

**IZABELLE SILVA REHFELD**

**TRANSMISSÃO DE *Vaccinia virus* PELO LEITE EM MODELO MURINO;  
DETECÇÃO E VIABILIDADE DE POXVIRUS NO QUEIJO E LEITE**

Tese apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, como requisito para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal.

**Área de Concentração:** Medicina Veterinária Preventiva.

**Orientadora:** Profa. Dra. Zélia Inês Portela Lobato

**Co-orientadores:** Profa. Dra. Maria Isabel Maldonado Coelho Guedes e Prof. Dr. Marcelo Resende de Souza.

**BELO HORIZONTE – MG  
ESCOLA DE VETERINÁRIA DA UFMG  
2016**

R345t Rehfeld, Izabelle Silva, 1981-  
Transmissão de *Vaccinia virus* pelo leite em modelo murino; detecção e viabilidade de poxvírus no queijo e leite / Izabelle Silva Rehfeld. – 2016.  
107 p. : il.

Orientadora: Zélia Inês Portela Lobato

Co-orientadores: Maria Isabel Maldonado Coelho Guedes, Marcelo Resende de Souza

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária

Inclui bibliografia

1. Leite – Análise – Teses. 2. Queijo – Análise – Teses. 3. Vaccinia – Teses.  
4. Poxvirus – Teses. 5. Bovino de leite – Doenças – Teses. I. Lobato, Zélia Inês Portela.  
II. Guedes, Maria Isabel Maldonado Coelho. III. Souza, Marcelo Resende de.  
IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. V. Título.

CDD – 637.1

## FOLHA DE APROVAÇÃO

### IZABELLE SILVA REHFELD

Tese submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de DOUTOR em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração em MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA.

Aprovada em 16 de Fevereiro de 2016, pela banca constituída pelos membros:

Prof<sup>ª</sup>. Zélia Inês Portela Lobato  
Presidente – Orientador

Prof<sup>ª</sup>. Mônica Maria Oliveira Pinho Cérqueira  
Escola de Veterinária - UFMG

Dr. Marcelo Fernandes Camarões  
Laboratório Nacional Agropecuário - LANAGRO/MAPA

Prof<sup>ª</sup>. Giliane de Souza Trindade  
Instituto de Ciências Biológicas - UFMG

Prof<sup>ª</sup>. Danielle Ferreira de Magalhães Soares  
Escola de Veterinária - UFMG





**Dedico esta tese aos animais e à ciência.**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, meu sincero agradecimento e respeito a todos os animais, especialmente àqueles que contribuem diretamente com a ciência. Nosso objetivo no uso de animais experimentais foi em prol da saúde humana e animal e nosso trabalho foi desenvolvido de acordo com as normas éticas preconizadas pela Comissão de Ética em Uso Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA-UFGM).

Gostaria muito de agradecer...

À Professora Zélia por ter me dado a oportunidade de desenvolver uma pesquisa enriquecedora, fascinante e prazerosa com grande relevância tanto para a academia quanto para a comunidade de uma forma geral. Sou muito grata pelos ensinamentos ético, laboratorial, prático-teórico, pelos momentos de descontração, pela paciência, pela confiança e pelo carinho. Todos os aprendizados foram muito importantes na minha formação profissional e pessoal.

À Professora Maria Isabel (Bel) pelos ensinamentos, pela confiança, pela compreensão, pela amizade, pelo carinho e pelo companheirismo. Bel, não tenho nem palavras para descrever o quanto você, como pessoa e como profissional, acrescentou na minha vida. Você não foi apenas minha co-orientadora, mas uma amiga também. Se 10% da população fosse igual a você, acho que o mundo seria muito melhor. Você é um exemplo a ser seguido!

Ao Professor Marcelo pelo apoio, pelos ensinamentos, pela atenção e pelo carinho. Você é uma das pessoas mais correta, mais ética, mais atenciosa e mais humana que já conheci, além de ser um Professor exemplar. Foi um prazer e um orgulho poder tê-lo como meu co-orientador.

Aos meus amigos, colegas e parceiros do LPVA que estiveram envolvidos direta e indiretamente nos trabalhos realizados. Carol, Érica (ou melhor, Professora Érica), Júlio, Alessandra, Grazi, Ana Fraiha, Aristóteles (Totó): vocês foram fundamentais no desenvolvimento de cada projeto e, sem vocês esta tese não teria sido concretizada. A vitória é de vocês também!! Muito obrigada pelos conselhos, pelas risadas, pelas ajudas, pelas parcerias e pela amizade. Conviver com vocês tornou o ambiente muito mais divertido e muito mais leve. Vocês estarão sempre no meu coração!

Ao DMVP, incluindo os professores, alunos e funcionários, em especial aos Professores Andrey, Chico, Nelson e Jenner; aos funcionários Eduardo, Graciela, Agda, Rita e Renata. Obrigada pela atenção, pelos ensinamentos e pelo carinho.

Ao DTIPOA, principalmente os Laboratório de Microbiologia do Alimento e de Qualidade do Leite, com agradecimento especial aos alunos Renata e Gilson por terem disponibilizado as amostras de queijos para o estudo; à Maura, que sempre foi uma pessoa muito prestativa e amável.

Aos proprietários das fazendas que nos receberam com muito carinho e compreensão, colaborando para com o estudo.

À minha família, especialmente aos meus pais, Paulo e Celina, que são meu norte, meu exemplo de vida e que sempre me apoiaram em todas as minhas decisões e me ajudaram a levantar e seguir em frente nas escolhas erradas. Aos meus irmãos, André e Paula, meus amigos e companheiros, são meus exemplos de lealdade, cumplicidade, solidariedade e integridade. Ao meu cunhado Henrique, que se tornou um grande irmão. Aos meus sobrinhos lindos, Anna Clara e Matheus, que são minha fonte de renovação e de alegria. Ao Tio Brás, meu padrinho e

segundo pai, que sempre esteve presente na minha vida e sempre me ajudou nos momentos que mais precisei. Aos primos Evandro e Cláudia que sempre me incentivaram nos estudos.

Ao Gabriel, meu companheiro em todos os momentos, sempre compreensivo, um grande amigo e cúmplice, uma pessoa com o coração enorme. Tenho muito orgulho de ter você ao meu lado e de poder compartilhar a minha vida e a minha alma com você!

Às minhas grandes amigas, minhas irmãs de coração, Tetê, Carol e Joseane, pelo apoio, pela presença, pelo carinho e pela lealdade.

Enfim, agradeço a todos que de forma direta ou indireta me ajudaram a concretizar esse sonho!!

“Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável para aprender a conhecer a influência libertadora da beleza do reino do espírito, para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertencer.”

(Albert Einstein)

## SUMÁRIO

Lista de figuras.....	12
Lista de tabelas.....	14
Lista de abreviaturas.....	15
Apresentação da tese .....	17
Resumo.....	18
Abstract.....	19
1. Introdução Geral.....	20
2. Objetivos.....	23
3. Revisão de literatura.....	23
3.1. Família <i>Poxviridae</i> e suas característica.....	23
3.1.1. Classificação.....	23
3.1.2. Estrutura e multiplicação viral.....	24
3.2. Principais doenças vesiculares causadas por poxvirus.....	28
3.2.1. Gênero <i>Parapoxvirus</i> .....	28
3.2.2. Gênero <i>Orthopoxvirus</i> .....	29
3.3. Patogênese das infecções por poxvirus.....	29
3.4. Pseudovaríola.....	31
3.4.1. Sinais clínicos.....	31
3.4.2. Pseudovaríola no Brasil.....	32
3.4.3. Hospedeiros do <i>Pseudocowpox virus</i> .....	33
3.5. Vaccínia bovina.....	33
3.5.1. Sinais Clínicos.....	33
3.5.2. Vaccínia bovina no Brasil.....	35
3.5.3. Hospedeiros do <i>Vaccinia virus</i> .....	37
3.6. Viabilidade do <i>Vaccinia virus</i> .....	38
3.7. Importância histórica e saúde pública.....	40
3.8. Patógenos possivelmente veiculados pelo leite.....	41
3.9. Queijo Minas artesanal.....	42
3.9.1. Processo de maturação dos queijos.....	46
Capítulo 1: <i>Vaccinia virus</i> : transmissão por leite experimentalmente contaminado utilizando modelo murino.....	50
Resumo.....	50

1. Introdução.....	51
2. Material e Métodos.....	52
2.1. Células.....	52
2.2. Vírus VACV-GP2.....	52
2.3. Amostras de leite e contaminação das mesmas.....	52
2.4. Aprovação da CEUA.....	52
2.5. Inoculação, acompanhamento e coleta de amostras.....	52
2.6. Provas moleculares.....	55
2.6.1. Extração de DNA.....	55
2.6.2. PCR- <i>nested</i> para amplificação do gene vgf.....	55
2.7. Isolamento viral.....	55
2.8. Histopatologia e imunohistoquímica.....	56
2.9. Soroneutralização por redução de placa.....	56
2.10. Análise estatística.....	56
3. Resultados.....	56
3.1. Sinais Clínicos e pesagem dos animais.....	56
3.2. PCR- <i>nested</i> e pesquisa de partículas virais viáveis.....	56
3.2.1. Suabe oral.....	56
3.2.2. Fezes e sangue.....	57
3.2.3. Tecidos.....	57
3.3. Histopatologia e Imunohistoquímica.....	57
3.4. Soroneutralização por redução de placa.....	60
3.5. Resultados de todas as análises.....	60
4. Discussão.....	61
5. Conclusão.....	65

Capítulo 2: Estudo da viabilidade do *Vaccinia virus* em queijo produzido com leite cru experimentalmente contaminado e submetido a diferentes tempos de maturação.....66

Resumo.....	66
1. Introdução.....	67
2. Material e Métodos.....	67
2.1. Células.....	67
2.2. Vírus VACV-GP2.....	68
2.3. Amostras de leite.....	68
2.4. Produção do queijo artesanal e o processo de maturação.....	68
2.5. Pesquisa de partículas virais viáveis e titulação.....	70

2.6. Provas moleculares.....	70
2.6.1. Extração de DNA.....	70
2.6.2. PCR em tempo real para amplificação do gene <i>vgf</i> .....	71
2.7. Análise Estatística.....	71
3. Resultados.....	71
3.1. Viabilidade e titulação do VACV em queijo.....	71
3.2. PCR em tempo real.....	73
4. Discussão.....	73
5. Conclusão.....	76
Capítulo 3: Detecção de <i>Vaccinia virus</i> em queijos Minas artesanais elaborados em propriedades com e sem casos de VB no estado de Minas Gerais.....	77
Resumo.....	77
1. Introdução.....	78
2. Material e Métodos.....	78
2.1. Propriedades visitadas, coletas e processamento dos queijos.....	78
2.2. Provas moleculares.....	80
2.2.1. Extração de DNA.....	80
2.2.2. PCR- <i>nested</i> para amplificação do gene <i>vgf</i> .....	80
2.2.3. PCR em tempo real para amplificação do gene <i>vgf</i> .....	80
2.3. Pesquisa de partículas virais infecciosas.....	80
2.3.1. Cultivo celular.....	80
2.3.2. Ovos embrionados de galinha.....	81
2.4. Imunoperoxidase em monocamada celular (IPMC).....	81
3. Resultados.....	81
4. Discussão.....	82
5. Conclusão.....	84
Capítulo 4: Comunicação – Detecção de DNA de <i>Parapoxvirus</i> em amostras de leite coletadas de vacas com lesões vesiculares nos tetos de propriedades com vaccínia bovina.....	85
Considerações Finais.....	88
Referências Bibliográficas.....	90
Anexo.....	107

## LISTA DE FIGURAS

<b>Revisão de literatura.....</b>	<b>23</b>
Figura 1: Diagrama filogenético da família <i>Poxviridae</i> e as subfamílias <i>Chordopoxvirinae</i> e <i>Entomopoxvirinae</i> . Fonte: Duraffour <i>et al.</i> , 2011, atualizado.....	24
Figura 2: Representação esquemática do genoma dos poxvirus. O genoma pode ser dividido em uma região central conservada que codifica proteínas essenciais para a replicação viral e as regiões terminais invertidas (ITRs) que são variáveis e codificam proteínas que não são essenciais para a replicação do vírus, no entanto, codificam proteínas que são responsáveis pelas interações vírus-hospedeiro e pelos mecanismos de patogênese. Fonte: Adaptado de Smith e McFadden, 2002, revisado por Oliveira, 2014.....	25
Figura 3: Morfologia dos Poxvirus. (A) Representação esquemática da partícula viral de um poxvirus. (B) Eletromicrografia de secção longitudinal do <i>Cowpox virus</i> . lb – Corpúsculos laterais, c – Cerne. A barra representa 100 nm. (C) Eletromicrografia em contraste negativo do VACV. Fontes: (A) Harrison <i>et al.</i> , 2004 (modificado); (B) ICTVdb, 2013; (C) Wilton <i>et al.</i> , 1995, revisado por Oliveira, 2014.....	25
Figura 4: Representação esquemática do ciclo de multiplicação dos poxvirus. Fonte: McFadden, 2005, traduzido.....	27
Figura 5: Ilustração da morfologia dos gêneros <i>Orthopoxvirus</i> (A) e <i>Parapoxvirus</i> (B). Fonte: Murphy <i>et al.</i> , 1999, adaptada por Canal e Diel, 2012.....	28
Figura 6: Lesões papulares em mão de humano, causadas por PCPV após manipulação de bezerros. Fonte: McNeil <i>et al.</i> , 2009.....	32
Figura 7: Lesões nas mãos dos ordenhadores acometidos em surtos de VB. Fonte: LPVA (Laboratório de Pesquisa em Virologia Animal, Escola de Veterinária, UFMG) .....	34
Figura 8: Lesões nas faces dos ordenhadores acometidos em surtos de VB. (A) intraorbital, (B) periorbital e (C) vestíbulo nasal. Fonte: Silva <i>et al.</i> , 2008.....	34
Figura 9: Lesões ulcerativas em tetos de vaca leiteira (A) e mucosa oral de bezerro (B) em propriedade com caso de VB. Fonte: LPVA.....	34
Figura 10: Estados onde amostras brasileiras de VACV foram isoladas, com acometimento de humanos, bovinos e outras espécies, durante o período de 1999 a 2015. Fonte: Oliveira, 2014 (modificado).....	36
Figura 11: Ciclo de patógenos veiculados pelo leite iniciando no ambiente de ordenha até sua transferência para o leite e derivados. (A) Os microrganismos patogênicos podem estar diretamente relacionados com a manipulação de utensílios contaminados no momento da ordenha ou com microrganismos eliminados junto com o leite; (B) o leite torna-se contaminado durante a ordenha mecânica ou manual; (C) O leite contaminado é encaminhado aos tanques de expansão; (D) O consumo de leite não pasteurizado e outros derivados lácteos produzidos a partir de leite não pasteurizado favorece a disseminação dos patógenos. Fonte: Oliver (2005), revisado por Oliveira, 2014, modificado.....	41
Figura 12: Mapa das microrregiões produtoras de queijo artesanal no estado de Minas Gerais. * Microrregiões produtoras de outros tipos de queijos elaborados a partir de leite cru: Vale do Jequitinhonha, produtor do queijo Cabacinha e Vale do Suaçuí, produtor do queijo parmesão artesanal. Fonte: Castro, 2015, adaptado.....	43
Figura 13: Esquema geral de proteólise decorrente da ação microbiana durante a maturação de queijos: 1. Descarboxilação; 2. Transaminações; 3. Desaminações oxidativas; 4. Degradações; 5. Reduções; 6. Oxidações. Fonte: Perry, 2004.....	47
<b>Capítulo 1: <i>Vaccinia virus</i>: transmissão por leite experimentalmente contaminado utilizando o</b>	

**modelo murino.....50**

Figura 1: Esquema de inoculação ecoleta de amostras de SOs, fezes, sangue e tecidos em camundongos experimentalmente inoculados, por via oral, com leite contaminado com VACV-GP2.....54

Figura 2: Cortes histológicos de pulmão mostrando infiltrado linfo-histiocitário no interstício (setas). Coloração H&E. A-Pulmão de camundongo do grupo GC que foi inoculado, por via oral, com leite não contaminado com VACV (200 µm); B-Pulmão de camundongo do grupo GI que foi inoculado, por via oral, com leite contaminado com VACV (200 µm) .....57

Figura 3: Cortes histológicos de camundongos experimentalmente infectados com VACV-GP2. Coloração pela técnica de IHQ (100 µm). A- Pulmão:discreta a moderada imunomarcção em citoplasma de linfócitos (setas). B-Baço: moderada imunomarcção em citoplasma de linfócitos (setas). C- Rim: discreta a moderada imunomarcção em citoplasma de células epiteliais dos túbulos contorcidos proximais (setas). D-Fígado: moderada a intensa imunomarcção em citoplasma de hepatócitos (setas). E- Linfonodo submandibular: discreta imunomarcção em citoplasma de linfócitos (setas pretas). F-Íleo: moderada imunomarcção em citoplasma de linfócitos da placa de Peyer (setas) e discreta em células epiteliais (setas vermelhas).....58

Figura 4: Cortes histológicos de camundongos experimentalmente inoculados com leite não contaminado com VACV (grupo controle) e o dia após inoculação (d.p.i.). Células sem imunomarcções intracitoplasmáticas específicas para VACV. Coloração pela técnica de IHQ (100 µm). A-Pulmão; B-Baço; C- Rim; D-Fígado; E- Linfonodo submandibular; F-Íleo.....59

**Capítulo 2: Estudo da viabilidade do VACV em queijo produzido com leite cru experimentalmente contaminado e submetido a diferentes tempos de maturação.....66**

Figura 1: Esquema de produção, coleta e processamento dos queijos controle e experimentalmente contaminados com VACV-GP2 submetidos aos tempos de maturação de 1,7, 14, 21, 45 e 60 dias a 25°C.....69

Figura 2: Esquema representando a coleta de cada queijo nos respectivos tempos de maturação e o processamento das amostras para realização das técnicas de biologia molecular e inoculação em cultivo celular. Foram selecionadas três alíquotas de cada amostra de queijo.....70

Figura 3: (A) Monocamada de células VERO íntegra após a inoculação de amostras de queijo controle. (B) Lise celular na monocamada de células VERO inoculada com amostra de queijo experimentalmente contaminado com VACV. Coloração com cristal violeta e aumento de 10x.....72

Figura 4: Representação gráfica da média do título viral, em UFF/mL, nos queijos experimentalmente contaminados com VACV submetidos à maturação por até 60 dias a 25°C. Barras verticais representam erros padrão da média. Área sombreada representa intervalo de confiança da regressão linear.....72

Figura 5: Representação gráfica da quantificação média de DNA (UG/g) do VACV em queijos experimentalmente contaminados em função de dias de maturação. Barras verticais representam erros padrão da média. Área sombreada representa intervalo de confiança da regressão linear.....73

**Capítulo 3: Detecção de *Vaccinia virus* em queijo Minas artesanal elaborados em propriedades com e sem casos de VB no estado de Minas Gerais.....77**

Figura 1: Foto mostrando isolamento de OPXV das amostras de QMA pela técnica de inoculação em MCA de ovo de galinha embrionado com formação de “pock” viral (seta) (A) e pela técnica de IPMC pela coloração específica para OPXV em monocamada de célula VERO com efeito de lise (B).....82

## LISTA DE TABELAS

<b>Revisão de literatura.....</b>	<b>23</b>
Tabela 1: Parâmetros que afetam crescimento microbiano em queijos.....	45
<b>Capítulo 1: <i>Vaccinia virus</i>: transmissão por leite experimentalmente contaminado utilizando o modelo murino.....</b>	<b>50</b>
Tabela 1: Iniciadores utilizados na reação de PCR- <i>nested</i> para detecção do gênero OPXV, com amplificação do gene <i>vgf</i> .....	55
Tabela 2: Descrição das imunomarcações em diferentes tempos observadas em tecidos de camundongos inoculados oralmente com leite experimentalmente contaminado com VACV-GP2.....	60
Tabela 3: Resultados de todas as técnicas realizadas para analisar amostras coletadas em camundongos inoculados por via oral com leite experimentalmente contaminado com VACV-GP2.....	61
<b>Capítulo 2: Estudo da viabilidade do VACV em queijo produzido com leite cru experimentalmente contaminado e submetido a diferentes tempos de maturação.....</b>	<b>66</b>
Tabela 1: Média do título de VACV-GP2 (UFP/ml) nas amostras de leite, soro, coágulo e queijos com diferentes tempos de maturação experimentalmente contaminados.....	72
Tabela 2: Quantificação média do DNA viral através da técnica de PCR em tempo real das amostras de queijos produzidos com leite cru experimentalmente contaminado com VACV-GP2 em função dos dias de maturação.....	73
<b>Capítulo 3: Detecção de <i>Vaccinia virus</i> em queijo Minas artesanal elaborados em propriedades com e sem casos de VB no estado de Minas Gerais.....</b>	<b>77</b>
Tabela 1: Descrição detalhada das propriedades visitadas (P1-P20), quantidade de queijos coletados por propriedades e tempo de maturação dos queijos.....	79
Tabela 2: Resultado das amostras de QMA coletadas em propriedades com e sem caso de VB (F1 e F2) submetidas às técnicas de PCR e isolamento para OPXV.....	82
<b>Capítulo 4: Comunicação – Detecção de DNA de <i>Parapoxvirus</i> em amostras de leite coletadas de vacas com lesões vesiculares de propriedades com vaccínia bovina.....</b>	<b>85</b>
Tabela 1: Resultado da técnica de PCR para amplificação do gene B2L, para detecção de PPV, em amostras de crostas e leite coletadas de vacas com lesões vesiculares nos tetos e a presença de coinfeção de PPV e OPXV nas amostras de leite, de propriedades com presença confirmada de VB.....	86

## LISTA DE ABREVIATURAS

ARAV - vírus Araçatuba  
AN – anticorpos neutralizantes  
BAV – vírus BeAN 58058  
BHV – vírus Belo Horizonte  
BPXV – *Buffalopox virus*  
CEV – vírus envelopado célula associado  
CPXV – *Cowpoxvirus*  
CTGV – vírus Cantagalo  
d.p.i. – dias pós inoculação  
ECMV – *Ectromelia virus*  
ECP – efeito citopático  
EEV – vírus extracelular envelopado  
GP1V – vírus Guarani P1  
GP2V – vírus Guarani P2  
HE – histopatologia  
HSPV – *Horsepox virus*  
IEV – vírus intracelular envelopado  
IHQ – imunohistoquímica  
IMA – Instituto Mineiro de Agropecuária  
IMV – vírus intracelular maduro  
IPMC – imunoperoxidase em monocamada celular  
MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento  
MCA – membrana corioalantóide  
MPXV – *Monkeypox virus*  
MURV – vírus Muriaé  
OPXV – *Orthopoxvirus*  
PSTV – vírus passatempo  
PCPV – *Pseudocowpox virus*  
PSV - pseudovariola  
PPV – *Parapoxvirus*  
QMA – queijo Minas artesanal  
qPCR – PCR quantitativa  
SAV – vírus Span 232  
SNRP – soroneutralização por redução de placa

SV1 – *Serro virus 1*

SV2 – *Serro virus 2*

SO – suabe oral

VACV – *Vaccinia virus*

VACV-BR – VACV brasileiros

VACV-P1 – VACV Pelotas 1

VACV-P2 – VACV Pelotas 2

VB - *Vaccinia Bovina*

VBH – vírus Belo Horizonte

UFP – unidades formadoras de placas

UG – unidades genômicas

## APRESENTAÇÃO DA TESE

Esta tese consiste de:

- RESUMO
- ABSTRACT
- INTRODUÇÃO GERAL
- OBJETIVOS
- REVISÃO DE LITERATURA
- CAPÍTULO 1: “***Vaccinia virus*: transmissão por leite experimentalmente contaminado utilizando o modelo murino**” descreve o estudo realizado em camundongos que ingeriram leite experimentalmente contaminado com VACV
- CAPÍTULO 2: “**Estudo da viabilidade do *Vaccinia virus* em queijos produzidos com leite cru experimentalmente contaminado e submetidos a diferentes tempos de maturação**” relata a viabilidade do VACV em queijos submetidos a diferentes tempos de maturação produzidos a partir de leite experimentalmente contaminado
- CAPÍTULO 3: “**Detecção de *Vaccinia virus* em queijo Minas artesanal elaborados em propriedades com e sem casos de vaccínia bovina no Estado de Minas Gerais**” descreve o estudo realizado em queijo artesanal de propriedades com e sem caso de VB no Estado de Minas Gerais visitadas pelo nosso grupo entre 2011 e 2014
- CAPÍTULO 4: “**Comunicação - Detecção de DNA de *Parapoxvirus* em amostras de leite coletadas de vacas com lesões vesiculares nos tetos**” relata, brevemente, a detecção do DNA de *Parapoxvirus*, em propriedades com casos de VB no Estado de Minas Gerais visitadas pelo nosso grupo entre 2011 e 2014.
- CONSIDERAÇÕES FINAIS
- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS
- ANEXO

## RESUMO

A vaccínia bovina (VB) é uma zoonose causada pelo *Vaccinia virus* (VACV) que afeta principalmente vacas leiteiras e humanos. Estudos prévios têm detectado partículas virais viáveis de VACV em amostras de leite de vacas natural e experimentalmente infectadas. Porém, ainda não se sabe se o leite contaminado pode transmitir VACV após o consumo. Por outro lado, há um estudo que mostra que humanos, inclusive crianças, que vivem em áreas endêmicas de VB, mas que nunca tiveram contato com vacas doentes, apresentaram anticorpos anti-OPXV, sugerindo que o VACV pode ser transmitido por outras vias. Levando em consideração o previamente exposto, esta tese teve como objetivo estudar a transmissão de VACV pelo leite em modelo murino e a detecção e viabilidade de poxvirus no queijo e leite. No capítulo 1, 30 camundongos receberam 100 µl de leite, por via oral, contendo 10<sup>6</sup> UFP de VACV-GP2. Amostras de suabe oral (SO), fezes, tecidos e sangue foram coletadas e analisadas. Nenhuma alteração clínica foi observada nos camundongos. DNA viral foi detectado, de forma intermitente, nas amostras de SO e de tecidos a partir do 2º d.p.i., enquanto em amostras de sangue e fezes a partir do 5º d.p.i. A detecção ocorreu até o 10º d.p.i. em SOs e, nas demais amostras, até o 30º d.p.i. Em todos os tecidos dos animais infectados, exceto coração, tonsila, língua, estômago and duodeno, foram observados imunomarcção intracitoplasmática na técnica de IHQ em todos os tempos analisados. Anticorpos neutralizantes (AN) foram detectados no 20º e no 30º d.p.i. em 50% dos camundongos infectados. No capítulo 2, 12 L de leite foram contaminados com 10<sup>5</sup> UFP/ml de VACV-GP2 e seis queijos foram produzidos. Os queijos foram submetidos ao processo de maturação durante 1, 7, 14, 21, 45 e 60 dias a 25°C. As amostras de queijo foram quantificadas na qPCR e tituladas em células VERO. A quantificação e a titulação viral apresentaram redução no decorrer do tempo de maturação, porém, não apresentaram diferença estatística. O 3º capítulo refere-se à detecção de VACV em amostras de queijos de campo provenientes de propriedades com e sem surto de VB. Cinquenta e nove queijos frescos e maturados foram coletados e analisados, sendo que dez queijos foram produzidos em propriedades com casos de VB e 49, oriundos de fazendas sem histórico da doença. A técnica de PCR-*nested* foi utilizada na detecção de DNA viral. As amostras de queijo positivas na PCR-*nested* foram inoculadas em cultivo celular ou membrana corioalantóide de ovos embrionados (MCA) de galinha. A confirmação do efeito citopático (ECP) foi realizada pelas técnicas de imunoperoxidase em monocamada celular (IPMC) e qPCR, respectivamente. O DNA viral foi detectado em 43 das 59 amostras testadas. Destas, 11 tinham partículas infecciosas do VACV, sendo quatro amostras oriundas de propriedades sem casos de VB. No último capítulo, seis propriedades leiteiras em Minas Gerais, com surtos de doenças vesiculares acometendo vacas em lactação, bezerras e humanos, foram visitadas. Aleatoriamente, foram selecionadas, por propriedade, dez vacas com lesões e amostras de leite foram coletadas, totalizando 60 amostras de leite. Além disso, duas crostas das lesões nos tetos das vacas também foram coletadas em cada fazenda, totalizando 12 crostas. Das seis propriedades estudadas, em todas foi confirmada a presença de OPXV nas amostras de crosta. A existência de coinfeção de PPV e de OPXV foi confirmada em quatro delas. Como duas propriedades foram negativas para PPV, as amostras de leite, provenientes das vacas destas propriedades, não foram analisadas. Com relação aos leites testados, foi observada amplificação para o gene *B2L* em 12 amostras das 40 analisadas, indicando a presença de PPV em 30% dos leites testados. Destas 12, oito estavam contaminadas tanto com PPV quanto com OPXV. Os resultados mostraram que leite contaminado pode ser fonte de infecção de VACV em modelo murino, sendo que os animais apresentaram infecção subclínica com distribuição sistêmica e eliminação pelas fezes e mucosa oral. Além disso, o processo de maturação do queijo reduz o número de partículas virais viáveis, mas não foi capaz de inativar o vírus durante os 60 dias testados. Por outro lado, a detecção de VACV em amostras de queijos Minas artesanais mostrou que o VACV pode circular de forma silenciosa, uma vez que houve detecção em amostras de queijos de propriedades sem surto de VB. Além disso, foi possível detectar coinfeção de PPV e VACV em amostras de leite de propriedades com surto de doenças vesiculares. Desta forma, o consumo de leite e queijos contaminados com VACV pode ser um risco para a saúde pública. Porém, mais estudos são necessários para determinar o possível risco de transmissão do vírus para humanos associado ao consumo de leite e queijos artesanais contaminados com VACV.

**Palavras-chaves:** *Vaccinia virus*, leite cru, modelo murino, transmissão, queijos artesanais, maturação

## ABSTRACT

Bovine vaccinia (BV) is a zoonotic disease caused by *Vaccinia virus* (VACV) and affect mainly dairy cows and humans. Previous studies have detect viral viable particles of VACV in milk samples of natural and experimentally infectious cows. But, is unknown if the contaminated milk can transmit VACV after consumption. On the other hand, there is a study that detected neutralizing antibodies (NA) against VACV in humans, including children. These people lived in BV endemic áreas, but they never had contact with sick cows what suggesting that VACV can be transmited by others routes. Thus, it becomes important to study the possible transmission of VACV by milk and detection and viability of the vírus in artisan cheeses. This thesis was divided in four chapters and the aims were to study the transmission of VACV by milk in murine model and detection and viability of poxvirus in artisan cheeses and milk. In the chapter 1, thirty mice were inoculated orally with 100 µl of milk containing 10<sup>6</sup> PFU of VACV-GP2 (infected group). Oral swab (OS), faeces, blood and tissues samples were collected and analised. The mice showed not clinical signs. Viral DNA was detected, intermitchently, in OS from 2<sup>nd</sup> d.p.i. to 10<sup>th</sup> d.p.i. while in blood and faeces samples from 5<sup>th</sup> d.p.i. to 30<sup>th</sup> d.p.i. At all times, viral DNA was detected in tissues samples, except stomach and duodenum. In immunohistochemistry test was observed intracytoplasmic immunostaining in all tissues, except heart, tonsil, tongue, stomach and duodenum. NA were detected on the 20<sup>th</sup> and 30<sup>th</sup> d.p.i. in 50% of mice infected. In the chapter 2, 12 litres of milk were contaminated with 10<sup>5</sup> PFU/ml of VACV-GP2 and six contaminated cheeses were produced. The cheeses were subjected to the process maturation during 1,7,14,21,45 and 60 days to 25°C. Real time PCR and titration VERO cells were performed. The viral quantification and titration reduced during the maturation process, but there was not statistical difference. The chapter 3 refers to the detection of VACV in artisan cheeses commercial from properties with and without BV outbreaks. Fifty nine fresh and matured artisan cheeses were collected and analyzed, of which 10 and 49 artisan cheeses were produced in properties with and without BV outbreaks, respectively. PCR-nested technique was perfomed for detection viral DNA. Positive samples were inoculated in VERO cells or chorioallantoic membrane of embryonated chicken eggs and immunoperoxidase in monolayer cell assay (IPMA) and real time PCR were used to confirm the cytopathic effect, respectively. Viral DNA was detected in 43 of 59 samples. These, 11 samples had viral infectious particles, of which four artisan cheeses produced in properties without BV outbreaks. In the last chapter, six dairy properties in Minas Gerais state with outbreaks vesicular diseases in dairy cows, calves and human were visited. Ten dairy cows with lesions in teats were selected, randomly, in each property. Milk and crust samples were collected, totalizing 60 and 12 samples, respectively. These six properties were detected VACV in samples crusts. The coinfection between PPV and VACV was confirm in four properties by convencional PCR for gene *B2L* amplification. Milk samples were analyzed only the four positive farms for PPV, totalizing 40 samples. PPV DNA was detected in 12 samples, accounting for 30% of samples tested. These 12, eight samples had coinfection between PPV and VACV, accounting for 66,7%. The results showed that contaminated milk can be source of transmission of VACV in murine model and mice infected do not present clinical signs and can eliminate vírus by faeces and oral mucosa. Moreover, the maturation processo is able to reduce viral load in cheeses, but it does not inactivated VACV at least 60 days. The detection de VACV in commercial artisan cheeses samples, mainly produced in properties without BV outbreaks, suggest that VACV can circular silently between properties. Futhermore, milk samples can be contaminated with two or more poxvirus species. Thus, the consumption of contaminated milk and artisan cheeses with VACV can be public health risk. But, more studies are necessary to determine the possible risk of vírus transmission to humans associated to consumption of milk and artisan cheeses contaminated with VACV.

**Keywords:** *Vaccinia virus*, raw milk, murine model, transmission, artisan cheeses, maturation

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O *Vaccinia virus* (VACV) é um vírus DNA dupla fita pertencente ao gênero *Orthopoxvirus* (OPXV) e à família *Poxviridae*. Este vírus foi usado no programa de vacinação contra *Variola virus* (VARV) humano (Buller & Palumbo, 1991). O VACV tem sido isolado e caracterizado molecularmente como agente etiológico de surtos de vaccínia bovina (VB) em todo Brasil (Damaso *et al.*, 2000; Trindade *et al.*, 2003; Leite *et al.*, 2005; Trindade *et al.*, 2006; Medeiros-Silva *et al.*, 2009; Assis *et al.*, 2013b).

A VB é uma zoonose que causa lesões exantemáticas autolimitantes em tetos e úberes de vacas leiteiras e nas mãos e braços de ordenhadores que entram contato com as lesões dos animais doentes (Lobato *et al.*, 2005; Da Silva *et al.*, 2008; Madureira, 2009; Abrahão *et al.*, 2015). Lesões nos lábios, focinho e cavidade oral dos bezerros que mamam nas vacas acometidas são também observadas (Lobato *et al.*, 2005; Madureira, 2009; Assis *et al.*, 2015). Em humanos, a infecção tem-se caracterizado pela presença de lesões ulcerativas e pustulares, principalmente nas mãos, podendo causar lesões nos antebraços e face, além de febre, dor, mal-estar e linfadenopatia (Leite *et al.*, 2005; Lobato *et al.*, 2005; Trindade *et al.*, 2007; Silva-Fernandes *et al.*, 2009; Trindade *et al.*, 2009; Megid *et al.*, 2012; Assis *et al.*, 2015; Costa *et al.*, 2015).

Destaca-se ainda, rápida disseminação da doença entre os animais do mesmo rebanho, observando-se alta taxa de ataque na propriedade (Schatzmayer *et al.*, 2000; Lobato *et al.*, 2005; Madureira, 2009; Megid *et al.*, 2012). Os principais prejuízos relatados pelos produtores referem-se à ocorrência de mastite e infecções secundárias, redução brusca na produção de leite, gastos com medicamentos, afastamento temporário do ordenhador e contrato de um novo empregado, além de acometimento de bezerros que mamam nas vacas doentes, levando a um empagrecimento desses animais (Lobato *et al.*, 2005; Madureira, 2009; Assis *et al.*, 2015).

No Brasil, a VB, popularmente conhecida como varíola bovina, tem sido relatada desde a década de 1930, com registro de casos esporádicos nas décadas de 1950 a 1990. Desde o final da década de 1990, houve um aumento exacerbado no número de casos relatados em vários estados brasileiros tais como Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Goiás, Mato Grosso, Bahia, Maranhão, Pará, Rondônia e Tocantins, comprometendo milhares de vacas e grande número de ordenhadores (Damaso *et al.*, 2000; Trindade *et al.*, 2003; Leite *et al.*, 2005; Lobato *et al.*, 2005; Nagasse-Sugahara *et al.*, 2005; Donatele *et al.*, 2007; Medaglia *et al.*, 2009; Quixabeira-Santos *et al.*, 2011; Megid *et al.*, 2012; Assis *et al.*, 2013b; Oliveira *et al.*, 2013; Abrahão *et al.*, 2015; Assis *et al.*, 2015; Peres *et al.*, 2016). Nos estados da região sul do país não há relatos da VB; porém, no Rio Grande do Sul, houve casos de doença vesicular em equídeos causados pelo VACV (Brum *et al.*, 2010). Nos estados de Minas Gerais e Bahia também foi detectado VACV em equídeos com lesões exantemáticas na mucosa oral e focinho (Matos *et al.*, 2013; Borges, 2014).

Diversos modelos animais têm sido propostos para a elucidação das infecções causadas por VACV, por *Ectromelia virus* (ECMV), por *Monkeypox virus* (MPXV) e por *Cowpox virus* (CPXV) (Zauch *et al.*, 2001; Esteban e Buller, 2005; Hughes *et al.*, 2011). A patogênese de amostras brasileiras isoladas de bovinos, equídeos e humanos acometidos com VACV tem sido estudada em modelos experimentais, utilizando camundongos e coelhos (Ferreira *et al.*, 2008a; Ferreira *et al.*, 2008b; Campos *et al.*, 2011; Cargnelutti *et al.*, 2012a). A patogênese de VACV amostra GP2 foi estudada em bovinos experimentalmente contaminados e foi observada que a infecção é sistêmica, causando viremia, replicação viral em vários tecidos, principalmente do

sistema linfático, além de eliminação viral pelas fezes e pelo leite (Guedes *et al.*, 2012; Rehfeld *et al.*, 2013; Rivetti *et al.*, 2013; Oliveira *et al.*, 2015a).

O risco de infecção de seres humanos pelo consumo de leite por VB é desconhecido no Brasil. Existe na literatura, até o presente momento, o relato de lesões exantemáticas na boca e mucosa oral de 17 seres humanos que consumiram leite infectado com *Buffalopox virus* (BPXV), uma subespécie de VACV da Índia (Gurav *et al.*, 2011). Estudos realizados no Brasil revelaram a presença tanto de DNA quanto de partículas virais infecciosas do VACV no leite de vacas doentes em surtos localizados em Minas Gerais (Abrahão *et al.*, 2009a). Em outro trabalho, Oliveira e colaboradores (2010) estudaram a viabilidade de VACV em leite experimentalmente contaminado e em queijos produzidos com esse leite e observaram que foi possível detectar partículas virais viáveis no leite tanto em armazenamento sob baixas temperaturas, quanto sob tratamento térmico (até 65°C), assim como no queijo fresco produzido com leite contaminado. Partículas virais viáveis foram detectadas, de forma intermitente, em amostras de leite coletadas de vacas experimentalmente infectadas com VACV por, pelo menos, 25 dias após cicatrização total das lesões e em queijos frescos produzidos a partir destes leites (Oliveira *et al.*, 2015a). Apesar de não existir relato de lesão na mucosa oral associada ao consumo de leite cru contaminado com VACV, há um trabalho recentemente publicado que detectou DNA do vírus no sangue de quatro pessoas, membros da mesma família, sendo três crianças (Costa *et al.*, 2015). Além disso, uma das crianças apresentou anticorpos neutralizantes anti-OPXV e nenhuma dessas pessoas tiveram contato direto com bovinos doentes. Estes autores revelaram que esta família tinha o costume de consumir leite cru ou queijo Minas artesanal e, desta forma, sugeriram que a fonte de infecção do vírus pode estar associada ao consumo de produtos lácteos contaminados.

A segurança microbiológica dos alimentos é uma grande preocupação tanto para a indústria alimentícia quanto para os consumidores e os produtos lácteos requerem vigilância especial, pois representam uma importante causa de infecções transmitidas por alimentos (Perry, 2004). A saúde do rebanho, a qualidade do leite e as boas práticas de fabricação dos queijos e outros produtos lácteos são fatores essenciais para evitar a contaminação com microrganismos patogênicos (Martins, 2006). Os queijos artesanais produzidos com leite cru podem ser submetidos ao processo de maturação que ajuda a melhorar a qualidade microbiológica do queijo. De acordo com Martins (2006), o processo de maturação do queijo depende basicamente de três fatores: temperatura e umidade da atmosfera em contato com o queijo; composição química do leite, como teor de gordura, aminoácidos, ácidos graxos e outros produtos da ação enzimática; e microbiota residual do leite original utilizado ou da planta industrial e seu ambiente.

Atualmente, os surtos de VB são descritos em grande parte do território brasileiro (Quixabeira-Santos *et al.*, 2011; Megid *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2013; Assis *et al.*, 2013b; Abrahão *et al.*, 2015; Assis *et al.*, 2015), incluindo Minas Gerais, o maior produtor de leite do Brasil (BRASIL, 2015). Em algumas fazendas acometidas por VB, principalmente de pequenos produtores, foi observado que o leite é coletado sem o uso rigoroso de técnicas assépticas (Madureira, 2009). Apesar do acometimento do rebanho e da possibilidade de veiculação do VACV pelo leite, além de outras vias, sabe-se que nos focos da doença o leite continua a ser produzido e comercializado normalmente ou encaminhado aos latões e tanques de refrigeração. Posteriormente, o leite segue para as cooperativas de produtores e finalmente para as indústrias lácteas. Uma parte do leite pode ser comercializada no mercado informal, apesar da proibição legal, sendo consumido ou processado sem nenhum tratamento térmico. Quanto ao consumo de

leite na propriedade, apesar da fervura do leite ser uma prática frequente em áreas rurais, isso nem sempre acontece devido a questões culturais regionais ou a desinformação, situação que permitiria a ingestão de partículas de VACV no leite contaminado.

Outro fator de risco é a utilização do leite cru contaminado com VACV na produção de queijos artesanais. Minas Gerais é o maior produtor de queijo Minas artesanal (QMA) do país (MINAS GERAIS, 2015). Dos 853 municípios mineiros, mais de 500 produzem QMA. Estudos da EMATER-MG mostraram, em 2008, uma produção de 3.600 toneladas/mês, envolvendo um montante financeiro da ordem de 10 milhões de reais/mês e promovendo 120 mil empregos diretos e 40 mil indiretos (IPHAN, 2008).

Casos de doenças vesiculares bovinas causadas por *Parapoxvirus* (PPV), outro gênero pertencente à família *Poxviridae*, também têm sido descritos no Brasil (Abrahão *et al.*, 2010; Cargnelutti *et al.*, 2012b; Sant'Ana *et al.*, 2012; Sant'Ana *et al.*, 2013; Cargnelutti *et al.*, 2014). Sabe-se que a co-infecção entre vírus do mesmo gênero ou com VACV pode ocorrer, porém, a origem e o significado dessas co-infecções na patogenia das doenças ainda não estão esclarecidos (Cargnelutti *et al.*, 2014). Apesar dos estudos relacionados à patogenia da VB em bovinos ter tido grandes avanços nos últimos anos, pouco se sabe sobre a infecção de PPV em bovinos.

Diante do exposto, existe a possibilidade de transmissão de poxvírus por leite e seus derivados, sendo que a investigação para tal hipótese é de suma importância. Desta forma, o presente trabalho propôs a pesquisa e o estudo da viabilidade de VACV em amostras de queijo a partir de leite experimentalmente contaminado e o envolvimento deste leite na transmissão da doença usando camundongos como modelo experimental. Assim como, pesquisar e estudar amostras de QMA comerciais elaborados a partir de leite de vacas, provenientes de propriedades com e sem casos de VB, localizadas no estado de Minas Gerais, entre o período de 2011 a 2014. Além disso, o estudo buscou detectar a presença de co-infecção de PPV com OPXV em crostas de lesões positivas para OPXV, coletadas em vacas com lesões vesiculares nos tetos, pertencentes a seis rebanhos da mesma região. Amostras de leite das vacas que apresentaram co-infecção entre os gêneros, foram testadas para PPV pelo teste de PCR, a fim de saber se PPV também pode ser veiculado pelo leite, assim como VACV.

## 2. OBJETIVOS

Capítulo 1: “**Vaccinia virus: transmissão por leite experimentalmente contaminado utilizando o modelo murino**”: Estudar a transmissão de VACV em modelo experimental usando camundongos inoculados, por via oral, com leite experimentalmente contaminado.

Capítulo 2: “**Estudo da viabilidade de Vaccinia virus em queijos produzidos com leite cru experimentalmente contaminado e submetidos a diferentes tempos de maturação**”: Estudar a viabilidade do VACV em queijos produzidos a partir de leite experimentalmente contaminado, submetidos a diferentes tempos de maturação a 25°C (1, 7, 14, 21, 45 e 60 dias).

Capítulo 3: “**Detecção de Vaccinia virus em queijos Minas artesanais elaborados em propriedades com e sem casos de VB no estado de Minas Gerais**”: Pesquisar a presença de VACV em amostras de queijos Minas artesanais coletadas em propriedades cadastradas, com e sem casos de VB, localizadas em microrregiões do Estado de Minas Gerais.

Capítulo 4: “**Comunicação - Detecção de DNA de Parapoxvirus em amostras de leite coletadas de vacas com lesões vesiculares de propriedades com vaccínia bovina**”: Pesquisar o DNA de PPV em amostras de leite coletadas de vacas com lesões vesiculares nos tetos, positivas para OPXV, de rebanho do estado de Minas Gerais entre 2011 e 2014.

## 3. REVISÃO DE LITERATURA

### 3.1. Família Poxviridae e suas características:

#### 3.1.1. Classificação:

A família *Poxviridae* se divide em duas subfamílias: *Entomopoxvirinae* e *Chordopoxvirinae* (Moss, 2007). A primeira subfamília, *Entomopoxvirus*, compreende apenas vírus cujos hospedeiros são invertebrados, sendo dividida em três gêneros: *Alphaentomopoxvirus*, *Betaentomopoxvirus* e *Gammaentomopoxvirus*. As espécies *Diachasmimorpha entomopoxvirus* e *Melanoplus sanguinipes entomopoxvirus 'O'*, não têm gênero definido (ICTV, 2014). A segunda, *Chordopoxvirinae*, que infecta vertebrados, é dividida em dez gêneros: *Orthopoxvirus*, *Parapoxvirus*, *Yatapoxvirus*, *Molluscipoxvirus*, *Cervidpoxvirus*, *Capripoxvirus*, *Crocodylidpoxvirus*, *Suipoxvirus*, *Avipoxvirus*, *Leporipoxvirus* e *Cerdopoxvirus* (ICTV, 2014). A espécie *Squirrel poxvirus* permanece sem gênero definido, sendo classificada como *Chordopoxvirinae* (Figura 1).

Dentre os vírus da subfamília *Chordopoxvirinae*, pode-se destacar o VACV, protótipo do gênero *Orthopoxvirus* (OPXV) (McFadden, 2005; Moss, 2007). Até 1990, o *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) classificava o *Buffalopox virus* (BPXV), como espécie do gênero OPVX. A partir de 1991, mediante estudos filogenéticos, o ICTV passou a classificar o BPXV como um VACV (ICTV, 2014). Além do VACV, os vírus do gênero OPXV têm caráter zoonótico e, portanto, relevantes para a saúde pública (revisado por Essbauer, 2010). Assim como as espécies pertencentes aos OPXV, outros três gêneros da subfamília *Chordopoxvirinae*, possuem vírus capazes de causar infecções em humanos: *Parapoxvirus* (PPV), *Yatapoxvirus*, e *Molluscipoxvirus*.

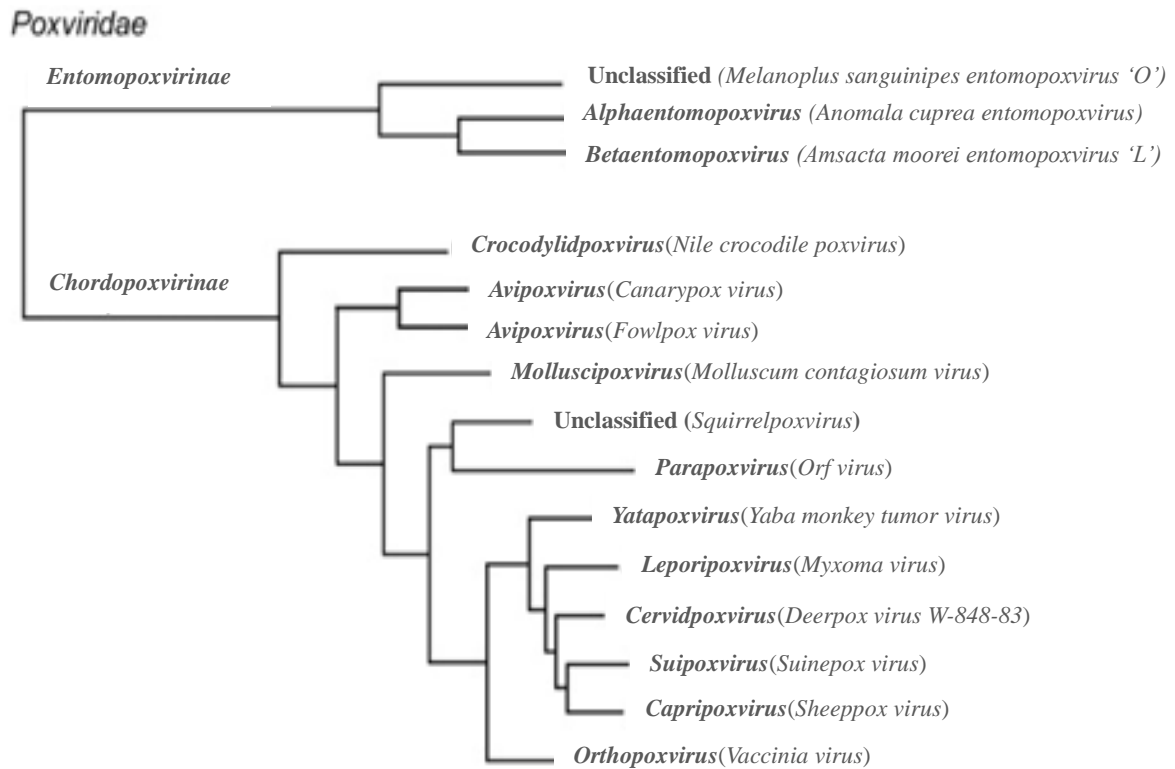


Figura 1: Diagrama filogenético da família *Poxviridae* e as subfamílias *Chordopoxvirinae* e *Entomopoxvirinae*. Fonte: Duraffour *et al.*, 2011, atualizado.

### 3.1.2. Estrutura e multiplicação viral:

A família *Poxviridae* é composta por vírus grandes e complexos e contém todas as enzimas necessárias para a síntese de RNAm. Os poxvírus possuem forma ovóide ou de tijolo, de formato heterogêneo, com dimensões que variam de 170 a 260 nm de largura/espessura, por 300 a 450 nm de extensão, sendo que *Vaccinia virus* (VACV) tem dimensões de 270 x 390 nm (Canal e Diel, 2012). O genoma do poxvírus consiste em uma molécula linear de DNA fita dupla, com tamanho variando entre 130 a 375 Kb (ICTV, 2012) (Figura 2). Quanto às características estruturais, o genoma dos poxvírus, sobretudo dos OPXV, possui uma região central que contém genes estruturais e relacionados à replicação do vírus, enquanto as regiões terminais invertidas (ITRs), localizadas nas alças terminais do genoma, contém genes que codificam proteínas responsáveis pela virulência e imunomodulação. (Moss, 2007; Smith *et al.*, 2002).

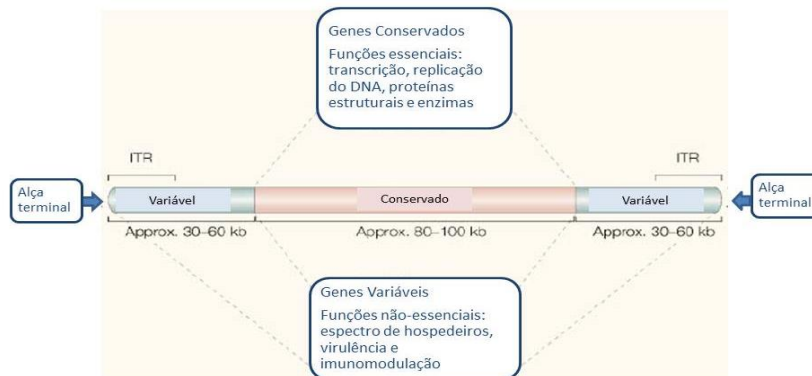


Figura 2: Representação esquemática do genoma dos poxvirus. O genoma pode ser dividido em uma região central conservada que codifica proteínas essenciais para a replicação viral e as regiões terminais invertidas (ITRs) que são variáveis e codificam proteínas que não são essenciais para a replicação do vírus, no entanto, codificam proteínas que são responsáveis pelas interações vírus-hospedeiro e pelos mecanismos de patogênese. Fonte: Adaptado de Smith e McFadden, 2002, revisado por Oliveira, 2014.

Os poxvírus têm quatro estruturas fundamentais distintas que compreendem: cerne, corpúsculos laterais, membrana e envelope (Buller e Pallumbo, 1991; Cyrklaff *et al.*, 2005) (Figura 3A). O cerne é a estrutura mais interna da partícula, apresenta a forma de disco bicôncavo, envolto por uma fina membrana e envolve o material genético (Figura 3B). O DNA e várias proteínas são organizados dentro do cerne viral formando o nucleocapsídeo. O material genético dos poxvírus consiste de uma molécula de DNA dupla fita, formando uma cadeia polinucleotídica covalentemente fechada nas extremidades (Moss, 2007). Nas concavidades do cerne encontram-se os corpúsculos laterais, cuja função ainda não é bem definida. A membrana externa circunda todo o cerne e é composta por uma bicamada lipoprotéica com túbulos de superfície arranjados irregularmente, formando uma camada em paliçada (Cyrklaff *et al.*, 2005) (Figura 3C). Algumas formas virais apresentam o envelope, uma membrana adicional que circunda completamente a partícula viral. Tanto a membrana externa quanto o envelope desempenham um importante papel na interação vírus-hospedeiro (Buller e Pallumbo, 1991).

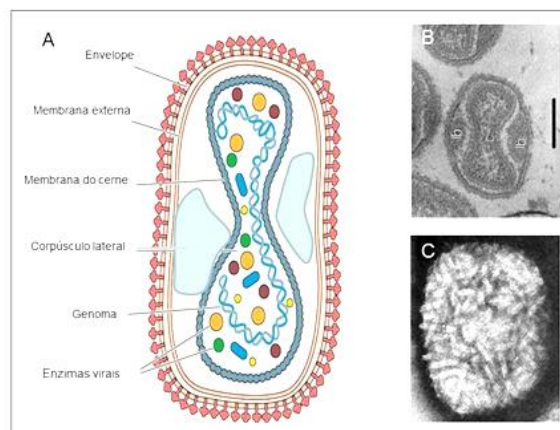


Figura 3: Morfologia dos Poxvirus. (A) Representação esquemática da partícula viral de um poxvirus. (B) Eletromicrografia de secção longitudinal do *Cowpox vírus*. lb – Corpúsculos laterais, c – Cerne. A barra representa 100 nm. (C) Eletromicrografia em contraste negativo do VACV. Fontes: (A) Harrison *et al.*, 2004 (modificado); (B) ICTVdb, 2013; (C) Wilton *et al.*, 1995, revisado por Oliveira, 2014.

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

O ciclo tem início com a adsorção viral na membrana da célula hospedeira. Diferentes glicoproteínas virais (A21, A27, D8, F9, G9, H2 e H3) parecem estar envolvidas na formação do complexo de fusão-penetração (Ojeda *et al.*, 2006; Moss, 2007). A capacidade de utilizar mais de um receptor para iniciar a infecção pode representar uma vantagem evolutiva, pois oferece aos vírus que possuem essa capacidade a possibilidade de infectar diferentes tipos de células e/ou hospedeiros (Flores e Kreutz, 2007).

Dois tipos de partículas infecciosas são produzidas no processo de replicação: vírus envelopado (EV) e vírus intracelular maduro (IMV). Os EV são liberados para o meio extracelular (EEV) ou permanecem aderidos à membrana citoplasmática (CEV), enquanto os IMV permanecem dentro do citoplasma das células infectadas (Moss, 2007).

Ao adsorver na membrana celular, o DNA viral é então liberado para o citoplasma, onde ocorre a sua replicação para, posteriormente, ocorrer a formação de partículas virais. O processo de expressão gênica é caracterizado pela transcrição temporal de três classes de genes (genes precoces, intermediários e tardios). As proteínas precoces participam do desnudamento completo do genoma, na sua replicação e na transcrição dos genes intermediários, cujos RNAm são traduzidos em proteínas. As proteínas intermediárias estão envolvidas principalmente na transcrição dos genes tardios, e participam das fases finais de replicação (resolução e separação das moléculas-filhas de DNA). As proteínas tardias fazem parte da estrutura vírica e participam da morfogênese dos núcleos virais, que adquirem o envelope pelo brotamento no aparelho de Golgi (empacotamento) e são liberados da célula. Alguns fatores de transcrição de genes precoces são sintetizados tardiamente durante a replicação viral e são adicionados nas partículas virais para serem utilizados no início do próximo ciclo de infecção (Moss, 2007) (Figura 4).

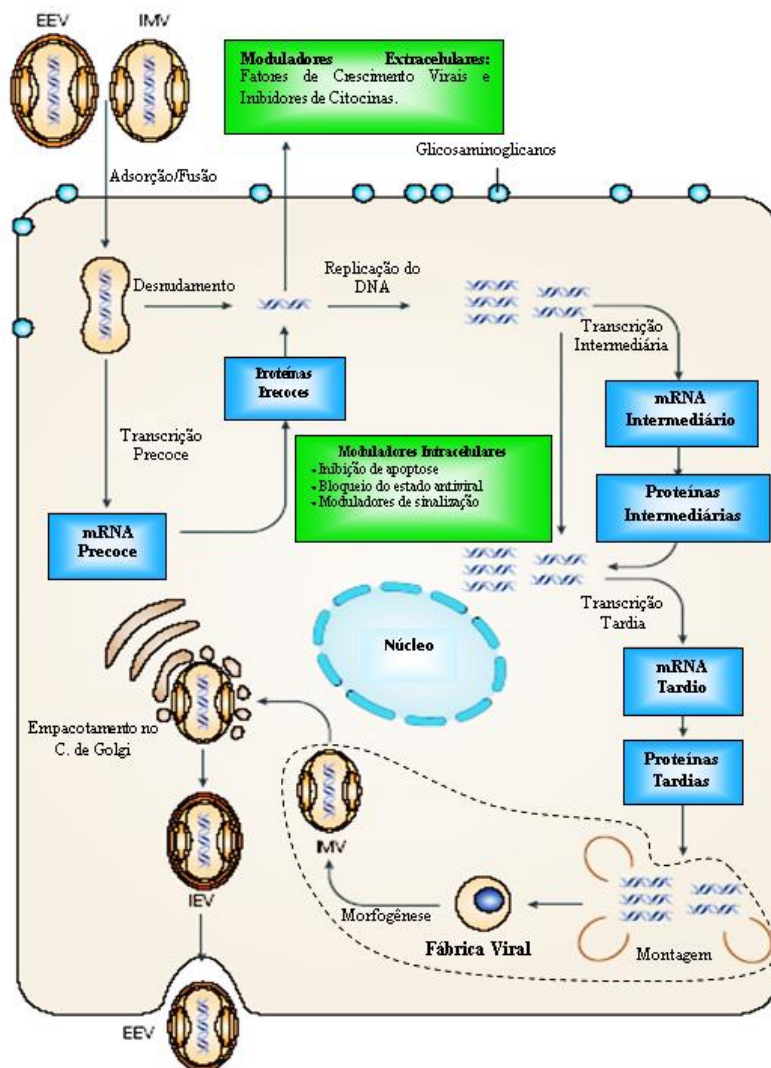


Figura 4: Representação esquemática do ciclo de multiplicação dos poxvirus. Fonte: McFadden, 2005, traduzido.

A primeira forma infecciosa visualizada pela microscopia eletrônica é o IMV, que é liberado apenas quando ocorre a lise celular. Uma fração menor de IMV é transportada para a periferia da célula e adquire duas membranas adicionais a partir do aparelho de Golgi para formar o vírus envelopado intracelular (IEV). O IEV então funde sua membrana externa com a membrana plasmática da célula (brotamento) e é liberado no meio extracelular, com duas membranas sendo chamado de vírus extracelular envelopado (EEV). As partículas de EEV, apesar de representarem apenas um pequeno percentual das partículas virais totais são essenciais para a disseminação do vírus dentro do hospedeiro durante uma infecção (Doceul *et al.*, 2010). Alternativamente, o IEV pode fundir sua membrana externa com a membrana plasmática, mas permanece associada à célula. Quando isso ocorre, uma proteína viral (A36) é fosforilada, induzindo a nucleação de monômeros de actina para formar caudas de actina abaixo da partícula viral. Estas caudas de actina impulsionam a partícula viral para células vizinhas, o que fornece um mecanismo direto de disseminação de célula a célula. As partículas associadas com os filamentos de actina são referidas como partículas virais associadas a células (Moss, 2007).

Durante a evolução do VACV e outros OPXV, diversos mecanismos para induzir um estado proliferativo em células infectadas e em células vizinhas foram criados, incluindo o *vgf*, uma proteína viral homóloga ao fator de crescimento epidérmico (EGF) de mamíferos (Andrade *et al.*, 2004). Quando o *vgf* liga-se ao receptor de EGF (EGFR) da célula, ocorre a ativação da proliferação e do estado anti-apoptótico na célula, facilitando a replicação e a disseminação do vírus (Tzahar *et al.*, 1998). Atualmente, este gene vem sendo amplamente utilizado para a identificação de surtos de VB ocorridos no Brasil pela utilização da técnica de PCR (Trindade *et al.*, 2008; Abrahão *et al.*, 2009b; Abrahão *et al.*; 2010a).

### 3.2. Principais doenças vesiculares causadas por poxvirus:

#### 3.2.1. Gênero *Parapoxvirus*:

O gênero *Parapoxvirus* (PPV) é composto por quatro espécies: vírus da estomatite papular bovina (BPSV) e vírus da pseudovariola (PSV) causada por *Pseudocowpox virus* (PCPV) em bovinos, vírus do ectima contagioso (ORFV) em caprinos e ovinos e o parapoxvírus de veado vermelho da Nova Zelândia (ICTV, 2014). No Brasil, as espécies mais importantes na medicina veterinária são ORFV, PCPV e BPSV (Canal e Diel, 2012). Esses vírus também infectam várias espécies de animais terrestres e aquáticos.

As parapoxviroses causam, geralmente, dermatite papular branda ao redor do focinho, mucosa oral, tetos e/ou pele de animais infectados (Inoshima *et al.*, 2000). Todas as espécies têm potencial zoonótico e podem afetar pessoas que entram em contato com animais infectados, como criadores, caçadores, ordenhadores e veterinários.

Os PPV possuem vírions com morfologia que difere dos outros gêneros de poxvírus, apresentando proteínas tubulares organizadas na superfície do vírion (Figura 5B). Essa característica é útil para o diagnóstico, pois permite diferenciação de outros poxvirus por microscopia eletrônica (ME) (Canal e Diel, 2012).

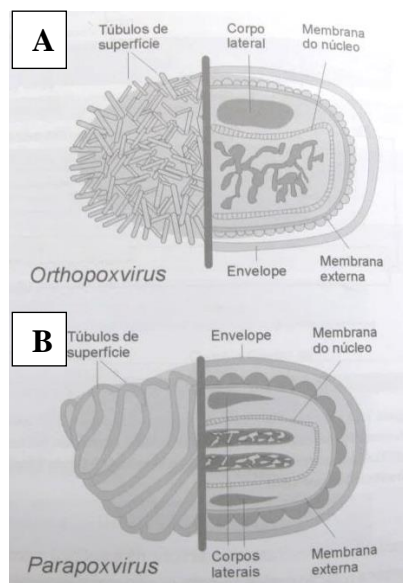


Figura 5: Ilustração da morfologia dos gêneros *Orthopoxvirus* (A) e *Parapoxvirus* (B). Fonte: Murphy *et al.*, 1999, adaptada por Canal e Diel, 2012.

### 3.2.2. Gênero *Orthopoxvirus*:

Dentro do gênero *Orthopoxvirus* (OPXV) as principais espécies relevantes para a saúde pública são: *Variola virus* (VARV), *Monkeypox virus* (MPXV), *Cowpox virus* (CPXV) e *Vaccinia virus* (VACV).

A varíola humana, causada por VARV, é uma doença grave, altamente letal e infecto-contagiosa (Babkin *et al.*, 2015). A varíola humana encontra-se erradicada no mundo desde 1980, sendo que no Brasil o último caso registrado foi em 1971 (Fenner *et al.*, 1988; Fenner, 2000).

MPXV tem um amplo espectro de hospedeiros e, nos últimos anos, vários casos têm sido relatados em humanos na África (Reynolds *et al.*, 2010; Damon, 2011; Thomassen *et al.*, 2013; Hutson *et al.*, 2015). Pelo seu potencial zoonótico e pela semelhança clínica com VARV, a infecção causada por MPXV é considerada, atualmente, a mais importante entre os membros do gênero OPXV (Canal e Diel, 2012), apesar de a taxa de mortalidade ser menor em relação ao VARV (Damon, 2011; Reynolds *et al.*, 2012).

O CPXV é responsável por causar a doença conhecida como varíola bovina. De acordo com a literatura, a sua distribuição é descrita na Europa e Ásia (Fenner, 2000; Lewis-Jones, 2004). Este vírus pode acometer roedores, sendo estes, considerados reservatórios, além de bovinos, felinos, e outros animais domésticos e silvestres (Bennett *et al.*, 1996; Chantrey *et al.*, 1999; Appl *et al.*, 2013). Porém, a ocorrência da doença em bovinos é raramente descrita e a maioria dos casos relatados em humanos está associada a infecções em felinos domésticos (Huemer *et al.*, 2012; Appl *et al.*, 2013). As lesões causadas por CPXV em bovinos são indistinguíveis, clinicamente, das lesões causadas por PSV e por VACV quando acometem bovinos e humanos.

A vaccínia bovina (VB) é a doença exantemática que acomete bovínos e vem sendo descrita no Brasil desde o final da década de 1990 (Schatzmayr *et al.*, 2000; Lobato *et al.*, 2005; Trindade *et al.*, 2007b; Megid *et al.*, 2012; Abrahão *et al.*, 2015). O agente etiológico é o VACV, vírus protótipo do gênero OPXV, e possui um amplo espectro de hospedeiros. Porém, a doença clínica acomete principalmente vacas lactantes, bezerras e ordenhadores (Lobato *et al.*, 2005; Medeiros-Silva *et al.*, 2009; Assis *et al.*, 2015). Segundo o ICTV, há uma subespécie de VACV que acomete búfalos e humanos com lesões exantemáticas denominado *Buffalopox virus* (BPXV). Os casos são relatados principalmente na Índia, Paquistão, Bangladesh, Rússia e Indonésia (Singh *et al.*, 2007; Venkatesan *et al.*, 2010; Gurav *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2012; Goraya *et al.*, 2015). Além disso, este vírus vem sendo associado com lesões na boca e mucosa oral de humanos que ingeriram leite cru (Gurav *et al.*, 2011). Apesar da maioria dos casos serem relatados em bubalinos, há descritos, em menor proporção, casos de BPXV em bovinos.

### 3.3. Patogênese das infecções por poxvírus:

Considerando as vias de infecção natural dos poxvírus, eles podem ser divididos em três grupos. O primeiro grupo, formado por vírus que têm como via principal de infecção o trato respiratório, sendo esta a via mais frequente. No segundo grupo estão relacionados os vírus que se multiplicam nos sítios primários de infecção, normalmente a epiderme e mucosas, e no terceiro grupo, os vírus que infectam seus hospedeiros pelo trato gastrointestinal. O trato respiratório é a via de infecção natural do *Camelpox virus*, VARV e MPXV. As infecções por VACV, CPXV, *Ectromelia virus* (ECMV) e PPV ocorrem por lesões de continuidade na epiderme ou mucosas (revisado por Fenner *et al.*, 1989; Canal e Diel, 2012). A ingestão de roedores contaminados é principal via de infecção de CPXV em gatos domésticos e felinos de

zoológicos (Coras, 2005). ECMV, além da via de infecção por lesões de continuidade na pele, também pode ser transmitido pelo trato gastrointestinal. Alguns roedores podem se alimentar da carcaça de outros animais infectados, favorecendo a disseminação do vírus (Coras, 2005). Camundongos que tiveram contato com fezes de bovinos experimentalmente contaminados com VACV, se infectaram e eliminaram o vírus pelas fezes, mostrando que a infecção por VACV também pode ocorrer por outras vias (D'Anunção *et al.*, 2012).

Fenner e colaboradores (1948) propuseram o modelo de patogênese de OPXV, considerando uma infecção experimental em um camundongo com ECMV. A infecção dá-se início após a introdução de ECMV por lesões de continuidade na pele ou por inoculação experimental. Após cerca de oito horas, o vírus alcança os linfonodos regionais, onde ocorre a multiplicação viral. A necrose das células dos linfonodos favorece a liberação de partículas virais. Em seguida, estas partículas virais alcançam a corrente sanguínea, mas são prontamente fagocitadas por macrófagos no fígado, baço e, possivelmente, medula óssea. Nestes órgãos ocorre a multiplicação viral no interior das células, dando início à segunda fase da infecção, sendo denominada viremia secundária, por volta do 4º d.p.i. Esta viremia é favorecida pela liberação de partículas virais no sangue favorecendo a disseminação viral. Nesta fase, observa-se a presença de lesões ulceradas generalizadas.

Recentemente, Ma e colaboradores (2013) em infecção experimental em camundongos com ECMV, observaram que após penetrar no epitélio das patas de roedores, o vírus alcança o linfonodo poplíteo através da via linfo-hematogênica e, posteriormente, o fígado, onde ocorre a sua multiplicação, matando o hospedeiro. Neste mesmo estudo, foi observado que ratos tratados com anticorpos anti-proteína IMV, não desenvolveram a doença, ficando evidente a participação das partículas IMV na disseminação do vírus (Ma *et al.*, 2013).

As espécies VACV e CPXV causam manifestações clínicas, normalmente localizadas nos sítios primários de infecção, que são lesões existentes na pele. Desta forma, ocorre multiplicação viral local e disseminação dos vírus para os linfonodos responsáveis pela drenagem das áreas afetadas e linfadenopatia localizada acentuada, sinal frequentemente observado e característico das infecções por poxvírus. As lesões de pele iniciam-se com vasodilatação e com aparecimento de eritema cutâneo, local e regional, com formação de pequenas manchas avermelhadas. Em seguida, as lesões evoluem para vesículas, podem evoluir para pústulas com o processo inflamatório local. As pústulas ulceram e ocorre formação de crostas que, finalmente, tendem a cicatrizar, deixando marcas definitivas na pele (Fenner *et al.*, 1989).

Na PSV, as lesões em bovinos e humanos são bastante semelhantes às causadas por VACV e CPXV; porém, geralmente mais brandas (Fenner *et al.*, 1989; Buller & Palumbo, 1991; Mazur *et al.*, 2000; Lewis-Jones, 2004). Num rebanho acometido por PSV, a doença tende a desaparecer depois de 18 a 21 dias, mas pode persistir por até um ano (Fenner *et al.*, 1989). Iketani e colaboradores (2002), após inocularem bovinos experimentalmente com PCPV, observaram período de incubação (PI) de sete dias e o curso da doença foi de 16 dias. Em muitos rebanhos a PSV é problema crônico e as lesões são usualmente vistas como relativamente brandas. Casos clínicos de reinfeção podem ocorrer (Cheville & Shey, 1967; Carter *et al.*, 1968, citado por Gibbs *et al.*, 1970). A PSV pode manifestar-se nos bovinos de forma subclínica e persistente, sendo que esta espécie pode funcionar como reservatório do vírus no campo. Além disso, o vírus pode ser ativado em animais estressados ou imunossuprimidos (Iketani *et al.*, 2002).

Com relação à espécie VACV, estudos de patogenia vem sendo realizados em modelo animal experimental utilizando diferentes formas de inoculação (Ferreira *et al.*, 2008a; Campos *et al.*, 2011; Cargnelutti *et al.*, 2012a; Guedes *et al.*, 2012; Rehfeld *et al.*, 2013; Rivetti *et al.*, 2013; Oliveira *et al.*, 2015a). Tais estudos têm reforçado a hipótese de que a ação de VACV ocorre de forma sistêmica e não apenas localizada. Além disso, alguns trabalhos têm mostrado diferenças patogênicas e características distintas entre as amostras de VACV isoladas no Brasil, quando inoculadas em camundongos e coelhos (Ferreira *et al.*, 2008a; Ferreira *et al.*, 2008b; Cargnelutti *et al.*, 2012a; Oliveira *et al.*, 2015b). Devido às diferenças genéticas e na patogenicidade observadas, as amostras brasileiras de VACV foram separadas em dois grupos: grupo 1 que engloba os vírus menos virulentos e o grupo 2, cujos vírus são capazes de causar sinais clínicos graves como pilo-ereção, arqueamento do dorso, perda de peso e morte em modelo experimental (Ferreira *et al.*, 2008a; Ferreira *et al.*, 2008b; Cargnelutti *et al.*, 2012a).

Recentemente, um modelo de patogênese para VB foi proposto após um estudo detalhado em vacas experimentalmente inoculadas com VACV amostra Guarani-P2 (VACV-GP2) (Rehfeld *et al.*, 2013; Rivetti *et al.*, 2013). Este estudo mostrou que o período de incubação (PI) do vírus é bastante rápido, por até 72 horas, e que o curso da doença varia de 17 a 32 dias, sendo a média de cicatrização das lesões dos animais entre 21 e 24 dias (Rehfeld *et al.*, 2013). Foi observado também que VACV tem ação sistêmica em bovinos, causando viremia e eliminação do vírus pelas fezes e leite, de forma intermitente (Rivetti *et al.*, 2013; Oliveira *et al.*, 2015a). Além disso, detecção de DNA e proteínas virais em vários tecidos, inclusive tecidos linfáticos, mostrou que a disseminação do vírus pelo organismo pode ocorrer tanto por via linfática quanto sanguínea. Vale ressaltar, que a reinfeção nos animais ocorreu de forma mais branda e curso mais rápido (Rehfeld *et al.*, 2013). A reativação viral também foi observada em vacas submetidas ao tratamento de imunossupressão (Rehfeld *et al.*, 2013), assim como foi descrito em animais inoculados com PSV.

Rivetti e colaboradores (2013), após a detecção de partículas viáveis de VACV nas fezes, observaram que a eliminação persistiu mesmo após a resolução das lesões nos tetos inoculados. Estes autores acreditam que a infecção causada pelo VACV não é aguda, e sim, prolongada. A partir desta detecção, camundongos Balb/c foram expostos às fezes destas vacas inoculadas experimentalmente com o VACV-GP2 por 20 dias. Foi possível detectar tanto o DNA de VACV quanto partículas virais infecciosas nas fezes dos camundongos (D'Anunciação *et al.*, 2012). Este modelo de transmissão do VACV descrito pode ocorrer em áreas de surto da VB, sugerindo uma possível transmissão horizontal do VACV dos bovinos infectados para roedores.

### **3.4. Pseudovariola:**

#### **3.4.1. Sinais clínicos:**

A espécie *Pseudocowpox virus* (PCPV), pertence ao gênero PPV, tem distribuição mundial e é o agente etiológico da doença conhecida como pseudovariola (PSV). As lesões causadas por PSV em bovinos são localizadas e proliferativas, muito semelhantes às produzidas pelo VACV e CPXV, sendo indistinguíveis clinicamente. As lesões iniciam-se com a formação de pápulas, as quais aumentam e se tornam proliferativas e crostosas, podendo persistir por 1-2 meses (revisado por MacNeil *et al.*, 2010). Em alguns casos, as lesões podem necrosar agravando o quadro do animal infectado (Esposito *et al.*, 1995).

A infecção por PSV tem distribuição mundial e afeta, principalmente, vacas leiteiras com condições higiênico-sanitárias mais limitadas. A doença é transmitida pelo contato direto e

indireto com as lesões. Como vias indiretas pode-se incluir bezerros que mamam direto nos tetos, moscas, equipamentos de ordenha dentre outros (Munz e Dumbell, 1994).

Nos humanos, lesões anelares são características e recebem o nome de “nódulo do ordenhador” (Figura 6). Estas lesões, quando causadas apenas pelo PSV, são relativamente indolores apresentando geralmente um prurido intenso e cura de quatro a seis semanas (Mazur *et al.*, 2000; Lewis-Jones, 2004). Sabe-se, que co-infecções com vírus do mesmo gênero ou com OPXV podem ocorrer e, desta forma, acredita-se que as lesões são mais graves e mais dolorosas (Abrahão *et al.*, 2010b; Sant’Ana *et al.*, 2012; Sant’Ana *et al.*, 2013; Cargnelutti *et al.*, 2014). Pode ocorrer também, casos com infecções bacterianas secundárias, febre e aumento de linfonodos regionais deixando o quadro mais grave (Canal e Diel, 2012).



Figura 6: Lesões papulares em mãos de humano, causadas por PCPV, desenvolvidas após manipulação de bezerros.  
Fonte: McNeil *et al.*, 2009

### 3.4.2. Pseudovariola no Brasil:

A PSV é frequente no Brasil, podendo estar ou não associada a outras espécies do mesmo gênero ou ao gênero OPXV (Abrahão *et al.*, 2010b; Cargnelutti *et al.*, 2012b; Sant’Ana *et al.*, 2013; Cargnelutti *et al.*, 2014). Porém, informações sobre a infecção em bovinos na literatura é escassa, possivelmente pela manifestação branda e pela semelhança clínica com BPSV e ORFV. Além disso, o diagnóstico muitas vezes é baseado na sintomatologia clínica e na microscopia eletrônica, sem identificação específica do agente etiológico (Cargnelutti *et al.*, 2012).

Abrahão e colaboradores (2010b) descreveram co-infecção de VACV e PCPV em humano com lesão vesicular nas mãos desenvolvidas após contato direto com tetos de vacas doentes em um surto de doenças exantemáticas em bovinos no Estado de Minas Gerais. Co-infecção com VACV e ORFV também foi descrita em surtos de doenças vesiculares de bovinos no Estado de Goiás (Sant’Ana *et al.*, 2013). No Estado de Rondônia, bezerros pertencentes a 13 rebanhos bovinos, com menos de seis meses de idade, apresentaram lesões papulares e vesiculares, principalmente na cavidade oral, mas também no focinho e na pele (Cargnelutti *et al.*, 2014). Segundo os autores, as lesões tiveram um curso entre sete e dez dias e foram causadas por PPV, sendo duas espécies detectadas: BPSV e PCPV. Cargnelutti e colaboradores (2012b) também descreveram um surto de PCPV ocorrido no Estado do Rio Grande do Sul, o qual bezerros na fase de engorda, entre 6-48 meses, apresentaram lesões papulares e vesiculares no focinho e mucosa oral e, humanos apresentaram lesões nas mãos.

Com relação à eliminação do PSV pelas fezes e leite, assim como ocorre com o VACV, ainda não há relatos descritos na literatura.

### **3.4.3. Hospedeiros do *Pseudocowpox virus*:**

Os hospedeiros mamíferos do PPV estão restritos às espécies de ruminantes domésticos (ovinos, caprinos e bovinos) e silvestres (*Rupicapra rupicapra* [camurça]; *Rangifer tarandus* [rena]; *Camelus* sp. [camelo]; *Ovibos moschatus* [boi-almiscarado]; *Capricornis crispus* [antílope japonês]) (revisado por Buttner *et al.*, 2002). O PCPV normalmente acomete bovinos e humanos (Abrahão *et al.*, 2010b; Cargnelutti *et al.*, 2012b; Sant’Ana *et al.*, 2013; Cargnelutti *et al.*, 2014; Lederman *et al.*, 2014; Ogusoglu *et al.*, 2014) porém, a infecção em gato também foi descrita (Fairley *et al.*, 2013). Iketani e colaboradores (2002) sugerem que os bovinos podem ser reservatório do vírus no campo, uma vez que nesta espécie a PSV pode manifestar-se de forma subclínica e persistente. Apesar da limitação de hospedeiros, Ogusoglu e colaboradores (2014) sugerem que o PCPV pode sofrer mutações e infectar animais que nunca foram relatados como hospedeiros para o vírus.

## **3.5. A vaccínia bovina (VB):**

### **3.5.1. Sinais Clínicos:**

As lesões típicas de poxvírus foram observadas em todos os surtos de VB identificados no Brasil. Em humanos, as lesões são comumente encontradas nas mãos e dedos (Lobato *et al.*, 2005; Megid *et al.*, 2008; da Silva *et al.*, 2008; Assis *et al.*, 2015; Peres *et al.*, 2016). No entanto, alguns autores relataram lesões em outras partes do corpo, como nariz, região ocular e boca (Madureira, 2009; Schatzmayr *et al.*, 2009; Silva-Fernandes *et al.*, 2009). Quanto à evolução clínica, elas são similares em homens e animais acometidos. Trindade e colaboradores (2009) descreveram a evolução clínica de uma infecção primária causada pelo VACV em humanos. Inicialmente, pode-se observar o surgimento de máculas e pápulas seguidas por edema e dor local. Após, surgem vesículas que, depois de 3 a 4 dias, evoluem para pústulas umbilicadas envoltas por tecido inflamatório e úlceras com tecido enegrecido (Figuras 7 e 8). Em alguns casos, a linfadenopatia periférica também pode ser observada (Trindade *et al.*, 2009). As queixas de mialgia, dor de cabeça e artralgia, além de linfadenopatia axilar, cervical e inguinal, e anorexia são frequentemente observadas durante a evolução clínica da VB em humanos (Trindade *et al.*, 2003a; Nagasse-Sugahara *et al.*, 2005; Leite *et al.*, 2005; Lobato *et al.*, 2005; da Silva *et al.*, 2008; Schatzmayr *et al.*, 2009; Silva-Fernandes *et al.*, 2009; Megid *et al.*, 2012; Assis *et al.*, 2015).



Figura 7: Lesões nas mãos dos ordenhadores acometidos em surtos de VB.  
Fonte: LPVA (Laboratório de Pesquisa em Virologia Animal, Escola de Veterinária, UFMG)

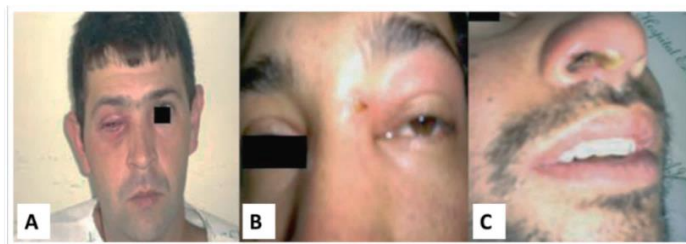


Figura 8: Lesões nas faces dos ordenhadores acometidos em surtos de VB. (A) intraorbital, (B) periorbital e (C) vestibulo nasal. Fonte: da Silva *et al.*, 2008

Em bovinos acometidos, as lesões podem ser observadas nos tetos e úbere (Figura 9A). A presença das lesões nos tetos pode favorecer o estabelecimento de infecções secundárias, como mastites bacterianas nos tetos, causando redução de até 50% na produção de leite (Lobato *et al.*, 2005; Madureira, 2009; Oliveira *et al.*, 2013; Assis *et al.*, 2013b). Os bezerros comumente se infectam durante a amamentação e apresentam lesões no focinho, gengiva e mucosa oral (Figura 9B).



Figura 9: Lesões ulcerativas em tetos de vaca leiteira (A) e mucosa oral de bezerro (B) em uma propriedade com caso de VB. Fonte: LPVA

Em todos os focos da VB, pode-se observar a rápida disseminação da doença dentro da propriedade. Quanto ao tipo de manejo, tanto propriedades com ordenha manual quanto mecânica foram relatados surtos de VB. Na ordenha mecânica foi observado uma taxa de ataque nas vacas em lactação entre 25 e 30%, enquanto em propriedades com ordenha manual, a

porcentagem de animais acometidos foi entre 80 a 100% (Lobato *et al.*, 2005; Madureira, 2009; Assis *et al.*, 2015). No entanto, somente vacas em lactação e bezerros que mamam em vacas doentes foram acometidos (Lobato *et al.*, 2005; Madureira, 2009). Entretanto, a doença muitas vezes não é notificada em Minas Gerais. O acometimento de pequenas propriedades rurais e de acesso médico precário favorece a subnotificação dos casos (Trindade *et al.*, 2009; Assis *et al.*, 2015).

### 3.5.2. Vaccínia bovina no Brasil:

A origem de VACV que circula no Brasil (VACV-BR), assim como dos possíveis hospedeiros naturais responsáveis pelos mecanismos de transmissão e disseminação de VACV não está esclarecida. Uma hipótese para a origem das amostras de VACV que circulam no Brasil, estaria relacionada com as amostras vacinais utilizadas nas campanhas de vacinação no Brasil até a erradicação de VARV (Damaso *et al.*, 2000). Durante surtos de VB, várias amostras de VACV brasileiras (VACV-BR) foram isoladas (Damaso *et al.*, 2000; Trindade *et al.*, 2003a; Trindade *et al.*, 2003b; Leite *et al.*, 2005; Trindade *et al.*, 2006; Trindade *et al.*, 2009; Abrahão *et al.*, 2009c; Campos *et al.*, 2011; Assis *et al.*, 2013b; Oliveira *et al.*, 2013). Porém, a variação genética entre os isolados sugere que VACVs brasileiros existem antes da campanha de vacinação da Organização Mundial de Saúde (OMS) contra VARV e tais isolados continuam circulando no Brasil (Trindade *et al.*, 2007). Entretanto, um trabalho recentemente publicado revelou, com base no genoma completo, a relação filogenética entre a amostra vacinal brasileira produzida pelo Instituto Oswaldo Cruz no Rio de Janeiro (VACV-IOC) usada na década de 1970, as amostras virais selvagens brasileiras VACV-Cantagalo (CTGV) e *Serro virus-2* (VACV-SV2), assim como com o *Horsepox virus* (HSPV) (Medaglia *et al.*, 2015). Estes autores sugerem que o VACV-CTGV evoluiu em paralelo com a amostra vacinal VACV-IOC após a divisão de um ancestral comum mais recente, provavelmente uma antiga amostra da vacina contra VARV relacionada com HSPV. Desta forma, este trabalho propõe novas relações evolutivas entre as amostras de VACV antigas e recentes, principalmente o vírus horsepox, VACV-IOC, o CTGV e as amostras de VACV-BR semelhantes, além da amostra vacinal Dryvax.

Os primeiros isolamentos de VACV no Brasil ocorreram em roedores. Amostra de vírus SPAN 232 (SAV) foi isolada de camundongos sentinelas na estação florestal de Cotia, São Paulo em 1961 (Lopes *et al.*, 1965; da Fonseca *et al.*, 2002). Em 1963, a amostra de VACV BeAn 58058 virus (BAV) foi isolada a partir do sangue de um roedor do gênero *Oryzomys* capturado em uma floresta no estado do Pará (Lopes *et al.*, 1965). Em 1993, uma nova amostra viral foi isolada a partir de camundongos suíços do Centro de Bioterismo da UFMG, sendo denominada *Belo Horizonte virus* (BHV). Os animais apresentavam sinais clínicos semelhantes à varíola murina, com lesões generalizadas no dorso, face, focinho e patas (Diniz *et al.*, 2001).

A partir da década de 1990, houve aumento progressivo dos isolamentos de VACV em quase todos os estados do Brasil, relacionados principalmente aos surtos de VB. Em 1999, *Araçatuba virus* (ARAV) foi isolado a partir de lesões ulcerativas nodulares de tetos e úberes de vacas da raça Girolanda no município de Araçatuba, São Paulo (Trindade *et al.*, 2003a). No mesmo ano, no município de Cantagalo, Rio de Janeiro, foi isolado CTGV (Damaso *et al.*, 2000).

Em Minas Gerais, os primeiros surtos de VB foram identificados na Zona da Mata, em 1999. Desde então, vários surtos foram relatados em todas as regiões do estado, incluindo: Vale do Rio Doce, Triângulo Mineiro/Alto Paranaíba, Sul/Sudoeste de Minas, Campo das Vertentes, Vale do Mucuri e região metropolitana de Belo Horizonte (Lobato *et al.*, 2005; Madureira, 2009). Em

2000, a amostra de VACV *Muriae virus* (MURV) foi isolada a partir de lesões das mãos de um ordenhador, no município de Muriaé, Minas Gerais (Trindade *et al.*, 2003b). Em 2001, duas novas amostras de VACV foram isoladas e identificadas em fazendas próximas, na cidade de Guarani, Minas Gerais: *Guarani P1 virus* (GP1V) e *Guarani P2 virus* (GP2V) (Trindade *et al.*, 2006).

Em 2003, na cidade de Passatempo, no estado de Minas Gerais, foi isolado *Passatempo virus* (PSTV) de vacas com lesões exantemáticas nos tetos (Leite *et al.*, 2005). Abrahão e colaboradores (2009c) isolaram a amostra *Mariana virus* (MARV) de roedores peridomésticos, proveniente da região de Mariana, Minas Gerais, onde foi relatado caso de VB. Em 2011, a amostra SV2 foi isolada a partir de um caso na região do Serro, Minas Gerais (Assis *et al.*, 2012). No mesmo ano, Assis e colaboradores (2013a) isolaram *Carangola virus* (CARV) em surto de VB na cidade de Carangola, Minas Gerais. Novos casos de VB em MG foram descritos recentemente por Abrahão e colaboradores (2015) na região rural da cidade de Doresópolis, sendo isolado VACV-DOR2010.

A ocorrência de casos de VB em outros estados também foi descrita: Goiás (Nagasse-Sugahara *et al.*, 2005), Espírito Santo (Donatele *et al.*, 2007), Pernambuco (Damaso *et al.*, 2008), Tocantins (Medaglia *et al.*, 2009), Rio de Janeiro (Silva-Fernandes *et al.*, 2009), Rondônia (Quixabeira-Santos *et al.*, 2011), São Paulo (Megid *et al.*, 2012) e Bahia (Assis *et al.*, 2015). Em 2013, casos de VB nos estados do Pará e do Maranhão revelaram mais duas amostras de VACV-BR, a amostra *Para virus* (PARV) (Assis *et al.*, 2013b) e o VACV Maranhão (MARV) (Oliveira *et al.*, 2013), respectivamente. Recentemente, foi publicada por Assis e colaboradores (2015) a nova amostra de VACV denominada *Mundo Novo virus* (MUNV), detectada no estado da Bahia (Figura 10).

Em 2010, Brum e colaboradores descreveram um surto de doença exantemática causado por VACV, acometendo cavalos crioulos em um haras localizado em Pelotas, Rio Grande do Sul, o qual deu origem ao nome das duas amostras isoladas: VACV-Pelotas 1 (VACV-P1) e VACV-Pelotas 2 (VACV-P2) (Brum *et al.*, 2010; Campos *et al.*, 2010) (Figura 10). A Figura 10 mostra os estados nos quais já foram identificadas amostras de VACV.



Figura 10: Estados brasileiros onde amostras brasileiras de VACV foram isoladas, com acometimento de humanos, bovinos e outras espécies durante o período de 1999 a 2015. Fonte: Oliveira, 2014 (modificado).

Trabalhos têm mostrado que existe uma grande heterogeneidade genética e biológica entre as amostras de VACV isolados em surtos de VB no Brasil (Trindade *et al.*, 2007; Ferreira *et al.*, 2008a; Drumond *et al.*, 2008). Esta variabilidade permitiu o agrupamento de isolados de VACV-BR em, pelo menos, dois grupos distintos (grupo 1-G1 e grupo 2-G2). Estes grupos demonstram uma dicotomia baseada na evidência da diversidade biológica e molecular, tais como virulência em modelo murino e fenótipo de placas de lise em células BSC-40. Os isolados de VACV-BR agrupados no G2 apresentam placas de lise celular maiores e são mais virulentos quando comparados com VACVs do G1 (Trindade *et al.*, 2006; Drumond *et al.*, 2008; Ferreira *et al.*, 2008a; Assis *et al.*, 2012). Além disso, foi observado polimorfismos em genes específicos de VACV, tais como: gene da hemaglutinina (A56R), o qual o grupo 1 apresenta deleção de 18 nucleotídeos, gene do tipo corpúsculo de inclusão (A26L) e gene da proteína de ligação quimiocina (C23L). Estes genes têm sido usados em estudos filogenéticos que também confirmaram a dicotomia existente entre G1 e G2 (Leite *et al.*, 2007; Drumond *et al.*, 2008; Assis *et al.*, 2012). Porém, um estudo recente demonstrou a variabilidade genética e biológica de VACV-BR isolados em propriedades com surto de VB, evidenciando que VACV pode conter subpopulações de clones virais (Oliveira *et al.*, 2015b). Estes autores acreditam que tais resultados levantam novas questões sobre a diversidade e origem dos VACV-BR que circulam no ambiente e destacam a importância na evolução e manutenção destes vírus no ambiente.

O G1 é o grupo mais frequentemente relatado em casos de lesões exantemáticas por VACV e inclui os isolados ARAV, CTGV, MARV, GP2V, P2V dentre outros (Damaso *et al.*, 2000; Trindade *et al.*, 2003; Trindade *et al.*, 2006; Abrahão *et al.*, 2009c; Campos *et al.*, 2011). Já no G2, menos relatado em casos de VB, pode-se incluir GP1V, P1V, BHV e SH2V (Trindade *et al.*, 2004; Trindade *et al.*, 2006; Campos *et al.*, 2011; Assis *et al.*, 2012). Entretanto, amostras distintas de VACV foram isoladas em um mesmo surto de VB, indicando co-circulação viral: GP1V e GP2V (Trindade *et al.*, 2006) e P1V e P2V (Campos *et al.*, 2011).

### **3.5.3. Hospedeiros do *Vaccinia virus*:**

O genoma extenso do VACV permite a codificação de uma diversificada quantidade de genes associados à modulação da resposta imune do hospedeiro, além de uma grande versatilidade bioquímica, e essas características aumentam a permissibilidade de vários tipos celulares à sua replicação, aumentando a sua capacidade de infectar vários hospedeiros (Hugues e Friedman, 2005).

Bovinos, bubalinos, equinos, roedores peri-domésticos e silvestres, marsupiais, macacos e o homem podem ser hospedeiros do VACV (Lopes *et al.*, 1965; da Fonseca *et al.*, 1998; Diniz *et al.*, 2001; Lobato *et al.*, 2005; Abrahão *et al.*, 2009c; Silva-Fernandes *et al.*, 2009; Abrahão *et al.*, 2010c; Brum *et al.*, 2010; Barbosa *et al.*, 2014). No homem, a doença tem caráter ocupacional, acometendo principalmente ordenhadores que tiveram contato com bovinos infectados que são os hospedeiros mais comumente descritos (Trindade *et al.*, 2003a; Nagasse-Sugahara *et al.*, 2005; Trindade *et al.*, 2006; Silva-Fernandes *et al.*, 2009, Assis *et al.*, 2015).

Equinos são também susceptíveis, como descrito em um surto envolvendo exclusivamente cavalos no sul do Brasil (Brum *et al.*, 2010) e em Minas Gerais (Matos *et al.*, 2013; Borges, 2014), em que vários animais desenvolveram lesões cutâneas no focinho, narinas externas, e nos lábios externos e internos. Em um trabalho posterior, duas amostras distintas de VACV, P1V e P2V, foram isoladas e identificadas de um mesmo equino acometido no surto ocorrido no sul do país (Campos *et al.*, 2011).

Anticorpos neutralizantes (AN) anti-OPXV foram detectados em animais silvestres no bioma Amazônico (macacos-pregos, bugio-pretos, quatis-de-cauda-anelada e cotias) e em São Paulo (capivaras) (Abrahão *et al.*, 2010c e Barbosa *et al.*, 2014). Das espécies capturadas na região amazônica, nas duas espécies de macacos silvestres [*Cebus apella* (macaco-prego) e *Allouata caraya* (macaco barbado ou bugio)] foi detectado DNA do VACV (Abrahão *et al.*, 2010c). Um trabalho recentemente publicado relatou um novo caso de VB em bovinos e humanos no interior do estado de São Paulo e, foi detectado DNA de VACV em amostras de sangue de cães domésticos (*Canis lupus familiaris*) e gambás (*Didelphis albiventris*) (Peres *et al.*, 2016).

Como já citado anteriormente, os vírus BAV, SAV e BHV foram isolados de roedores silvestres, camundongos sentinelas e camundongos de biotérios, respectivamente (Lopes *et al.*, 1965; Fonseca *et al.*, 1998; Diniz *et al.*, 2001). Além disso, Abrahão e colaboradores (2009c) identificaram a presença de DNA de VACV no sangue de roedores peridomésticos (*Rattus rattus* e *Mus musculus*) capturados nas proximidades de um foco de VB em Mariana, Minas Gerais.

Apesar de todos esses hospedeiros, o reservatório natural do VACV ainda não foi definitivamente determinado. Mediante tais descobertas, a detecção do vírus em roedores sentinelas e silvestres, propõe que esses sejam os principais reservatórios (Lopes *et al.*, 1965; Fonseca *et al.*, 1998; Abrahão *et al.*, 2009c), assim como descrito para CPXV, na Europa (Haenssle *et al.*, 2006). Desta forma, Abrahão e colaboradores (2009c) propuseram um modelo hipotético de transmissão da VB, que inclui a participação de roedores peridomésticos no elo entre o ciclo silvestre do VACV e o ambiente das fazendas. Roedores peridomésticos poderiam ingerir ou aspirar fezes contaminadas de bovinos infectados e, posteriormente, infectar animais silvestres presentes nos arredores das fazendas (Abrahão *et al.*, 2009c). Embora não haja registro de casos de transmissão de VB de roedores para bovinos e/ou para humanos, vários estudos mostraram que roedores eliminam vírus infeccioso nas fezes reforçando a hipótese de participação destes animais na cadeia de transmissão da doença (Ferreira *et al.*, 2008a; Abrahão *et al.*, 2009c; Abrahão *et al.*, 2009d; D'Anunção *et al.*, 2012).

### **3.6. Viabilidade do *Vaccinia virus*:**

A espécie VACV possui resistência considerável ao calor, à dessecação e é capaz de manter sua infectividade em restos celulares presentes em crostas por longo tempo. Em aerossóis, Harper (1961) comprovou a estabilidade de VACV por aproximadamente 23 horas, sobretudo sob baixas temperaturas e umidades relativas, e em ambiente não irradiado por raios ultra-violetas (UV). A resistência ambiental de VACV também foi demonstrada em amostras de água de chuva e de rios (Essbauer *et al.*, 2007). Essas características de resistência ambiental podem facilitar a transmissão do VACV (Harper, 1961; Fenner, 2000; Essbauer *et al.*, 2007).

Huq (1976) avaliou a persistência da viabilidade de VARV em crostas sob diferentes condições de temperatura. Foi possível detectar partículas virais infecciosas além de DNA viral por até oito semanas quando as crostas foram mantidas a 4°C ou a -20°C. No entanto, o título do vírus das crostas mantidas a -20 °C foi superior durante todo o período do experimento quando comparado ao título do vírus recuperado das crostas que foram mantidas a 4°C.

A viabilidade de amostras de VACV (GP1V, GP2V, BAV e WR) também foi avaliada em fezes de camundongos experimentalmente inoculados por via intranasal (Abrahão *et al.*, 2009d). Partículas virais viáveis de GP1V foram detectadas até o 15° d.p.i., enquanto das demais

amostras de VACV foi possível recuperar partículas viáveis até o 20º d.p.i. Neste experimento, cada camundongo recebeu  $10^6$  UFP e, o valor médio de UFP por grama de fezes para as amostras de VACV inoculadas variou entre  $1,3 \times 10^3$  UFP (dia 1) e  $1,9 \times 10^2$  UFP (20ºd.p.i.). Segundo os autores, o título viral nas fezes diminuiu cerca de 3,4% (44 UFP) por dia, quando comparado com o primeiro dia. Este experimento mostrou que o VACV pode permanecer viável em fezes de camundongos por várias semanas, podendo representar uma fonte potencial de vírus circulante entre os roedores e um importante fator epidemiológico da VB (Abrahão *et al.*, 2009d).

Oliveira e colaboradores (2010) estudaram a viabilidade de VACV-GP2 em leite experimentalmente inoculado após diferentes condições de armazenamento e após tratamento térmico (pasteurização lenta 62-65°C/30 min), além da produção de leite fermentado e queijo. A amostra VACV-GP2 permaneceu viável no leite após temperaturas de armazenamento em geladeira, câmara fria e -20°C durante 48 horas. Foi possível observar grande semelhança nos resultados das três formas de armazenamento a partir dos valores médios das reduções dos títulos virais. No entanto, apesar de ser observada menor redução no título viral das amostras estocadas a -20°C, o resultado aponta que, estatisticamente, a redução média do título viral para as todas as temperaturas de armazenamento foi igual ( $p < 0,05$ ) (Oliveira *et al.*, 2010).

As temperaturas avaliadas estão de acordo com a Instrução Normativa número 51 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (Brasil, 2002). Segundo esta legislação, o leite cru tipo C pode permanecer estocado sob refrigeração a 4 °C ou menos por até 24 horas até ser enviado para o estabelecimento beneficiador. No entanto, este período pode ser estendido para 48 horas quando o leite é proveniente de propriedades que realizam a segunda ordenha no final da tarde.

A temperatura do leite, de outros alimentos e até a da água podem influenciar a viabilidade de muitos vírus. O pH, bem como a luz UV e outros fatores, podem interferir na viabilidade do VACV (Essbauer *et al.*, 2007). No entanto, Mahnel e colaboradores (1977), não observaram a interferência do pH das amostras no título do VACV inoculado em água de diferentes fontes. O título viral do VACV inoculado experimentalmente em água de beber (pH 7,52), rio ou lago (pH 8,05) foi reduzido em 1-2 logs depois de 200 dias estocado a 10° C. Essbauer e colaboradores (2007) observaram que água de chuva ligeiramente ácida e a presença de proteína favoreceram a viabilidade do VACV no ambiente. Além disso, o vírus permaneceu viável sobre as superfícies de alimentos como salsichas e tecidos de algodão.

Essbauer e colaboradores (2007) avaliaram a viabilidade de VACV (amostra *Munich 1*) em água de chuva, quando estocada a 4 °C. O vírus permaneceu viável durante todo o período do experimento (duas semanas). Neste experimento, a temperatura de 4°C também foi capaz de manter o vírus viável sem redução significativa no título do vírus. Em alimentos como pão, salada e salsicha inoculados experimentalmente com o VACV e armazenados durante 14 dias a 4°C, também foi possível detectar a presença tanto do DNA viral quanto de partículas virais viáveis (Essbauer *et al.*, 2007). Outros vírus também foram avaliados quanto à viabilidade após armazenamento a 4°C. A espécie ECMV permaneceu mais estável mantida a 4°C quando comparadaàs demais temperaturas testadas: 23 °C a 25 °C ou 37 °C (Bratt e Jacoby, 1987).

Sauerbrei e Wutzler (2009) avaliaram a resistência de VACV ao calor seco utilizando um instrumento capaz de emitir calor, o *Keredusy*. O vírus foi resistente ao calor quando exposto durante uma hora às temperaturas de 40 °C, 75 °C, 85 °C e 95 °C. A redução significativa do

título viral (redução de pelo menos 4 log o título inicial do vírus) foi observada somente quando exposto a temperatura de 95°C durante duas horas. Sob as demais temperaturas, o VACV não sofreu redução do título viral, sendo, portanto, resistente às temperaturas testadas.

Embora o VACV permaneça viável tanto no leite após tratamentos térmicos quanto após o processamento para produção de queijo, ainda não se sabe a respeito da transmissão do vírus pela ingestão de produtos contaminados (Oliveira *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2015a). No entanto, a adoção de medidas que visem a prevenção e o controle da disseminação da doença no rebanho são importantes, haja vista o risco potencial de consumo de leite cru para a saúde pública.

### **3.7. Importância histórica e saúde pública:**

A origem da palavra vaccínia faz referência à palavra vacina, por sua vez originada da palavra *vaccínus*, de *vacca* (vaca), em latim. Em 1796, o médico inglês Edward Jenner retirou pequena quantidade de material das mãos de uma camponesa com lesões de varíola bovina, causada pelo CPXV, e inoculou em um garoto de oito anos. Com o tempo, constatou-se que a criança havia se tornado imune à varíola humana. Jenner realizou esse experimento após observar que pessoas antes infectadas com o vírus da varíola bovina (bem mais branda) dificilmente manifestavam a varíola humana, descobrindo assim a vacina contra essa enfermidade (Fenner, 1988).

O vírus protótipo do gênero OPXV, a espécie VACV, tem grande importância histórica na saúde pública, pois durante décadas, foi o vírus utilizado na produção da vacina contra a varíola humana, declarada erradicada do mundo em 1980 pela OMS (Fenner, 2000). Diversas amostras de VACV foram utilizadas na produção destas vacinas: amostras da linhagem Lister, originada do Lister Institute, na Inglaterra, e da linhagem New York City Board of Health, originada do Laboratório Wyeth, Radnor, nos Estados Unidos. Além dessas, outras amostras foram utilizadas na China, na Rússia e na Índia (Henderson e Moss, 1999, citado por Ferreira, 2008a). No Brasil, o Instituto Butantã em São Paulo produziu milhões de doses de vacina com a linhagem VACV Lister, procedente da Inglaterra, sendo este vírus denominado aqui como Lister-Butantã (Lanna, 1980). No Rio de Janeiro, a produção de vacinas utilizando a amostra de VACV-IOC do Instituto Oswaldo Cruz também foi amplamente utilizada durante a campanha de vacinação no Brasil (Damaso *et al.*, 2000).

Entretanto, com a erradicação da varíola humana, a vacinação foi suspensa. Atualmente, a vacinação apenas é recomendada para profissionais que trabalham em laboratórios, manipulando estes agentes, além de alguns grupos de risco como profissionais da área de saúde e militares, nos Estados Unidos e em alguns países da Europa, devido ao receio de bioterrorismo (Hughes *et al.*, 2011).

Este vírus tem também importância como vetor de expressão na produção de vacinas. A primeira vacina utilizando um poxvírus recombinante foi feita com VACV, contendo o gene da glicoproteína G (gG) do vírus da raiva. Este vetor foi construído a partir da inserção do cDNA da gG do vírus da raiva no local do gene da timidina quinase em amostras Copenhagem de VACV. Essa vacina tem sido utilizada para a imunização oral de raposas e outros carnívoros de vida livre contra a raiva, a partir de 1987, na Bélgica, e tem propiciado o controle e até mesmo a erradicação desta doença em vários países europeus (Canal e Diel, 2012). O vírus Vaccinia Ankara modificado (MVA), após ser gerado por inúmeras passagens em culturas de fibroblastos de embrião de galinha, tornou-se altamente atenuado e incapaz de se multiplicar na maioria das

células de mamíferos devido à perda de 15% de seu genoma parental (Freitas, 2011). Essa perda inclui genes relacionados com a imunorregulação do hospedeiro, evasão do sistema imune e com o espectro de hospedeiros e, por isso, o MVA é considerado um vetor vacinal seguro e vem sendo utilizado na tentativa de produzir novas vacinas.

### 3.8. Patógenos possivelmente veiculados pelo leite:

O consumo de leite sem prévio tratamento térmico pode oferecer risco à saúde pública na medida em que ele pode veicular várias bactérias patogênicas, dentre elas: *Salmonella*, *Campylobacter*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium bovis*, *Escherichia coli* e *Brucella* spp (Jayarao e Henning, 2001; Murinda *et al.*, 2002; Van Kessel *et al.*, 2004; Oliver *et al.*, 2005; Santos, 2010; Franco *et al.*, 2013). No entanto, alguns autores destacaram a possibilidade de veiculação de vírus pelo leite, sobretudo quando estes oferecem uma ameaça à saúde pública (Sellers, 1969; Callis *et al.*, 1975; Venables *et al.*, 1997; Jayarao e Henning, 2001; Tomasula e Konstance, 2004; Bona *et al.*, 2005; Oliver *et al.*, 2005, Franco *et al.*, 2013; Resende, 2014). Porém, a literatura ainda é escassa quando se trata de doenças virais transmitidas por alimentos lácteos. As infecções virais causadas pelos produtos lácteos contaminados são negligenciadas em comparação aos surtos alimentares de origem bacteriana (Silva & Lavinas, 2010).

Normalmente, o leite produzido na glândula mamária de animais saudáveis não contém bactérias ou vírus patogênicos aos humanos. No entanto, se o animal apresentar uma infecção sistêmica ou intra-mamária, os microrganismos podem ser eliminados juntamente com o leite no momento da ordenha (LeJeune e Rajala-Schultz, 2009). Além disso, o leite também pode ser contaminado por fômites no momento da ordenha (Oliver *et al.*, 2005; LeJeune e Rajala-Schultz, 2009). Normalmente, as formas de prevenção contra microrganismos patogênicos transmitidos pelo alimento são a higiene pessoal e de utensílios, o tratamento adequado da água, o saneamento básico adequado, a higienização correta dos alimentos e evitar o consumo de alimentos crus ou mal cozidos (Germano & Germano, 2008). Em se tratando de leite, a saúde do rebanho e a higienização na ordenha são fatores primordiais para minimizar a contaminação por patógenos (Figura 11).

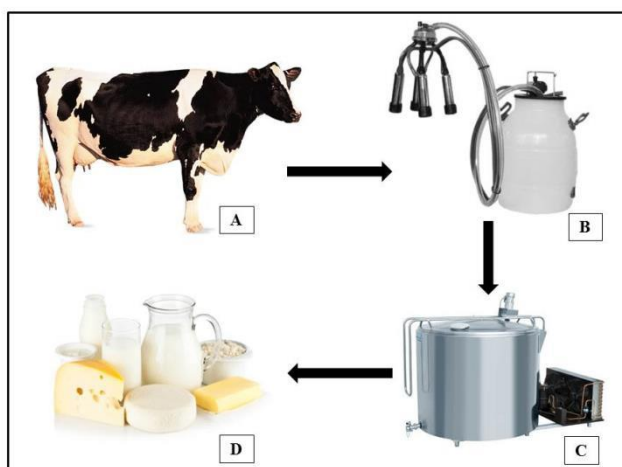


Figura 11: Ciclo de patógenos veiculados pelo leite iniciando no ambiente de ordenha até sua transferência para o leite e derivados. (A) Os microrganismos patogênicos podem estar diretamente relacionados com a manipulação de utensílios contaminados no momento da ordenha ou com microrganismos eliminados junto com o leite; (B) o leite torna-se contaminado durante a ordenha mecânica ou manual; (C) O leite contaminado é encaminhado aos tanques de refrigeração; (D) O consumo de leite não pasteurizado e outros produtos produzidos a partir de leite não pasteurizado favorece a disseminação dos patógenos. Fonte: Oliver (2005), revisado por Oliveira, 2014a (modificado).

Rohrbach e colaboradores (1992), em avaliação dos microrganismos isolados a partir de tanques de refrigeração de leite nos estados do Tennessee e Virgínia (EUA), observaram que quase 35% dos produtores de leite que participaram da pesquisa afirmaram consumir leite cru estocado nos tanques de refrigeração das fazendas. Porém, 25% destes mesmos tanques estavam contaminados com um ou mais patógenos. Desta forma, o consumo de leite cru bem como de queijos produzidos a partir de leite cru representa ameaça à saúde pública (Oliver *et al.*, 2005; Jayarao *et al.*, 2006; Leedom, 2006).

A pasteurização tem como objetivo eliminar os microrganismos patogênicos. No entanto, a sua efetividade na inativação de vírus de importância para a saúde pública também deve ser considerada (Bona *et al.*, 2005). O vírus da febre aftosa, por exemplo, embora não apresente riscos diretos à saúde humana, representa uma ameaça aos rebanhos de animais biungulados. Contudo, a sua viabilidade no leite após diferentes processos de pasteurização é bastante estudada. A pasteurização lenta do leite consiste em mantê-lo sob temperatura de 62 a 65 °C durante 30 minutos, sendo comumente realizado em tanques onde o leite é mantido sob agitação mecânica durante todo o processo (Brasil, 1952). Embora não seja adotado em escala industrial, este processo pode ser empregado em laticínios de pequeno porte para o abastecimento público ou para produção de derivados lácteos de acordo com a IN 51 de 18 de setembro de 2002 (Brasil, 2002).

Sellers (1969), avaliando a viabilidade do vírus da febre aftosa no leite, observou a importância do pH e da temperatura na inativação do vírus. No leite inoculado com partículas virais e mantido à temperatura de 63 °C, observou-se a completa inativação do vírus após um minuto com pH 6,7. Contudo, mantendo a mesma temperatura e pH 7,6, o vírus foi inativado somente após dois minutos. Outros vírus também podem ser veiculados pelo leite. Venables e colaboradores (1997) pesquisaram a viabilidade do vírus da imunodeficiência bovina (BIV) no leite cru e após sofrer processo de pasteurização. A transmissão do vírus foi constatada pela PCR e sorologia do grupo de animais que foi alimentado com o leite cru contendo vírus. No entanto, nenhum animal inoculado com o leite previamente pasteurizado contendo o BIV, desenvolveu a doença.

Embora as rotas conhecidas de infecção natural de VACV e PCPV não incluam a ingestão de alimentos que contenham o vírus, o leite pode apresentar partículas virais viáveis, uma vez que lesões presentes nos tetos e úbere podem se soltar durante a ordenha, contaminando o leite. Além disso, Oliveira e colaboradores (2015a) comprovaram, por isolamento viral e PCR quantitativo, que vacas experimentalmente infectadas podem eliminar o VACV pelo leite e, esta eliminação pode ocorrer mesmo após a cicatrização das lesões. A quantificação do DNA do VACV nas amostras de leite dos tetos revelou uma variação na quantificação do DNA viral que vai desde 3000 UG/ml até 18331000 UG/ml, durante 33 dias (Oliveira *et al.*, 2015a).

A transmissão do VACV pelo leite ainda é desconhecida no Brasil, mas há na literatura a descrição de lesões exantemáticas na boca e mucosa oral de 17 indianos que ingeriram leite cru contaminado com BPXV (Gurav *et al.*, 2011), indicando que a ingestão de leite contaminado com VACV pode ser um risco para a saúde pública.

### **3.9. Queijo Minas artesanal:**

Minas Gerais (MG) é o estado brasileiro que mais produz leite, cerca de 8,7 bilhões de litros, representando 27,1% da produção nacional (Brasil, 2013a). Além disso, MG é também o maior

produtor de queijos do Brasil, processando, 215 mil toneladas por ano, o que era equivalente a 50% da produção total do país (Martins, 2006).

O queijo Minas artesanal (QMA) é um dos mais antigos e tradicionais queijos do estado, sendo produzidos cerca de 30 mil toneladas/ano e mantendo na atividade mais de 25 mil produtores. A produção desse queijo está presente em mais de 600 dos 853 municípios do Estado e exerce grande importância para a economia e identidade sócio-cultural de Minas Gerais (Dores e Ferreira, 2012, revisado por Castro, 2015). Desde 2008, a produção do QMA é considerada patrimônio imaterial do país, pelo Instituto de Patrimônio Histórico e Artístico Nacional (IPHAN).

O QMA deve ser elaborado em propriedade leiteira, a partir do leite cru, integral, recém-ordenhado de vaca, obtido de um rebanho sadio e que atenda aos padrões de qualidade exigidos pela legislação estadual vigente. São utilizadas, em sua produção, técnicas tradicionais, ficando proibida a utilização de técnicas industriais, como ultrafiltração do leite, prensagem mecânica, emprego de leite concentrado ou em pó e proteínas lácticas. Deve ainda ser elaborado no interior de queijarias artesanais situadas em propriedades rurais, destinadas exclusivamente à produção deste queijo (Minas Gerais, 2012).

O Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) reconhece, até o presente momento, sete regiões tradicionalmente produtoras de QMA, sendo elas: Serro, Cerrado, Araxá, Serra da Canastra, Campo das Vertentes e mais, recentemente, o Triângulo Mineiro e Serra do Salitre (Figura 12) (Minas Gerais, 2002; Minas Gerais, 2003a; Minas Gerais, 2003b; Minas Gerais, 2004; Minas Gerais, 2009; Minas Gerais, 2014a; Minas Gerais, 2014b).

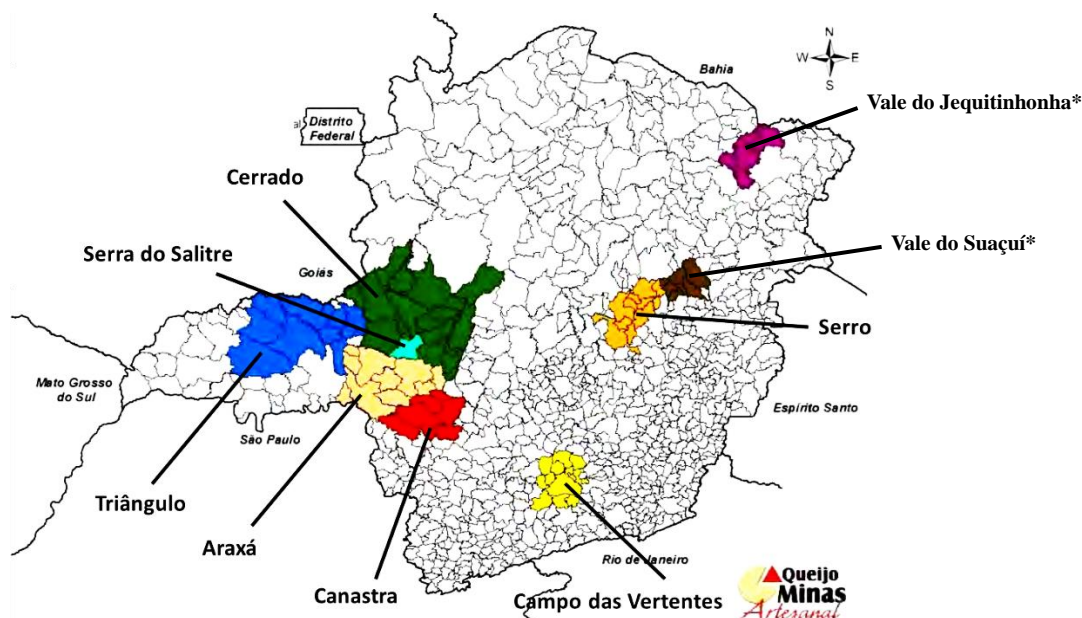


Figura 12: Mapa das microrregiões produtoras de queijo artesanal no estado de Minas Gerais.

\*Microrregiões produtoras de outros tipos de queijos elaborados a partir de leite cru: Vale do Jequitinhonha, produtora do queijo cabacinha e Vale do Suaçuí, produtora do queijo parmesão artesanal. Fonte: Castro (2015), adaptado.

Os fatores físico-naturais de cada uma dessas regiões propiciam pastagens naturais típicas e o desenvolvimento de bactérias específicas que se multiplicam em cada um desses micro-climas e dão, a cada queijo, aparência e sabor específicos. A esses fatores, somaram-se vários aspectos sócio-culturais ao qual foi elaborado um modo próprio de fazer como: a manipulação do leite, dos coalhos, das massas, das formas de prensagem, da cura e da tradição comercial (IPHAN, 2006).

A segurança do QMA é atestada, sobretudo, por meio da inspeção e fiscalização higiênico-sanitária de toda sua cadeia produtiva pelos órgãos competentes, que devem assegurar o cumprimento das exigências das legislações vigentes.

A regulamentação sobre os queijos artesanais (QA) ocorreu em 2000, por meio da resolução Nº 7 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (Brasil, 2000). Este documento ratificou o exposto no Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) de que a comercialização de queijo elaborado a partir de leite cru seria permitida e regularizada pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF) no queijo submetido a um tempo mínimo de 60 dias de maturação (BRASIL, 1952). Esta medida levou a grande insatisfação por parte dos produtores, que alegavam que este período de maturação ocasionaria perda das características sensoriais tradicionais do queijo, além de aumentar os custos com a estocagem do produto (Castro, 2015). No intuito de resguardar a produção artesanal do queijo Minas e garantir a segurança dos consumidores, o governo estadual de Minas Gerais, elaborou e publicou a Lei nº14.185, de 31 de janeiro de 2002, pioneira no assunto, que dispõe sobre o processo de produção do QMA (MINAS GERAIS, 2002b). Essa lei, regulamentada pelo Decreto nº 42.645, de 05 de junho de 2002 (MINAS GERAIS, 2002a), definiu normas de fabricação, de embalagem e de transporte do QMA, estabelecendo-se ainda a obrigatoriedade de certificação de qualidade dos produtores e o cadastramento oficial das queijarias pelo IMA. Outras portarias e decretos foram lançados a fim de melhorar a produção do QMA (MINAS GERAIS, 2006; MINAS GERAIS, 2008).

Porém, os 60 dias de maturação e o impedimento da comercialização em outros estados brasileiros foram mantidos, fazendo com que alguns produtores mineiros continuassem a comercializar sua produção na clandestinidade (Dores e Ferreira, 2012). A grande evolução para a ampliação de mercado do QMA veio mais tarde, com a publicação da Instrução Normativa nº 57 em 16 de dezembro de 2011 pelo MAPA (BRASIL, 2011), que permitiu a comercialização de queijos artesanais com período de maturação inferior a 60 dias, contrariando a determinação anterior dada pelo RIISPOA (BRASIL, 1952). Contudo, a produção ficava restrita a queijarias situadas em regiões certificadas ou tradicionalmente reconhecidas e na unidade produtora de leite cru.

Após o reconhecimento da equivalência do Serviço de Inspeção de Produtos de Origem Animal do IMA, para adesão ao Sistema Brasileiro de Inspeção de Produtos de Origem Animal (SISBIP-POA), pela publicação da portaria de nº 366 pelo MAPA (BRASIL, 2012a), os esforços do estado foram intensificados para modificar a situação dos QA, uma vez que esta portaria criou condições para que os produtos com o selo de Serviço de Inspeção Estadual, inspecionados pelo IMA, pudessem ser comercializados em todo o território nacional com equivalência ao selo do Serviço de Inspeção Federal (SIF). Nesse sentido, em 30 de abril de 2013, entrou em vigor a portaria estadual de nº 1305 que determina tempos mínimos de maturação para o QMA produzido a partir de leite cru e com a utilização de soro fermentado ou “pingo”, popularmente conhecido (MINAS GERAIS, 2013a). Logo depois, uma nova normativa do MAPA decretou

que os QA elaborados a partir de leite cru podem ser maturados por um período inferior a 60 dias em queijarias situadas em regiões de indicação geográfica registrada ou tradicionalmente reconhecida e em propriedades certificadas como livre de tuberculose e brucelose, de acordo com o disposto no Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT), ou controladas para brucelose e tuberculose pelo Órgão Estadual de Defesa Sanitária Animal (BRASIL, 2013).

A adoção conjunta das Boas Práticas de Fabricação (BPF) e das Boas Práticas Agropecuárias (BPA), por todos os elos envolvidos na cadeia produtiva do QMA, garantem produtos de qualidade mais elevada e que não apresentam perigo à saúde pública (Azevedo *et al.*, 2004). Diagnósticos das regiões produtoras de QMA (Araújo, 2004; Pinto, 2008) indicaram a necessidade de adequações estruturais das propriedades e das BPF para melhoria da qualidade dos queijos produzidos nestas regiões. Os autores constataram não conformidade e contaminação microbiana no leite cru em um grande número de propriedades rurais, assim como no queijo recém produzido e na água utilizada na produção e manipulação dos alimentos. Intervenções nesses aspectos foram consideradas prioritárias para propiciar um queijo maturado com qualidade dentro dos prazos definidos. Vários fatores podem contribuir para a contaminação dos QMA por patógenos: qualidade da água das queijarias, qualidade do soro-fermento (produto indispensável na produção dos QMA), saúde do rebanho, o que compromete a qualidade do leite, dentre outros (Castro, 2015).

Os derivados de leite, e principalmente os queijos, são alimentos altamente nutritivos, ideais para o crescimento de microrganismos patogênicos como também para os deteriorantes (Dores, 2007). *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Campylobacter* spp., *Listeria* spp., *Bacillus cereus*, *Brucella* spp. e *Staphylococcus aureus* são alguns exemplos de microrganismos patogênicos associados a surtos de infecções e intoxicações alimentares nos quais produtos lácteos, em especial, os queijos, estão frequentemente envolvidos (Jay, 2005; Ornelas, 2005).

Segundo Beresford e colaboradores (2001), a qualidade microbiológica do queijo é dependente do controle de, pelo menos, seis fatores que são apresentados juntos com suas respectivas implicações na Tabela 1.

Tabela 1: Parâmetros que afetam crescimento microbiano em queijos

Fatores	Efeito no crescimento microbiano
Umidade	Umidade elevada aumenta susceptibilidade de esporulação.
Teor de sal	Inibe, geralmente, em concentrações de 10 a 100 g/kg
pH	Crescimento ótimo próximo da neutralidade. Inibido em pH<5.
Temperatura de crescimento	Temperaturas ótimas para crescimento de mesófilos e termófilos são 30° e 42°C, respectivamente.
Eh*	Aeróbios estritos (300 a 500 mV); anaeróbios estritos (-300 a 100 mV); anaeróbios facultativos (-100 a 100 mV).
Nitrato	Usado em queijos para prevenir o crescimento de <i>Clostridium tyrobutyricum</i> .

\*Eh = potencial de oxirredução. Fonte: Beresford *et al.*, 2001 (traduzido)

O leite cru utilizado para a produção de queijos e derivados representa risco potencial de disseminação de doenças provenientes tanto de microrganismos eliminados pelo leite quanto daqueles adquiridos a partir da utilização de utensílios contaminados no momento da ordenha. Porém, pouco é citado na literatura sobre vírus transmitidos por leite e derivados. Os surtos

alimentares virais são negligenciados, em comparação aos surtos alimentares de origem bacteriana. Por outro lado, os vírus são capazes de contaminar um produto sem alterar suas características sensoriais, sendo responsáveis por uma alta taxa de morbidade em humanos que consomem tal produto contaminado (Santos, 2010; Silva & Lavinias, 2010).

Callis e colaboradores (1975) mostraram que o vírus da febre aftosa permaneceu viável nos queijos tipo *Camembert* (pH de 5,0) e *Cheddar* produzido a partir de leite aquecido a 63°C durante até quatro meses. Oliveira e colaboradores (2010) observaram que o VACV permanece viável em queijos frescos produzidos a partir de leite experimentalmente contaminado. Recentemente, estes mesmos autores recuperaram partículas infecciosas de VACV em queijos produzidos com leite proveniente de vacas experimentalmente infectadas com o vírus (Oliveira *et al.*, 2015a). Em focos de VB, a utilização do leite cru para a produção de queijo pode oferecer risco tanto para o queijeiro, que normalmente manipula a massa sem nenhum tipo de proteção (como luvas), quanto para as pessoas que consomem estes produtos, caracterizando um risco à saúde pública.

### **3.9.1. Processo de maturação dos queijos:**

A maturação do queijo corresponde à fase de transformações físicas, químicas e microbiológicas, que ocorrem tanto na periferia como no interior da massa, sob a ação de enzimas lipolíticas e proteolíticas, a maior parte de origem microbiana. É um fenômeno bastante complexo, pois varia de queijo para queijo (Perry, 2004; de Paula *et al.*, 2009). O índice de maturação do queijo é medido pela degradação de caseína, pela avaliação da proporção entre nitrogênio total e nitrogênio solúvel, assim denominado nitrogênio oriundo de matéria orgânica. Este índice deve aumentar com o avanço da maturação (Perry, 2004).

As principais reações bioquímicas que ocorrem durante a maturação são a proteólise e a lipólise. No entanto, o metabolismo da lactose e do citrato, apesar de estarem presentes em baixas concentrações, é importante em todas as variedades de queijos e crítico em algumas (Paiva, 2012). A proteólise consiste na degradação das proteínas em produtos mais simples e mais solúveis, sendo o principal e o mais complexo evento bioquímico que ocorre durante a maturação da maioria das variedades de queijo (Santos, 2010; Resende, 2014). Nesse processo, a caseína é hidrolisada por enzimas proteolíticas a peptídeos de alto, médio e baixo peso molecular, aminoácidos, amidas e amônias. A procedência dessas enzimas pode ser do próprio leite, das bactérias que contaminam o leite, do coalho ou enzima coagulante, das bactérias lácticas ou mesmo da microbiota secundária (de Paula *et al.*, 2009).

A proteólise contribui para as modificações ocorridas na textura, por meio da quebra da rede protéica, diminuição da atividade de água, formação de novas ligações entre a água, grupos carboxilas e aminas liberados e, por aumento do pH, principalmente para variedades de queijos maturados por fungos, o que facilita a liberação de compostos aromáticos (Fox, 1993; de Paula *et al.*, 2009). Esta reação tem contribuição direta para o sabor e ocorre mediante a formação de peptídeos e aminoácidos livres, assim como a liberação de substratos (aminoácidos) para reações de transaminação, desaminação oxidativa, descarboxilação, redução e oxidação, dessulfuração, catabolismo de aminoácidos aromáticos e reações de aminoácidos com outros compostos (Figura 13). O teor de sal afeta diretamente a proteólise, pois inibe o desenvolvimento das bactérias lácticas, o que diminui a produção de enzimas proteolíticas (de Paula *et al.*, 2009).

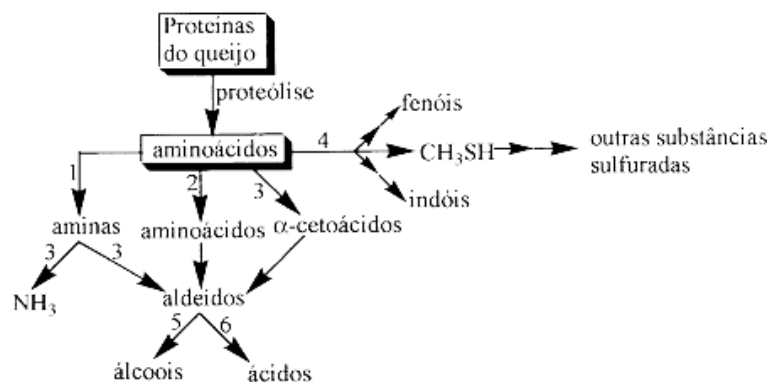


Figura 13: Esquema geral de proteólise decorrente da ação microbiana durante a maturação de queijos: 1. Descarboxilação; 2. Transaminações; 3. Desaminações oxidativas; 4. Degradações; 5. Reduções; 6. Oxidações. Fonte: Perry, 2004.

A hidrólise da gordura causada por enzimas é denominada lipólise. Essas enzimas podem ser provenientes do próprio leite, dos microrganismos endógenos e contaminantes, do fermento adicionado ou, ainda, de preparações enzimáticas usadas durante a fabricação (Fox, 1993). Essas ações enzimáticas resultam em produtos como ácidos graxos voláteis de cadeia curta que incluem o butírico, caprótico, caprílico e cáprico (de Paula *et al.*, 2009). A lipólise é importante na formação do aroma; porém, não altera a textura do queijo (Fox, 1993). Na maioria dos queijos, a lipólise não é extensa, sendo um pouco mais significativa para queijos oriundos de leite cru. As lipases ativas no queijo provêm de microrganismos e das lipases naturais do leite, sendo essas últimas inativadas por valores de pH inferiores a 6,5 e por temperaturas elevadas (de Paula *et al.*, 2009). A lipólise nos queijos é influenciada pelo aumento de temperatura, população alta de bactérias psicrotólicas e homogeneização do leite (Wastraet *et al.*, 1999).

Durante o período de maturação, a atividade de água ( $a_w$ ) diminui, principalmente devido à desidratação sofrida pelos queijos, expostos às condições ambientais (temperatura e umidade relativa da sala de maturação) (Paiva, 2012). Além da umidade, outros parâmetros como índices de proteólise e teor de sal também influenciam a  $a_w$  dos queijos (Furtado, 1990).

É de fundamental importância a determinação do potencial hidrogeniônico (pH) em queijos, já que este apresenta enorme influência na textura e na vida microbiana, afetando, assim, a maturação. As enzimas de origem microbiana, como lipases, proteinases e peptidases, dependentes do pH, necessitam de um potencial de hidrogênio para a sua atividade para catalisarem as reações químicas da maturação (Perry, 2004). Os valores de pH em QMA são bastante variáveis, devido as variações observadas no processo de elaboração deste queijo. Neste sentido, a quantidade de coalho adicionado ao leite, a qualidade do leite cru, o tipo de bactéria ácido-lática e de outros micro-organismos presente no leite e no pingo e o tempo/temperatura de maturação estão diretamente relacionados ao valor de pH encontrado no QMA (Castro, 2015). A redução do pH do queijo, para valores entre 4,5 e 5,5, principalmente ocasionada pela produção de ácido lático pelas bactérias lácteas presentes no leite, pingo e, conseqüentemente, no queijo, contribui para a prevenção do crescimento de bactérias patogênicas e da maioria dos microrganismos deteriorantes do queijo (Noronha, 2014).

O pH encontrado em QMA, de propriedades não cadastradas localizadas na região da Serra da Canastra foi de 5,34 (Resende, 2010). Aos oito dias de maturação, este mesmo queijo, quando

maturado à temperatura ambiente, apresentou pH de 5,03, no período das águas, e de 5,0, no período seco (Dores, 2007). Em trabalho semelhante, Silva e colaboradores (2011) encontraram, no verão, pH médio dos queijos de 5,14 e, no inverno, de 5,36.

A acidez titulável em queijos se refere a quantidade de ácido láctico presente em uma amostra (Cecchi, 2003). Ela pode variar conforme o cultivo láctico presente no queijo e no pingo, a quantidade de sal adicionada ao processo, tempo e temperatura durante a prensagem do queijo, tamanho do grão obtido no corte da coalhada, entre outros fatores que variam ao longo de sua produção (Scott, 2002). As bactérias ácido-láticas presentes no queijo são capazes de fermentar lactose, como substrato para suas funções vitais, levando a formação de grande quantidade de ácido láctico durante as fases iniciais de produção do QMA e ao longo de todo o seu processo de maturação. O aumento da concentração de ácido láctico no queijo leva a diminuição do pH. Entretanto, não existe uma correlação entre os valores de acidez e pH encontrados, uma vez que este, mede a quantidade de íons hidrogênio no meio (Scott, 2002) e a acidez, a quantidade de ácido que está disponível para reagir com uma base (Cecchi, 2003).

De acordo com Furtado e colaboradores (1980), um produto com sabor e aroma mais acentuados, resulta da adição da cultura láctica. Assim, leite inoculado com fermento láctico que apresenta maior quantidade de bactérias lácticas, sofre maior hidrólise da lactose e produz mais ácido láctico durante a coagulação. Wandeck (1972); Hosken e Furtado (1983); Davies e Law (1984) afirmaram que o teor de ácido láctico, a presença de componentes tamponantes, o fosfato de cálcio coloidal solubilizado e as proteínas, que contribuem para o poder tampão da massa, resultam na variação do pH dos queijos.

Durante o processo de maturação, inicialmente, ocorre uma diminuição gradual do pH devido à formação de ácido láctico a partir da lactose residual. Porém, posteriormente, por causa da liberação de produtos alcalinos da proteólise, como a produção de amônia, ocorre um aumento gradativo do pH que neutraliza a acidez do meio (Perry, 2004). Vasek e colaboradores (2013) relatam que o aumento do pH, após o sétimo dia de maturação, é outro fator de risco para a sobrevivência de microrganismos patogênicos. Paiva (2012), ao estudar os queijos artesanais da Serra da Canastra, observou um ligeiro aumento no pH dos queijos durante os primeiros 15 dias de maturação, variando entre 4,7 e 5,1. Porém, o decréscimo de pH pode voltar a ocorrer durante o período de maturação devido ao crescimento de bactérias ácido lácticas não provenientes do fermento (NSLAB), podendo atingir, para queijos da Serra da Canastra, pH de 4,5, dependendo da época do ano (Paiva, 2012). NSLAB é uma microbiota de composição muito variável que depende do tipo de queijo, localização geográfica e estação do ano, proveniente de leite cru ou do próprio ambiente da indústria. Estas bactérias têm um período de latência muito grande e é, por essa razão, que suas contagens começam a aparecer no queijo a partir das primeiras semanas, onde também se inicia o processo de declínio das bactérias do fermento lácteo (CRH Hansen, 2011, revisado por Paiva, 2012). Segundo este autor, o substrato para essas bactérias é o resíduo de lactose resultante da fermentação ou, ainda, o citrato que é utilizado por algumas espécies.

O período do ano é determinante na qualidade do QMA. Isto se deve, principalmente, às diferenças observadas quanto as temperaturas médias e umidade relativa do ar entre o período chuvoso e seco. Sabe-se, por exemplo, que o queijo produzido no período seco, por ser elaborado e maturado a baixa temperatura e baixa umidade, desfavorece o crescimento de microrganismos deteriorantes e/ou patogênicos. Resultados confirmando menores contagens em maturação no período da seca foram observados em QMA do Serro (Martins, 2006).

Contrariamente, queijos elaborados durante o período chuvoso, devido às altas temperatura e umidade do ar, também elevada, apresentam maiores contagem microbiológicas, como mostram os resultados encontrados em QMA da Serra da Canastra e do Campo das Vertentes (Dores *et al.*, 2013; Oliveira, 2014).

A influência do período do ano na qualidade do QMA também advém de variações observadas na qualidade do leite e da água empregados na elaboração do queijo, que também são comumente mais contaminados durante o período chuvoso. Sob o ponto de vista físico-químico, a composição do queijo é fortemente influenciada pela composição do leite, em especial o teor de gordura, proteína, lactose e contagem de células somáticas. Durante o período chuvoso, há um aumento de casos de mastite no rebanho, com elevação de CCS e, conseqüente redução de lactose no leite (Bueno, 2005). Neste mesmo período, devido ao maior aporte forrageiro aos animais, tem-se uma elevação nos teores de gordura e proteína no leite e, conseqüentemente, no queijo (Larsen *et al.*, 2010).

Na tentativa de evitar possíveis intoxicações pelo consumo, a legislação brasileira permite a comercialização do queijo produzido com leite cru, desde que maturado por 60 dias a uma temperatura superior a 5°C (BRASIL, 2000). Porém, estudos mostraram que 17 e 22 dias de maturação para queijos produzidos na microrregião do Serro e microrregiões da Canastra, do Cerrado, de Araxá e do Campo das Vertentes, respectivamente, foram suficientes para enquadrar os queijos nos parâmetros da Legislação Estadual nº 14.185 (MINAS GERAIS, 2002). Desta forma, em 2013, a Portaria do IMA nº1305 definiu estes períodos de maturação do QMA (17 e 22 dias) para estas regiões (Martins, 2006; Dores, 2007). No mesmo ano, o MAPA decreta uma nova normativa (IN 13) que permite que os QMA possam ser maturados por um período inferior a 60 dias (BRASIL, 2013). Entretanto, a normativa enfatiza tal permissão quando estudos técnico-científicos comprovarem que a redução do período de maturação não compromete a qualidade e a inocuidade do produto.

## Capítulo 1: *Vaccinia virus*: transmissão pelo leite experimentalmente contaminado utilizando o modelo murino

(Artigo publicado na revista PlosOne, 2015 – vide anexo 1)

### RESUMO

A VB é uma zoonose causada por VACV que afeta principalmente vacas leiteiras e humanos. Estudos prévios têm detectado partículas virais viáveis de VACV em amostras de leite de vacas natural e experimentalmente infectadas. Porém, ainda não se sabe se o leite contaminado pode transmitir VACV após o consumo. Por outro lado, há um estudo que mostra que humanos que vivem em áreas endêmicas de VB, mas que nunca tiveram contato com vacas doentes, apresentaram anticorpos anti-OPXV, sugerindo que o VACV pode ser transmitido por outras vias. Levando em consideração o previamente exposto, torna-se importante estudar a possível transmissão deste vírus pelo leite e seus derivados. Por isto, este experimento teve como objetivo estudar a transmissão, a patogenia e a eliminação de VACV em camundongos inoculados por via oral com leite experimentalmente contaminado. Baseando-se em trabalhos anteriores, 30 camundongos receberam 100 µl de leite, por via oral, contendo 10<sup>6</sup> UFP de VACV-GP2 (grupo infectado). O grupo controle foi composto por 10 camundongos e cada um foi inoculado com 100µl de leite não contaminado. Exames clínicos foram realizados durante 30 dias consecutivos após a inoculação. Fezes e suabes orais (SO) foram coletados em dias alternados. Eutanásia foi realizada em dias pré-determinados (2, 5, 10, 20 e 30 dias) para coleta de sangue e tecidos. Foram realizados testes de soroneutralização por redução de placa (SNRP), PCR-*nested*, inoculação em monocamada celular, histopatologia (HE) e imunohistoquímica (IHQ). Amostras de SO foram analisadas individualmente, enquanto nas fezes, nos tecidos e no sangue foi realizado um *pool*, em cada tempo de coleta, para obter um volume adequado para o processamento. Nenhuma alteração clínica foi observada nos camundongos. DNA viral foi detectado, de forma intermitente, nas amostras de SO e de tecidos a partir do 2º d.p.i., enquanto em amostras de sangue e fezes a partir do 5º d.p.i. A detecção ocorreu até o 10º d.p.i. em SOs e, nas demais amostras, até o 30º d.p.i. O pulmão dos camundongos, tanto do grupo controle quanto do infectado, apresentou infiltrado linfo-histiocitário moderado a intenso no interstício, sugerindo pneumonia intersticial. Em todos os tecidos dos animais do grupo infectado, exceto coração, tonsila, língua e estômago foram observados imunomarcagem intracitoplasmática na técnica de IHQ em todos os tempos analisados. Anticorpos neutralizantes (AN) foram detectados no 20º e no 30º d.p.i. em 50% dos camundongos infectados. Os resultados mostraram que leite contaminado pode ser fonte de infecção de VACV em modelo murino, sendo que os animais apresentaram infecção subclínica com distribuição sistêmica e eliminação pelas fezes e mucosa oral.

**Palavras-chaves:** *Vaccinia virus*, leite contaminado, modelo murino, transmissão.

## 1. INTRODUÇÃO

A espécie *Vaccinia virus* (VACV), do gênero *Orthopoxvirus* (OPXV), é o agente etiológico da vaccínia bovina (VB). A VB é uma zoonose ocupacional que afeta principalmente vacas em lactação, bezerros e ordenhadores. Casos de VB têm sido relatados frequentemente, em várias regiões do Brasil, desde o final da década de 1990 (Damaso *et al.*, 2000; Trindade *et al.*, 2003; Leite *et al.*, 2005; Lobato *et al.*, 2005; Nagasse-Sugahara *et al.*, 2005; Donatele *et al.*, 2007; Medaglia *et al.*, 2009; Quixabeira-Santos *et al.*, 2011; Megid *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2013; Assis *et al.*, 2013b; Abrahão *et al.*, 2015; Peres *et al.*, 2016). Lesões iniciam com a formação de vesículas e pápulas, as quais evoluem para úlceras e crostas que tendem a cicatrizar. Queda brusca na produção de leite, mastite, infecção secundária bacteriana, afastamento do ordenhador, despesas médicas e acometimento de bezerros são os principais prejuízos causados pela VB. O reservatório natural ainda não está bem esclarecido. Entretanto, a detecção do vírus em roedores sentinelas e silvestres sugere que sejam os reservatórios principais (Lopes *et al.*, 1965; Fonseca *et al.*, 2002; Abrahão *et al.*, 2009), como relatado para *Cowpox virus* (CPXV) na Europa (Chantrey *et al.*, 1999).

Dentre as regiões brasileiras, a Sudeste merece destaque pelo número crescente de casos de VB notificados, além de ser a maior produtora de leite do Brasil (IBGE, 2013). Apesar do comprometimento do rebanho e da possibilidade de veiculação de VACV pelo leite e seus derivados, sabe-se que nas propriedades onde a doença foi diagnosticada, as vacas continuam a ser ordenhadas e o leite é comercializado normalmente. Partículas infecciosas de VACV foram detectadas em amostras de leite de vacas natural e experimentalmente infectadas (Abrahão *et al.*, 2009a; Oliveira *et al.*, 2015). Além disso, Oliveira e colaboradores (2010) isolaram partículas virais viáveis em leite experimentalmente inoculado e submetido a tratamentos térmicos, mostrando que o VACV resiste ao processo de pasteurização lenta.

Por ser uma doença subnotificada, ainda não se sabe a prevalência da VB no Brasil; e o risco de infecção pelo consumo de leite e produtos lácteos produzidos em áreas afetadas também é desconhecido. Estudo com infecção experimental de vacas em lactação mostrou que a amostra de VACV-GP2 continua a ser eliminada no leite por, pelo menos, 25 dias após a cicatrização total das lesões (Oliveira *et al.*, 2015a). Esses resultados indicam que pode haver presença de vírus no leite mesmo após a fase clínica da doença, aumentando o risco de transmissão, uma vez que, sem lesões, a vaca será considerada “curada”, e o leite voltará a ser utilizado para consumo e produção de derivados lácteos, se já não o era antes.

Apesar do impacto causado pela VB, a vigilância epidemiológica não é suficiente para controlar a doença, e o número de casos é provavelmente subestimado. Como já houve detecção de partículas virais no leite de animais naturalmente infectados, existe o risco de haver consumo de leite e produtos derivados potencialmente contaminados com VACV. No Brasil, a soroprevalência de OPXV e possíveis fatores de exposição relacionados com infecções de VACV foram determinados em humanos que viviam em regiões endêmicas para VB (Costa *et al.*, 2013; Costa *et al.*, 2015). Curiosamente, anticorpos neutralizantes (AN) anti-OPXV foram detectados em humanos, inclusive crianças de uma mesma família, que nunca tiveram contato com bovinos doentes e muitos deles tinham o hábito de consumir leite não pasteurizado ou queijo artesanal (Costa *et al.*, 2013; Costa *et al.*, 2015). Embora não tivesse sido estabelecida uma relação de causa-efeito nesse estudo, esses resultados sugerem que o consumo de leite e derivados contaminados com VACV pode ser uma possível fonte de infecção viral. Além disso, Gurav e colaboradores (2011), descrevendo um surto de poxvirus de búfalo (BPXV) na Índia,

com 166 casos humanos, informaram que 17 casos tinham lesões relacionadas com BPXV na boca. Estes autores sugeriram que as lesões na boca podiam estar relacionadas ao consumo de leite contaminado. Este é o único relato no mundo, cujo aparecimento de lesões exantemáticas na região oral de humanos, pode estar associado à ingestão de leite ou derivados contaminados.

Portanto, o estudo da possível transmissão de VACV usando leite contaminado torna-se importante, levando em consideração os relatos acima descritos. O modelo murino foi escolhido, no presente estudo, devido a sua susceptibilidade para a infecção pelo VACV, como tem sido demonstrado em muitos experimentos (Ferreira *et al.*, 2008a; Ferreira *et al.*, 2008b; Abrahão *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2015b). Além disso, os camundongos são animais de fácil manutenção e manuseio. Desta forma, este estudo teve como objetivo analisar a transmissão, patogênese e eliminação de VACV em camundongos inoculados, por via oral, com leite experimentalmente contaminado.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Células:**

Cultivo de células VERO (ATCC-CCL81) foi utilizado para multiplicação e para o teste de soroneutralização por redução de placa (SNRP). Cultivo de células BSC-40 (ATCC-CRL2761) foi utilizado para a detecção de partículas virais viáveis. As células foram semeadas em meio mínimo essencial de Eagle (EMEM, GIBCO™, EUA) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB), gentamicina (50 µg/mL), penicilina potássica (500 U/mL) e fungizona (2,5 µg/mL), sob incubação a 37° C, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

### **2.2. Vírus VACV-GP2:**

A amostra VACV-Guarani P2 (VACV-GP2) foi isolada de lesões nos tetos de uma vacade propriedade com caso de VB, ocorrido no município de Guarani, Minas Gerais, em 2001, a qual foi caracterizada sorologicamente e molecularmente (Trindade *et al.*, 2006). A purificação viral foi realizada de acordo com técnica descrita por Joklik (1962). Ensaios foram feitos para determinar os títulos dos estoques virais em placas de seis poços, de acordo com técnica descrita por Campos & Kroon (1993). O título foi representado em unidade formadora de placa por mililitro (UFP/mL).

### **2.3. Amostras de leite e contaminação das mesmas:**

O leite usado no experimento foi obtido de vacas Girolandas da Fazenda Modelo da Escola de Veterinária da UFMG, sorologicamente negativas para OPXV. Cinco mililitros de leite, negativo para OPXV no teste de PCR-*nested*, foram contaminados com VACV-GP2 contendo, na solução final, 10<sup>7</sup> (UFP/ml).

### **2.4. Aprovação da CEUA:**

O presente projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG (CEUA-UFMG) cujo número do protocolo é: nº 83 2011.

### **2.5. Inoculação, acompanhamento e coleta de amostras:**

Quarenta camundongos Balb/c fêmeas, com quatro semanas, soronegativos para OPXV, foram utilizados no experimento. Destes, dez animais receberam leite não contaminado com VACV (grupo controle - GC) e 30 foram inoculados, por via oral, com leite contaminado com 10<sup>7</sup> UFP/mL (grupo infectado - GI), sendo que cada camundongo, recebeu uma carga viral contendo 10<sup>6</sup> UFP. A dose viral foi baseada em trabalhos anteriores que inocularam camundongos com VACV

(Ferreira *et al.*, 2008a; Ferreira *et al.*, 2008b; Abrahão *et al.*, 2009d). Os animais foram mantidos por 30 dias em gaiolas próprias com fluxo de ar individualizado e, em cada gaiola foram colocados dez animais.

Para estudo da patogenia e distribuição do vírus pelos órgãos dos camundongos, 20% dos animais de cada grupo, selecionados ao acaso, foram eutanasiados aos 2 (T2), 5 (T5), 10 (T10), 20 (T20) e 30 (T30) dias pós-inoculação, ou seja, dois animais do GC e seis animais do GI a cada dia de eutanásia. Os animais foram eutanasiados conforme recomendações da CEUA, utilizando associação de lidocaína 2% e tiopental a 10 mg/ml em doses três vezes maiores que o recomendado para anestesia na espécie. Amostras de fígado, tonsila, baço, rim, bexiga, linfonodo submandibular, língua, coração, pulmões, estômago, íleo e ceco foram coletadas durante a necropsia. Cada tecido coletado foi seccionado obtendo duas frações. Uma fração foi armazenada em formol tamponado a 10% para exames histopatológico (HE) e imunohistoquímico (IHQ), e a outra fração, sem nenhum conservante, foi armazenada a -20°C para testes de PCR-*nested* e pesquisa de partículas virais viáveis. Os linfonodos submandibulares e bexiga foram separados apenas para HE e IHQ, por serem difíceis de seccionar.

Os camundongos foram examinados e pesados diariamente. Amostras de sangue foram coletadas de todos os animais antes da inoculação (T0) e nos tempos T2, T5, T10, T20 e T30 dos camundongos que foram eutanasiados nas respectivas datas. A coleta do sangue foi realizada pelo plexo ocular por meio de uma prévia sedação com xilazina (1mg/kg) e quetamina (100mg/kg) aplicada intraperitonealmente. As amostras de soro foram analisadas individualmente e submetidas ao teste de SNRP. Os coágulos foram macerados e diluídos em solução salina (1:10) para realização do teste de PCR-*nested*.

Amostras de fezes foram coletadas, em dias alternados, usando microtubos estéreis, posicionados diretamente no ânus dos animais. Estas amostras foram diluídas em solução salina (1:10) de acordo com Ferreira e colaboradores (2008a) para realização de PCR-*nested*. Suabe oral (SO) também foi coletado em dias alternados, diluídos em solução salina e processados pelo teste de PCR-*nested*, porém, o número de amostras diminuía à medida que os animais eram eutanasiados.

Um *pool* de fezes, sangue e tecidos foi realizado por grupo (GI e GC), referente a cada dia de coleta, a fim de aumentar o volume final para realizar as análises. Os SOs foram analisados individualmente.

Todas as amostras positivas na PCR-*nested* foram inoculadas em monocamada de células BSC-40, na tentativa de pesquisar se haviam partículas virais viáveis do VACV. A Figura 1 mostra, de forma esquemática, a metodologia do processo de inoculação e coleta das amostras.

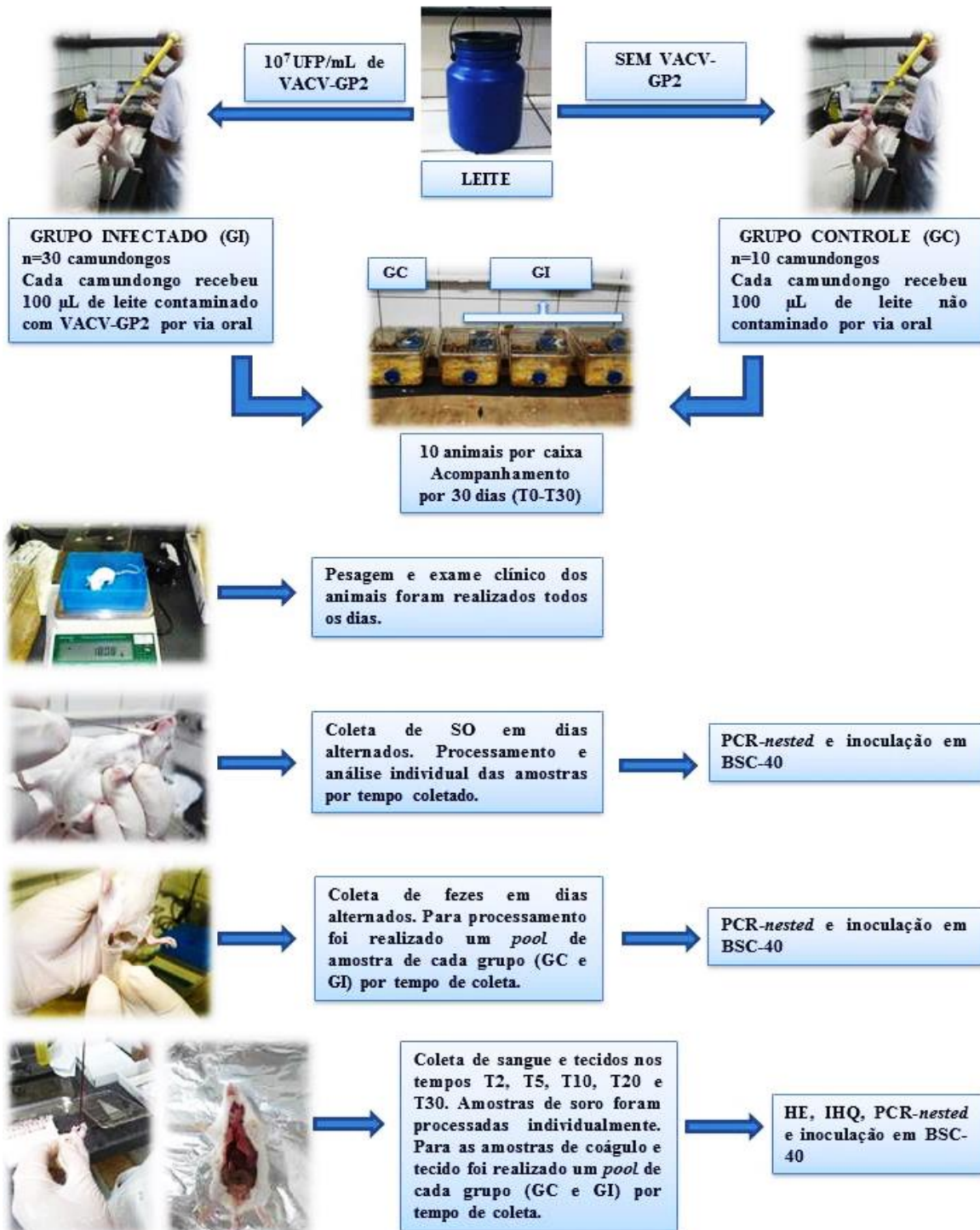


Figura 1: Esquema de inoculação e coleta de amostras de SOs, fezes, sangue e tecidos em camundongos experimentalmente inoculados, por via oral, com leite contaminado com VACV-GP2.

## 2.6. Provas moleculares:

### 2.6.1. Extração do DNA:

Todas as amostras foram submetidas à extração de DNA utilizando o kit comercial Wizard Genomic DNA Purification System (Promega, Wisconsin, EUA). As amostras de fezes, sangue e tecidos foram maceradas e diluídas em solução salina (PBS 1x) na proporção 1:10. Os SOs foram armazenados em tubos de 1,5 mL e 500µL de PBS 1x foram acrescentados em cada tubo. Posteriormente, as amostras foram submetidas à extração. Resumidamente, 300 µL das amostras previamente diluídas foram adicionadas a uma solução de lise celular, centrifugadas e descartado o sobrenadante. Após, o precipitado foi adicionado a uma solução de lise nuclear associada à solução de precipitação de proteínas e submetido à nova centrifugação. O sobrenadante foi precipitado e reidratado em 50µL da solução de reidratação e armazenados a -20 °C.

### 2.6.2. PCR-*nested* para amplificação do gene *vgf*:

A técnica de PCR-*nested*, para pesquisa do gene fator de crescimento (*vgf*) do gênero OPXV, foi utilizada para detecção do DNA viral nas amostras coletadas nos camundongos, tais como fezes, SO, sangue e tecidos, de acordo com a técnica descrita por Abrahão e colaboradores (2009b). A reação para amplificação do gene *vgf* foi realizada em duas etapas, sendo o produto da primeira reação utilizado como molde para a segunda etapa. Na primeira etapa, foram utilizados os iniciadores *vgf* F e R, que amplificam um fragmento de 1536 pb. A segunda etapa de amplificação utiliza os iniciadores *vgf* F2 e *vgf* R2, que amplificam 170 pb (Tabela 1). O volume de 2µL da 1ª reação foi utilizado, sem diluição, como amostra na 2ª reação. Nos controles negativos, 2µL de água foram utilizados para substituir as amostras correspondentes. Nos controles positivos foram utilizados 10<sup>5</sup> UFP/µl de VACV-WR, previamente purificado. Os fragmentos amplificados foram fracionados por eletroforese em gel de poli-acrilamida (PAGE) 8%, sob voltagem de 100V e corados pela prata.

Tabela 1: Iniciadores utilizados na reação de PCR-*nested* para detecção do gênero OPXV, com amplificação do gene *vgf*

Iniciadores	Sequências (5'-3')
<i>vgf</i> F	CGCTGCTATGATAATCAGATCATT
<i>vgf</i> R	GATATGGTTGTGCCATAATTTTTAT
<i>vgf</i> F2	ACACGGTGACTGTATCCA
<i>vgf</i> R2	CTAATACAAGCATAATAC

Fonte: Abrahão *et al.*, 2009b

## 2.7. Isolamento viral:

Trezentos microlitros das amostras positivas de fezes, SOs, tecidos e sangue na técnica de PCR-*nested* foram inoculados em cultivo de células BSC-40, com 90% de confluência, para a pesquisa de partículas virais viáveis. Três passagens celulares consecutivas, com incubação de 72 horas cada, foram realizadas conforme descrito por Rivetti e colaboradores (2013).

## **2.8. Histopatologia (HE) e Imunohistoquímica (IHQ):**

Os tecidos fixados em formol 10% foram processados e embebidos em parafina. Os blocos foram seccionados em 5 a 6 µm em micrótomo rotatório padrão e colocados sobre uma lâmina para coloração com hematoxilina e eosina (HE) (Bersano *et al.*, 2003).

Na IHQ, foi utilizado anticorpo primário policlonal de coelho anti-VACV na diluição 1:1000. Os anticorpos secundário e terciário (Streptavidina conjugada com peroxidase) utilizados foram os do Kit DAKO LSAB + System-HRP (Dako, EUA). Albumina sérica bovina (BSA) 2% foi usada como bloqueio. Peróxido de hidrogênio a 10% foi utilizado para bloquear a peroxidase endógena. Como cromógeno, foi utilizado o 3-amino 9 ethyl carbazole (AEC), Sigma, EUA (Rehfeld, 2011). Como controles positivos foram usados cortes de teto de vaca com lesão e pulmão de camundongo inoculado com VACV. As lâminas do pulmão foram cedidas gentilmente pelo Laboratório de Vírus do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. Os tecidos dos camundongos do grupo GC foram usados como controle negativo.

A leitura das lâminas de HE e IHQ foram realizadas, de forma independente, por dois pesquisadores. A análise qualitativa das lâminas positivas de IHQ foi realizada pela distribuição da marcação nos tecidos, sendo que a classificação +1, +2 ou +3, corresponde, respectivamente, a imunomarcção focal, multifocal ou difusa.

## **2.9. Soroneutralização por redução de placa (SNRP):**

As amostras de soros coletadas dos camundongos foram submetidas ao teste de SNRP, para pesquisa de anticorpos neutralizantes anti-VACV. O título do soro foi calculado pelo inverso da diluição capaz de neutralizar 50% do número de placas que foram detectadas nos controles de vírus. Títulos maiores ou iguais a 1/20 foram considerados positivos (Madureira, 2009).

## **2.10. Análise estatística:**

Para a pesagem dos animais foi utilizado o método paramétrico de Bonferroni considerando intervalo de confiança de 95%, pelo programa GraphPad Prism Software, California, EUA.

É importante ressaltar, que o número de animais utilizados no GC foi menor (n=10 animais, representando 25% do total de camundongos) por motivos éticos como recomendado pela CEUA-UFMG. Logo, o número de animais do GC foi o mínimo necessário para permitir a comparação estatística entre os grupos experimentais.

# **3. RESULTADOS**

## **3.1. Sinais clínicos e pesagem dos animais:**

Nenhum sinal clínico foi observado nos camundongos durante os 30 dias de acompanhamento após a inoculação com leite contaminado com VACV-GP2. Comparando os animais não infectados (GC) com os infectados (GI) em cada tempo de pesagem, não houve diferença estatística entre o peso dos animais para  $p > 0,05$ .

## **3.2. PCR-nested e pesquisa de partículas virais viáveis:**

### **3.2.1. Suabe oral:**

A análise da PCR-nested para SO mostrou que a amplificação de DNA viral ocorreu

intermitentemente entre o 2° e o 10° d.p.i. em pelo menos um animal do GI. As amostras positivas foram inoculadas em células BSC-40 e nenhuma placa de lise foi observada. As amostras de SO do GC foram negativas na PCR.

### 3.2.2. Fezes e sangue:

O DNA viral foi detectado no *pool* de fezes nos 6°, 8° e 30° d.p.i. As amostras de sangue foram coletadas no 2°, 5°, 10°, 20° e 30° d.p.i. dos animais que foram eutanasiados, sendo que, em todos os tempos de coleta, a partir do 5° d.p.i., ocorreu amplificação do gene *vgf* no *pool* referente ao dia de coleta. As amostras positivas foram inoculadas em células BSC-40 e nenhuma placa de lise foi observada. As amostras de fezes e sangue do GC foram negativas na PCR.

### 3.2.3. Tecidos:

DNA de VACV foi amplificado em amostras de pulmão, coração, língua, rim, tonsila, fígado e baço em, pelo menos um tempo de coleta. As amostras positivas foram inoculadas em células BSC-40 e nenhuma placa de lise foi observada. As amostras de tecidos do GC foram negativas na PCR.

### 3.3. Histopatologia e imunohistoquímica (HE e IHQ):

Parte dos tecidos coletados dos camundongos eutanasiados foi submetida às técnicas de HE e IHQ. Na HE, os pulmões de todos os animais inoculados apresentaram infiltrado linfocitário moderado a intenso no espaço intersticial, caracterizando pneumonia intersticial. Os animais do GC apresentaram pneumonia intersticial branda a moderada (Figura 2).

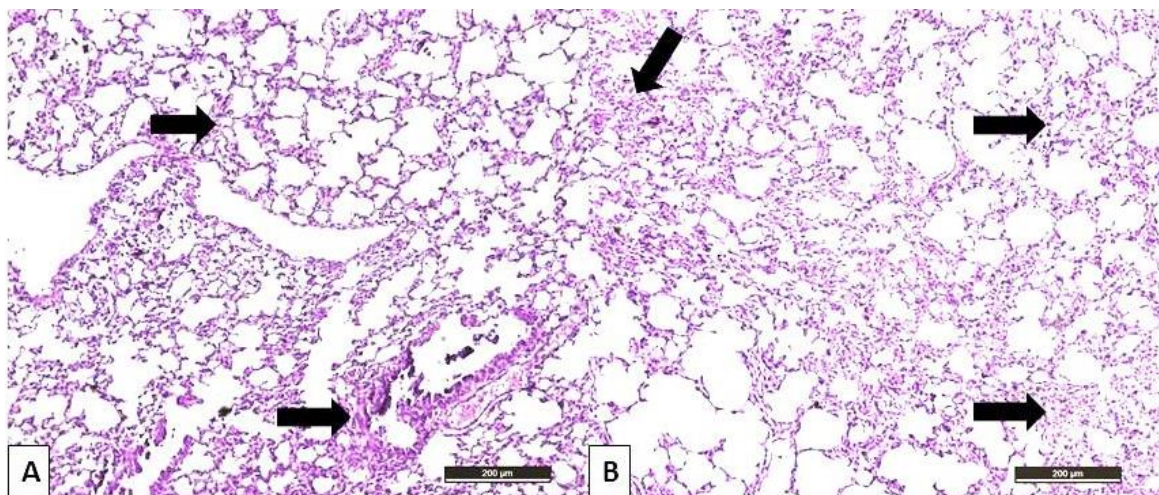


Figura 2: Cortes histológicos de pulmão mostrando infiltrado linfo-histiocitário no interstício (setas). Coloração H&E. A-Pulmão de camundongo do grupo GC que foi inoculado, por via oral, com leite não contaminado com VACV (200 μm); B-Pulmão de camundongo do grupo GI que foi inoculado, por via oral, com leite contaminado com VACV (200 μm).

Na IHQ, imunomarcações intracitoplasmáticas foram observadas em vários tecidos, indicando presença de proteína do VACV intracitoplasmática (Figura 3). As imunomarcações foram observadas do 5° d.p.i. ao 30° d.p.i., exceto nos pulmões cujas marcações específicas foram

detectadas a partir do 2º d.p.i. A intensidade e a distribuição das imunomarcações foram variadas entre os tecidos e entre o tempo de coleta. Em cortes da língua, tonsila, coração e estômago não foram observadas marcações intracitoplasmática. No intestino delgado, apenas no 20º d.p.i. foi observada imunomarcação focal em células epiteliais. Nos tecidos dos animais do GC não foram observadas imunomarcações intracitoplasmáticas (Figura 4). Os detalhes das imunomarcações de cada tecido, em cada tempo analisado, estão descritos na Tabela 2.

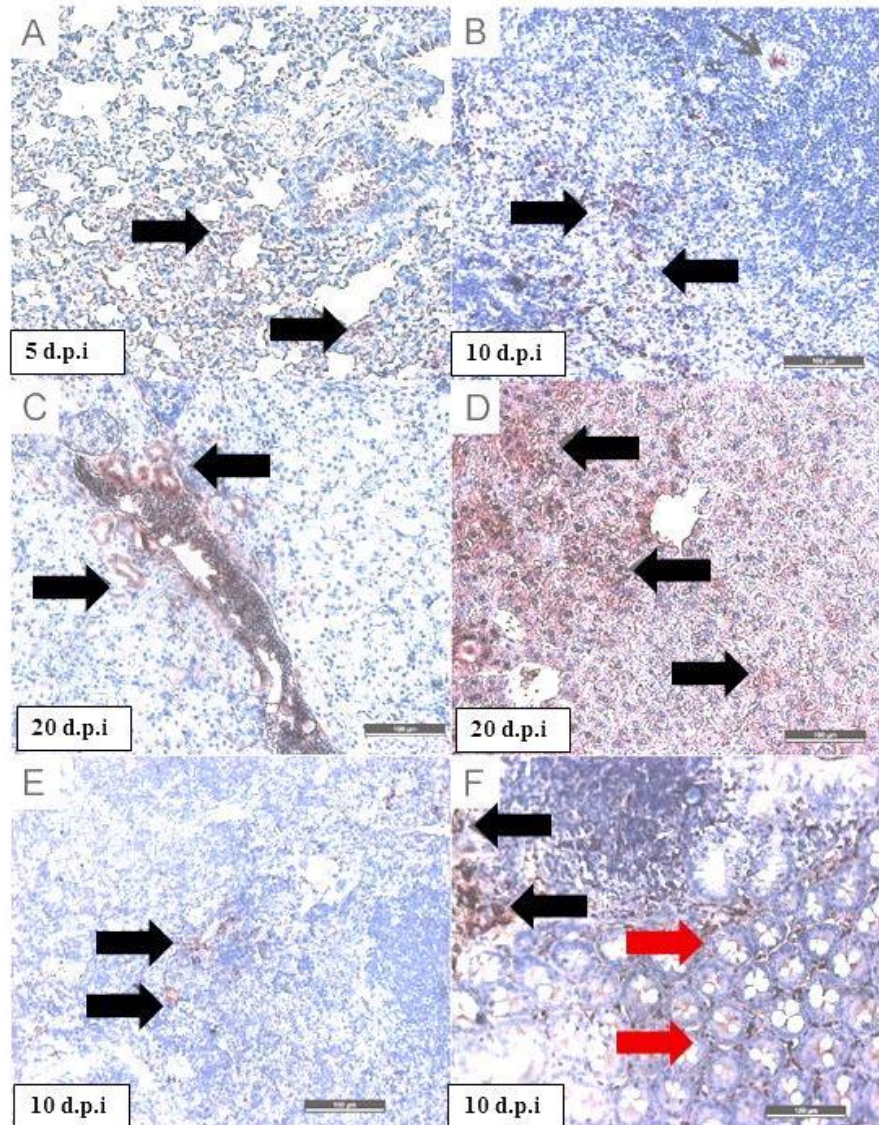


Figura 3: Cortes histológicos de camundongos experimentalmente inoculados com leite contaminado com VACV-GP2 e o dia pós inoculação (d.p.i). Coloração pela técnica de IHQ (100 µm). A-Pulmão: discreta a moderada imunomarcação em citoplasma de linfócitos (setas). B-Baço: moderada imunomarcação em citoplasma de linfócitos (setas). C- Rim: discreta a moderada imunomarcação em citoplasma de células epiteliais dos túbulos contorcidos proximais (setas). D-Fígado: moderada a intensa imunomarcação em citoplasma de hepatócitos (setas). E- Linfonodo submandibular: discreta imunomarcação em citoplasma de linfócitos (setas). F-Íleo: moderada imunomarcação em citoplasma de linfócitos da placa de Peyer (setas pretas) e discreta em células epiteliais (setas vermelhas).

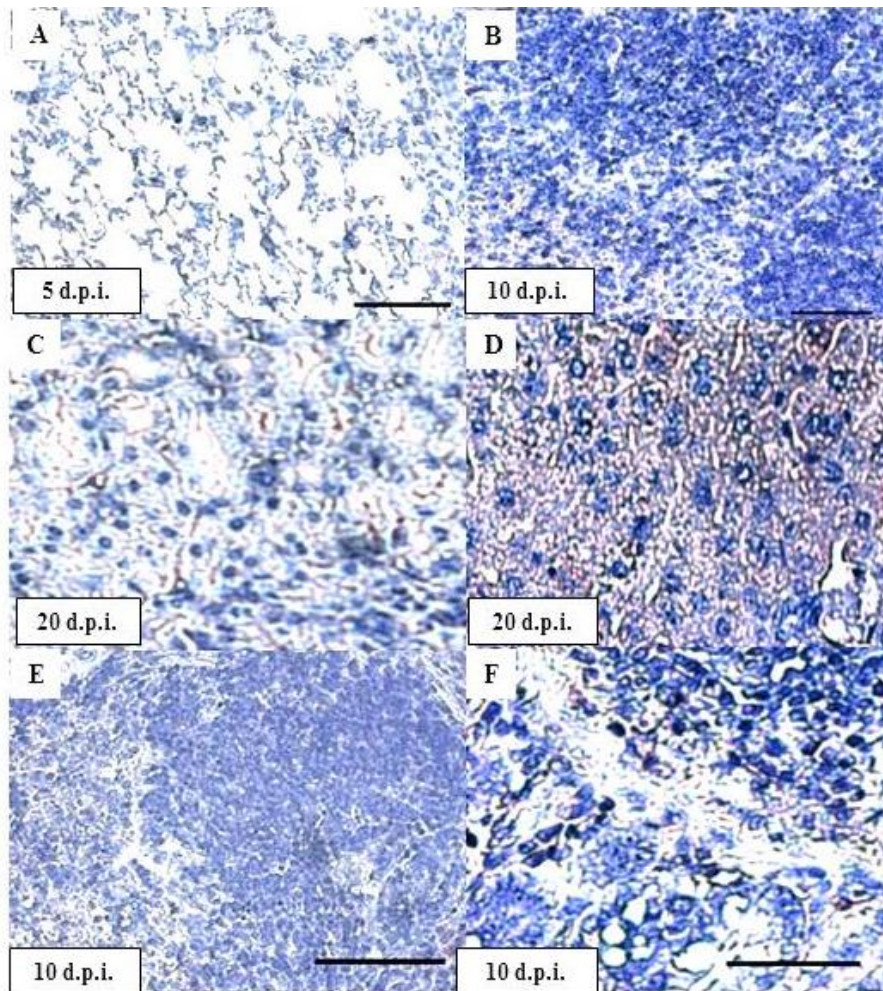


Figura 4: Cortes histológicos de camundongos experimentalmente inoculados com leite não contaminado com VACV (grupo controle) e o dia pós inoculação (d.p.i). Células sem imunomarcações intracitoplasmáticas específicas para VACV. Coloração pela técnica de IHQ (100 µm). A-Pulmão; B-Baço; C- Rim; D-Fígado; E- Linfonodo submandibular e F-Íleo

Tabela 2: Descrição das imunomarcações em diferentes tempos observadas nos tecidos de camundongos inoculados oralmente com leite experimentalmente contaminado com VACV-GP2

<b>Tempo (d.p.i.)</b>	<b>Grupo controle</b>	<b>Grupo infectado</b>
<b>T2</b>	Negativo	<u>Pulmão</u> (+)*: pneumócitos e linfócitos**
<b>T5</b>	Negativo	<u>Rins</u> (+): células epiteliais dos TCP*** <u>Baço</u> (+) a (++): linfócitos <u>Íleo</u> (+): Placa de Peyer <u>Pulmão</u> (+): pneumócitos e linfócitos
<b>T10</b>	Negativo	<u>Baço</u> (+) a (++)*: linfócitos <u>Íleo</u> (++): Placa de Peyer <u>Rins</u> (++): células epiteliais dos TCP <u>Fígado</u> (++): hepatócitos; <u>Pulmão</u> (++): pneumócitos e linfócitos <u>Linfonodo submandibular</u> (+): linfócitos
<b>T20</b>	Negativo	<u>Fígado</u> (++) a (+++)*: hepatócitos <u>Linfonodo submandibular</u> (++): linfócitos <u>Pulmão</u> (++): pneumócitos e linfócitos <u>Baço</u> (++): linfócitos <u>Bexiga</u> (+): células epiteliais <u>Rins</u> (++): células epiteliais dos TCP <u>Íleo</u> (+): células epiteliais e placa de Peyer
<b>T30</b>	Negativo	<u>Baço</u> (++): linfócitos <u>Pulmão</u> (+): pneumócitos <u>Fígado</u> (+): hepatócitos

\* Os sinais (+), (++) e (+++) classificam a distribuição das imunomarcações como focal, multifocal e disseminada, respectivamente.

\*\* Descrição dos tipos celulares com imunomarcação em cada tecido.

\*\*\*TCP = túbulo contorcido proximal

### 3.4. Soroneutralização por redução de placa (SNRP):

Os soros testados na técnica de SNRP foram coletados nos tempos T0, T10, T20 e T30. Os anticorpos neutralizantes (AN) foram detectados no T20 e no T30 em 50% dos animais amostrados com títulos entre 80 e 160.

### 3.5. Resultados de todas as análises:

A Tabela 3 mostra os resultados das amostras de fezes, sangue, SO, tecidos e soro sanguíneo positivas nas técnicas de PCR-*nested*, IHQ e SN dos camundongos inoculados por via oral com leite contaminado com VACV-GP2.

Tabela 3: Resultados de todas as técnicas utilizadas para analisar as amostras dos camundongos inoculados por via oral com leite experimentalmente contaminado com VACV-GP2.

(tempo) d.p.i.	PCR-nested				IHQ*	SN
	Fezes	SO	sangue	Tecidos*		
<b>T2</b>	N	<b>P</b>	N	<b>Pu, To, Li</b>	<b>Pu</b>	N
<b>T4</b>	N	<b>P</b>	NC	NC	NC	NC
<b>T5</b>	NC	NC	<b>P</b>	<b>Ri, Co</b>	<b>Pu, Ri, Ba, Il</b>	<b>N</b>
<b>T6</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	NC	NC	NC	NC
<b>T8</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	NC	NC	NC	NC
<b>T10</b>	N	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>Ri, Pu, Fi, Co, Li</b>	<b>Pu, Ri, Ba, Il, Fi, LS</b>	<b>N</b>
<b>T12</b>	N	N	NC	NC	NC	NC
<b>T14</b>	N	N	NC	NC	NC	NC
<b>T16</b>	N	N	NC	NC	NC	NC
<b>T18</b>	N	N	NC	NC	NC	NC
<b>T20</b>	N	N	<b>P</b>	<b>Ba</b>	<b>Pu, Ri, Ba, Il, LS, Fi, Be</b>	<b>P</b>
<b>T22</b>	N	N	NC	NC	NC	NC
<b>T24</b>	N	N	NC	NC	NC	NC
<b>T26</b>	N	N	NC	NC	NC	NC
<b>T28</b>	N	N	NC	NC	NC	NC
<b>T30</b>	<b>P</b>	N	<b>P</b>	<b>Co</b>	<b>Pu, Ba, Fi</b>	<b>P</b>

P=positivo; N=negativo; Pu=pulmão; To=tonsila; Li=língua; Ri=rim; Co=coração; Fi=fígado; Ba=baço; LS=linfonodo submandibular; Il=íleo; Be=bexiga.

\*Tecidos positivos nas técnicas de PCR-nested e IHQ

NC = amostras não coletadas

#### 4. DISCUSSÃO

O presente estudo mostrou que leite experimentalmente contaminado com VACV pode ser uma fonte de infecção para camundongo, apesar de nenhum sinal clínico ter sido observado. Estudos têm mostrado que o modelo murino é ideal para experimentos com VACV e outros OPXV, uma vez que são susceptíveis à infecção pelo vírus; são animais de fácil manipulação e podem ser usados como modelo experimental no estudo de transmissão de OPXV (Gledhill, 1962; Wallace *et al.*, 1985; Ferreira *et al.*, 2008a; Ferreira *et al.*, 2008b; Abrahão *et al.* 2009c; D'Anuniação *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2015b).

A quantidade de partículas de VACV eliminada pelo leite de vacas naturalmente infectadas ainda não está definida, assim como a dose infecciosa mínima necessária para infectar um humano ou outro animal pelo consumo de leite ou derivados contaminados. Entretanto, é seguro assumir que a quantidade de VACV detectada no leite pode ser variável devido a vários fatores, tais como: a dose infecciosa inicial, a fase da infecção e as variações individuais (raça, idade, resposta imune). Portanto, a dose de VACV inoculada nos camundongos foi determinada de forma empírica, baseada em estudos anteriores. Oliveira e colaboradores (2015) mostraram que

vacas experimentalmente inoculadas com VACV podem eliminar pelo leite até  $1,8 \times 10^7$  unidades genômicas por mililitro (UG/ mL), de forma intermitente. Além disso, Ferreira e colaboradores (2008a) inocularam camundongos por via nasal utilizando  $10^7$ UFP/ 100 $\mu$ L de VACV-GP2 e observaram eliminação e transmissão horizontal pelas fezes.

Sabe-se que VACV-GP2 é uma amostra brasileira isolada de bovinos, pertencente ao grupo 1, que engloba as amostras mais comumente isoladas em surtos de VB no Brasil (Damaso *et al.*, 2000; Trindade *et al.*, 2006; Abrahão *et al.*, 2009c; Assis *et al.*, 2013b; Oliveira *et al.*, 2013). Além disso, tem baixa virulência em camundongos causando doença subclínica (Ferreira *et al.*, 2008a). Porém, bovinos inoculados intradermicamente nos tetos com VACV-GP2 apresentaram doença clínica com lesões características (vesícula, pápula, úlcera e crosta) e disseminação sistêmica (Guedes *et al.*, 2012; Rehfeld *et al.*, 2013; Rivetti *et al.*, 2013). Apesar de os camundongos não terem manifestado alteração clínica, a infecção foi sistêmica, pois houve detecção de DNA viral em sangue e tecidos, além da eliminação pelas fezes e saliva. Anticorpos neutralizantes foram detectados em 50% dos camundongos no 20° e 30° d.p.i. Vale ressaltar que roedores capturados em fazendas com casos de VB estavam infectados com VACV, porém, não pareciam ter sinais clínicos e/ou quaisquer lesões visíveis que estariam associados com infecção por VACV (Abrahão *et al.*, 2009c).

A transmissão de VACV para humanos pelo consumo de leite ainda não foi descrita no Brasil. Anticorpos neutralizantes contra OPXV foram detectados em humanos que vivem em área endêmica para VB, mas que nunca tiveram contato com animais doentes, inclusive em crianças de uma mesma família (Costa *et al.*, 2013; Costa *et al.*, 2015). Porém, a maioria das pessoas (88,8%) tinha o hábito de consumir leite não pasteurizado e queijo artesanal (Costa *et al.*, 2013; Costa *et al.*, 2015). Apesar deste estudo não ter estabelecido a relação direta de causa e efeito, estes achados sugerem que a transmissão de VACV após a ingestão de leite e ou derivados lácteos contaminados pode ocorrer e que a infecção subclínica de VB parece ser possível em humanos que não tiveram contato direto com bovinos acometidos.

DNA viral foi detectado nas fezes nos 6°, 8° e 30° d.p.i. indicando que a infecção pode ser persistente, devido ao longo período de eliminação. Na saliva, a eliminação viral foi observada no período mais precoce (2° ao 10° d.p.i.) de forma intermitente em alguns animais, o que sugere que o DNA viral é oriundo da saliva e não do inóculo. DNAmia foi observada em todos os tempos de coleta, a partir do 5°d.p.i. Em camundongos inoculados por via intranasal com VACV-GP2, oDNA viral foi encontrado nas fezes e sangue até o 30°d.p.i., porém, a eliminação pela saliva não foi observada (Ferreira *et al.*, 2008a). A amostra VACV-GP2, assim como os demais poxvirus, tem tropismo por células epiteliais (Esposito *et al.*, 2001). Na inoculação por via oral, o vírus pode ter multiplicado na mucosa oral (sítio primário), o que justifica a eliminação pela saliva. Além disso, pode ter ocorrido disseminação pelo sistema linfático e/ou sanguíneo, como ocorre por outras vias de inoculação (Ferreira *et al.*, 2008a; Ferreira *et al.*, 2008b; D'Anunção *et al.*, 2012), o que pode justificara eliminação pelas fezes. Estudos sugerem que a eliminação de VACV pelas fezes de animais infectados pode ter um papel fundamental na manutenção e na disseminação do vírus no ambiente (Ferreira *et al.*, 2008a; Ferreira *et al.*, 2008b; D'Anunção *et al.*, 2012; Guedes *et al.*, 2012). Camundongos Balb-c foram infectados com VACV após o contato com fezes de bovinos experimentalmente infectados com VACV-GP2, sugere que fezes de bovinos doentes a campo podem transmitir o vírus para roedores (D'Anunção *et al.*, 2012).

No presente estudo, o gene *vgf* foi amplificado em baço, fígado, coração, tonsila, língua, rim e

pulmão. Esta detecção comprovou que o leite contaminado com VACV pode promover infecção sistêmica em modelo murino. Língua e tonsila são tecidos presentes no local de inoculação, podendo esses serem sítios primários de multiplicação viral. A disseminação para os demais tecidos também pode ter ocorrido por via linfática, e não apenas sanguínea, como já citado anteriormente. Rivetti e colaboradores (2013) detectaram o DNA viral pela técnica de PCR-*nested* nos linfonodos mesentéricos, íleos, linfonodos retromamários, tonsila, baço e fígado de vacas experimentalmente inoculadas com VACV-GP2, pela escarificação dos tetos. Este trabalho mostrou que o vírus tem afinidade por tecidos linfoides em bovinos.

Como os camundongos não foram perfundidos antes da necropsia, a detecção de DNA viral pode estar associada a partículas virais existentes no sangue. No entanto, a detecção de proteínas de VACV em diferentes tecidos também foi mostrada na IHQ, indicando que o vírus estava presente em diferentes células. Desta forma, a detecção de VACV em tecidos pela técnica de PCR-*nested*, provavelmente, não é proveniente da contaminação pelo sangue no momento da necropsia.

A comparação entre os resultados obtidos mostrou uma concordância entre as técnicas de IHQ e PCR-*nested* nos seguintes tecidos: baço, fígado, rim e pulmão. Porém, alguns tecidos foram positivos para uma técnica e negativos para a outra. Isso pode estar relacionado com o corte do tecido e a região selecionada para cada técnica. Por exemplo, na IHQ, foi detectada imunomarcagem específica nos rins e bexiga até o 20º d.p.i. Entretanto, a marcação foi focal, sendo que a região selecionada para a PCR poderia não ter vírus ou a carga viral estava muito baixa a ponto de não ser detectada. Contudo, este resultado é importante, pois sugere que camundongos inoculados com leite contaminado com VACV-GP2 também podem eliminar o vírus pela urina. Estudos em camundongos e ratos infectados com *Ectromelia virus* (ECMV) (Gledhill, 1962; Maiboroda, 1982; Wallace *et al.*, 1985) e *Cowpox virus* (CPXV) (Goff *et al.*, 2007), respectivamente, relataram a eliminação destes vírus pela urina, por um período longo após a inoculação. Ferreira e colaboradores (2008a) detectaram DNA viral em urina de camundongos inoculados por via nasal com VACV-GP2 e VACV-WR, corroborando com esta hipótese.

O pulmão, além de ser um órgão irrigado por artérias calibrosas, também possui regiões linfoides o que justificaria a presença de proteína viral no tecido. Nas análises histopatológicas todos os camundongos, inclusive os controles, apresentaram pneumonia intersticial; sendo que nos camundongos do GC, a pneumonia foi mais branda. Provavelmente, essa pneumonia pode ter sido desencadeada no ato da deglutição, quando parte do inóculo foi desviado para a traquéia. Nos camundongos do GI, a presença do inóculo no pulmão pode ter sido responsável pela detecção precoce de proteínas e DNA virais por IHQ e PCR-*nested*, respectivamente. Camundongos que foram inoculados com VACV-GP2 por via nasal também manifestaram pneumonia intersticial focal, assim como, marcações em citoplasma de células inflamatórias foram observadas na IHQ a partir do 1º d.p.i. (Ferreira *et al.*, 2008b). No grupo controle inoculado com PBS, os autores não observaram lesão pulmonar. As mesmas alterações pulmonares foram descritas em coelhos inoculados por via nasal com as amostras VACV-P1 e VACV-P2 (Cargnelutti *et al.*, 2012). Como o leite é uma substância rica em gordura, proteína e carboidrato, pode desencadear um processo inflamatório no pulmão ao ser aspirado, o que justificaria a pneumonia nos animais. Entretanto, a pneumonia foi mais grave nos animais infectados o que sugere que tal lesão foi potencializada pela ação viral.

No estômago, nenhuma marcação específica e/ou amplificação do gene *vgf* foi observada. Essbauer e colaboradores (2007) mostraram que VACV pode permanecer viável, por até 56 dias, em meio levemente ácido, com pH entre 4,5-5,7. Porém, o estômago de mamíferos contém uma solução de 0,1M de ácido clorídrico (HCl). Esse meio extremamente ácido, inativa muitos patógenos ingeridos e desnatura diversas proteínas, antes que sejam degradadas por enzimas proteolíticas (Thormar *et al.*, 1987; Smith, 2003; Lodish *et al.*, 2010). Desta forma, suspeita-se que o pH estomacal pode ter sido responsável por perda considerável no número de partículas virais do inóculo além de causar desnaturação da estrutura viral. Provavelmente, por isso não houve detecção de material genético e de VACV viável no estômago, duodeno e jejuno. Por outro lado, a infecção manifestou de forma sistêmica nos camundongos, o que reforça a suspeita da presença de um sítio primário de replicação do vírus na região orofaríngea, uma vez que houve detecção de DNA viral em SOs e em alguns tecidos do trato gastrointestinal superior, além de presença de proteína viral em linfonodo submandibular.

O íleo é a parte terminal do intestino delgado onde localizam-se as placas de Peyer (órgãos linfoides); e as imunomarcações foram observadas em linfócitos e macrófagos na maioria dos cortes e, em apenas um corte, houve marcação específica em células epiteliais. Estudos demonstraram intensa multiplicação do vírus em intestino de camundongos (Ferreira *et al.*, 2008b) e bovinos (Rivetti *et al.*, 2013) infectados com VACV. Camundongos Balb-c inoculados por via intranasal com as amostras VACV-WR e VACV-GP2 apresentaram hiperplasia nas placas de Peyer localizadas no íleo (Ferreira *et al.*, 2008a e 2008b). Rivetti e colaboradores (2013) comprovaram que bovinos experimentalmente inoculados com VACV-GP2, por escarificação na pele dos tetos, têm disseminação sistêmica, inclusive no trato digestivo acometendo linfonodos mesentéricos e o íleo. Esses resultados indicam que a via linfática é a mais importante para a distribuição do vírus nesses órgãos, já que as marcações ficaram restritas a tais células.

No presente trabalho, partículas virais viáveis não foram detectadas em nenhuma das amostras inoculadas em células BSC-40. Alguns fatores podem ter contribuído para a ausência de detecção de partículas de VACV viáveis. Primeiro, a quantidade de cada amostra não foi suficiente para realizar a técnica em duplicata ou para repeti-la, devido às inúmeras técnicas utilizadas no experimento. Outro fator pode estar relacionado com a via de inoculação. Cada camundongo recebeu  $10^6$  UFP/ 100 $\mu$ L por via oral e, o ácido gástrico pode ter causado degradação viral, como discutido anteriormente, ocorrendo uma considerável perda da carga viral. Porém, na técnica de IHQ, marcações intracitoplasmáticas foram detectadas em vários tecidos, indicando que houve multiplicação viral nessas células. Por outro lado, Ferreira e colaboradores (2008b) também não detectaram partículas infecciosas do vírus em tecidos de camundongos inoculados com VACV-GP2, detectando apenas em animais inoculados com amostras mais virulentas. Muitos estudos evidenciam que, independentemente da via de inoculação, camundongos e outros mamíferos são susceptíveis a vários OPVXs, manifestando infecção sistêmica e eliminando o vírus por excreções e secreções (Zaucha *et al.*, 2001; Ferreira *et al.*, 2008a; Ferreira *et al.*, 2008b; Wahm-Jensen *et al.*, 2011). A detecção apenas de DNA viral nas fezes e na saliva, sem comprovação de partículas virais viáveis, não descarta a hipótese de que o leite contaminado com VACV pode contribuir com a manutenção e disseminação do vírus no ambiente.

Sabe-se que, no campo, a ingestão de leite cru por pessoas, sem submetê-lo à fervura, pode ocorrer. Por outro lado, partículas virais viáveis de VACV foram detectadas em amostras de leite cru de vacas natural e experimentalmente contaminadas (Abrahão *et al.*, 2009a; Oliveira *et*

*al.*, 2015a) e em queijos produzidos a partir de leite contaminado de vacas experimentalmente infectadas (Oliveira, 2014). Estes resultados indicam que a transmissão de VACV para humanos pode ocorrer pelo consumo de leite e derivados contaminados. Outro fato que corrobora com essa hipótese é o relato descrito na Índia, em que humanos apresentaram lesões exantemáticas na boca e na mucosa oral após a ingestão de leite cru contaminado com *Buffalopox virus* (BPXV) (Gurav *et al.*, 2011). A detecção de AN anti-OPXV em humanos moradores de região endêmica para VB e com hábito de ingestão de leite e queijo artesanal e que nunca tiveram contato com animais doentes (Costa *et al.* 2013; Costa *et al.*, 2015), foi outro fato sugestivo de infecção de VB por outras vias. Apesar de os autores não terem concluído por qual via ocorreu a infecção, não se pode descartar a hipótese de ingestão de leite e/ou queijo contaminados com VACV, uma vez que os humanos apresentaram soro-conversão sem manifestação clínica da doença, assim como foi observado nos camundongos inoculados por via oral com leite contaminado.

Este é o primeiro relato do potencial risco de transmissão de leite contaminado com VACV em modelo murino. Este estudo mostrou que camundongos são susceptíveis à infecção pela via oral, apresentando infecção sistêmica sem manifestação clínica da doença. Além disso, os animais eliminaram vírus pelas fezes e saliva de forma intermitente, indicando que o vírus pode ser transmitido mesmo sem manifestar sinais clínicos. Mediante todos os relatos descritos na literatura e os resultados observados no respectivo trabalho, o consumo de leite cru e ou derivados contaminados com VACV podem ser uma possível fonte de infecção para humanos, principalmente leite e queijos artesanais provenientes de regiões onde há circulação do vírus.

## 5. CONCLUSÃO

Camundongos inoculados, por via oral, com leite contaminado experimentalmente com a amostra VACV-GP2, são susceptíveis à infecção sistêmica, podendo eliminar o vírus pelas fezes e saliva, porém, com manifestação subclínica.

ARTIGO PUBLICADO REFERENTE AO CAPÍTULO: VIDE ANEXO 1

## Capítulo 2: Estudo da viabilidade do *Vaccinia virus* em queijo produzido com leite cru experimentalmente contaminado e submetido a diferentes tempos de maturação

### RESUMO

A VB é uma zoonose causada por VACV e há relatos de casos acometendo bovinos e humanos em vários estados brasileiros. Estudos têm mostrado que o vírus é eliminado pelo leite e que permanece viável à pasteurização lenta e à produção de queijo e iogurte. O queijo Minas artesanal é fabricado a partir de leite cru, podendo ser fonte de transmissão do VACV. Porém, ainda não se sabe se o processo de maturação do queijo é capaz de inativar o vírus. Desta forma, o objetivo deste estudo foi produzir queijo com leite cru experimentalmente contaminado com VACV e analisar a viabilidade viral em diferentes tempos de maturação. Vinte e quatro litros de leite foram coletados de vacas soronegativas para OPXV. Doze litros de leite foram contaminados com  $10^5$  UFP/ml de VACV-GP2e, seis queijos foram produzidos. A outra metade do leite foi utilizada na produção de seis queijos controles. Os queijos foram submetidos ao processo de maturação durante 1, 7, 14, 21, 45 e 60 dias a 25°C. A produção dos queijos foi repetida quatro vezes. Os queijos foram coletados nos respectivos tempos pré-determinados e, posteriormente, foram triturados, macerados e diluídos em solução salina. As amostras foram submetidas à PCR em tempo real para quantificação e foram tituladas em células VERO. Partículas infecciosas virais foram detectadas em todos os tempos de maturação dos queijos contaminados. O resultado da titulação realizada em células VERO mostrou uma redução do título viral no decorrer do tempo de maturação, sendo que no 1º dia, o queijo apresentou  $10^4$  UFP / mL de VACV e no 60º dia, passou a ser de  $10^2$  UFP / mL. A titulação e a quantificação do DNA viral dos queijos experimentalmente contaminados em função do tempo de maturação não apresentaram diferença estatística considerando intervalo de confiança de 95%. Porém, observou-se uma tendência linear de queda na titulação e na quantificação do DNA no decorrer do tempo. Logo, os resultados obtidos no presente estudo sugerem que o processo de maturação do queijo, além de reduzir o número de partículas virais viáveis, pareceu capaz de degradar o DNA viral. Apesar de haver redução no título viral, o VACV permaneceu viável por, pelo menos, 60 dias de maturação do queijo. Desta forma, queijos contaminados com VACV, mesmo submetidos à maturação, pode ser fonte de infecção do vírus e potencial risco para a saúde pública.

**Palavras-chaves:** *Vaccinia virus*, queijo, maturação, partículas virais infecciosas

## 1. INTRODUÇÃO

A VB é uma zoonose negligenciada causada pelo VACV, responsável por causar grandes prejuízos econômicos nas propriedades leiteiras acometidas (Lobato *et al.*, 2005). Atualmente, está disseminada por vários estados brasileiros, principalmente Minas Gerais, o maior produtor de leite do Brasil (Damaso *et al.*, 2000; Trindade *et al.*, 2003; Leite *et al.*, 2005; Lobato *et al.*, 2005; Nagasse-Sugahara *et al.*, 2005; Donatele *et al.*, 2007; Medaglia *et al.*, 2009; Quixabeira-Santos *et al.*, 2011; Megid *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2013; Assis *et al.*, 2013b; Abrahão *et al.*, 2015).

A principal forma de transmissão da VB para humanos é pelo contato direto com lesões de vacas doentes no ato de ordenhar (Lobato *et al.*, 2005; Madureira, 2009). Porém, estudos em modelo animal experimental mostraram que a infecção de VACV pode ocorrer por outras vias como a nasal e a oral (Ferreira *et al.*, 2008a; Ferreira *et al.*, 2008b; Abrahão *et al.*, 2009a; Cargnelutti *et al.*, 2012; D'Anunciação *et al.*, 2012; Rehfeld *et al.*, 2015). Desta forma, a detecção da presença de partículas viáveis de VACV no leite cru (Abrahão *et al.*, 2009b; Oliveira *et al.*, 2015a) e queijos frescos produzidos a partir de leite experimentalmente contaminado e com leite de vaca experimentalmente infectadas (Oliveira *et al.*, 2010; Oliveira, 2014), tornou-se uma preocupação, uma vez que podem ser risco para a saúde da população que manipula e consome tais produtos.

Dos produtos lácteos, o queijo Minas artesanal (QMA) merece destaque, pois é um produto típico do Estado de Minas Gerais, e sua produção, a partir de leite cru, tornou-se patrimônio imaterial do Brasil (BRASIL, 2008). De acordo com Santos (2010), os queijos fabricados com leite cru e sem controle higiênico sanitário satisfatório podem apresentar contaminação microbiana, o que representa perigo à saúde do consumidor. Sabe-se que o processo de maturação ajuda a minimizar a carga de patógenos presentes no queijo. Porém, as legislações estadual (MINAS GERAIS, 2013) e federal (BRASIL, 2013), as quais recomendam o tempo de 17-22 dias e 60 dias de maturação dos QMA, respectivamente, são baseadas em estudos contra patógenos bacterianos.

Dentre os microrganismos patogênicos capazes de contaminar o leite e seus derivados, os vírus são pouco descritos na literatura. Apesar de não haver relato, no Brasil, de pessoas que se infectaram com VACV após ingestão de leite e ou queijos artesanais, estudos têm mostrado que o risco de transmissão existe (Abrahão *et al.*, 2009b; Oliveira *et al.*, 2010; Oliveira, 2014; Oliveira *et al.*, 2015a; Rehfeld *et al.*, 2015). Além disso, já foi descrito na Índia, casos de humanos com lesões nos lábios e mucosa oral após ingestão de leite cru contaminado com *Buffalopox virus* (BPXV) (Gurav *et al.*, 2011). Por isto, levando em consideração o potencial zoonótico do VACV, o objetivo do trabalho foi pesquisar a viabilidade desse vírus em queijos tipo artesanais elaborados a partir de leite cru experimentalmente contaminado e submetidos a diferentes tempos de maturação.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Células:

Células VERO (ATCC-CCL81) foram utilizadas para isolamento e titulação viral. As células foram semeadas em meio mínimo essencial de Eagle (EMEM, GIBCO™, EUA) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB), gentamicina (50 µg/mL), penicilina potássica (500 U/mL) e fungizona (2,5 µg/mL), sob incubação a 37° C, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

## **2.2. Vírus VACV-GP2:**

VACV amostra Guarani P2 (VACV-GP2) foi isolado de lesões nos tetos de uma vaca acometida durante um surto de VB ocorrido no município de Guarani, Minas Gerais, em 2001 e que foi caracterizado sorologicamente e molecularmente como um VACV (Trindade *et al.*, 2006). A purificação viral foi realizada de acordo com técnica descrita por Joklik (1962). Ensaios foram feitos para determinar os títulos dos estoques virais em placas de seis câmaras, de acordo com técnica descrita por Campos & Kroon (1993). O título foi representado em unidade formadora de placa por mililitro (UFP/mL).

## **2.3. Amostras de leite:**

O leite usado na elaboração dos queijos foi obtido de vacas girolandas da Fazenda Modelo da Escola de Veterinária da UFMG, sorologicamente negativas para OPXV. O leite também foi previamente testado em PCR-*nested* para detecção do gene *vgf* e, apresentou-se negativo para OPXV. Foram realizadas quatro repetições da produção dos queijos, em momentos distintos, e para cada produção foram utilizados 24L de leite. Doze litros foram contaminados com VACV-GP2, na concentração final de  $10^5$  UFP/mL, para a elaboração de seis queijos contaminados. A dose viral inoculada foi baseada no trabalho de Oliveira e colaboradores (2010). Os outros doze litros foram utilizados na produção de seis queijos controles.

## **2.4. Produção do queijo e o processo de maturação:**

Dois grupos de queijos foram produzidos: contaminados e não contaminados (controle). Para cada queijo produzido foram utilizados dois litros de leite cru, 2% de iogurte natural comercial da marca Nestlé® como cultura láctea e coagulante líquido comercial HA-LA® (Chr Hansen SA, São Paulo, Brasil) na concentração determinada pelo fabricante.

O leite foi previamente aquecido a 36°C (Figura 1B) e após a adição do coalho (Figura 1C), foi deixado em repouso por um período entre 30 a 40 minutos até formar uma massa firme. A massa foi cortada em cubos de aproximadamente um centímetro (Figura 1D). Os cubos foram misturados cuidadosamente para liberação do soro (Figura 1E). Após a dessoragem, a massa foi coletada e colocada em formas de 500 ml (Figura 1F). Após 6 horas, o queijo foi virado na forma e com 24 horas foi desenformado (Figura 1G). Cloreto de sódio (NaCl) foi adicionado nas superfícies dos queijos para mimetizar a produção do queijo artesanal. Os queijos foram mantidos numa estufa BOD (demanda bioquímica de oxigênio) a 25°C para maturação (Figura 1H). Os queijos foram produzidos no Laboratório de Tecnologia de Leite do Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal (DTIPOA) da Escola de Veterinária da UFMG.

Foram produzidos seis queijos por grupo, um para cada dia de maturação (1, 7, 14, 21, 45 e 60 dias). Nos respectivos dias de maturação, um queijo controle e um queijo contaminado foram coletados ao acaso e foram totalmente triturados. Amostras foram diluídas e maceradas em PBS 1X na diluição de 1:10 e foram produzidos três alíquotas por queijo (Figura 2). Além dos queijos, foram coletadas amostras do leite, do soro e do coalho contaminados e controles no processo de produção. O processo de produção dos queijos foi repetido quatro vezes em tempos distintos, para melhor confiabilidade dos resultados. Totalizaram-se 24 amostras de queijos contaminados e 24 amostras de queijos controles, sendo que, no final, para cada tempo de maturação foram analisados quatro queijos.

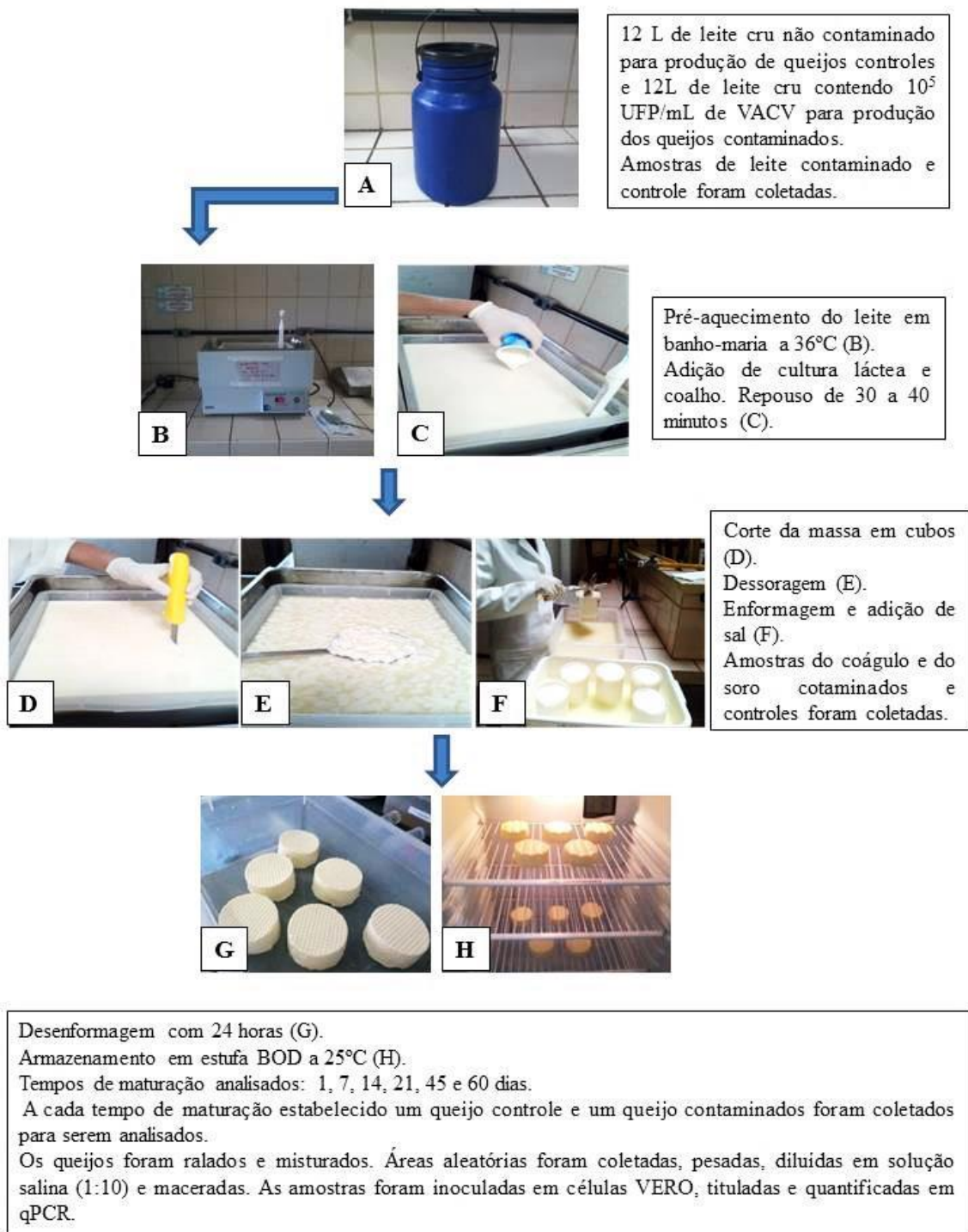


Figura 1: Esquema de produção, coleta e processamento dos queijos controle e experimentalmente contaminados com VACV-GP2 submetidos aos tempos de maturação de 1, 7, 14, 21, 45 e 60 dias a  $25^\circ\text{C}$ . Esse processo de produção de queijos foi realizado quatro vezes, em tempos distintos, a partir de lote de leite diferente.

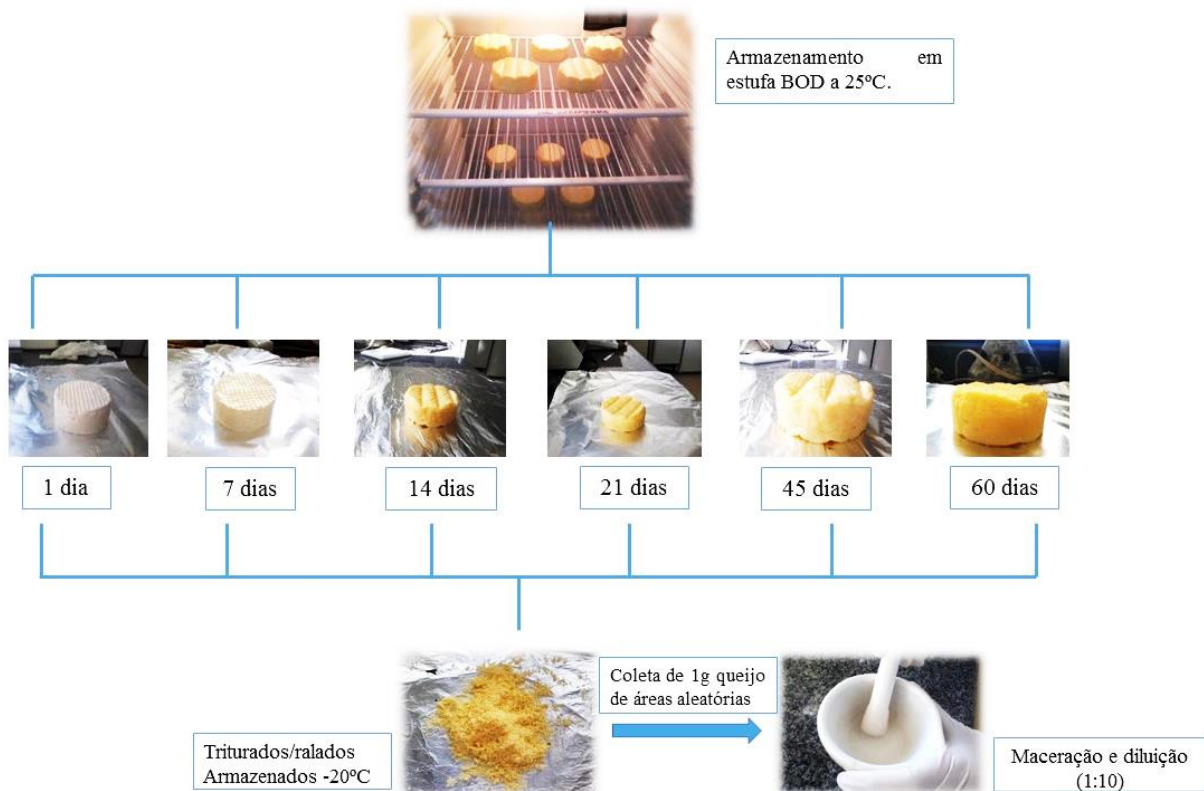


Figura 2: Esquema representando a coleta de cada queijo nos respectivos tempos de maturação e o processamento das amostras para realização das técnicas de biologia molecular e inoculação em cultivo celular. Foram selecionadas três alíquotas de cada amostra de queijo diluída.

## 2.5. Pesquisa de partículas virais viáveis e titulação:

As amostras de queijos contaminados e controles foram inoculadas em cultivo de células VERO para a tentativa de detecção de partículas virais viáveis (Oliveira *et al.*, 2010). As amostras que apresentaram efeito citopático (ECP) foram tituladas em placas de seis poços contendo células VERO de acordo com Oliveira (2015).

## 2.6. Provas moleculares:

### 2.6.1. Extração do DNA:

Todas as amostras foram submetidas à extração de DNA utilizando o kit comercial “Wizard Genomic DNA Purification System” (Promega, Wisconsin, EUA). As amostras foram maceradas e diluídas em solução salina (PBS 1x) estéril na proporção 1:10. Posteriormente, os queijos diluídos foram centrifugados durante 5 minutos a 3000 g (rotor H1000B - Sorvall RT6000 B), a 4°C. O sobrenadante foi recolhido e submetido à extração. Resumidamente, 300 µl das amostras previamente diluídas foram adicionadas a uma solução de lise celular, centrifugadas e descartado o sobrenadante. Após, o precipitado foi adicionado a uma solução de lise nuclear associada à solução de precipitação de proteínas e submetido à nova centrifugação. O sobrenadante foi precipitado e reidratado em 50 µl da solução de reidratação e armazenados a 20 °C negativos.

### 2.6.2. PCR em tempo real para amplificação do gene *vgf*:

A técnica de PCR em tempo real (PCRq), para amplificação do gene *vgf*, foi utilizada para detecção e quantificação do DNA viral nas amostras de leite, soro, coágulo e queijos. Foi utilizado o mix comercial (SYBR Green® PCR Master Mix, *Applied Biosystems*) com os iniciadores *vgf forward* e *vgf reverse* desenhados para amplificação de um fragmento com tamanho 82 pb do gene *vgf* (Alves, P.A. dados não publicados) nas concentrações de 400 µM de cada iniciador em uma reação com volume final de 10 µl. Cada réplica das amostras de queijo foi feita em duplicata. Foram consideradas válidas as reações as quais houve amplificação da duplicata das amostras, com valores da Temperatura de *melting* (T<sub>m</sub>) de acordo com a curva padrão previamente estabelecida por Oliveira e colaboradores (2015a). As amostras suspeitas, em que houve amplificação em somente uma das replicatas, foram submetidas novamente ao teste. Além disso, a T<sub>m</sub> (°C) foi analisada de acordo com os controles positivos, aceitando-se uma variação de ± 1°C. A técnica foi desenvolvida conforme Oliveira e colaboradores (2015a). O controle negativo da reação foi feito com leite sabidamente negativo e PBS 1x, submetidos à extração prévia.

Os resultados da quantificação viral das amostras de leite e soro foram dados em unidades genômicas por mililitro (UG/ml). Os resultados da quantificação viral das amostras sólidas (coágulo e a massa dos queijos) foram dados em unidades genômicas por grama (UG/g). Todas as PCRq foram feitas utilizando o termociclador *StepOne®* da *Applied Biosystems* (Thermo-Fisher, EUA) e os dados de quantificação e detecção foram coletados e analisados pelo *software StepOne®* versão 2.1 da *Applied Biosystems* (Thermo-Fisher, EUA).

### 2.7. Análise estatística:

O efeito de dias de maturação sobre a titulação e a quantificação de DNA viral foi testado por meio de modelo de regressão linear simples ou quadrático (equação 1), utilizando-se polinômios ortogonais para avaliação da significância dos modelos linear e quadrático para intervalo de confiança de 95%. Utilizou-se ambiente R para análises estatísticas (R Core Team, 2013).

## 3. RESULTADOS

### 3.1. Viabilidade e titulação do VACV em queijo artesanal:

Efeito citopático (ECP), com formação de placa de lise, foi observado nas células inoculadas com as amostras de queijos experimentalmente contaminadas com VACV de todos os tempos de maturação estudados, do 1º ao 60º dia de maturação. ECP também foi observado nas células inoculadas com amostras de soro e de coágulo experimentalmente contaminadas, coletadas no processo de produção dos queijos. O ECP foi observado nas células inoculadas com astrês alíquotas de cada queijo coletado e nas quatro repetições realizadas (Figura 3). Nas células inoculadas com leite, soro, coágulo e queijos controles não foram observados ECP.

Para comprovar a carga viral inicial do leite contaminado usado na produção dos queijos, este foi titulado em células VERO e, nas quatro repetições as amostras continham 10<sup>5</sup> UFP/mL. A monocamada celular inoculada com o leite não contaminado não apresentou ECP.

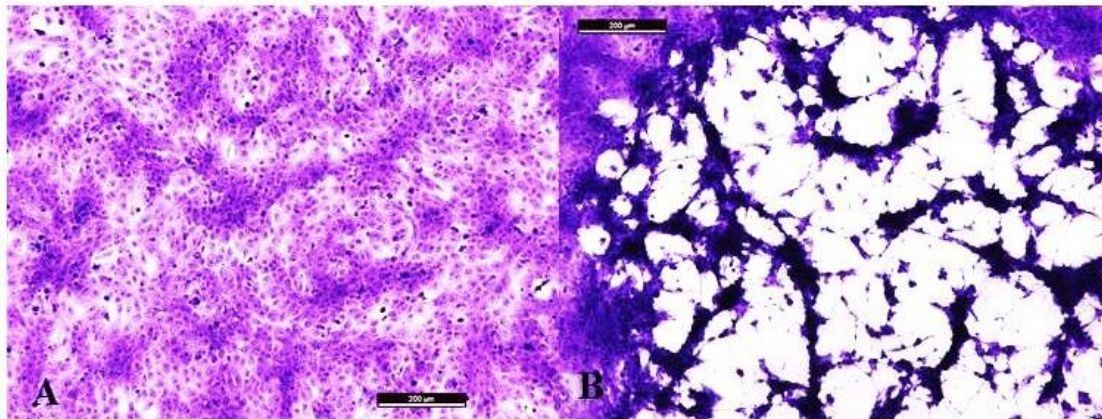


Figura 3: (A) Monocamada de células VERO íntegra após a inoculação de amostras de queijo controle. (B) Lise celular na monocamada de células VERO inoculada com amostra de queijo experimentalmente contaminado com VACV. Coloração com cristal violeta e aumento de 10x.

Com relação à titulação, a amostra com um dia de maturação apresentou, em média, redução de 1 log no título viral. Nos queijos de 7 e 14 dias de maturação, houve perda de 2 logs no título viral, enquanto nos queijos de 21, 45 e 60 dias de maturação, a queda observada no título foi de 3 logs, com relação ao título inicial do leite, como observado na Tabela 1. A Figura 4 representa, de forma gráfica, a influência da maturação dos queijos na viabilidade do VACV pelo modelo de regressão linear. A carga viral das amostras em cada tempo de maturação não apresentou diferença estatística significativa considerando intervalo de confiança de 95%, apesar de haver uma tendência linear decrescente do título viral durante os dias de maturação dos queijos.

Tabela 1: Média do título de VACV-GP2 (UFP/mL) nas amostras de leite, soro, coágulo e queijos com diferentes tempos de maturação experimentalmente contaminados

Amostras	Leite	Soro	Coágulo	Q1*	Q7*	Q14*	Q21*	Q45*	Q60*
Média título (UFP/mL)	$1,0 \times 10^5$	$2,2 \times 10^3$	$8,7 \times 10^4$	$1,6 \times 10^4$	$1,8 \times 10^3$	$2,9 \times 10^3$	$9,3 \times 10^2$	$2,3 \times 10^2$	$1,7 \times 10^2$

\*Q1, Q7, Q14, Q21, Q45 e Q60 representam as amostras de queijos nos tempos de maturação analisados

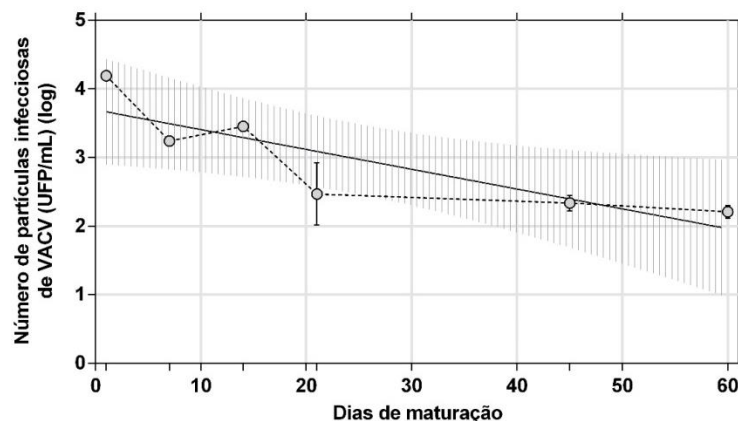


Figura 4: Representação gráfica da média do título viral, em UFP /mL, nos queijos experimentalmente contaminados com VACV submetidos à maturação por até 60 dias a 25° C. Barras verticais representam erros padrão da média. Área sombreada representa intervalo de confiança da regressão linear.

### 3.2. PCR em tempo real:

Em todas as amostras de queijo, leite, soro e coágulo contaminados com VACV houve amplificação do gene *v<sub>g</sub>f* com variação de *Cycle Threshold* (Ct) entre 22 a 25, 22 a 25, 23 a 26 e 23 a 30 ciclos, na primeira, segunda, terceira e quarta produções, respectivamente. Em relação à quantificação das amostras de queijo em função do tempo de maturação, não houve diferença estatística para  $p > 0,05$  (Tabela 2), apesar de existir uma tendência linear de redução na quantificação com o aumento dos dias como mostrado na Figura 4. Não houve amplificação nas amostras controles.

Tabela 2: Quantificação média do DNA viral pela técnica de PCR em tempo real das amostras de queijos produzidos com leite cru experimentalmente contaminado com VACV-GP2 em função dos dias de maturação

	Dias de maturação						Valor P		
	1	7	14	21	45	60	Dias	L	Q
Quantificação de DNA (UG/g)	4022,73 (± 152,87)	2955,08 (± 1225,41)	2504,24 (± 72,81)	2428,84 (± 661,76)	2241,72 (± 88,95)	1418,55 (± 734,81)	0,6614	0,081	0,548

Intervalos representam erro padrão da média para cada dia de maturação.

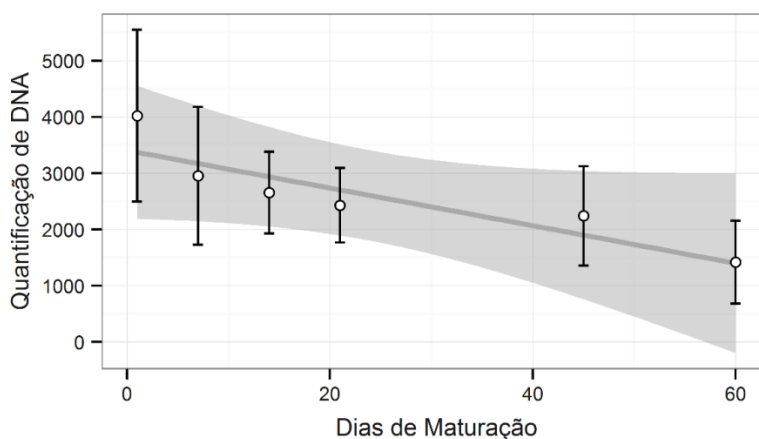


Figura 4: Representação gráfica da quantificação média de DNA (UG/g) do VACV em queijos experimentalmente contaminados em função de dias de maturação. Barras verticais representam erros padrão da média. Área sombreada representa intervalo de confiança da regressão linear.

## 4. DISCUSSÃO

A maturação do queijo artesanal implica em importantes alterações nas suas características físico-químicas, sensoriais e microbiológicas devido à perda de umidade e ao aumento da proteólise e lipólise (Mendonza e Oyón, 2002, revisado por Martins, 2006). As bactérias lácteas desempenham um papel muito importante no processo de maturação, pois produzem substâncias antimicrobianas capazes de inibir ou reduzir a contaminação por microrganismos deteriorantes e/ou patogênicos. Na literatura, todos os estudos a respeito do processo de maturação do queijo descrevem suas ações bactericidas e bacteriostáticas associadas a bactérias patogênicas como *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium bovis*, *Brucella* sp dentre outras

(Martins, 2006; Santos, 2010); sendo que, para patógenos virais, não há relatos que descrevem tais ações.

Mediante os resultados obtidos neste trabalho, foi possível observar que o VACV permanece viável no queijo por pelo menos 60 dias de maturação a 25°C. Porém, houve um decréscimo no título viral no decorrer do tempo, mostrando que o processo de maturação pode diminuir a carga viral presente no queijo experimentalmente contaminado, além de ter capacidade de degradar o material genético, como foi mostrado na PCR quantitativa. Contudo, os 60 dias de maturação não foram suficientes para inativar totalmente as partículas virais infecciosas presentes no queijo. O queijo Minas artesanal é rico em proteína e gordura e, à medida que aumenta o tempo de maturação, ocorre perda de água e tais substâncias ficam mais concentradas no produto (Machado *et al.*, 2004). Estes fatores podem estar associados à viabilidade do VACV no queijo, assim como ocorre com o vírus da febre aftosa no leite, o qual é protegido por moléculas de gordura e proteína, como descrito por Callis e colaboradores (1975).

Oliveira (2014a) fez um estudo sobre a presença de VACV nas diferentes fases do leite de vacas experimentalmente inoculadas com VACV a fim de saber a localização do vírus no leite. Após a centrifugação, o leite foi separado em três fases: gordura ou creme (fase menos densa), soro (fase intermediária) e fase celular (fase mais densa, composta por células somáticas e epiteliais). O DNA de VACV foi detectado na fase de gordura e na fase celular, sugerindo que o vírus pode estar associado às células do leite. A presença de DNA viral no creme de algumas amostras foi associada à presença de células somáticas (CS) em suspensão que eventualmente teriam ficado presas nesta fase do leite (Oliveira, 2014). Porém, há um fato importante que deve ser ressaltado. O experimento acima descrito foi realizado com amostras de leite obtidas de vacas infectadas com VB o que justifica o fato do vírus estar associado a células, pois houve infecção sistêmica das vacas pelo VACV (Rehfeld *et al.*, 2013; Rivetti *et al.*, 2013; Oliveira *et al.*, 2015a). Entretanto, no presente trabalho as amostras de leite foram contaminadas com VACV purificado para produzir os queijos. Desta forma, o VACV provavelmente estaria livre no leite e, conseqüentemente, nos queijos, e não associado a células. Esse é um fator preocupante, pois, sem estar associado a células, o VACV permaneceu viável no queijo durante 60 dias de maturação mesmo com um título mais baixo do que o inóculo inicial. Ou seja, em condições naturais, o fato de o VACV estar associado a células é um fator a mais que pode contribuir com a “proteção” do vírus no leite e no queijo contaminados e, conseqüentemente, favorecer a estabilidade das partículas virais presentes no produto lácteo contaminado. A estabilidade das partículas virais aumenta o risco de transmissão do VACV após a ingestão do produto lácteo contaminado.

Há na literatura relatos sobre a resistência de OPXV em ambientes ricos em proteínas. Bratt e Jacoby (1987) mostraram que o ECMV permaneceu infeccioso por mais tempo após ser suspenso em soro fetal bovino (SFB) quando comparado à suspensão viral em solução de PBS e glicerol. Essbauer e colaboradores (2007) relataram que o VACV permaneceu viável por um período superior a 166 dias na água de chuva suplementada com SFB, um meio rico em proteínas, e armazenada a 4,5° C. Já na água de chuva sem a adição de SFB, o vírus permaneceu viável por apenas 56 dias. Nos experimentos citados, a presença de SFB, rico em proteínas, prolongou a viabilidade viral quando comparada às amostras sem SFB.

A maturação em temperatura ambiente promove a redução de pH e da umidade, assim como aumenta a concentração de NaCl e da atividade antagonista por bactérias ácido-láticas, as quais contribuem para a queda da população de microrganismos patogênicos. Queijos artesanais

submetidos à maturação podem ter valores de pH variando entre 4,4 e 6,4 (Martins, 2006) e entre 5,28 e 5,48 (Mello e Armachuk, 2013). Já foi descrito que VACV permanece infecciosopor até 56 dias em água de chuva com pH levemente ácido entre 4,5-5,7 (Essbauer *et al.*, 2007). Assim, o pH ácido é outro fator que pode ter favorecido a viabilidade viral na massa do queijo.

Essbauer e colaboradores (2007) citam que o VACV possui resistência considerável ao calor, à dessecação e é capaz de manter sua infectividade em restos celulares presentes em crostas por longo tempo. Apesar de o queijo artesanal sofrer alterações durante o processo de maturação, tudo indica que o ambiente formado é propício para a manutenção de VACV, pois há a associação de fatores com maior concentração de gordura e de proteína e maior acidez que podem contribuir com a viabilidade do vírus na massa do queijo. A persistência da viabilidade viral na massa do queijo pode ser atribuída tanto à presença de proteínas quanto de gorduras, ambos componentes importantes na manutenção da proteção da viabilidade viral no leite, como no caso do vírus da febre aftosa (Callis *et al.*, 1975). A concentração média de proteínas e gorduras na massa do queijo Minas artesanal é de 17g/100g e 29,22g/100g, respectivamente (Machado *et al.*, 2004).

Blackwell e Hyde (1976) avaliando a viabilidade do vírus da febre aftosa no creme de leite obtido a partir de leite integral e desnatado, concluíram que a gordura presente no leite integral protegeu o vírus da ação do calor. No entanto, nesse experimento, também foi possível atribuir a presença de gorduras e proteínas a uma maior capacidade de proteção das partículas virais.

É importante ressaltar que, durante o período de maturação, foi observada redução na quantificação do DNA viral. Esta queda na quantificação do DNA de VACV, apesar de não ter sido estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ), mostrou que as alterações físico-químicas que ocorrem na maturação foram capazes de degradar o material genético do vírus. Dois fatores podem explicar essa vulnerabilidade do vírus perante o processo de maturação e que, talvez, aconteça em menor proporção nas condições naturais de contaminação dos produtos lácteos pelo VACV. O primeiro fator pode estar relacionado à partícula viral usada na contaminação experimental do leite. O inóculo utilizado foi a amostra VACV-GP2 purificada em laboratório de acordo com a técnica de Joklik (1962). Nesta técnica de purificação, a partícula viral predominante é a intracelular madura (IMV), sendo uma forma viral infecciosa desprovida de envelope viral (Moss, 2007). A membrana externa dos poxvírus é composta por uma bicamada lipoprotéica (Fenner, 1989) a qual, provavelmente, pode ter sofrido alterações durante os processos de lipólise e proteólise que ocorrem na maturação do queijo, causando desnaturação da estrutura viral. O segundo fator importante que pode ter contribuído para tal degradação é a presença de partículas virais não associadas a células, uma vez que o inóculo viral foi adicionado diretamente ao leite, antes de produzir os queijos. As partículas virais livres no leite podem se tornar mais vulneráveis às ações físico-químicas causadas pelo processo de maturação, pois o vírus fica mais exposto a tais transformações. No início do processo de maturação, ocorre uma diminuição gradual do pH devido à formação de ácido láctico a partir da lactose residual, mas, posteriormente, por causa da liberação de produtos alcalinos da proteólise, como a produção de amônia, ocorre um aumento gradativo do pH que neutraliza a acidez do meio (Perry, 2004). Logo, o auge dos processos de proteólise e lipólise ocorre nas primeiras semanas de maturação do queijo devido à presença das bactérias lácteas. Porém, nem toda gordura e proteína são degradadas durante esses processos, o que pode favorecer a manutenção de partículas virais viáveis, uma vez que o VACV permanece viável em ambiente rico em proteínas com pH levemente ácido (Essbauer *et al.*, 2007). Vasek e colaboradores (2013) relataram que o aumento do pH após o sétimo dia de maturação dos queijos é um dos fatores de

risco para a sobrevivência de microrganismos patogênicos.

Outro resultado importante obtido no experimento foi a detecção de partículas infecciosas em amostras de soro. Oliveira e colaboradores (2010) também conseguiram recuperar partículas virais infecciosas tanto na massa quanto no soro após a produção de queijos experimentalmente contaminados com o VACV. O soro é um subproduto do queijo sendo usado para a produção de ricotas e bebidas lácteas em laticínios e também pode ser destinado à produção de ração animal. Em fazendas produtoras de queijo artesanal utiliza-se o “pingo”, um fermento natural rico em bactérias lacto-fermentativas específicas de cada região. Ele é obtido com o soro que é drenado dos queijos recém-manufaturados durante a tarde e a noite do primeiro dia de maturação (BRASIL, 2006). Portanto, uma vez contaminado com o VACV, o pingo pode transmitir o vírus para queijos que não estão contaminados ou até mesmo aumentar a carga viral de queijos já contaminados. Além disso, o uso inadequado do soro nos laticínios, caso esteja contaminado com VACV, pode torna-se um risco ao consumidor. Sendo a bebida láctea um produto destinado principalmente ao público infantil, as preocupações com relação à transmissão de VACV tornam-se maiores, uma vez que essa categoria ainda possui um sistema imune imaturo.

Apesar de já existirem relatos na Índia de humanos com lesões na boca e mucosa oral após ingestão de leite contaminado com BPXV (Gurav *et al.*, 2011), tal fato ainda não foi relatado no Brasil. Porém, anticorpos neutralizantes anti-OPXV foram detectados em humanos que vivem em região endêmica para VB, os quais nunca tiveram contato com bovinos doentes e que não foram vacinados contra o VARV (Costa *et al.*, 2013; Costa *et al.*, 2015). Uma das hipóteses para explicar a presença desses anticorpos anti-OPXV seria que os indivíduos soropositivos se infectaram pela ingestão de leite e/ou queijo artesanal contaminados com VACV, uma vez que se trata de uma região leiteira e tradicional na produção de queijos artesanais. Rehfeld e colaboradores (2015), ao inocularem camundongos por via oral com leite contaminado com VACV, observaram soro-conversão nos animais e infecção sistêmica, sem manifestação de sinais clínicos, assim como foi observado nos humanos supracitados.

Como discutido anteriormente, as alterações físico-químicas que ocorrem durante o processo de maturação do queijo podem ter causado redução na carga viral presente em queijos experimentalmente contaminados, porém, não foram 100% eficazes na inativação do VACV durante o período testado. Desta forma, queijo contaminado com VACV, mesmo submetido à maturação por 60 dias, pode ser fonte de infecção do vírus.

## 5. CONCLUSÕES

Queijos contaminados com VACV, mesmo submetidos à maturação por 60 dias a 25°C podem ser um risco de transmissão do vírus durante a manipulação e após o consumo do produto.

### **Capítulo 3: Detecção de *Vaccinia virus* em queijo Minas artesanal elaborados em propriedades com e sem casos de VB no Estado de Minas Gerais**

#### **RESUMO**

A produção de queijo artesanal a partir de leite cru é uma atividade tradicional e patrimoniada em vários estados do Brasil, inclusive Minas Gerais. Porém, o leite cru constitui um potencial risco de contaminação destes queijos caso haja agentes patogênicos ali presentes. Estudos têm mostrado que partículas infecciosas de VACV são eliminadas pelo leite de vacas acometidas com vaccínia bovina (VB) e essa eliminação pode ser detectada por pelo menos 25 dias após a cicatrização das lesões. Além disso, o vírus permanece viável em queijos frescos contaminados experimentalmente e submetidos à maturação. Por ser uma zoonose negligenciada com impacto significativo na pecuária e na saúde pública, foi proposto pesquisar o VACV em amostras de queijos Minas artesanais (QMA) comerciais produzidos em propriedades com e sem casos de VB no estado de Minas Gerais. Vinte propriedades produtoras de QMA cadastradas foram visitadas. Cinquenta e nove queijos frescos e maturados foram coletados e analisados, sendo que dez queijos foram produzidos em propriedades com casos de VB e 49, oriundos de fazendas sem histórico da doença. Para as análises, foram processados 25 gramas de cada queijo, coletados em pontos aleatórios do produto. Estas amostras foram trituradas, misturadas e maceradas em solução salina. A técnica de PCR-*nested* foi utilizada na detecção de DNA viral. As amostras de queijo positivas na PCR-*nested* foram inoculadas em cultivo celular ou membrana corioalantóide de ovos embrionados (MCA) de galinhae, a confirmação do efeito citopático (ECP) foi realizada pelas técnicas de imunoperoxidase em monocamada celular (IPMC) e PCR em tempo real (qPCR), respectivamente. O DNA viral foi detectado em 43 das 59 amostras testadas. Destas, 11 tinham partículas infecciosas do VACV, sendo quatro amostras oriundas de propriedades sem casos de VB. Esses resultados mostram que o VACV pode circular de forma silenciosa e que queijos artesanais comerciais podem estar contaminados com o VACV, sendo um possível risco para a saúde pública. Porém, mais estudos são necessários para determinar o possível risco de transmissão do vírus para humanos associado ao consumo destes queijos.

**Palavras-chaves:** *Vaccinia virus*, queijos Minas artesanais, propriedades com e sem casos de VB

## 1. INTRODUÇÃO

O *Vaccinia virus* (VACV) é a principal espécie, pertencente ao gênero *Orthopoxvirus* (OPXV), comumente detectado em surtos de lesões exantemáticas no Brasil (Trindade *et al.*, 2003; Trindade *et al.*, 2004; Leite *et al.*, 2005; Trindade *et al.*, 2006; Medaglia *et al.*, 2009; Campos *et al.*, 2011; Assis *et al.*, 2013b; Abrahão *et al.*, 2015; Assis *et al.*, 2015; Peres *et al.*, 2016). A vaccínia bovina (VB) afeta, principalmente, tetos e úberes de vacas em lactação, mucosa oral e focinhos de bezerros, mãos e braços de ordenhadores (Lobato *et al.*, 2005; Madureira, 2009; Schatzmayr *et al.*, 2009; Abrahão *et al.*, 2010). Além disso, a VB é uma zoonose subnotificada e negligenciada que acomete, principalmente, bovinos e humanos de pequenas propriedades leiteiras, causando impacto na saúde pública e na economia (Lobato *et al.*, 2005; Madureira, 2009; Assis *et al.*, 2015).

A produção do queijo Minas artesanal (QMA) tornou-se patrimônio imaterial do país em 2008 pelo Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional (IPHAN) e essa atividade, normalmente desenvolvida por pequenos produtores rurais, é a principal fonte geradora de renda, assim como é responsável por caracterizar a identidade sócio-cultural da região produtora (Furtado, 1980). Porém, por ser um produto bastante manipulado e produzido com leite cru, o queijo artesanal pode gerar consequências graves à saúde pública pela possibilidade de veiculação de micro-organismos patogênicos e/ou suas toxinas (Santos, 2010).

Dos patógenos transmitidos pelo leite, os vírus são bastante negligenciados e a literatura é bastante escassa. Dentre os microrganismos potencialmente capazes de contaminar o queijo artesanal, as bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus* sp., *Salmonella* sp. e suas toxinas e *Listeria monocytogenes* são muito citadas na literatura (Jay, 2005; Santos, 2010; Cardoso, 2011). O leite também é citado como veiculador do vírus da febre aftosa (Bordot *et al.*, 2013) e de OPXV (Abrahão *et al.*, 2009). Vacas experimentalmente infectadas eliminam partículas infecciosas virais pelo leite por, pelo menos, 25 dias após a cicatrização das lesões (Oliveira *et al.*, 2015a). Além disso, o VACV é resistente aos processos de produção de iogurtes e queijos frescos produzidos a partir de leite experimentalmente contaminados (Oliveira *et al.*, 2010) e ao processo de maturação dos queijos (Rehfeld *et al.*, dados não publicados, vide capítulo 2).

Relatos no Brasil sobre a transmissão do VACV para humanos após a ingestão de leite e derivados lácteos contaminados ainda não foram relatados. Porém, na Índia, foram descritos casos de humanos com lesões na boca e mucosa oral após a ingestão de leite contaminado com *Buffalopox virus* (BPXV), um OPXV (Gurav *et al.*, 2011), o que indica que a transmissão de VACV pelo consumo e da manipulação de leite e derivados contaminados é possível, caracterizando um risco à saúde pública. Mediante os relatos acima descritos, QMA comerciais produzidos em propriedades cadastradas com e sem surtos de VB foram coletados a fim de pesquisar a presença do VACV nesses produtos.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Propriedades visitadas, coletas e processamento dos queijos:

As coletas dos QMA foram divididas em duas fases (F1 e F2). Em F1, oito propriedades com surto de VB, localizadas na microrregião do Serro, foram visitadas e dez queijos, com diferentes tempos de maturação e mantidos à temperatura ambiente, foram coletados. O manejo de ordenha dessas propriedades era manual, mantendo bezerro ao pé. Os queijos foram coletados

pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Pesquisa em Virologia Animal do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da UFMG (LPVA/EV/UFMG) em parceria com o Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA).

Em F2, doze propriedades sem histórico de VB, localizadas nas microrregiões de Araxá e do Campo das Vertentes, foram visitadas e 49 queijos artesanais, com diferentes tempos de maturação e mantidos à temperatura, foram coletados. Todas as propriedades de F2 ordenhavam as vacas de forma mecânica. Das 12 propriedades em F2, em seis delas foram obtidos queijos, produzidos a partir do mesmo lote de leite, com 1, 7, 14, 21, 45 e 60 dias de maturação mantidos à temperatura ambiente na queijaria da propriedade. Os queijos foram acondicionados em caixas isotérmicas e enviados, em um prazo máximo de 24 horas, para os Laboratórios do Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal da UFMG (DTIPOA/EV/UFMG). A amostragem dos queijos foi realizada no Laboratório de Microbiologia de Alimentos no DTIPOA e enviada para o LPVA para pesquisar a presença de VACV (Tabela 1).

Todas as propriedades visitadas eram cadastradas como produtoras de QMA no Estado de Minas Gerais e os proprietários cederam gentilmente os queijos para o estudo.

Foram processados 25g de cada queijo, coletados em pontos aleatórios do produto. A coleta foi realizada com espátula estéril incluindo regiões da casca (superfície externa) e do “miolo” (região mais interna) do queijo. Essas amostras foram trituradas, maceradas e diluídas em solução salina (1:10). Posteriormente, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante foi coletado e submetido às análises.

Tabela 1: Descrição detalhada das propriedades visitadas (P1-P20), quantidade de queijos coletados por propriedades e tempo de maturação dos queijos

Propriedades (P)	Número de queijos coletados (n)	Tempo de maturação (dias)	Surtos de BV	Tipo de ordenha
P1	2	1 e 7*	sim	Manual
P2	1	1	sim	Manual
P3	1	2	sim	Manual
P4	1	2	sim	Manual
P5	2	1 e 7*	sim	Manual
P6	1	3*	sim	Manual
P7	1	2	sim	Manual
P8	1	2	sim	Manual
P9	7	1,7,14,21,28,45 e 60 *	não	Mecânica
P10	7	1,7,14,21,28,45 e 60 *	não	Mecânica
P11	7	1,7,14,21,28,45 e 60 *	não	Mecânica
P12	7	1,7,14,21,28,45 e 60 *	não	Mecânica
P13	7	1,7,14,21,28,45 e 60 *	não	Mecânica
P14	7	1,7,14,21,28,45 e 60 *	não	Mecânica
P15	1	1	não	Mecânica
P16	2	1 e 6*	não	Mecânica
P17	1	6*	não	Mecânica
P18	1	1	não	Mecânica
P19	1	1	não	Mecânica
P20	1	1	não	Mecânica
<b>Total</b>	<b>59</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>

\* A maturação dos queijos foi realizada nas queijarias das propriedades

## **2.2. Provas moleculares:**

### **2.2.1 Extração do DNA:**

Todas as amostras foram submetidas à extração de DNA utilizando o kit comercial “Wizard Genomic DNA Purification System” (Promega, Wisconsin, EUA). Resumidamente, 300 µl das amostras previamente diluídas foram adicionadas a uma solução de lise celular, centrifugadas e descartado o sobrenadante. Após, o precipitado foi adicionado a uma solução de lise nuclear associada à solução de precipitação de proteínas e submetido à nova centrifugação. O sobrenadante foi precipitado e reidratado em 50µl da solução de reidratação e armazenados a -20 °C.

### **2.2.2. PCR-nested para amplificação do gene *vgf*:**

A PCR-nested, para pesquisa do gene fator de crescimento (*vgf*) do gênero OPXV, foi utilizada para detecção do DNA viral nas amostras de queijos coletadas como descrito por Abrahão e colaboradores (2009b). A reação para amplificação do gene *vgf* foi realizada em duas etapas, sendo o produto da primeira reação utilizado como molde para a segunda etapa. Na primeira etapa, foram utilizados os iniciadores *vgf* F e R, que amplificam um fragmento de 1536 pb. A segunda etapa de amplificação utiliza os iniciadores *vgf* F2 e *vgf* R2, que amplificam 170 pb. O volume de 2µL da 1ª reação foi utilizado, sem diluição, como amostra na 2ª reação. Nos controles negativos, 2µL de água foi utilizado para substituir as amostras correspondentes. Os controles positivos foram utilizados 10<sup>5</sup> UFP/µl de VACV-WR, previamente purificado. Os fragmentos amplificados foram fracionados por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) 8%, sob voltagem de 100V e corados pela prata.

### **2.2.3. PCR em tempo real para amplificação do gene *vgf*:**

A técnica de PCR em tempo real (qPCR), para amplificação do gene *vgf*, foi utilizada para confirmar a presença de DNA de VACV nas amostras de MCA com “pock” viral, inoculadas com o sobrenadante dos queijos de F2. Foi utilizado o mix comercial (SYBR Green® PCR Master Mix, *Applied Biosystems*) com os iniciadores *vgfforwardvgfreverse* desenhados para amplificação de um fragmento com tamanho 82 pb do gene *vgf* (Alves, P.A. dados não publicados) nas concentrações de 400 µM de cada iniciador em uma reação com volume final de 10 µl. As amostras foram testadas em trélicas e cada tréplica foi feita em duplicata. Foram consideradas válidas as reações as quais houve amplificação da duplicata das amostras nas três repetições, com valores da Temperatura de *melting* (T<sub>m</sub>) de acordo com a curva padrão previamente estabelecida. As amostras suspeitas, em que houve amplificação em somente uma das replicatas, foram submetidas novamente ao teste. Além disso, a T<sub>m</sub> (°C) foi analisada de acordo com os controles positivos, aceitando-se uma variação de ± 1 °C. A técnica foi realizada conforme Oliveira e colaboradores (2015a). O controle negativo da reação foi feito com leite sabidamente negativo e PBS 1x, submetidos à extração prévia.

Todas as reações de qPCR foram feitas utilizando o termociclador StepOne® da *Applied Biosystems* (Thermo-Fisher, EUA) e os dados de quantificação e detecção foram coletados e analisados pelo *softwareStepOne*® versão 2.1 da *Applied Biosystems* (Thermo-Fisher, EUA).

## **2.3. Pesquisa de partículas virais infecciosas:**

### **2.3.1.Cultivo celular:**

As amostras positivas na técnica de PCR-*nested* das amostras de queijos de F1 e F2 foram inoculadas em cultivo de células VERO (ATCC, CCL-81) para a tentativa de detecção de partículas virais viáveis. Três passagens celulares consecutivas, com incubação de 72 horas cada, foram realizadas conforme Rivetti e colaboradores (2013). Amostras que apresentaram efeito citopático (ECP), com formação de placa de lise celular, foram confirmadas para OPXV pelo teste de imunoperoxidase em monocamada celular (IPMC) (Gerber *et al.*, 2012), vide item 2.4.

### **2.3.2. Ovos embrionados de galinha:**

Nenhuma amostra de queijo de F2, positiva na PCR-*nested*, apresentou ECP em células. Para aumentar a sensibilidade, essas amostras foram inoculadas em membrana corioalantóide (MCA) de ovo embrionado de galinha (Sarkar *et al.*, 1973). Ovos embrionados de galinha com dez dias foram inoculados, diretamente na MCA, com 100 µL do sobrenadante dos queijos de F2 positivos na PCR-*nested*. Os ovos inoculados foram mantidos a 37°C e, após 72 horas, foram abertos em fluxo laminar e as membranas foram separadas e lavadas com PBS 1X a fim de observar presença de “pock” viral. Como controle positivo, foi inoculada amostra de VACV-GP2 purificado com título de 10<sup>5</sup> UFP/mL. No controle negativo, foi inoculado PBS 1X estéril. As membranas que apresentaram “pock” foram maceradas em PBS 1X e centrifugadas a 3000g por 5 minutos. O sobrenadante foi coletado e, posteriormente, foi realizado extração e qPCR para amplificação do gene *vgf* (Oliveira *et al.*, 2015a), vide subitem 2.2.3.

### **2.4. Imunoperoxidase em monocamada celular (IPMC):**

Após a terceira inoculação em cultivo de VERO, as amostras de queijos de F1, submetidas ao isolamento e que apresentaram ECP foram inoculadas em placas de 96 poços (Greiner Bio-one; Cellstar, Alemanha) contendo células VERO. Após 48h de incubação a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, as células foram fixadas com solução de acetona: metanol (1:1). O bloqueio para reações inespecíficas foi realizado com albumina bovina a 1,5%. Como anticorpo primário, foi utilizado soro de coelho anti-VACV-GP2, o qual foi diluído 1250 vezes juntamente com a solução de bloqueio e incubado durante 60 minutos sob agitação de 240 rpm (Ika KS 130 basic, Estados Unidos) em uma estufa a 37°C. Em seguida foi realizada uma lavagem com solução contendo Tween 20 0,5% e NaCl 0,85% (solução de lavagem). Foi então adicionada proteína G conjugada com peroxidase diluída 1:600, a qual foi incubada por 1 hora a 37°C sob agitação de 240 rpm (Ika KS 130 basic, Estado Unidos). Posteriormente, as placas foram lavadas por uma vez com a solução de lavagem com 100 µL por vez.

A reação foi revelada pela adição de 50 µL por poço do substrato 3-amino-9-etil-carbazol (AEC) por um período de até 10 minutos à temperatura ambiente com proteção à luz. Os poços foram lavados com solução salina (NaCl 0,85%) para realização da leitura. A leitura da reação de IPMC foi realizada em microscópio óptico de luz invertida (Leitz® Diavert, Alemanha). A reação de IPMC baseou-se em ensaio descrito Gerber e colaboradores (2012).

## **3. RESULTADOS**

DNA viral foi detectado em 43 amostras de queijos artesanais das 59 analisadas, incluindo três queijos com 60 dias de maturação e, sendo que 11 tinham partículas infecciosas de OPXV. Destas, quatro amostras originadas de propriedades sem casos de VB (F2), incluindo um queijo com 15 dias de maturação (Tabela 2), as quais foram inoculadas em MCA e confirmadas por PCRq (Figura 1A). As demais amostras em que houve detecção de partículas infecciosas de

OPXV, ou seja, sete amostras, foram originadas das propriedades com surto de VB e inoculadas em células VERO, cujo ECP foi confirmado por IPMC (Figura 1B).

Tabela 2: Resultado das amostras de QMA coletadas em propriedades com e sem caso de VB (F1 e F2) submetidos às técnicas de PCR e isolamento para OPXV

Propriedades	PCR-nested n/nt (%)		Inoculação em VERO e IPMC n/nt (%)		Inoculação em MCA e qPCR n/nt (%)	
	P	N	P	N	P	N
<b>F1 (com casos de VB)</b>	8/10 (80%)	2/10 (20%)	7/8 (87,5%)	1/8 (12,5%)	NR	NR
<b>F2 (sem casos de VB)</b>	35/49 (71,4%)	14/49 (28,6%)	0/35 (0%)	35/35 (100%)	4/35 (11,4%)	31/35 (88,6%)
<b>Total</b>	<b>43/59 (72,9%)</b>	<b>16/59 (27,1%)</b>	<b>7/43 (16,3%)</b>	<b>36/43 (83,7%)</b>	<b>4/35 (11,4%)</b>	<b>31/35 (88,6%)</b>

Nt = número total de amostras testadas

P = positivas; N = negativas

NR = não realizado

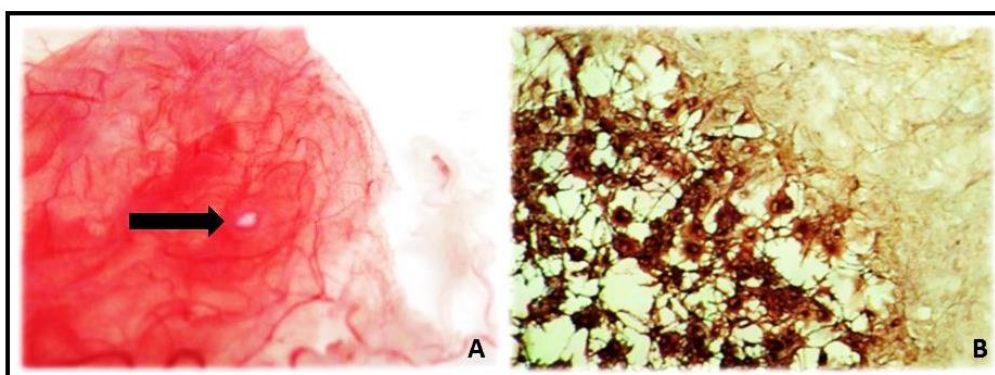


Figura 1: Foto mostrando o isolamento de OPXV das amostras de QMA pela técnica de inoculação em MCA de ovo de galinha embrionado com formação do “pock” viral (seta) (A) e pela técnica de IPMC pela coloração inespecífica para OPXV da monocamada de células VERO com efeito de lise (B).

#### 4. DISCUSSÃO

Das amostras de QMA analisadas, foi observado que nas propriedades com surtos de VB (F1) a proporção na detecção de partículas virais viáveis de OPXV com relação à detecção de DNA viral foi alta. Das oito amostras positivas na PCR-nested em F1, em sete, foram obtidos isolamento do vírus, equivalendo a 87,5%. Enquanto nas amostras de QMA oriundas das propriedades sem surto de VB (F2), o número de detecção de partículas virais viáveis foi equivalente a 11,4% das amostras positivas na PCR-nested. Apesar da detecção de partículas virais viáveis nos QMA das propriedades F2 ter sido menor, não deixa de ser um fator preocupante, uma vez que são queijos provenientes de propriedades sem histórico de VB, o que dificulta o rastreamento da contaminação nestes produtos. Além disso, das 49 amostras processadas, em 35 (71,4%) houve amplificação do material genético de OPVX, indicando que os produtos estavam contaminados com vírus.

A literatura é bastante escassa quando se trata de doenças virais transmitidas por alimento. Os surtos alimentares de origem viral em produtos lácteos são negligenciados, em comparação aos surtos alimentares de origem bacteriana. Os vírus são responsáveis por uma alta morbidade em todo o mundo, pois, por muitas vezes infectam um produto sem alterar suas características sensoriais (Santos, 2010). Existem inúmeras portarias que regulamentam as boas práticas de fabricação do QMA, porém, vários trabalhos realizados sobre a qualidade microbiológica destes queijos mostraram que os produtos se encontravam em condições higiênicas insatisfatórias (Martins, 2006; Santos, 2010).

Dentre os produtos derivados do leite, o queijo é considerado um veículo frequente de patógenos de origem alimentar e, em especial, os queijos frescos artesanais, por serem, na maioria das vezes, elaborados a partir de leite cru e não sofrerem processo de maturação por períodos adequados. A contaminação microbiana desses produtos assume destacada relevância, tanto para a indústria, pelas perdas econômicas, como para a saúde pública, pelo risco de causar doenças transmitidas por alimentos (Feitosa *et al.*, 2003). Ainda não há registros oficiais sobre a transmissão do VACV ao homem pela manipulação e consumo de queijo; porém, os resultados obtidos com as pesquisas indicam que o consumo de leite e seus derivados contaminados com o vírus oferecem um potencial risco à saúde pública (Abrahão *et al.*, 2009a; Oliveira *et al.*, 2010, Oliveira, 2014). Sabe-se que o VACV permanece viável em amostras de queijos frescos produzidos com leite experimentalmente contaminados ou com leite de vacas experimentalmente infectadas (Oliveira *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2015a). Porém, a detecção de VACV em QMA comerciais, coletados diretamente nas propriedades cadastradas, é descrito pela primeira vez no presente estudo.

Na Índia, houve 17 casos suspeitos de transmissão de BPXV para humanos que ingeriram de leite cru contaminado e manifestaram lesões na boca e mucosa oral (Gurav *et al.*, 2011). Além disso, Costa e colaboradores (2013) detectaram anticorpos neutralizantes (AN) contra OPXV em humanos que vivem em área endêmica para VB em Minas Gerais, os quais nunca foram vacinados contra VARV e que nunca tiveram contato com lesões em vacas doentes, mas que tinham o hábito de beber leite sem tratamento térmico e comer queijo artesanal. Nesta mesma região, também foram detectados AN em crianças de uma mesma família e que tinham costume de ingerir leite e queijo artesanal (Costa *et al.*, 2015). Apesar de não haver um estudo de causa-efeito, tais achados indicam que o contato com o VACV pode ter ocorrido por outra via de infecção, sendo a via oral uma possível porta de entrada para o vírus. Não se pode descartar também a hipótese de infecção subclínica de humanos pelo VACV, assim como ocorreu em camundongos inoculados por via oral com leite contaminado com VACV (Rehfeld *et al.*, 2015). Desta forma, estes fatores descritos anteriormente reforçam a suspeita de que o VACV pode ser transmitido pelo leite e seus derivados contaminados.

Foi realizada a detecção de partículas infecciosas de OPXV em queijos artesanais provenientes de propriedades com e sem doença clínica aparente. O mais frequente observado e relatado é a ocorrência de VB em rebanhos com ordenha manual, embora casos esporádicos da doença tenham sido relatados em propriedades com ordenha mecânica (Madureira, 2009). As propriedades nas quais a doença não foi manifestada realizavam a ordenha de forma mecânica. A ordenha mecânica pode minimizar as lesões, devido à utilização de desinfetantes para higienização das teteiras, o que diminui a sobrevivência de vários patógenos, reduzindo a carga microbiana e diminuindo a probabilidade de transferência da doença de um animal para outro e para o homem, porém a soroprevalência para VB nesses animais é alta (Lobato *et al.*, 2005; Madureira, 2009). Por outro lado, a detecção de partículas virais viáveis em fezes e leite de

bovinos assintomáticos em propriedades de ordenha manual foi observada, mostrando que a infecção subclínica em bovinos também pode ocorrer (Rehfeld *et al.*, dados não publicados). Desta forma, a doença passa despercebida pelos proprietários e o leite e seus derivados são comercializados normalmente. Conseqüentemente, os bovinos com VB subclínica tornam-se indivíduos epidemiologicamente importantes na cadeia de transmissão do vírus, uma vez que podem ser os responsáveis pela manutenção e disseminação do VACV. Além disso, o trânsito desses animais pode favorecer a disseminação do vírus em propriedades livres da doença.

As propriedades em que há notificação de VB são interditadas pelo IMA enquanto os animais manifestarem sinais clínicos. Após a cicatrização das lesões os produtos lácteos podem ser comercializados novamente. Porém, estudos mostraram que VACV continua sendo eliminado no leite por pelo menos 25 dias após a cicatrização das lesões (Oliveira *et al.*, 2015a). Controlar a contaminação dos QMA com VACV é uma tarefa complicada, uma vez que as vacas com VB podem continuar a eliminar vírus após a cicatrização das lesões, por um período máximo desconhecido, além da dificuldade em detectar a VB em propriedades com ordenha mecânica ou em animais com infecção subclínica.

Mediante tais resultados e outros descritos na literatura, foi observado que o grande problema da VB é a subnotificação, a falta de informação de profissionais tanto na área da saúde como na pecuária e o descaso dos órgãos públicos. Medidas de prevenção e controle oficiais pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e pelo Ministério da Saúde (MS) são necessários. Assim como, as fiscalizações na produção dos queijos artesanais devem ser mais frequentes com coparticipação de veterinários particulares e oficiais e cooperativas, para que o produtor possa oferecer um produto com menor risco para a saúde do consumidor. Apesar de não haver relatos da transmissão para humanos de poxvírus pelo consumo de leite e seus derivados contaminados, sabe-se que a VB causa grandes prejuízos econômicos na pecuária leiteira bem como na saúde pública. Atualmente, a melhor forma de prevenção da doença, na tentativa de minimizar os impactos e a disseminação, principalmente por animais com infecção subclínica e por produtos lácteos, é a vacinação. Ainda não existe vacina comercial para a doença, mas uma formulação vacinal foi desenvolvida pelo grupo de pesquisa de poxvírus do Laboratório de pesquisa em Virologia Animal da Escola de Veterinária da UFMG, a qual apresentou resultados satisfatórios (Matos *et al.*, 2015). Caso a circulação viral em bovinos seja controlada, conseqüentemente, casos humanos poderão ser evitados, assim como o ciclo viral no ambiente. Ao mesmo tempo, o risco de transmissão de VACV pelo leite e seus derivados contaminados após o consumo poderá ser minimizado.

Pela primeira vez, partículas infecciosas de OPXV foram detectadas em amostras de queijos Minas artesanais comerciais fabricados em propriedades com e sem surto de VB. Esses resultados mostram que o VACV está disseminado nas propriedades leiteiras produtoras de QMA, podendo manifestar-se de forma subclínica nos animais. O risco para saúde pública é preocupante, porém, mais estudos são necessários para determinar o possível risco de transmissão do vírus para humanos associado ao consumo destes queijos.

## 5. CONCLUSÃO

Queijos Minas artesanais comerciais podem estar contaminados com VVB, inclusive os produzidos em propriedades sem histórico da doença, podendo ser possível fonte de infecção viral após o consumo.

#### **Capítulo 4: Comunicação - Detecção de DNA de *Parapoxvirus* em amostras de leite coletadas de vacas com lesões vesiculares de propriedades com vaccínia bovina**

A pseudovariola (PSV) ou nódulo do ordenhador é uma doença vesicular de bovinos de caráter zoonótico, causada pelo *Pseudocowpox virus* (PCPV), pertencente ao gênero *Parapoxvirus* (PPV) (Buttner e Rziha, 2002). A infecção causada pelo PCPV cursa com doença vesiculopustular autolimitante, geralmente nos tetos das vacas, cavidade oral de bezerros, podendo acometer humanos (Abrahão *et al.*, 2010; Sant'Ana *et al.*, 2013; Cargnelutti *et al.*, 2014). As lesões iniciam com vesículas e pápulas, evoluindo para úlceras e crostas, as quais são indistinguíveis clinicamente da VB.

Relatos sobre infecções por poxvirus vêm sendo descritos em vários estados brasileiros, sendo que o *Vaccinia virus* (VACV), do gênero *Orthopoxvirus* (OPXV) é a espécie mais comumente detectada (Lobato *et al.*, 2005; Nagasse-Sugahara *et al.*, 2005; Donatele *et al.*, 2007; Medaglia *et al.*, 2009; Quixabeira-Santos *et al.*, 2011; Megid *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2013; Assis *et al.*, 2013b; Abrahão *et al.*, 2015; Assis *et al.*, 2015). Porém, casos de coinfeção entre PPV e OPXV já foram relatados em surtos de doença vesicular de bovinos no Brasil (Abrahão *et al.*, 2010; Sant'Anna *et al.*, 2013). A origem e o significado dessas coinfeções na patogenia das doenças ainda não estão esclarecidos, embora se acredite que a infecção associada entre dois ou mais vírus possa resultar em lesões mais graves e de aspecto inflamatório mais pronunciado (Abrahão *et al.*, 2010a; Campos *et al.*, 2011; Cargnelutti *et al.*, 2014).

Estudos relacionados à patogenia e transmissão do VACV têm mostrado grandes avanços nos últimos tempos (Ferreira *et al.*, 2008a; Abrahão *et al.*, 2009c; Brumet *et al.*, 2010; D'Anunção *et al.*, 2012; Guedes *et al.*, 2012; Rivetti *et al.*, 2013; Rehfeld *et al.*, 2013; Assis *et al.*, 2015; Oliveira *et al.*, 2015a; Oliveira *et al.*, 2015b; Peres *et al.*, 2016). Porém, pouco se sabe sobre a infecção causada por PPV em bovinos. Quando surgiram os estudos sobre a detecção do VACV no leite (Abrahão *et al.*, 2009b; Oliveira *et al.*, 2010; Oliveira, 2014), surgiu a dúvida com relação ao PPV e sua possível detecção no mesmo. Desta forma, este trabalho teve como objetivo pesquisar a presença do PPV em leite de vacas provenientes de surtos de doenças vesiculares.

Entre 2011 e 2014, seis propriedades leiteiras em Minas Gerais, com surtos de doenças vesiculares acometendo vacas em lactação, bezerros e humanos, foram visitadas (P1-P6). As propriedades eram de pequenos produtores de leite, localizadas na microrregião do Serro e cuja ordenha era realizada de forma manual. Aleatoriamente, foram selecionadas, por propriedade, dez vacas com lesões e amostras de leite foram coletadas de cada uma em frascos de 100 mL estéreis, ordenhando manualmente os animais. Assim, totalizaram 60 amostras de leite coletadas. Além disso, duas crostas das lesões nos tetos das vacas também foram coletadas em cada fazenda em microtubos estéreis, totalizando 12 crostas. As amostras foram mantidas refrigeradas durante as coletas e no laboratório, as crostas e os leites foram armazenados a -80°C e -20°C, respectivamente, até o processamento.

As amostras de crostas foram maceradas e diluídas em solução salina (PBS 1X) na proporção 1:10. As amostras de leite foram diluídas na proporção 1:3 em PBS 1X. Posteriormente, as amostras foram submetidas à extração de DNA utilizando o kit comercial "Wizard Genomic DNA Purification System (Promega, Wisconsin, EUA). Para pesquisar a presença de DNA de PPV foi realizada a técnica de PCR convencional conforme descrito por Inoshima e colaboradores (2000), com amplificação de fragmento do gene *B2L* de ORFV amostra NZ2,

conservado entre os PPV. Foram utilizados dois iniciadores genéricos denominados PPP-1 *forward* (5'-3'GTCGTCCACGATGAGCAGCT) e PPP-4 *reverse* (5'-3'TACGTGGGAAGCGCCTCGCT). A reação amplificou um fragmento com 594 pb.

Das seis propriedades estudadas, em todas foi confirmada a presença de OPXV nas amostras de crosta. A existência de coinfeção de PPV e de OPXV foi confirmada em quatro delas. Como duas propriedades foram negativas para PPV, as amostras de leite, provenientes das vacas destas propriedades, não foram analisadas. Com relação aos leites testados, foi observada amplificação para o gene *B2L* em 12 amostras das 40 analisadas, indicando a presença de PPV em 30% dos leites testados. Destas 12, oito estavam contaminadas tanto com PPV quanto com OPXV, ou seja, 66,7% dos leites estavam coinfectados (Tabela 1).

Tabela 1: Resultado da técnica de PCR, para amplificação do gene *B2L*, para detecção de PPV nas amostras de crosta e leite coletadas em propriedades com surto de doença vesicular de bovinos e a presença de coinfeção de PPV e OPXV nas amostras de leite, em propriedades com presença confirmada de OPXV.

Propriedades	PCR crostas para gene B2L n/nt (%)	PCR leite para gene B2L n/nt (%)	Coinfeção nas amostras de leite de PPV e OPXV n/nt (%)
<b>P1</b>	2/2 (100%)	3/10 (30%)	1/3 (33,3%)
<b>P2</b>	0/2 (0%)	NR*	NR*
<b>P3</b>	2/2 (100%)	3/10 (30%)	3/3 (100%)
<b>P4</b>	1/2 (50%)	4/10 (40%)	2/4 (50%)
<b>P5</b>	0/2 (0%)	NR*	NR*
<b>P6</b>	2/2 (100%)	2/10 (20%)	2/2 (100%)
<b>Total</b>	7/12 (58,3%)	12/40 (30%)	8/12 (66,7%)

\*NR = não realizado porque foram propriedades negativas para PPV

N = número de amostras positivas na PCR

Nt = número amostral total

A existência de coinfeção entre PPV e OPXV foi relatada, na literatura, em amostras de lesões de vacas e humanos em surtos de doenças vesiculares de bovinos no Brasil (Abrahão *et al.*, 2010a; Sant'Ana *et al.*, 2013; Cargnelutti *et al.*, 2014). Entretanto, a presença de material genético de PPV é descrito em leite pela primeira vez, indicando que o vírus pode estar presente neste produto e em seus derivados, associado ou não à infecção por OPXV.

O sequenciamento das amostras de DNA deste trabalho não foi realizado, porém, todas as espécies de PPV têm caráter zoonótico. Desta forma, estes resultados são preocupantes, uma vez que existe o risco de transmissão para humanos ao consumir ou manipular estes produtos contaminados, assim como ocorre com OPXV. Alguns autores já mostraram que a coinfeção pode acontecer dentro do mesmo gênero, como PCPV, ORFV e/ou BPSV (Cargnelutti *et al.*, 2014), assim como entre os gêneros PPV e OPXV (Abrahão *et al.*, 2010b; Sant'Ana *et al.*, 2013). Além disso, Abrahão e colaboradores (2010b) detectaram a existência de coinfeção entre VACV e PCPV em ordenhadores que tiveram contato com lesões de vacas doentes.

Logo, tornam-se necessários mais estudos sobre a prevalência de PPV em rebanhos bovinos brasileiros, a frequência de coinfeção entre OPXV e PPV e sobre os métodos de prevenção e controle das doenças vesiculares bovinas causadas pelos poxvirus. A prevalência das doenças

populares bovinas causadas por poxvírus no Brasil não é conhecida, pois, são subnotificadas. Mas sabe-se que estas doenças estão disseminadas no território nacional e são responsáveis em causar grandes prejuízos na pecuária leiteira e na saúde pública.

Este trabalho mostrou que amostras de leite oriundas de vacas com lesões vesiculares causadas por poxvirus podem estar contaminadas com duas ou mais espécies virais pertencentes aos gêneros PPV e OPXV, podendo aumentar o risco de transmissão após o consumo de produtos lácteos contaminados. Autores acreditam que a coinfeção pode ser responsável em causar lesões mais graves e aumentar a resposta inflamatória no animal e/ ou humano acometido (Abrahão *et al.*, 2010a; Campos *et al.*, 2011; Cargnelutti *et al.*, 2014), conseqüentemente, os prejuízos na propriedade podem ser maiores. Além das lesões por contato direto, a presença de duas espécies ou mais de poxvirus no leite mostra que o impacto de doenças vesiculares de bovinos na saúde pública e na pecuária é relevante e não pode ser negligenciado.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Devido ao número crescente de surtos de VB que vem ocorrendo no Brasil desde 1999, muitos grupos de pesquisa têm se empenhado nos estudos sobre o VACV.

Apesar da doença clínica ser relatada principalmente em vacas em lactação, bezerros e humanos, sabe-se que o VACV se encontra disseminado nos meios rural e silvestre, com um amplo espectro de hospedeiros. Em bovinos, estudos mostraram que o vírus pode ser eliminado pelas fezes e pelo leite e, esta eliminação pode persistir mesmo após a cicatrização das lesões. Além disso, doença subclínica foi detectada tanto nas vacas em lactação quanto em bovinos de outras categorias (novilhas, vacas secas, touros) os quais também são capazes de eliminar o vírus pelas fezes e, no caso de vacas em lactação, pelo leite. Técnicas moleculares permitiram separar as amostras de VACV isoladas no Brasil em dois grupos por apresentarem características genéticas e patogenicidade distintas. Ao mesmo tempo, foi possível detectar, utilizando essas mesmas técnicas, amostras pertencentes a ambos os grupos de VACV-BR e, até mesmo amostras do gênero PPV, circulando em um mesmo ecossistema. Em alguns surtos de doenças vesiculares, foi observada acoinfecção entre amostras dos grupos 1 e 2 de VACV, e até mesmo entre amostras de VACV e PPV.

No início, acreditava-se que a VB era uma doença localizada, sazonal que acometia um pequeno grupo de risco: vacas em lactação e seus respectivos bezerros e ordenhadores. As pesquisas têm revelado que a VB é uma doença sistêmica, com ciclo ecológico complexo envolvendo animais silvestres, domésticos e humanos. A presença de solução de continuidade no epitélio parece ser a principal forma de transmissão do VACV, porém outras formas de infecção do vírus, como oral e nasal, também podem ocorrer. Desta forma, o grupo de risco passou a ter uma amplitude maior, incluindo: as famílias dos produtores, os transportadores de animais, proprietários e funcionários de laticínios e as pessoas que consomem leite e seus derivados contaminados, principalmente quando elaborados com leite cru.

A presente tese propôs estudar a detecção e transmissão de poxvírus em leite e queijos natural e experimentalmente contaminados. Resumidamente, concluímos que o leite e os queijos artesanais, inclusive maturados, contaminados com VACV têm risco potencial para a saúde pública. Além disso, observamos que o vírus está presente em QMA comerciais, inclusive queijos produzidos em propriedades que não têm histórico de VB. A relação da transmissão do VACV ao consumo desses produtos contaminados ainda não é conhecida. Entretanto, foi relatada a detecção de anticorpos neutralizantes em pessoas que vivem em regiões endêmicas. Essas pessoas nunca tiveram contato com a VB e também nunca foram vacinadas contra o VARV, e tinham o costume de consumir leite e queijos artesanais, sugerindo transmissão do vírus por outra via. Por outro lado, observamos que camundongos após ingestão de leite contaminado experimentalmente com VACV-GP2, não manifestaram doença clínica, entretanto, os animais soroconverteram e apresentaram proteína viral disseminada em vários tecidos. Os resultados observados nos camundongos e a detecção de AN em humanos que não desenvolveram a doença, sugere que a transmissão por via oral após consumo de leite e/ou seus derivados contaminados com VACV em humanos é uma hipótese plausível, uma vez que, da mesma forma como ocorreu em camundongos, os humanos podem manifestar infecção subclínica.

A fervura do leite é recomendada para minimizar a carga de patógenos. Porém o tratamento térmico não pode ser feito na fabricação do queijo Minas artesanal, uma vez que descaracteriza

o produto. A melhor maneira de melhorar a qualidade microbiológica do QMA é a obtenção higiênica do leite em local limpo, além da higienização do ambiente e do manuseio do produto no ato da fabricação, além de manter o rebanho saudável, como recomendado na legislação. Porém, vários trabalhos discutem a qualidade do queijo artesanal, sendo este produto veículo de vários patógenos, inclusive o VACV. Entretanto, as doenças virais transmitidas pelo leite e seus derivados contaminados ainda são pouco abordadas na literatura.

A subnotificação e o descaso dos órgãos públicos podem ser responsáveis pelo quadro atual em que o Brasil se encontra em relação às doenças vesiculares de bovídeos causadas por poxvírus. Estas doenças devem ser abordadas como um problema econômico e de saúde pública e não, simplesmente, como diagnóstico diferencial de febre aftosa. Desse modo, essas doenças necessitam de medidas de prevenção e controle recomendados pelos órgãos públicos, tanto relacionadas à pecuária, quanto à saúde pública. Além disso, as fiscalizações na produção dos queijos artesanais devem ser mais frequentes com coparticipação ativa das cooperativas e dos médicos veterinários particulares e oficiais, para que o produtor possa oferecer um produto com menor risco para a saúde do consumidor.

Mediante a complexidade dos fatos, o controle sanitário do rebanho bovino pela vacinação será a melhor forma de prevenção da VB. Até o momento, não existe uma vacina comercial contra doenças vesiculares de bovinas causadas por poxvírus. Porém, um estudo recentemente realizado pelo nosso grupo de pesquisa em poxviroses do LPVA da Escola de Veterinária da UFMG, propôs a produção de uma vacina contra a VB, a qual apresentou resultados satisfatórios. O trabalho mostrou que existe proteção vacinal evitando o aparecimento de lesões nos tetos de vacas experimentalmente inoculadas com VACV-GP2. Desta forma, a circulação de VACV em bovinos pode ser evitada e, conseqüentemente, casos humanos e eliminação do vírus no ambiente e no leite poderão ser controlados, diminuindo o impacto na saúde pública e na pecuária.

As pesquisas sobre as doenças vesiculares de bovinos no Brasil causadas por poxvírus são importantes e há muitas questões que devem ser elucidadas, principalmente relacionadas ao(s) reservatório(s) dos vírus e à prevalência da doença em bovinos no país e de produtos lácteos contaminados, assim como a real importância desses produtos contaminados como potencial risco de transmissão para humanos durante a manipulação e após o consumo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABRAHÃO, J.S.; OLIVEIRA, T.M.; CAMPOS, R.K. *et al.* Bovine vaccinia outbreaks: detection and isolation of Vaccinia virus in milk samples. *Foodborne Path. Dis.*, v.6, p.1141–1146, 2009a
2. ABRAHÃO, J.S.; LIMA, L.S.; ASSIS, F.L. *et al.* Nested-multiplex PCR detection of *Orthopoxvirus* and *Parapoxvirus* directly from exanthematic clinical samples. *Virol. J.*, v.11, n.6, p.140, 2009b.
3. ABRAHÃO, J.S.; GUEDES, M.I.; TRINDADE, G.S. *et al.* One more piece in the VACV ecological puzzle: Could peridomestic rodents be the link between wildlife and bovine vaccinia outbreaks in Brazil? *PLoS ONE*, v.4, n.10, p.7428, 2009c
4. ABRAHÃO, J.S.; TRINDADE, G.S.; FERREIRA, J.M. *et al.* Long-lasting stability of *Vaccinia virus* strains in murine feces: implications for virus circulation and environmental maintenance. *Arch. Virol.*, v.155, p.1200-1222, 2009d.
5. ABRAHÃO, J.S.; DRUMOND, B.P.; TRINDADE, G.S. *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, p.692-99, 2010a.
6. ABRAHÃO, J.S.; SILVA –FERNANDES, A.T.; ASSIS, F.L. *et al.* Human *Vaccinia virus* and *Pseudocowpox virus* co-infection: clinical description and phylogenetic characterization. *J. Clin. Virol.*, v.48, n.1, p.69-72, 2010b.
7. ABRAHÃO, J.S.; SILVA- FERNANDES, A.T.; LIMA, L.S. *et al.* *Vaccinia virus* infection in Monkeys, Brazilian Amazon. *Emerg. Infect. Dis.*, v.16, n.6, p.976-979, 2010c.
8. ABRAHÃO, J.S.; CAMPOS, R.K.; TRINDADE, G.S. *et al.* Outbreak of severe zoonotic *Vaccinia virus* infection, southeastern Brazil. *Emerg. Infect. Dis.*, v.21, n.4, p.695-98, 2015.
9. ANDRADE, A.A.; SILVA, P.N.; PEREIRA, A.C. *et al.* The vaccinia virus-stimulated mitogen-activated protein kinase (MARK) pathway is required for virus multiplication. *Biochem. J.*, v.381, p. 437-446, 2004.
10. APPL, C.; VON BOMHARD, W.; HANCZARUK, M. *et al.* Feline *Cowpoxvirus* infections in Germany: clinical and epidemiological aspects. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, v.126, n.1-2, p.55-61, 2013.
11. ARAÚJO, A.B.M. *Diagnóstico socioeconômico, cultural e avaliação dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos do queijo Minas artesanal da região de Araxá, MG.* 2004. 121f. Dissertação (mestrado). Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

12. ASSIS, F.L.; BORGES, I.A.; FERREIRA, P.C. *et al.* Group 2 *Vaccinia virus*, Brazil. *Emerg.Infect.Dis.*, v.18, n.12, p.2035-38, 2012.
13. ASSIS, F.L.; BORGES, I.A.; MESQUITA, V.S. *et al.* *Vaccinia virus* in household environment during bovine vaccinia outbreak, Brazil. *Emerg.Infect.Dis.*, v.19, n.12, p.2045-47, 2013a.
14. ASSIS, F.L.; VINHOTE, W.M.; BARBOSA, J.D. *et al.* Reemergence of *Vaccinia virus* during zoonotic outbreak, Pará State, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.*, v.19, n.12, p. 2017-20, 2013b.
15. ASSIS, F.L.; FRANCO-LUIZ, A.P.M.; PAIM, L.M. *et al.* Horizontal study of *Vaccinia virus* infections in endemic area: epidemiologic, phylogenetic and economic aspects. *Arch. Virol.*, v.160, p.2703-08, 2015.
16. AZEVEDO, A.C. Análise microbiológica de queijos Minas artesanal como critério final de avaliação para certificação. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA – CONBRAVET, 31, 2004, São Luís. *Anais...* São Luís: Sociedade de Medicina Veterinária do Maranhão – SOMEVETMA, 2004.
17. BABKIN, I.V.E BABKINA, I.N. Review: The origin of the *Variola virus*. *Viruses*, v.7, p.1100-112, 2015.
18. BARBOSA, A.V.; MEDAGLIA, M.L.G.; SOARES, H.S. *et al.* Presence of neutralization antibodies to *Orthopoxvirus* in Capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) in Brazil. *J.Infect.Dev.Ctries.*, v.8, n.12, p.1646-649, 2014.
19. BENNETT, M. E BAXBY, D. Cowpox. *J.Cli.Microbiol.*, v.45, n.4, p.157-58, 1996.
20. BERA, B.C.; SHANMUGASUNDARAM, K.; BARUA, S. *et al.* Sequence and phylogenetic analysis of host-range (E3L, K3L and C7L) and structural protein (B5R) genes of *Buffalopox virus* isolates from buffalo, cattle and human in India. *Virus Gen.*, v.45, p.488-498, 2012.
21. BERKELMAN, R.L. Human illness associated with use of veterinary vaccines. *Clin. Infect. Dis.*, v.37, n.3, p.407-14, 2003.
22. BERSANO, J.G.; CATROXO, M.H.B.; VILLALOBOS, E.M.C. *et al.* Varíola suína: Estudo sobre a ocorrência de surtos nos estados de São Paulo e Tocantins, Brasil. *Arq. Inst. Biol.*, v.70, n.3, p.269-78, 2003.
23. BONA, C.; DEWALS, B.; WIGGERS, L. *et al.* Pasteurization of milk abolishes bovine herpesvirus 4 infectivity: short communication. *J. Dairy Science*, v.88, n.9, p.3079-83, 2005.
24. BORDOT, D.C. E ZAPPA, V. Febre Aftosa: Revisão de Literatura. *Ver. Cient. Eletr. Med. Vet.*, v.11, n.20, 2013.

25. BORGES, I.A. *Fatores de risco e cadeia de transmissão da vaccínia bovina no estado de Minas Gerais*. 2014. Tese de Doutorado (Microbiologia). Instituto de Ciências Biológicas, UFMG.
26. BRASIL, 1952. Ministério da Agricultura. Decreto nº 30.691 de 29 de março de 1952. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – Riispoa. Disponível em : [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/decreto/1950-1969/D30691.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/1950-1969/D30691.htm) Acessado em: 02 de abril de 2015.
27. BRASIL, 2000. Resolução n. 7, de 28 de novembro de 2000. Critérios de Funcionamento e de Controle da Produção de Queijarias, para seu relacionamento junto ao Serviço de Inspeção Federal. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria Nacional de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 02 jan. 2001.
28. BRASIL, 2002. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002. Aprova os regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite tipo A, do leite tipo B, do leite tipo C, do leite pasteurizado e do leite cru refrigerado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru refrigerado e seu transporte a granel. *Diário Oficial da União*, Brasília, [Brasília, DF], 20 de setembro de 2002. Seção 1, p. 13.
29. BRASIL, 2006. Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional (IPHAN). Inventário Nacional de Referências Culturais (INRC) – Queijo Artesanal de Minas, 2006. Disponível em: <http://portal.iphan.gov.br/portal/baixaFcdAnexo.do?id=3223>. Acessado em 05 de agosto de 2014.
30. BRASIL, 2011. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 57, 15 dez. 2011. Critérios adicionais para elaboração de queijos artesanais. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 16 Dez. 2011. Seção 1, p 23.
31. BRASIL, 2012. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Gabinete do Ministro. Portaria nº 366 de 04 mai. 2012. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 07 mai. 2012a. Seção 1, p 3.
32. BRASIL, 2013a. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Indicadores IBGE. Estatística da Produção Pecuária. Junho de 2013. Disponível em: [http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos\\_201301\\_publicacao\\_completa.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201301_publicacao_completa.pdf) >. Acessado em 14/05/2014.
33. BRASIL, 2013b. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa 30 de 7 de agosto de 2013. Disponível em: <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>
34. BRASIL, 2015. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Indicadores IBGE. Estatística da Produção Pecuária. Disponível em:

[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos\\_201503\\_publ\\_completa.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201503_publ_completa.pdf)

35. BRATT, P.N. e JACOBY, R.O. Stability of *Ectromelia virus* strain NIH-79 under various laboratory conditions. *Lab. Anim. Sci.*, v.37, n.1, p.33-35, 1987.
36. BRUM, M.C.S.; ANJOS, B.L.; NOGUEIRA, C.E.W. *et al.* An outbreak of *Orthopoxvirus*-associated disease in horse in Southern Brazil. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.22, p.143-47, 2010.
37. BULLER, R.M.L. e PALUMBO, G.J. Poxvírus pathogenesis. *Microbiol. Rev.*, v.55, n.1, p.80-122, 1991.
38. BULLER, R.M.L.; CHAKRABARTIS, S.; MOSS, B. *et al.* Cell proliferative response to *Vaccinia virus* is mediated by VGF. *Virology*, v.164, n.1, p.182- 192, 1998.
39. BUTTNER, M. e RZIHA, H.J. Parapoxviruses: from the lesion to a viral genome. *J. Vet. Med. B.*, v. 49, p.7-16, 2002.
40. CALLIS, J.J.; HYDE, J.L.; BLACKWELL, J.H. *et al.* Survival of foot-and-mouth disease virus in milk and milk products. *B. de l'Office Internat. Epizoot.*, v.83, n.3-4, p.183-191, 1975.
41. CAMPOS, M.A.S. E KROON, E.G. Critical period of irreversible block of VACV replication. *Review Microbiol.*, v.24, p.104–110, 1993.
42. CAMPOS, R.K.; BRUM, M.C.S.; NOGUEIRA, C.E.W. *et al.* Assessing the variability of Brazilian *Vaccinia virus* isolates from a horse exanthematic lesion: coinfection with distinct viruses. *Arch. Virol.*, v.156, p.275–283, 2011.
43. CANAL, C.W. e DIEHL, D.G. Poxviridae In: Flores, E. F. (Ed) *Virologia Veterinária*. 2ªed. Editora UFSM. 2012, p.571-603.
44. CARGNELUTTI, J.F.; SCHMIDT, C.; MASUDA, E.K. *et al.* *Vaccinia* viruses isolated from cutaneous disease in horses are highly virulent for rabbits. *Microb. Pathog.*, v.52, n.3, p.192–99, 2012a.
45. CARGNELUTTI, J.F.; FLORES, M.M.; TEIXEIRA, F.R.M. *et al.* Na outbreak of pseudocowpox in fattening calves in southern Brazil. *J. Vet. Diag. Invest.*, v.24, n.2, p.437-41, 2012b.
46. CARGNELUTTI, J.F.; SANTOS, B.S.; LEBRE, S.N. *et al.* Pseudocowpox and papular stomatitis in cattle in the Rondonia state, Brazil (in Portuguese). *Ciência Rural, Santa Maria*. v.44, n.3, p.479-85, 2014.
47. CASTRO, R.D. *Queijo minas artesanal fresco de produtores não cadastrados da mesorregião de Campo das Vertentes, MG: qualidade microbiológica e físico-química em diferentes épocas do ano*. 2015, 125f. dissertação (mestrado). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

48. CHANTREY, J.; MEYER, H.; BAXBY, D.*et al.* Cowpox: reservoir hosts and geographic range. *Epidemiol. Infect.*, v.122,p.455–60, 1999.
49. CHEVILLE, N.F. E SHEY,D.J. Pseudocowpox in dairy cattle. *J.Am.Vet.Med.Assoc.*, v.150, n.8, p.855-61, 1967.
50. CORAS, B., ESSBAUER, S., PFEFFER, M. *et al.* Cowpox and a cat. *Lancet*,v.365, n.9457, 446, 2005.
51. COSTA, G.B. Evidence of *Orthopoxvirus* circulation in a vulnerable rural population in Minas Gerais State. In: PROCEEDINGS OF THE XXIV BRAZILIAN CONGRESS OF VIROLOGY AND VIII MERCOSUR MEETING OF VIROLOGY, Porto Seguro, Bahia. *AnaisVirus Reviews and Research*, 2013, v.18, n.1, p.84–85.
52. COSTA, G.B.; BORGES, I.A.; ALVES, P.A. *et al.* Alternatives routes of zoonotic *Vaccinia virus* transmission, Brazil. *Emerg. Inf. Dis.*, v. 21, n.12, p.2244-46, 2015.
53. CYRKLAKK, M.; RISCO, C.; FERNÁNDEZ, J.J.*et al.* Cryo-electron tomography of *Vaccinia virus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.102, n.8, p.2772-7, 2005.
54. D'ANUNCIÇÃO, L.; GUEDES, M.I.; OLIVEIRA, T.L.*et al.* Filling one more gap: Experimental evidence of horizontal transmission of *Vaccinia virus* between bovines and rodents. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, v.12, n.1, p.61–4,2012.
55. DA FONSECA, F.G.; SILVA, R.L.; MARQUES, J.T., *et al.* The genome of Cowpox virus contains a gene related to those encoding the epidermal growth factor, transforming growth factor alpha and vaccinia growth factor. *Virus Genes*, v.18, n.2,p.151-160, 1999.
56. DA FONSECA, F.G.; TRINDADE, G.S.; SILVA, R.L. *et al.* Characterization of vaccinia-like virus isolated in a Brazilian forest. *J. Gen. Virol.*,v.83, n.1, p.223–8, 2002.
57. DAMASO, C.R.A.; Esposito, J.E.; Condit, R.C. *et al.* An emergent poxvirus from humans and cattle in Rio de Janeiro state: Cantagalo virus may from Brazilian smallpox vaccine. *Virology*,v.27,p.439-49, 2000.
58. DAMON, I.K. Poxviruses. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M (ED)*Fields'Virology*. 5ªed. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven Publishers; 2007. pp. 2948–2974.
59. DAMON, I.K. Orthopoxvirus: Vaccinia (Smallpox Vaccine), Variola (Smallpox), Monkeypox and Cowpox. In: MANDELL, G.L.; BENNETT, J.E.; DOLIN, R. (Ed) *Principles and Practices of Infectious Diseases*, 7ed., Churchill Livingstone Elsevier, Philadelphia, 2010, p.1923-32.
60. DAMON, I.K. Status of human monkeypox: clinical disease, epidemiology and research. *Vaccine.*, v.29S, p.D54-D59, 2011.

61. DA SILVA, A.C.; REIS, B.B.; RICCI JUNIOR, J.E.R. *et al.* Human infection by the cowpoxvirus in the microregion of Itajuba, state of Minas Gerais: case report. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.41, n.5, p.507-11, 2008.
62. DE PAULA, J.C.J.; CARVALHO, A.F.; FURTADO, M.M. Princípios básicos de fabricação de queijos: do histórico à salga. *Ver. Inst. Latic.*, v.64, p.19-25, 2009.
63. DINIZ, S.; TRINDADE, G.; FONSECA, F.G. *et al.* Surto de varíola murina em camundongos suíços em biotério - relato de caso. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.8, n.5, p.152-156, 2001.
64. DOCEUL, V.; HOLLINSHEAD, M.; VAN DER LINDEN, L. *et al.* Repulsion of superinfecting virions: a mechanism for rapid virus spread. *Science*, v.327, n.87, p.873-6, 2010.
65. DONATELE, D.M.; TRAVASSOS, C.E.P.F.; LEITE, J.A. *et al.* Epidemiologia da poxirose bovina no Estado do Espírito Santo, Brasil. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Scien.*, v.44, p.275-282, 2007.
66. DORES, M.T. *Queijo Minas artesanal da Canastra maturado à temperatura ambiente e sob-refrigeração*. 2007, 91f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
67. DORES, M.T. e FERREIRA, C.L.L.F. Queijo Minas artesanal, tradição centenária: ameaças e desafios. *Rev. Bras. Agrop. Sust. (RBAS)*, v.2, n.2, p.26-34, 2012.
68. DRUMOND, B.P.; LEITE, J.A.; FONSECA, C.A. *et al.* Brazilian *Vaccinia virus* strains are genetically divergent and differ from the Lister vaccine strain. *Microbes Infect.*, v.10, n.2, p.185-197, 2008.
69. DURAFFOUR, S.; MEYER, H.; ANDREI, G. *et al.* *Camelpox virus*. *Antiv. Res.*, v.92, n.2, p.167-86, 2011.
70. ESPOSITO, J.J. e FENNER, F. Poxviruses. In: Fields, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M.; GRIFFIN, D.E. (Ed) *Fields' Virology*. Philadelphia, PA: *Lippincott-Raven Publishers*. 2001, p.2885-2921.
71. ESSBAUER, S.; MEYER, H.; PORSCHE-OZCURUMEZ, M. *et al.* Long-lasting stability of VACV (OPV) in food and environmental samples. *Zoon. Pub. Health*, 54(3-4): 118-124, 2007.
72. ESSBAUER, S.; PFEFFER, M.; MEYER, H. Zoonotic poxviruses. *Vet. Microbiol.*, v.140, p.229-236, 2010.
73. ESTEBAN, D.J. E BULLER, R.M. *Ectromelia virus*: the causative agent of mousepox. *J. Gen. Virol.*, v.86, p.2645-59, 2005.
74. FAIRLEY, R.A.; MERCER, A.A.; COPLAND, C.I. *et al.* Persistent *Pseudocowpox virus* infection of the skin of a foot in a cat. *New Zeal. Vet. J.*, v.61 (4), p. 242-43, 2013.

75. FEITOSA, T. Pesquisa de *Salmonella* sp., *Listeria* sp. e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no estado do Rio Grande do Norte. *Ciênc. Tecnol. Alim., Campinas*, v.23, p.162-5, 2003.
76. FENNER, F. The pathogenesis of the acute exanthems. An interpretation based on experimental investigations with mousepox (infectious Ectromelia of mice). *Lancet*, p.915-20, 1948.
77. FENNER, F.; HENDERSON, D.A.; ARITA, I. *et al.* *Smallpox and its eradication*. Geneva: WHO. 1988. 1793p.
78. FENNER, F.; WITTEK, R.; DUMBELL, K.R. The pathogenesis, pathology and immunology of Orthopoxvirus infectious. *Academic Press, San Diego, CA*, 85-141, 1989.
79. FENNER, F. Adventures with poxviruses of vertebrates. *FEMS Microbiol. Rev.*, v.24, p.123-33, 2000.
80. FERREIRA, J.M.; DRUMOND, B.P.; GUEDES, M.I. *et al.* Virulence in murine model shows the existence of two distinct populations of Brazilian Vaccinia virus strains. *Plos ONE*, v.3, n.8, p.1–10, 2008a.
81. FERREIRA, J.M.; ABRAHÃO, J.S.; DRUMOND, B.P. *et al.* Vaccinia virus: shedding and horizontal transmission in a murine model. *J. Gen. Virol.*, v.89, n.12, p.2986-91, 2008b.
82. FLORES, E.D. E KREUTZ, L.C. Replicação viral. In: FLORES, E.D. (Ed) *Virologia Veterinária*. Ed. UFMSM. Santa Maria, 2007, p.109-134.
83. FONSECA, F.G.; LANNA, M.C.S.; CAMPOS, M.A.S. *et al.* Morphological and molecular characterization of the poxvirus BeAn 58058. *Arch. Virol.*, v.143, n.9, p.1171-86, 1998.
84. FOX, P.F. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Cork:General Aspects. Published by Chapman e Hall, 2-6 Boundary Row. 1993, 577p.
85. FRANCO, M.M.J.; PAES, A.C.; RIBEIRO, M.G. *et al.* Occurrence of mycobacteria in bovine milk samples from both individual and collective bulk tanks at farms and informal markets in the southeast region of São Paulo. *BMC Vet.Res.*, v.9, p.85, 2013.
86. FREITAS, L.F.D. *Caracterização da resposta imune induzida pelo vírus Vaccinia Ankara modificado (MVA) em modelo murino*. 2011 nf. Dissertação (Mestrado). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
87. FURTADO, M.M. Queijo do Serro: tradição na história do povo mineiro. *Rev.Inst. Latic. Cândido Tostes.*, v.35, n.210, p.33-36, 1980.

88. GERBER, P.F.; MATOS, A.C.D.; GUEDES, M.I.M.C. *et al.* Validation of immunoperoxidase monolayer assay for total anti-vaccinia virus antibody titration. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.24, p.355-58, 2012.
89. GERMANO, P.M.L. e GERMANO, M.I.S. *Higiene e vigilância sanitária dos alimentos: qualidade das matérias-primas, doenças transmitidas por alimentos e treinamentos de recursos*. 3ed. São Paulo: Manole, 2008, 986p.
90. GIBBS, E.P.; JOHNSON, R.H.; OSBORNE, A.D. The differential diagnosis of viral skin infections of the bovine teat. *Vet.Rec.*, v.87, n.20, p.602-9, 1970.
91. GLEDHILL, A.W. Latent Ectromelia. *Nature*, v.196, p.298, 1962.
92. GOFF, A.; TWENHAFEL, N.; GARRISON, A. *et al.* In vivo imaging of cidofovir treatment of *Cowpox virus* infections. *Vir. Res.*, v.128, p.88-98, 2007.
93. GORAYA, U.M.; QURESHI, Z.A.; ABBAS, M. *et al.* Isolation of buffalo poxvirus from clinical cases and variations in the genetics of the B5R gene over fifty passages. *Virus Genes*, v.51, p.45-50, 2015.
94. GUEDES, M.I.M.C.; REHFELD, I.S.; DE OLIVEIRA, T.M. *et al.* Detection of *Vaccinia virus* in blood and faeces of experimentally infected cows. *Transb. Emerg. Inf. Dis.*, v.60, n.6, p.552-5, 2012.
95. GURAV, Y.K.; RAUT, C.G.; YADAV, P.D. *et al.* Buffalopox outbreak in humans and animals in Western Maharashtra, India. *Prev. Vet. Med.*, v.100, p.242-247, 2011.
96. HAENSSELE, H.A.; KIESSLING, J.; KEMPF, V.A. *et al.* *Orthopoxvirus* infection transmitted by a domestic cat. *J. Am. Acad. Dermatol.*, v.54, n.2, p.1-4, 2006.
97. HARPER, G.J. Airborne micro-organisms: survival tests with four viruses. *J. Hyg.*, v.59, n.8, p.479-86, 1961.
98. HUGHES, A.L. e FRIEDMAN, R. Poxvirus genome evolution by gene gain and loss. *Mol. Phylogenet. Evol.*, v.35, n.1, p.186-195, 2005.
99. HUGHES, C.M.; BLYTHE, D.; YU, L. *et al.* *Vaccinia virus* infections in martial arts gym, Maryland, USA, 2008. *Emerg. Infect. Dis.*, v.17, n.4, p.730-33, 2011.
100. HUTSON, C.L.; NAKAZAWA, Y.J.; SELF, J. *et al.* Laboratory investigations of african pouched rats (*Cricetomys gambianus*) as a potencial reservoir host species for *Monkeypox virus*. *Plos Neglected Trop. Dis.*, v.9, n.10, e0004013, 2015.
101. HUEMER, H.P.; LASSNING, C.; NOWOTNY, N. Cowpox isolate virulent in humans shows attenuated phenotype in mice. *Res. Vet. Sc.*, v.92, p.333-37, 2012.
102. HUQ, F. Effect of temperature and relative humidity on variola virus in crusts. *WHO*, v.54, n.6, p.710-12, 1976.
103. ICTV, 2014. Acessado em: 23 de dezembro de 2015. Disponível em: [http://www.ictvonline.org/taxonomyHistory.asp?taxnode\\_id=19901071&taxa\\_name=Buffalopox%20virus](http://www.ictvonline.org/taxonomyHistory.asp?taxnode_id=19901071&taxa_name=Buffalopox%20virus)

104. ICTV, 2014. Acessado em: 23 de dezembro de 2015. Disponível em: <http://www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp>
105. IKETANI, Y.; INOSHIMA, Y.; ASANO, A. *et al.* Persisten *Parapoxvirus* infection in cattle. *Microb. Immunol.*, v.46, n.4, p.285-91, 2002.
106. INOSHIMA, Y.; MOROOKA, A.; SENTSUI, H. Detection and diagnosis of *Parapoxvirus* by polymerase chain reaction. *J. Virol. Meth.*, v.84, p.201-8, 2000.
107. JAY, J.M. *Microbiologia de Alimentos*. 6 ed. Porto Alegre: Artmed. 2005, 711p.
108. JAYARÃO, B.M. e HENNING, D.R. Prevalence of foodborne pathogens in bulk tank milk. *J. Dairy Sc.*, v.84, n.10, p.2157-62, 2001.
109. JAYARÃO, B.M.; DONALDSON, S.C.; STRALEY, B.A. *et al.* A survey of foodborne pathogens in bulk tank milk and raw milk consumption among farm families in Pennsylvania. *J. Dairy Sc.*, v.89, n.7, p.2451-58, 2006.
110. JOKLIK, W.K. The purification of four strains of poxvirus. *Virology*, v.18, p.9-18, 1962.
111. LANNA, M.C. *Propriedades biológicas dos poxvirus silvestres Cotia e BenAn58058 isolados no Brasil*. 1980, 105f. Dissertação (mestrado), Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
112. LEDERMAN, E.; KHAN, S.U.; LUBY, S. *et al.* Zoonotics parapoxviruses detected in symptomatic cattle in Bangladesh. *BMC Research Notes*, v.7, p.816, 2014.
113. LEEDOM, J.M. Milk of nonhuman origin and infectious diseases in humans. *Clin. Infect. Dis.*, v.43, n.5, p.610-15, 2006.
114. LEITE, J.A.; DRUMMOND, B.P.; TRINDADE, G.S. *et al.* Passatempo virus, a vaccinia virus strain, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.*, v.11, p.1935-38, 2005.
115. LEJEUNE, J.T. e RAJALA-SCHULTZ, P.J. Unpasteurized milk: a continued public health threat. *Clin. Infect. Dis.*, v.48, n.1, p.93-100. 2009.
116. LEWIS-JONES, S. Zoonotic poxvirus infections in humans. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, v.17, p.81-89, 2004.
117. LOBATO, Z.I.P.; TRINDADE, G.S.; MADUREIRA, M.C. *et al.* Surto de variola bovina causada por virus vaccinia na região da Zona da Mata Mineira. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.57, n.4, p.423-429, 2005.
118. LODISH, H.; BERK, A.; MATSUDAIRA, P. *et al.* O transporte transmembrana de íons e pequenas moléculas. In: Junqueira e Carneiro (Ed) *Biologia Celular e Molecular*. 7ª ed., p.475-528.

119. LOPES, O.D.E.S.; LACERDA, J.P.; FONSECA, I.E. *et al.* *Cotia virus*: a new agent isolated from sentinel mice in Sao Paulo, Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* v.14, n.1, p.156–57, 1965.
120. MA, X.; XU, R.H.; ROSCOE, F. *et al.* The mature virion of *Ectromelia virus*, a pathogenic poxvirus, is capable of intrahepatic spread and can serve as a target for delayed therapy. *J. Virol.*, v.87, n.12, p.7046-53, 2013.
121. MACHADO, E.C.; FERREIRA, C.L.L.; FONSECA, L.M. *et al.* Características físico-químicas e sensoriais do queijo Minas artesanal produzido na região do Serro, Minas Gerais. *Ciênc. Tecnol. Alim.*, v.24, n.4, p.516-521, 2004.
122. MADUREIRA, M.C. *Vaccinia bovina no Estado de Minas Gerais, 2005-2007*. 2009,102f. Tese (Doutorado) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
123. MAHNEL, H.; OTTIS, K.; MERLYN, M. Stability in drinking and surface water of nine virus species of different genera. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene*, v.164, n.1-2, p.64-84, 1977.
124. MAIBORODA, A.D. Experimental infection of Norwegian rats (*Rattus norvegicus*) with *Ratpox virus*. *Acta Virol.*; v.2, n.65, p.106–9, 1982.
125. MARTINS, J.M. *Características físico-químicas e microbiológicas durante a maturação do queijo Minas artesanal da região do Serro*. 2006, 158f. Tese (Doutorado Ciência e Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
126. MATOS, A.C.D.; GUEDES, M.I.M.C., REHFELD, I.S. *et al.* Outbreak of *Vaccinia virus* infection in horses in Minas Gerais State. In: XXIV CONGRESSO BRASILEIRO DE VIROLOGIA E VIII ENCONTRO DE VIROLOGIA DO MERCOSUL. Porto Seguro, Bahia. *Anais Virus Reviews and Research*, 2013, v.18, n.1, p.240–241.
127. MATOS, A.C.D.; VILLANI, F.N.A.; GALINARI, G.C.F. *et al.* Bovine *Vaccinia*: testing an inactivated vaccine in cattle. In: XXVI CONGRESSO BRASILEIRO DE VIROLOGIA E X ENCONTRO DE VIROLOGIA DO MERCOSUL. Florianópolis, Santa Catarina. *Anais Virus Reviews and Research*, 2015, v.20, n.1, p.41–42.
128. MAZUR, C.; FERREIRA, I.I.; RANGFEL FILHO, F.B. *et al.* Molecular Characterization of Brazilian Isolates of *Orf virus*. *Vet. Microbiol.*, v.73, p.253-59, 2000.
129. MCFADDEN, G. Poxvírus tropism. *Nat. Rev. Microbiol.*, v.3, n.3, p.201-213, 2005.
130. MCNEIL, A.; LEDERMAN, E.; REYNOLDS, M.G. *et al.* Diagnosis of bovine-associated *Parapoxvirus* infections in humans: molecular and epidemiological evidence. *Zoon.Pub. Health.*, v.57, p.e161-e164, 2010.
131. MEDAGLIA, M.L.G.; PESSOA, L.C.G.D.; SALES, E.R.C. *et al.* Spread of *Cantagalo virus* to Northern Brazil. *Emerg. Infect. Dis.*, v.15, n.7, p.1142-43, 2009.

132. MEDAGLIA, M.L.G.; MOUSSATCHÉ, N.; NITSCHKE, A. *et al.* Genomic analysis, phenotype, and virulence of the historical brazilian smallpox vaccine strain IOC: implications for the origins and evolutionary relationships of *Vaccinia virus*. *J. Virol.*, v.89, n.23, p. 909-925, 2015.
133. MEDEIROS-SILVA, D.C.; MOREIRA-SILVA, E.A.S.; GOMES, J.A.S. *et al.* Clinical signs, diagnosis and reports of *Vaccinia virus* infections. *Braz. J. Infect. Dis.*, v.14, n.2, p.129-134, 2010.
134. MEGID, J.; APPOLINÁRIO, C.M.; LANGONI, H. *et al.* *Vaccinia virus* in humans and cattle in Southwest Region of São Paulo State, Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.79, n.5, p.647-51, 2008.
135. MEGID, J.; BORGES, I.A.; ABRAHÃO, J.S. *et al.* *Vaccinia virus* zoonotic infection, São Paulo State, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.*, v.18, n.1, p.189-91, 2012.
136. MELLO, E.Z. e ARMACHUK, M.A. *Avaliação do queijo colonial durante a maturação: Modificações físico-químicas e microbiológicas*. 2013, Trabalho de conclusão de curso, Universidade Tecnológica do Paraná, Pr.
137. MINAS GERAIS, 2002b. Lei Estadual nº 14.185 de 31 de janeiro de 2002. Dispõe sobre o processo de produção do queijo Minas artesanal e da outras providências. Minas Gerais Diário do Executivo, de 01 de fevereiro de 2002, p.3, col. 1. Disponível em: [http://imanel.ima.mg.gov.br/nova/gec/outros\\_documentos/14185.pdf](http://imanel.ima.mg.gov.br/nova/gec/outros_documentos/14185.pdf)
138. MINAS GERAIS, 2003a. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. Portaria n. 594 de 10 jun. 2003a. Identifica a microrregião de Araxá. Disponível em: [http://www.ima.mg.gov.br/component/docman/doc\\_details/244-portaria-594](http://www.ima.mg.gov.br/component/docman/doc_details/244-portaria-594) Acessado em: 05 dez. 2014.
139. MINAS GERAIS, 2003b. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. Portaria n. 619 de 01 dez. 2003b. Identifica a microrregião do Cerrado. Disponível em: [http://www.ima.mg.gov.br/component/docman/doc\\_details/256-portaria-619](http://www.ima.mg.gov.br/component/docman/doc_details/256-portaria-619) Acessado em: 05 dez. 2014.
140. MINAS GERAIS, 2004. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. Portaria n. 694 de 17 nov. 2004. Identifica a microrregião da Canastra. Disponível em: [http://www.ima.mg.gov.br/component/docman/doc\\_details/276-portaria-694](http://www.ima.mg.gov.br/component/docman/doc_details/276-portaria-694) Acessado em: 05 dez. 2014.
141. MINAS GERAIS, 2006. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA- IMA. Portaria n. 818, de 12 de dezembro de 2006. Baixa o regulamento técnico de produção do Queijo Minas Artesanal e dá outras providências. Disponível em: [http://www.ima.mg.gov.br/component/docman/doc\\_details/338-portaria-818](http://www.ima.mg.gov.br/component/docman/doc_details/338-portaria-818). Acessado em: 09 dez. 2014.
142. MINAS GERAIS, 2008. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA (IMA).

Disponível em: <http://www.ima.mg.gov.br/> Acessado em julho de 2013.

143. MINAS GERAIS, 2008b. ASSEMBLÉIA LEGISLATIVA DO ESTADO DE MINAS GERAIS. Decreto nº 44.864 de 01 de agosto de 2008. Altera o regulamento da lei nº 14.185 de 31 de janeiro de 2002, que dispõe sobre o processo de produção do queijo de minas artesanal. Diário do Executivo. Minas Gerais, Belo Horizonte, 2 ago. 2008. p. 1 col. 2. Disponível em: <http://www.almg.gov.br>. Acessado em: 07 dez. 2014.
144. MINAS GERAIS, 2009. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA- IMA. Portaria n. 1022 de 3 nov. 2009. Identifica a região de Campo das Vertentes. Disponível em: [http://imanet.ima.mg.gov.br/nova/legis/portarias\\_pdf/1022.pdf](http://imanet.ima.mg.gov.br/nova/legis/portarias_pdf/1022.pdf). Acessado em: 05 dez. 2014.
145. MINAS GERAIS, 2013. Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA). Portaria 1305, 30 de abril, 2013. Disponível em: [http://www.ima.mg.gov.br/portarias/doc\\_details/1159-portaria-no-1305-de-30-de-abril-de-2013](http://www.ima.mg.gov.br/portarias/doc_details/1159-portaria-no-1305-de-30-de-abril-de-2013)
146. MINAS GERAIS, 2014a. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. Portaria nº 1397, de 13 fev. 2014a. Identifica a Microrregião do Triângulo Mineiro como produtora de Queijo Minas Artesanal. Disponível em: [http://www.ima.mg.gov.br/material-curso-cfo-cfoc/doc\\_details/1315-portaria-no-1397-de-13-de-fevereiro-de-2014](http://www.ima.mg.gov.br/material-curso-cfo-cfoc/doc_details/1315-portaria-no-1397-de-13-de-fevereiro-de-2014) Acessado em: 05 dez. 2014.
147. MINAS GERAIS, 2014b. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. Portaria nº 1428, de 29 ago. 2014b. Identifica a microrregião da serra do salitre como produtora do queijo Minas artesanal. Disponível em: <http://www.ima.mg.gov.br/component/search/?searchword=Queijo+Artesanal&ordering=&searchphrase=all> Acessado em: 05 dez. 2014.
148. MOSS, B. Poxviridae: The Viruses and Their Replication. In: KNIPE, D.M., HOWLEY, P.M. (Ed), *Field's Virology*, 5ed. Lippincot Williams & Wilkins. 2007, 2905–2945
149. MURINDA, S.E.; NGUYEN, L.T.; IVEY, S.J. *et al.* Prevalence and molecular characterization of *Escherichia coli* O157:H7 in bulk tank milk and fecal samples from cull cows: a 12-months survey of dairy farms in east Tennessee. *J.Food Protect.*, v.65, n.5, p.752-759, 2002.
150. NAGASSE-SUGAHARA, T.K.; KISIELIUS, J.J.; UEDA-ITO, M. *et al.* Human vaccinia-like virus outbreaks in São Paulo and Goiás States, Brazil: virus detection, isolation and identification. *Rev. Inst. Med. Trop.*, v.46, p.315-322, 2005.
151. OGUZOGLU, T.C.; KOÇ, B.T.; KIRDECI, A. *et al.* Evidence of zoonotic *Pseudocowpox virus* infection from a cattle in Turkey. *Virus Dis.*, v.25, n.3, p. 381-84, 2014.
152. OJEDA, S.; DOMI, A.; MOSS, B. *Vaccinia virus* G9 protein is an essential component of the poxvirus entry-fusion complex. *J. Virol.*, v.80, n.19, 9822-30, 2006.

153. OLIVEIRA, T.M.; REHFELD, I.S.; SIQUEIRA, J.M. *et al.* *Vaccinia virus* is not inactivated after thermal treatment and cheese production using experimentally contaminated milk. *Foodborne Path. Dis.*, v.7, n.12, p.1491–96, 2010.
154. OLIVEIRA, D.B.; ASSIS, F.L.; FERREIRA, P.C.P. *et al.* Short report: Group 1 *Vaccinia virus* zoonotic outbreak in Maranhão State, Brazil. *Am.J.Trop.Med.Hyg.*, v.89, n.6, p.1142-45, 2013.
155. OLIVEIRA, T.M. *Vaccinia virus: detecção e viabilidade no leite de vacas experimentalmente inoculadas*. 2014, 92f Tese (Doutorado), Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
156. OLIVEIRA, G.P. *Vaccinia virus: avaliação da diversidade biológica e molecular de clones virais isolados de espécimes clínicos humanos e bovinos*. 2015 nf. Dissertação (Mestrado). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
157. OLIVEIRA, T.M.L.; GUEDES, M.I.M.C.; REHFELD, I.S. *et al.* Detection of *Vaccinia virus* in milk: evidence of a systemic and persistente infection in experimentally infected cows. *Foodborne Path. Dis.*, v.12, n.11, p.898-903, 2015a.
158. OLIVEIRA, G.P.; ASSIS, F.; ALMEIDA, G. *et al.* From lesions to viral clones: biological and molecular diversity amongst authchtonous Brazilian *Vaccinia virus*. *Viruses*, v.7, p.1218-37, 2015b.
159. OLIVER, S.P.; JAYARÃO, B.M.; ALMEIDA, R.A. Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: food safety and public health implications *Foodborne Pathog. Dis.*, v.2, n.2, p.115-129, 2005.
160. ORNELAS, E.A. *Diagnóstico preliminar para a caracterização do processo e das condições de fabricação do queijo artesanal da Serra da Canastra, MG*. 2005, nf dissertação (mestrado). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
161. PERES, M.G.; BARROS, C.B.; APOLINÁRIO, C.M. *et al.* Dogs and Opossums positive for *Vaccinia virus* during outbreak affecting cattle and humans, São Paulo State, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.*, v.22, n.2, 2016.
162. PERRY, K.S.P. Queijos: Aspectos físicos, bioquímicos e microbiológicos. *Química Nova*, v.27, n.2, p.293-300, 2004.
163. PINTO, M.S. *Efeito da microbiota endógena e da nisina sobre Listeria sp. e Staphylococcus aureus em queijo Minas artesanal do Serro*. 2008, 71f. Tese (Doutorado), Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
164. QUIXABEIRA-SANTOS, J.C.; MEDAGLIA, M.L.G.; PESCADOR, C.A. *et al.* Animal movement and establishment of *Vaccinia virus* Cantagalo strain in Amazon Biome, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.*, v.17, n.4, p.726-29, 2011.
165. R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R

*Foundation for Statistical Computing*, Vienna, Austria, 2013, 3464p.

166. REHFELD, I.S.; GUEDES, M.I.; MATOS, A.C. *et al.* Clinical, hematological and biochemical parameters of dairy cows experimentally infected with *Vaccinia virus*. *Res.Vet. Sc.*, v.95, p.752-57, 2013.
167. REHFELD, I.S.; GUEDES, M.I.M.C.; FRAIHA, A.L.S. *et al.* *Vaccinia virus*: transmission through experimentally contaminated milk using murine model. *PlosOne*, v.10, n5, p.e0127350, 2015.
168. RESENDE, E.C. *Aspectos microbiológicos do queijo minas artesanal da microrregião Campo das Vertentes*. 2014, 114f. Dissertação (mestrado). Ciência e Tecnologia do leite e derivado, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora.
169. REYNOLDS, M.G.; CARROLL, D.S.; OLSON, V.A. *et al.* A silent enzootic of an *Orthopoxvirus* in Ghana, West Africa: evidence for multi-species involvement in the absence of widespread human disease. *J. Am. Trop. Med. Hyg.*, v.82, n.4, 746-54, 2010.
170. REYNOLDS, M.G.; CARROLL, D.S.; KAREM, K.L. Factors affecting the likelihood of monkeypox's emergence and spread in the post-smallpox era. *Current Opinion in Virol.*, v.2, p.335-343, 2012.
171. RIVETTI, A.V.; GUEDES, M.I.M.C.; REHFELD, I.S. *et al.* Bovine vaccinia, a systemic infection: Evidence of fecal shedding, viremia and detection in lymphoid organs. *Vet. Microbiol.*, v.162, n.1, p.103-11, 2013.
172. ROBINSON, R.K. *Dairy Microbiology Handbook*. 3Ed. Copyright © 2002. Wiley-Interscience, Inc. New York – USA. Microbiology of soft cheese. 2002, p.479-513, 765p.
173. ROHRBACH, B.W.; DRAUGHON, F.A.; DAVIDSON, P.M. Prevalence of *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica*, and *Salmonella* in bulk tank milk: risk factors and risk of human exposure. *J.Food Protect.*, v.55, p.93-97, 1992.
174. SANT'ANA, F.J.F.; RABELO, R.E.; VULCANI, V.A.S. *et al.* Bovine papular stomatitis affecting dairy cows and milkers in midwestern Brazil. *J. Vet. Diag. Invest.*, v.24, n.2, p.442-5, 2012.
175. SANT'ANA, F.J.F.; LEAL, F.A.A.; RABELO, R.E. *et al.* Coinfection by *Vaccinia virus* and na *Orf virus*-like *Parapoxvirus* in an outbreak of vesicular disease in dairy cows in Midwestern Brazil. *J. Vet. Diag. Invest.*, v.25, n.2, p.267-72, 2013.
176. SANTOS, A.S. *Queijo Minas artesanal da microrregião do Serro: Efeito da sazonalidade sobre a microbiota do leite cru e comportamento microbiológico durante a maturação*. 2010, 67f. Dissertação (Mestrado). Escola de Zootecnia, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina.

177. SARKAR, J.K.; MITRA, A.C.; MUKHERJEE, M.K. *et al.* Virus excretion in smallpox. Excretion in the throats of household contacts. *WHO*, v.48, p.523–27, 1973.
178. SAUERBREI, A. e WUTZLER, P. Testing thermal resistance of virus. *Arch. Virol.*, v.154, n.1, p.115-19, 2009.
179. SCHATZMAYR, H. G.; LEMOS, E. R.; MAZUR, C. *et al.* Detection of poxvirus in cattle associated with human cases in the State of Rio de Janeiro: preliminary report. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, v.95, n.5, p.625-27, 2000.
180. SCHATZMAYR, H.G.; COSTA, R.V.C.; GONÇALVES, M.C.R. *et al.* Human infections caused by vaccinia-like poxviruses in Brazil [in portuguese]. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.42, n.6, p.672-6, 2009.
181. SELLERS, R.F. Inactivation of foot-and-mouth disease virus in milk. *British Vet. Journal*, v.125, n.4, p.163-67, 1969.
182. SILVA, M.P. e LAVINAS, F.C. Virose alimentar: microbiologia das principais doenças de origem alimentar transmitidas por vírus. *Saúde & Amb. Ver.*, v.5, n.1, p.33-43, 2010.
183. SILVA-FERNANDES, A.T.; TRAVASSOS, C.E.P.F.; FERREIRA, J.M.S.F. *et al.* Natural human infections with *Vaccinia virus* during bovine vaccinia outbreaks. *J.Clin. Virol.*, v.44, n.4, p.308-13, 2009.
184. SINGH, R.K.; HOSAMANI, M.; BALAMURUGAN, V. *et al.*, Buffalopox: an emerging and re-emerging zoonosis. *Anim. Health Res. Rev.*, v.8, n.1, p.105-14, 2007.
185. SINGH, R.K.; BALAMURUGAN, V.; BHANUPRKASH, V. *et al.* Emergence and reemergence of Vaccinia-like viruses: global scenario and perspectives. *Indian J. Virol.*, v.23, n.1, p.1–11, 2012.
186. SMITH, G.L.; MURPHY, B.J.; LAW, M. *Vaccinia virus* motility. *Ann. Rev. Microbiol.*, v.28, n.3, p.149-85, 2002.
187. SMITH, J.L. The role of gastric acid in preventing foodborne disease and how bacteria overcome acid conditions. *J. Food Prot.*, v.66, n.7, p.1292-303, 2003.
188. THOMASSEN, H.A.; FULLER, T.; ASEFI-NAJAFABADY, S. *et al.* Pathogen-host associations and predicted range shifts of human monkeypox in response to climate change in Central Africa. *PlosOne.*, v.8, n.7, p.e66021, 2013.
189. THORMAR, H.; ISAACS, C.E.; BROWN, H.R. *et al.* Inactivation of enveloped viruses and killing of cells by fatty acids and monoglycerides. *Antimicrob Agents Chemother.*, v.31, n.1, p.27-31, 1987.
190. TOMASULA, P.M. e KONSTANCE, R.P. The survival of foot-and-mouth disease virus in raw and pasteurized milk and milk products. *J. Dairy Sc.*, v.87, n.4, p.1115-12, 2004.

191. TRINDADE, G.S.; FONSECA, F.G.; MARQUES, J.T. *et al.* Araçatuba virus: a Vaccinia like virus associated with Infection in humans and cattle. *Emerg. Infect. Dis.*, v.9, n.2, p.1-9, 2003.
192. TRINDADE, G.S.; FONSECA, F.G.; MARQUES, J.T. *et al.* Belo Horizonte virus: a vaccinia-like virus lacking the A-type inclusion body gene isolated from infected mice. *J.Gen. Virol.*, v.85, p.2015-21, 2004.
193. TRINDADE, G.S.; LOBATO, Z.I.P.; DRUMOND, B.P. *et al.* Short Report: isolation of two *Vaccinia virus* strains from a single bovine vaccinia outbreak in rural area from Brazil: implications on the emergence of zoonotic orthopoxviruses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.75, n.3, p.486-90, 2006.
194. TRINDADE, G.S.; DRUMOND, B.P.; GUEDES, M.I.M.C. *et al.* Zoonotic *Vaccinia virus* infection in Brazil: clinical description and implications for health professionals. *J. Clin. Microbiol.*, v.45, n.4, p.1370-72, 2007a.
195. TRINDADE, G.S.; GINNY, E.; DARIN, S. *et al.* Brazilian *Vaccinia virus* and their origins. *Emerg. Infect. Dis.*, v.13, n.7, p.965-72, 2007b.
196. TRINDADE, G.S.; LI, Y.; OLSON, V.A. *et al.* Real-time PCR assay to identify variants of *Vaccinia virus*: Implications for the diagnosis of bovine vaccinia in Brazil. *J. Virol. Methods.*, v.152, n.1-2, p.63-71, 2008.
197. TRINDADE, G.S.; DRUMOND, B.P.; GUEDES, M.I.M.C. *et al.* Zoonotic *Vaccinia virus*: clinical and immunological characteristics in a naturally infected patient. *Clin. Infect. Dis.*, v.48, n.3, p.37-40, 2009.
198. TZAHAR, E.; MOYER, J.D.; WATERMAN, H. *et al.* Pathogenic poxviruses reveal viral strategies to exploit the ErbB signaling network. *Embo J.*, v.17, p.5948-63, 1998.
199. VAN KESSEL, J.A.; KARNS, J.S.; GORSKI, L. Prevalence of *Salmonella* sp, *Listeria monocytogenes* and fecal coliforms in bulk tank milk on U.S. dairies. *J. Dairy Sc.*, v.87, n.9, p.2822-30, 2004.
200. VENEABLES, C.; LYSONS, R.; HORIGAN, M. *et al.* Bovine immunodeficiency-like virus: inactivation in milk by pasteurization. *Vet. Rec.*, v.140, n.11, p.275, 1997.
201. VENKATESAN, G.; BALAMURUGAN, V.; PRABHU, M. *et al.* Emerging and re-emerging zoonotic buffalopox infection: a severe outbreak in Kolhapur (Maharashtra), India. *Vet. Ital.*, v.46, n.4, p.439-48, 2010.
202. WALSTRA, P.; GEURTS, T.J.; NOOMEN, A. *et al.* *Dairy technology: principles of milk properties and processes*. Food Sc.Techn. Marcel Dekker, Inc. New York – Basel. 1999, 727p.
203. WAHL-JENSEN, V.; CANN, J.A.; RUBINS, K.H. Progression of pathogenic events in cynomolgus macaques infected with *Variola virus*. *PLoS ONE*. v.6, n.10, p.24832, 2011.

204. WALLACE, G.D. e BULLER, R.M. Kinetics of *Ectromelia virus* (mousepox) transmission and clinical response in C57BL/6j, BALB/cByj and AKR/J inbred mice. *Lab. Anim. Sci.*, v.35, n.1, p.41-46, 1985.
205. ZAUCHA, G.M.; JAHRLING, P.B.; GEISBERT, T.W. The pathology of experimental aerosolized *Monkeypox virus* infection in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Lab Invest.*, v.81, p.1581-1600, 2001.

## ANEXO 1

RESEARCH ARTICLE

# *Vaccinia virus* Transmission through Experimentally Contaminated Milk Using a Murine Model

Izabelle Silva Rehfeld<sup>1</sup>, Maria Isabel Maldonado Coelho Guedes<sup>1</sup>, Ana Luiza Soares Fraiha<sup>1</sup>, Aristóteles Gomes Costa<sup>1</sup>, Ana Carolina Diniz Matos<sup>1</sup>, Aparecida Tatiane Lino Fiúza<sup>2</sup>, Zélia Inês Portela Lobato<sup>1\*</sup>

**1** Laboratório de Pesquisa em Virologia Animal (LPVA), Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil,  
**2** Laboratório de Patologia Veterinária, Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

\* [ziplobato@gmail.com](mailto:ziplobato@gmail.com)

