboratório de Vírus for their excellent technical support. Financial support was provided by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de

Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) and Pro-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (PRPq-UFGM). E.G. Kroon, G.S. Trindade and P.C.P. Ferreira are researchers from CNPq.

Conflict of interest statement

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Figures.



Figure 1: Lesions caused by VACV. (A,B) Exanthematic-lesion on hands, finger and forearm of study patients, which were acquired after contact with VACV, infected dairy cattle. (C-E) Dairy cattle teats and calf muzzle presenting several umbilicated pustules and ulcerated lesions.

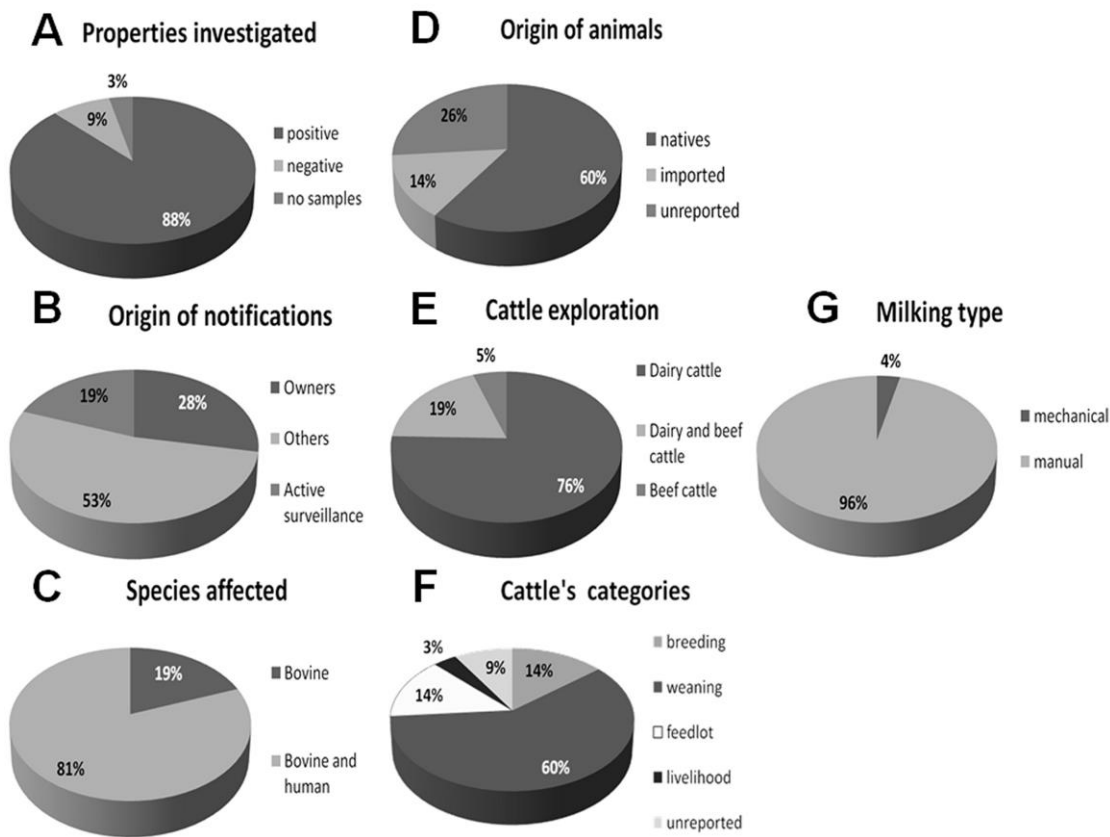


Figure 2: Epidemiological information. (A) The positive/negative index of VACV circulation at the visited properties; (B) Origin of the VACV outbreak notifications; (C) Human and/or bovine index affected at the outbreak episodes; (D) The origin of animals at invited properties. The majority of imported animals came from Minas Gerais State; (E) The profile of cattle exploration in the visited farms; (F) The cattle's category index at farms; (G) The milking technology used at visited farms.

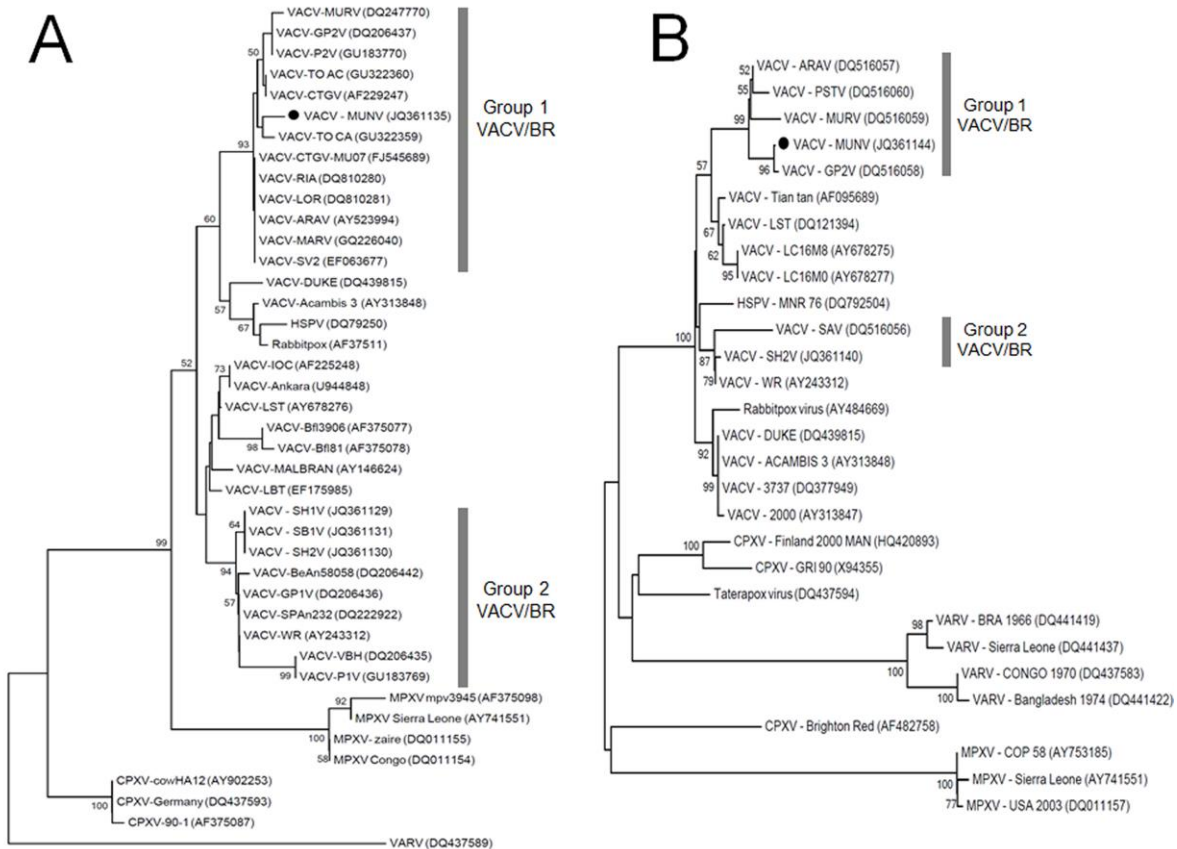


Figure 3: Phylogenetic trees based on OPV's nucleotide sequences of the A56R (A) and A26L (B) genes. In both phylogenetic trees, the MUNV isolate (black dot) grouped into VACV/BR group 1 that comprises most of Brazilian VACV isolates. The trees were both constructed using the neighbor-joining method with use the Tamura-Nei model of nucleotide substitutions and bootstrap of 1,000 replicates in MEGA 4.0.

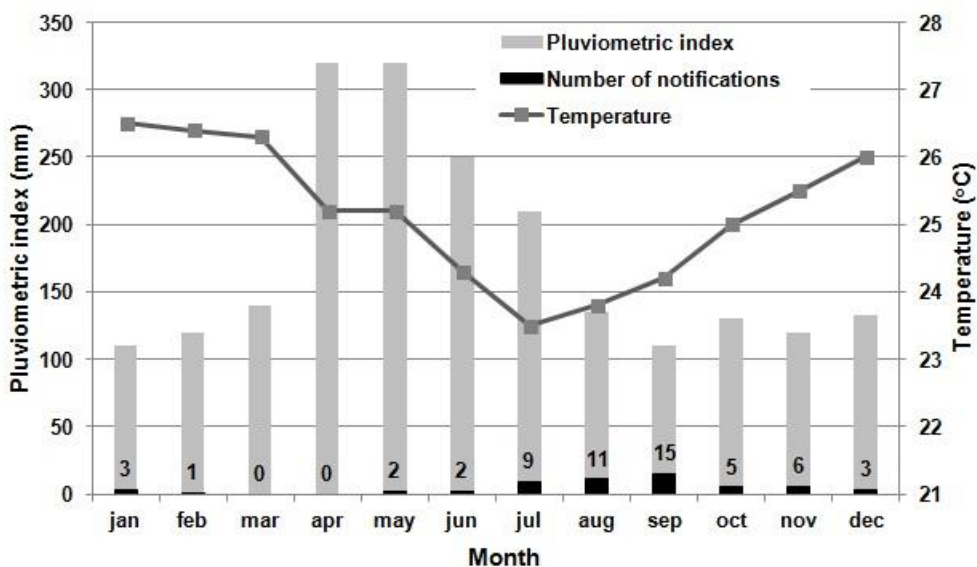


Figure S1: Annual VACV outbreak notification associated with pluviometric index and temperature variation during 2011 in Bahia State.

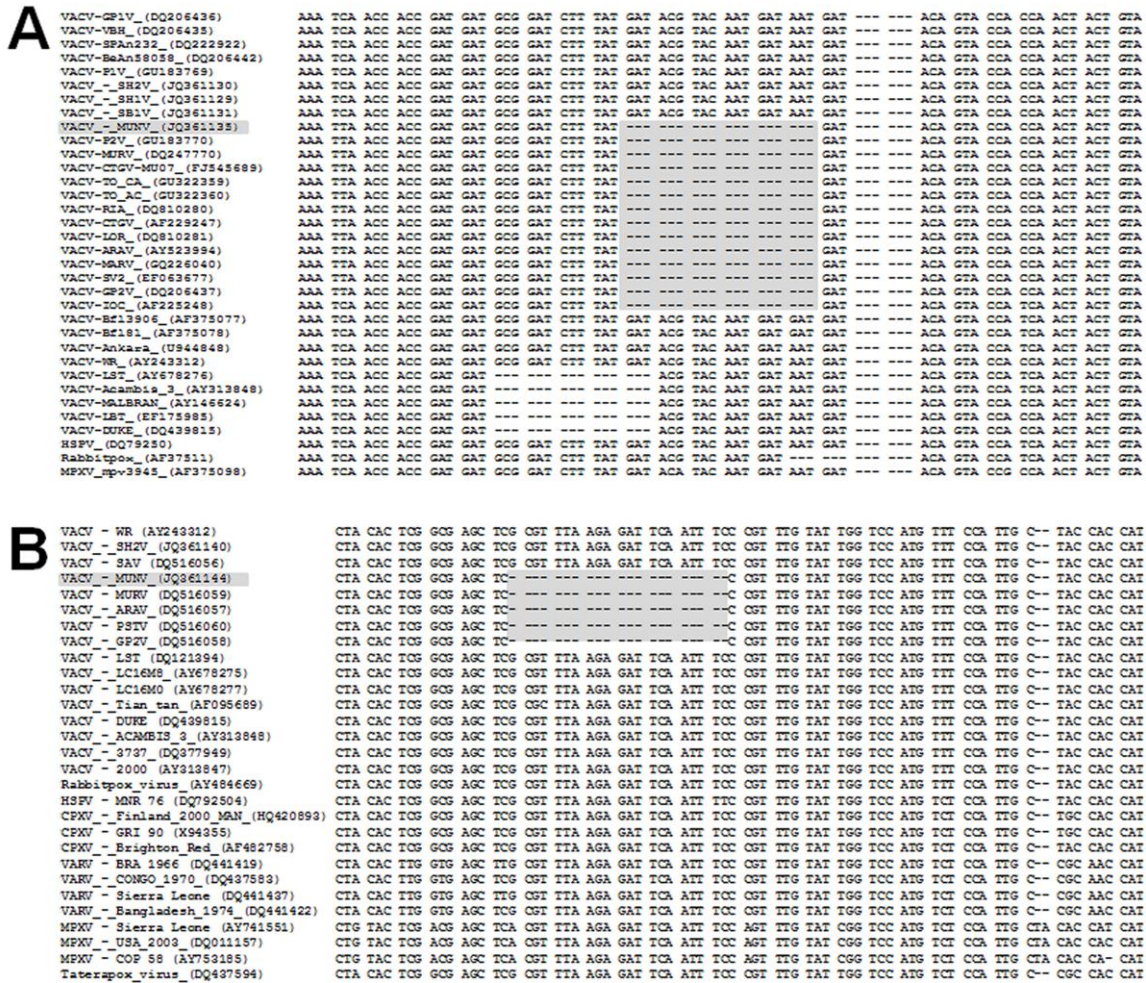


Figure S2: Alignment of Brazilian VACV A56R (A) and A27L (B) genes. Gray box are highlighting deletion signatures presenting in the Brazilian VACV group 1, which include the new isolate VACV-MUNV. Sequences were retrieved from GenBank and aligned using the MEGA 4.0 program. GP1V, Guarani propriedade 1 virus; P1V, Pelotas 1 virus; SH2V, Serro humano 2 virus; SH1V, Serro humano 1 virus; SB1V, Serro bovino 1 virus; MUNV, mundo novo virus; P2V, Pelotas 2 virus; MURV, Muriaé virus; CTGV, Cantagalo virus; ARAV, Araçatuba virus; MARV, Mariana virus; S2V, Serro 2 virus; GP2V, Guarani propriedade 2 virus; IOC, Instituto Oswaldo Cruz; WR, Western reserve; LST, Lister; LBT, Lister butantã; HSPV, horsepox virus; MPXV, Monkeypox virus

Table S1 – Counties and outbreaks analyzed in this study, Bahia State.

Counties of Bahia	No. of focus	Counties of Bahia	No. of focus
Agua Fria	1	Macarani	1
Alcobaça	1	Mairi	4
Baianópolis	1	Mundo Novo	15
Baixa Grande	1	Pintadas	1
Capela A. Alegre	3	Piritiba	6
Inhambupe	2	Poçoões	1
Ipirá	4	Ruy Barbosa	1
Itapé	2	Serrolândia	1
Jacobina	5	Tapiramuta	2
M. Calmon	2	Tx. De Freitas	1
Macajuba	1	Vázea do Poço	1

References

1. ICTVdB Management (2013) 00.058.1.01.001. Vaccinia virus. In: ICTVdB - The Universal Virus Database, version 4. Buchen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA.
2. McFadden G (2005) Poxvirus tropism. *Nat. Ver.*3:201-213.
3. Moss B (2007) Poxviridae: The Viruses and Their Replication. In: Fields, B. N., Knipe, D. M., Howley, P.M., Fields Virology. Fifth edition., Lippincott Williams & Wilkinsv, Philadelphia v 2 pp 2906-2945.
4. Kroon EG, Mota BEF, Abrahão JS, Fonseca FG, Trindade GS (2010) Zoonotic Brazilian Vaccinia virus: From field to therapy. *Antivir. Res.* 92:150-163.
5. Damaso CRA, Joseph JE, Richard CC, Nissin M (2000) An Emergent Poxvirus from Humans and Cattle in Rio de Janeiro State: Cantagalo Virus May Derive from Brazilian Smallpox Vaccine. *Virology.* 277:439-449.

6. Trindade GS, Lobato ZI, Drumond BP, Leite JA, Trigueiro RC, Guedes MI, da Fonseca FG, dos Santos JR, Bonjardim CA, Ferreira PC, Kroon EG (2006) Short report: isolation of two *Vaccinia virus* strain from a single bovine vaccinia outbreak in rural área from Brazil: implications on the emergence of zoonotic Orthopoxviruses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 75:486-490.
7. Trindade GS, Ginny LE, Darin SC, Erna GK, Inger KD (2007) Brazilian Vaccinia Viruses and Their Origins. *Emerging Infect. Dis.* 13:7: 965-972.
8. Abrahão JS, Guedes MI, Trindade GS, Fonseca FG, Campos R., Mota B F, Lobato Z IP, Silva-Fernandes A T, Rodrigues GOL, Lima LS, Ferreira PPF, Bonjardim CA, Kroon EK (2009) One More Piece in the VACV Ecological Puzzle: Could Peridomestic Rodents Be the Link between Wildlife and Bovine Vaccinia Outbreaks in Brazil?. *Plos one.* 4:10:1-7.
9. Assis FL, Borges IA, Ferreira PCP, Bonjardim CA, Trindade GS, Lobato ZIP, Guedes MIM, Vaz M, Kroon EG, Abrahão JS (2012) Group 2 Vaccinia Virus, Brazil. *Emerging Infect. Dis.* 18:2035-2038.
10. Silva-Fernandes AT, Travassos CE, Ferreira JM, Abrahao JS, Rocha ES, Viana-Ferreira F, dos Santos JR., Bonjardim CA, Ferreira PC, Kroon EG (2009) Natural human infections with Vaccinia virus during bovine vaccinia outbreaks. *J Clin Virol.* 44:308-313.
11. O'brien T C, Martin GM, Nicola MT (1971) Kinetics of the Vaccinia Virus Plaque Neutralization Test. *Appl. Microbiol.* 21: 968-970.
12. Fonseca FG, Lanna MC, Campos MAS, Kitajima EW, Peres JN, Golgher RR, Ferreira PCP, Kroon EG (1998) Morphological and molecular characterization of the poxvirus BeAn 58058. *Arch Virol.* 143:1171-86.
13. Abrahão JS, Larissa SL, Assis FL, Alves PA, Silva-Fernandes AT, Cota MMG, Ferreira VM, Campos R K, Mansur C, Lobato ZIP, Trindade GS, Kroon EG (2009) Nested-multiplex PCR detection of *Orthopoxvirus* and *Parapoxvirus* directly from exanthematic clinical samples. *J Virol.* 140: 1-5.

14. Ropp SL, Jin QI, Knight JC, Massung RF, Esposito JJ (1995) PCR strategy for identification and differentiation of smallpox and other orthopoxviruses. *J. Clin. Microbiol.* 33: 2069-2076.
15. Brum MCS, dos Anjos BL, Nogueira CEW, Amaral LA, Rudi W, Flores EF (2010) An outbreak of orthopoxvirus-associated disease in horses in southern Brazil. *J Vet Diagn Invest.* 22:143-147.
15. Meyer H, Ropp SL, Esposito JJ (1997) Gene for A-type inclusion body protein is useful for a polymerase chain reaction assay to differentiate orthopoxvirus. *J. Virol. Methods.* 64:217-221.
16. Quixabeira-Santos JC, Medaglia MLG, Pescador CA, Damaso CR (2011) Animal Movement and Establishment of Vaccinia Virus Cantagalo strain in Amazon Biome, Brazil. *Emerging Infect. Dis.* 17:726-729.

ARTIGO PUBLICADO

Short Report: Intrafamilial Transmission of *Vaccinia virus* during a Bovine Vaccinia Outbreak in Brazil: A New Insight in Viral Transmission Chain

Graziele Pereira Oliveira, André Tavares Silva Fernandes, Felipe Lopes de Assis, Pedro Augusto Alves, Ana Paula Moreira Franco Luiz, Leandra Barcelos Figueiredo, Cláudia Maria Costa de Almeida, Carlos Eurico Pires Ferreira Travassos, Giliane de Souza Trindade, Jônatas Santos Abrahão, and Erna Geessien Kroon*

Laboratório de Vírus, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, Brazil; Laboratório de Sanidade Animal, Hospital Veterinário, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brazil

Abstract. Bovine vaccinia (BV) is an emerging zoonosis caused by the *Vaccinia virus* (VACV), genus *Orthopoxvirus* (OPV), *Poxviridae* family. In general, human cases are related to direct contact with sick cattle but there is a lack of information about human-to-human transmission of VACV during BV outbreaks. In this study, we epidemiologically and molecularly show a case of VACV transmission between humans in São Francisco de Itabapoana County, Rio de Janeiro state. Our group collected samples from the patients, a 49-year-old patient and his son. Our results showed that patients had developed anti-OPV IgG or IgM antibodies and presented neutralizing antibodies against OPV. The VACV isolates displayed high identity (99.9%) and were grouped in the same phylogenetic tree branch. Our data indicate that human-to-human VACV transmission occurred during a BV outbreak, raising new questions about the risk factors of the VACV transmission chain.

The *Vaccinia virus* (VACV) belongs to the *Poxviridae* family, genus *Orthopoxvirus* (OPV) and it is related to bovine vaccinia (BV) outbreaks in Brazil. The BV is an emerging zoonosis that circulates between bovines and humans causing economic losses and public health problems.^{1,2}

Since 1999, several BV outbreaks have been reported in Brazil, causing exanthematic lesions in dairy cattle and milkers.^{3,4} Several VACVs have been isolated during BV outbreaks from different Brazilian regions, showing a genetic and biological dichotomy.⁵ The main VACV transmission route is likely direct occupational contact between milkers and sick cattle.⁶ Therefore, in most of the outbreaks, the human lesions have been restricted to the milkers' hands and arms. Other symptoms are also frequent, including fever, myalgia, headache, arthralgia, and lymphadenopathy.¹

Although the lesions usually present high titers of infectious particles,⁷ there is a lack of information about human-to-human transmission of VACV during BV outbreaks. In this study we describe, based on virological, biological, and molecular data, a case of intrafamilial transmission of VACV during a BV outbreak.

During field expeditions conducted in São Francisco de Itabapoana County, in Rio de Janeiro state, in September 2002, our group was notified about the occurrence of a case of exanthematic disease affecting a milker (patient 1). The 49-year-old patient had been working as a milker at three farms belonging to the same farmer. Patient 1 reported that he had not been previously vaccinated against smallpox and did not present a vaccination scar on his left arm. This patient reported the development of lesions on his hands a few days after contact with sick cattle. The lesions evolved from macules to papules, vesicles, pustules and, after some weeks, to scabs. In addition, patient 1 presented a high fever, ranging from 39 to 40°C, myalgia, headache, and axillary lymphadenopathy. Patient 1 did not report the use of ban-

dages for lesion covering. The disease lasted 3 weeks (Figure 1A). Interestingly, ~6 days after the beginning of the healing stage, patient 1 reported that his son (patient 2), a 14-year-old student, presented with similar symptoms, including exanthematic lesions, fever, myalgia, headache, and axillary lymphadenopathy. During part of the acute phase of the disease (vesicle and scab) patient 1 had shared domestic environments with patient 2, keeping direct contact to him (Figure 1A). There is no information about sharing of clothes or devices between patient 1 and 2. Interestingly, patient 2 did not work as a milker and did not have contact with cattle. Patient 2 had been living at a residence located 24 km from the property where patient 1 reported occupational contact with sick cattle.

To investigate this case, our team went to the affected farm and collected scab samples from the hands of patient 1 using sterile devices, as previously described,⁸ and swab samples from the hand lesions of patient 2 using a sterile swab. In addition, sera samples were collected from both patients. The study followed the rules of Ethics Committee of Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). The collection procedures were carried out separately, and the samples were stored and manipulated far from each other to avoid cross-contamination. In our laboratory, the samples (swab and scab) were prepared for virus isolation, as described previously. The samples were inoculated onto a Vero cell monolayer and the chorioallantoic membranes of hen's eggs^{8,9}; after the appearance of cytopathic effects, DNA was extracted by phenol-chloroform and isoamyl alcohol,¹⁰ and then submitted to a polymerase chain reaction (PCR) assay,¹¹ targeting the *a56r* gene. This gene is a molecular marker for Brazilian VACV (VACV-BR), and its sequencing allows both the identification of VACV and indicates in which Brazilian VACV-BR group the new viral isolate can be included. Furthermore, we amplified and sequenced two more viral genes: the A-type-inclusion body gene (*a26l*) and serine protease inhibitor 3 (*k2l*), by using primers designed to amplify 780 and 1100 base pair (bp), respectively. The viral isolates were named VACV-SFI1 (patient 1) and VACV-SFI2 (patient 2). The PCR products

* Address correspondence to Erna Geessien Kroon, Av. Antônio Carlos, 6627, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, 31270-901. E-mail: kroone@icb.ufmg.br

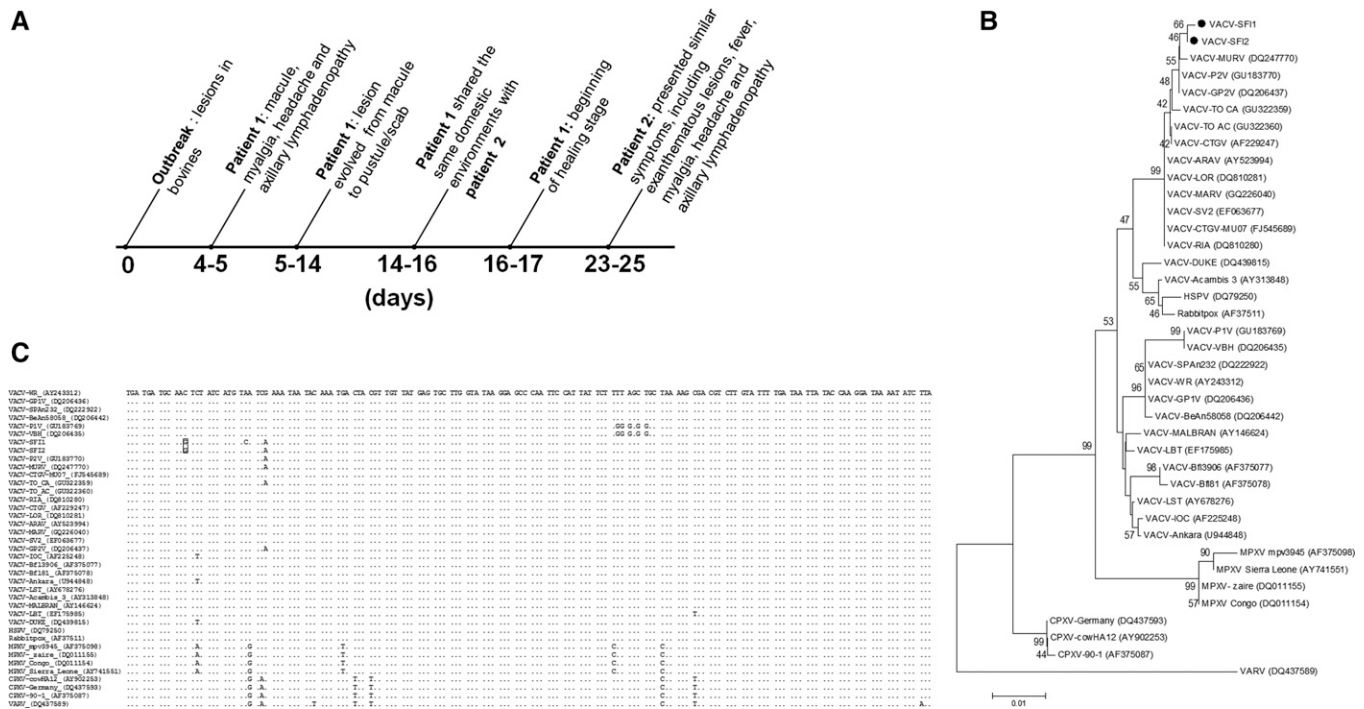


FIGURE 1. (A) Clinical and epidemiological timeline. (B) Maximum parsimony phylogenetic tree constructed based on the nucleotide sequence of the *Orthopoxvirus* (OPV) *a56r* gene. The SF1 and SF2 isolates grouped with other Brazilian *Vaccinia virus* (VACV) in group 1. This clade is the most prevalent in bovine vaccinia (BV) outbreaks. Bootstrap confidence intervals are shown on the branches (1,000 replicates), as are the GenBank accession numbers. (C) Nucleotide alignment of partial *a56r* gene sequences of some VACV and other OPV. The arrow highlights a nucleotide signature (guanine) of the SFI's isolates, whereas all other viruses show a cytosine residue.

were directly sequenced using the MegaBACE platform¹² and compared with nucleotide sequences available in the GenBank database using BLASTN. Based on the *a56r* nucleotide sequences from the VACV-SFIs and other OPV, we constructed a maximum parsimony tree using the MEGA 4.1 program (Arizona State University, Phoenix, AZ).

Both exanthematous samples showed the amplification of *a56r*, *a26l*, and *k2l* fragments. The alignment of the *a56r* sequences obtained from VACV-SFI1 and VACV-SFI2 displayed high identity (99.9%) (Figure 1C). When compared with nucleotide sequences available, the *a56r* genes from the VACV-SFI isolates were similar to homologous genes from other VACV isolates. The SFI *a56r* inferred amino acid sequence contained a signature deletion also present in the sequences of other VACV-BR, such as Araçatuba virus (ARAV), Cantagalo virus (CTGV), Serro virus (SV2), Mariana virus (MARV), Guarani P2 virus (GP2V), Muriae virus (MURV), and others, but absent in GuaraniP1 virus (GP1V), Belo Horizonte virus (VBH), BeAn58058 virus (BAV), and SPAn232 virus (SAV). The SFIs were sub-clustered together among several VACV isolates (Figure 1B). Although the SFIs isolates presented an nt change in *a56r* (A-C), the alignment of the VACV *a56r* regions indicates that the VACV-SFIs share an exclusive nucleotide substitution (C-G) upstream from the 18 nt deletion (Figure 1C). The observed nt change in VACV-SFIs may be a result of viral polymerase error-prone during viral replication in patient 1 or 2. Distinct OPV had been isolated from a same exanthematous lesion,² however, we believe that this is not the case of VACV-SFIs, based on lack of substantial genetic evidence of co-infection, as described in other studies.² Corroborating this hypothe-

sis, the sequencing of *a26l* and *k2l* genes showed a perfect nt alignment (100% identity) among the two SFI isolates. Therefore, taking together molecular and epidemiological data, we believe that a VACV human-to-human transmission took place in this outbreak.

Additionally, sera samples from the patients were submitted to immunoglobulin G (IgG) and immunoglobulin M (IgM) OPV enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) and to a 50% plaque-reduction neutralizing test (PRNT₅₀). Our results showed that patients 1 and 2 had developed anti-OPV IgG and IgM antibodies, respectively. Both patients presented neutralizing antibodies against OPV. Furthermore, we also analyzed several bovine sera samples from the farm where patient 1 worked as a milker during the outbreak. The bovine sera also presented anti-OPV IgG antibodies.

The number of poxvirus infections of humans has increased in recent years highlighting the importance of studies in this area. The BV is an occupational disease with no specific treatment or an available vaccine for cattle, the primary known host of VACV in Brazil.^{6,13,14}

During BV outbreaks, both bovines and humans develop exanthematous lesions. The VACV transmission to humans occurs primarily by direct contact with infected animals or occasionally with contaminated fomites. Few studies have reported cases of VACV-BR transmission among humans.¹⁴⁻¹⁶ However, VACV vaccine strains have been associated with several cases of human-to-human transmission in the United States¹⁷ with most related to contact transmission from smallpox vaccines among military personnel and their relatives. To our knowledge, only two cases of natural transmission have been described between humans during BV outbreaks,

although in these cases, no molecular, virological or phylogenetic analyses were used to confirm the intrafamilial transmission.^{15,16} Additionally, there is only one additional case reporting an intrafamilial transmission.¹⁴ In this study, we molecularly showed a case of VACV transmission between humans. We analyzed sera samples taken from a father and son by serological methods, which confirmed the infection by an OPV. Additionally, the molecular and phylogenetic analyses reinforced the diagnosis and suggested that the father and son were infected with the same virus.

Considering our molecular and epidemiological data, we believe that this was a case of VACV intrafamilial transmission during the BV outbreak that occurred in São Francisco de Itabapoana. Some previous studies have shown long-lasting stability of VACV and other OPVs particles under environmental conditions.^{8,18,19} Therefore, two hypotheses could explain such intrafamilial transmission: 1) direct contact between the father's lesion and the son's skin, and 2) VACV transmission occurring through contaminated fomites.

Our study reinforces the risk of non-occupational VACV transmission during BV outbreaks. Further studies are needed to elucidate the importance of human-to-human transmission during BV outbreaks and to indicate how this type of report is under-notified. A relevant question to be explored is why human-to-human VACV transmission after smallpox vaccination is much more frequently described than those observed (or notified) during BV outbreaks in Brazil. Nevertheless, we believe that this report provides one more clinically relevant piece in the VACV transmission chain, particularly considering the possibility of household transmission among infected milkers and immunosuppressed patients.

Received October 25, 2013. Accepted for publication January 31, 2014.

Published online March 10, 2014.

Acknowledgments: We thank João R. dos Santos, Gisele Sirilo dos Santos, and colleagues from Laboratório de Vírus (ICB-UFMG).

Financial support: Financial support was provided by CNPq, CAPES, FAPEMIG, and MAPA. GST and EGK received a fellowship from CNPq.

Authors' addresses: Grazielle Pereira Oliveira, André Tavares Silva Fernandes, Felipe Lopes de Assis, Pedro Augusto Alves, Ana Paula Moreira Franco Luiz, Leandra Barcelos Figueiredo, Jônatas Santos Abrahão, Giliane de Souza Trindade, and Erna Geessien Kroon, Laboratório de Vírus, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, Brazil, E-mails: graziufmg@yahoo.com.br, fernandeserthal@gmail.com, felipelopesassis@gmail.com, pedroaugustoalves@yahoo.com.br, anapaulamluiz@gmail.com, leandrabo@yahoo.com.br, jonatas.abrahao@gmail.com, gittrindade@yahoo.com.br, and kroone@icb.ufmg.br. Cláudia Maria Costa de Almeida and Carlos Eurico Pires Ferreira Travassos, Laboratório de Sanidade Animal, Hospital Veterinário, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brazil, E-mails: calmeida@uenf.br and cakatrav@uenf.br.

REFERENCES

- Damon I, 2007. Poxviridae and their replication. In: *Fields Virology*. Knipe, DM, Howley, PM, eds. Fifth edition. New York: Raven Press, 2079–2081.
- Kroon EG, Mota BE, Abrahão JS, da Fonseca FG, de Souza Trindade G, 2011. Zoonotic Brazilian *Vaccinia virus*: from field to therapy. *Antiviral Res* 92: 150–163.
- Trindade GS, da Fonseca FG, Marques JT, Nogueira ML, Mendes LC, Borges AS, Peiró JR, Pituco EM, Bonjardim CA, Ferreira PC, Kroon EG, 2003. Araçatuba virus: a *Vaccinia*-like virus associated with infection in humans and cattle. *Emerg Infect Dis* 9: 155–160.
- Damaso CR, Esposito JJ, Condit RC, Moussatche N, 2000. An emergent poxvirus from humans and cattle in Rio de Janeiro State: Cantagalo virus may derive from Brazilian smallpox vaccine. *Virology* 277: 439–449.
- Drumond BP, Leite JA, da Fonseca FG, Bonjardim CA, Ferreira PC, Kroon EG, 2008. Brazilian *Vaccinia virus* strains are genetically divergent and differ from the Lister vaccine strain. *Microbes Infect* 10: 185–197.
- Silva-Fernandes AT, Travassos CE, Ferreira JM, Abrahão JS, Rocha ES, Ferreira FV, dos Santos JR, Bonjardim CA, Ferreira PC, Kroon EG, 2009. Natural human infections with *Vaccinia virus* during bovine vaccinia outbreaks. *J Clin Virol* 44: 308–313.
- Trindade GS, Guedes MI, Drumond BP, Mota BE, Abrahão JS, Lobato ZI, Gomes JA, Oliveira RC, Nogueira ML, Kroon EG, Fonseca FG, 2009. Zoonotic *Vaccinia virus*: clinical and immunological characteristics in a naturally infected patient. *Clin Infect Dis* 48: 37–40.
- Abrahão JS, Guedes MI, Trindade GS, Fonseca FG, Campos RK, Mota BE, Lobato ZI, Fernandes AT, Rodrigues GO, Lima LS, Ferreira PC, Bonjardim CA, Kroon EG, 2009. One more piece in the VACV ecological puzzle: could peridomestic rodents be the link between wildlife and bovine *Vaccinia* outbreaks in Brazil? *PLoS ONE* 4: 1–7.
- Overman JR, Tamm I, 1957. Multiplication of *Vaccinia virus* in the chorioallantoic membrane *in vitro*. *Virology* 3: 173–184.
- Sambrook E, Fritsch F, Maniatis T, 1989. *Molecular Cloning*. Fifth edition. New York: Cold Spring Harbor Press.
- Ropp SL, Jin Q, Knight JC, Massung RF, Esposito JJ, 1995. PCR strategy for identification and differentiation of small pox and other orthopoxviruses. *J Clin Microbiol* 33: 2069–2076.
- Sanger F, Air GM, Barrell BG, Brown NL, Coulson AR, Fiddes CA, Hutchison CA, Slocumbe PM, Smith M, 1977. Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature* 265: 687–695.
- Reynolds MG, Yorita KL, Kuehnert MJ, Davidson WB, Huhn GD, Holman RC, Damon IK, 2006. Clinical manifestations of human monkey pox influenced by route of infection. *J Infect Dis* 194: 773–780.
- Schatzmayr HG, Lemos ER, Mazur C, Schubach A, Majerowicz S, Rozental T, Schubach TM, Bustamante MC, Barth OM, 2000. Detection of poxvirus in cattle associated with human cases in the State of Rio de Janeiro: preliminary report. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 65: 625–627.
- Lobato ZI, Trindade GS, Frois MC, Ribeiro EB, Dias GR, Teixeira BM, Lima FA, Almeida GM, Kroon EG, 2005. Surto de varíola bovina causada pelo vírus *Vaccinia* na região da Zona da mata mineira. *Arq Bras Med Vet Zootec* 57: 423–429.
- Batista VH, Scremin J, Aguiar LM, Schatzmayr HG, 2009. Vulvar infection and possible human-to-human transmission of bovine poxvirus disease. *Virus Rev* 14: 1–10.
- Vora S, Damon I, Fulginiti V, Weber SG, Kahana M, Stein SL, Gerber SL, Garcia-Houchins S, Lederman E, Hruby D, Collins L, Scott D, Thompson K, Barson JV, Regnery R, Hughes C, Daum RS, Li Y, Zhao H, Smith S, Braden Z, Karem K, Olson V, Davidson W, Trindade G, Bolken T, Jordan R, Tien D, Marcinak J, 2008. Severe eczema vaccinatum in a household contact of a smallpox vaccine. *Clin Infect Dis* 46: 1555–1561.
- Wolff HL, Croon JJ, 1968. The survival of smallpox virus (variola minor) in natural circumstances. *Bull World Health Organ* 38: 492–493.
- Essbauer S, Meyer H, Porsch-Ozcürümez M, Pfeffer M, 2007. Long-lasting stability of *Vaccinia virus* (orthopoxvirus) in food and environmental samples. *Zoonoses Public Health* 54: 118–124.

TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS CIENTÍFICOS

Clinical case: Intrafamiliar transmission of Vaccinia virus during bovine vaccinia outbreak in Brazil. **OLIVEIRA, G.P.**;Silva-Fernandes, A.T. ; Assis, F.L. ; ALVES, P. A. ; LUIZ, A.P.M.F. ; FIGUEIREDO, L.B. ; ALMEIDA, C.M.C ; TRAVASSOS, C.E.P.F ; TRINDADE, G.S ; ABRAHÃO, J.S. ; KROON, E. G. Evento: **XXIV Congresso Brasileiro de Virologia e VIII Encontro de virologia do Mercosul**, Porto Seguro-BA, 2013.

Evaluation of influence from normal microbiota on Vaccinia virus infection in gnotobiotics and conventional swiss mice by two different inoculation forms. LIMA, M. T. ; ANDRADE, A. C. S. P. ; CALIXTO, R. S. ; **OLIVEIRA, G. P.** ; MARTINS, F. S. ; KROON, E. G ; ABRAHÃO, J. S. Evento: **XXV Congresso Brasileiro de Virologia e IX Encontro de virologia do Mercosul**, Ribeirão Preto-SP,2014.

Evaluation of the influence exercised by a microorganism probiotic during Vaccinia virus infection balb/c mice. ANDRADE, A. C. S. P. ; **OLIVEIRA, G. P.** ; LIMA, M. T. ; CALIXTO, R. S. ; MARTINS, F. S. ; FERREIRA, J.M.S. ; KROON, E. G ; ABRAHÃO, J. S. Evento: **XXV Congresso Brasileiro de Virologia e IX Encontro de virologia do Mercosul**, Ribeirão Preto-SP,2014.

Transmissão intrafamiliar de *Vaccinia virus* durante surto de vaccinia bovina no Brasil **OLIVEIRA, G.P.** ; Silva-Fernandes, A.T. ; Assis, F.L. ; ALVES, P. A. ; FRANCO-LUIZ, A. P. M. ; FIGUEIREDO, L. B. ; ALMEIDA, C. M.C ; Travassos, C.E.P.F ; Trindade, G.S ; Abrahão, J.S. ; KROON, E. G. **I simpósio de microbiologia da UFMG**, Belo Horizonte-MG, 2014.