

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS – UFMG
ESCOLA DE VETERINÁRIA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA - DMVP
Colegiado dos Cursos de Pós-Graduação

**VACCÍNIA BOVINA EM VACAS SECAS E
LACTANTES EXPERIMENTALMENTE INOCULADAS
COM O *Vaccinia virus***

Izabelle Silva Rehfeld

Belo Horizonte

2011

Izabelle Silva Rehfeld

**VACCÍNIA BOVINA EM VACAS SECAS E
LACTANTES EXPERIMENTALMENTE INOCULADAS
COM O *Vaccinia virus***

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do grau de mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Professora Dra. Zélia Inês Portela Lobato

Co-orientadora: Dra. Maria Isabel Maldonado Coelho Guedes

Belo Horizonte

2011

Dissertação defendida e aprovada em 08 de agosto de 2011, pela Comissão Examinadora constituída por:



Profª. Zélia Inês Portela Lobato
Presidente



Profª. Marieta Cristina Madureira



Prof. Roberto Mauricio Carvalho Guedes



Prof. Elias Jorge Facury Filho

Rehfeld, Isabelle Silva, 1981-

R345v *Vaccinia bovina em vacas secas e lactantes experimentalmente inoculadas com o *Vaccinia vírus* / Isabelle Silva Rehfeld. – 2011.*
98 p. : il.

Orientadora: Zélia Inês Portela Lobato

Co-orientadora: Maria Isabel Maldonado Coelho Guedes

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária

Inclui bibliografia

1. Bovino de leite – Doenças – Teses. 2. Tetas – Ferimentos e lesões – Teses.
3. Vacínia – Teses. I. Lobato, Zélia Inês Portela. II. Guedes, Maria Isabel Maldonado Coelho. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. IV. Título.

CDD – 636.214 089 69

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, o meu eterno agradecimento será para as protagonistas do experimento... as vacas. Elas foram fundamentais na realização desse trabalho tão grandioso.

Ao Seu Zé e Seu Geraldo, duas pessoas indispensáveis no experimento. Fico pensando se o manejo das vacas ficasse por conta das mulheres do laboratório. Afff! Obrigada pela paciência e dedicação.

Ao LANAGRO, por ter cedido o espaço para realização do experimento. Obrigada!

À Profa. Zélia, por ter me acolhido no laboratório, pelos ensinamentos e pela orientação. Você é meu exemplo de pessoa, veterinária, professora e pesquisadora. Estar ao lado de uma profissional como você só tem a acrescentar. Muitíssimo obrigada!!!

À Bel, outro exemplo a ser seguido. Pessoa sempre disposta a ajudar, com um coração enorme e super competente. Nesse tempo de convivência, madrugando em “PL city”, debaixo de chuva, no calor infernal ou na geada; recebendo coice, cabeçada e rabada das nossas queridas vaquinhas, aprendi bastante com você. Foram muitos os momentos de emoção, não foram? Espero poder continuar trabalhando com você.

Ao Prof. Roberto Guedes, pelas necropsias realizadas e pelos ensinamentos de histopatologia. Muito obrigada!

À Fabíola Fukushima, pela disponibilidade de nos acompanhar e realizar a eutanásia de alguns animais.

Ao Prof. Paulo Ricardo, gostaria de agradecê-lo pelos ensinamentos e pela paciência para comigo nas análises dos resultados da Patologia Clínica. Aproveitando, gostaria de agradecer também ao Laboratório de Patologia Clínica, principalmente a Carol, pelo processamento das amostras.

Ao Prof Marcos Xavier pela paciência e disponibilidade de realizar as análises estatísticas do trabalho.

Ao Prof. Marcos, Prof. Ernani e Prof. Rubens, mesmo não participando diretamente do experimento, meu eterno agradecimento. Vocês contribuíram e contribuem muito para o meu crescimento.

Em especial, agradeço aos companheiros de “PL city”, Tércia, Carol, Bel, Anselmo, Luis, Fabinha e Pri. Durante um ano e meio de experimento, descobrimos várias vocações para pedreiro, mestre de obra, faxineiro, costureiro, vaqueiro, pintor, marceneiro. E descobrimos que a veterinária não se esconde apenas atrás de tubos falcon, eppendorfs, béqueres, camundongos, etc... ela vai muito além disso.

À Grazi, pelos bate-papos, pelo carinho e principalmente, pelas ajudas e disponibilidade. Às vezes não sei como você dá conta... trabalha, estuda, cuida da casa e do Igor. Você é uma pessoa admirável e merece todo o sucesso do mundo.

À Fabinha, pela amizade e companheirismo. Você é a pessoa mais pura de alma que já conheci. Continue sempre assim, pois você só colherá frutos bons.

À Alessandra, pelo carinho, pela amizade, pela alegria e pelos bombons que adoçam nossos momentos de estresse. É um prazer poder conviver com você. Torço muito pelo seu sucesso.

À Carol, minha companheira de viagens e perrenhes, obrigada pela alegria, pelo companheirismo e parceria. Já enfrentamos muitas coisas juntas, né? Desejo a você muito sucesso na vida. Ahhh!! E seja menos estressada... isso só nos traz dor de estômago e enxaqueca.

À Pri, pelos conselhos, atenção e disponibilidade. Desejo tudo de melhor para você.

À Amanda, pessoa mais alegre que já conheci. Admiro muito sua competência e inteligência.

Aos meus queridos companheiros do laboratório de virologia animal, que me acolheram com carinho. Conviver e trabalhar com vocês é muito prazeroso.

Aos colegas de corredor que emprestam material de última hora, que disponibilizam equipamentos e o espaço dentro de seus laboratórios... obrigada por tudo.

Ao Eduardo e às meninas da limpeza que são dedicados, trabalhadores, bem dispostos e muito pacientes. Fico muito agradecida por existir pessoas assim como vocês.

À minha família... pai, mãe, irmãos e sobrinho: família que não escolhemos, mas se eu pudesse escolher, escolheria exatamente vocês e viveria tudo novamente. Quem sou hoje devo a vocês. Em cada decisão, em cada escolha, tive o apoio de vocês. Tive muitos puxões de orelha, tapas no bumbum, escutei muitos 'NÃO', mas ao mesmo tempo tive muito amor, carinho e compreensão... Não tem coisa melhor para mim em saber que o 'colinho' de vocês está sempre disponível, mesmo que seja para me dar uma bronca. Pai, mãe, André, Paula e Matheus vocês são tudo pra mim.

Ao Gabriel, meu "Gabiru", obrigada pelo amor, pela dedicação, pela paciência e pelo companheirismo durante todo esse tempo. Você é muito importante na minha vida e pode ter certeza que estarei sempre ao seu lado para o que der e vier.

Aos meus amigos eternos, Jô, Carol, Tetê e Wériton, obrigada por tudo. Onde quer que vocês estejam terão sempre a minha lealdade. Vocês são os irmãos que eu escolhi.

Para finalizar, gostaria de agradecer a todos, que de alguma forma me ajudaram a chegar até aqui. Muito, muito, muito obrigada !!!

Agora é "bola para frente" porque o tempo não para, a vida é muito curta e ainda temos muita coisa para descobrir...

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	11
LISTA DE TABELAS.....	14
LISTA DE ABREVIATURAS.....	15
APRESENTAÇÃO DA DISSERTAÇÃO.....	18
RESUMO PRINCIPAL.....	19
ORGANOGRAMA DA DISSERTAÇÃO.....	21
INTRODUÇÃO GERAL.....	22
REVISÃO DE LITERATURA.....	23
1. Família <i>Poxviridae</i>	23
1.1. Os poxvírus e a estrutura viral.....	23
1.2. Estrutura do genoma	23
1.3. Multiplicação viral.....	23
1.4. Patogênese dos poxvirus.....	25
2. Gênero <i>Orthopoxvirus</i> (OPXV).....	27
2.1. <i>Vaccinia virus</i> (VACV).....	27
2.2. VACV no Brasil.....	27
2.3. VACV Guarani P2 (VACV-GP2).....	30
3. Características das lesões.....	30
3.1. Sinais clínicos.....	30
3.2. Achados Histopatológicos.....	33
3.3. Achados Hematológicos e Bioquímicos.....	33
4. Mastite.....	34
CAPÍTULO 1: Evolução clínico-patológica da vaccínia bovina em vacas secas experimentalmente inoculadas com <i>Vaccinia virus</i> (VACV).....	35
RESUMO.....	35
1. INTRODUÇÃO.....	37
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	37
2.1. Local do experimento e instalações.....	37
2.2. Animais inoculados.....	37
2.3. Alimentação dos animais.....	37
2.4. Vírus utilizado.....	38
2.5. Escarificação e Inoculação.....	38
2.6. Acompanhamento dos animais.....	38

2.7. Ordenha.....	39
2.8. Eutanásia.....	39
2.9. Material coletado.....	39
2.9.1. Amostras de tecidos.....	39
2.9.2. Soro sanguíneo.....	39
2.9.3. Crostas.....	39
2.10. Testes realizados.....	39
2.10.1. Análise Histopatológica.....	39
2.10.2. Imuno-histoquímica.....	40
2.10.3. Imunoperoxidase em monocamada celular.....	40
2.10.4. Soroneutralização.....	40
2.10.5. PCR-nested.....	41
2.10.6. Isolamento e purificação viral.....	41
2.11. Comitê de Ética.....	41
2.12. Análise Estatística.....	41
3. RESULTADOS.....	41
3.1. Exame clínico e análise macroscópica dos tecidos.....	41
3.2. Evolução das lesões.....	41
3.3. Anticorpos totais e neutralizantes contra VACV.....	43
3.4. Coleta de crostas.....	43
3.5. PCR-nested.....	43
3.6. Isolamento viral.....	43
3.7. Padronização da técnica de IHQ.....	43
3.8. Achados histopatológicos.....	43
3.9. Imuno-histoquímica.....	43
4. DISCUSSÃO.....	49
5. CONCLUSÕES.....	51
CAPÍTULO 2: Métodos de inoculação para reprodução da vaccínia bovina em bovino.....	52
RESUMO.....	52
1. INTRODUÇÃO.....	54
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	54
2.1. Local do experimento e instalações.....	54
2.2. Animais inoculados.....	54
2.3. Alimentação dos animais.....	54
2.4. Vírus utilizado.....	54

2.5. Escarificação e inoculação.....	55
2.6. Acompanhamento clínico.....	55
2.7. Ordenha.....	55
2.8. Eutanásia.....	55
2.9. Material coletado.....	57
2.9.1. Amostras de tecidos.....	57
2.9.2. Soro sanguíneo.....	57
2.9.3. Suabe da lesão oral e crostas dos tetos.....	57
2.10. Testes realizados.....	57
2.10.1. Análise Histopatológica.....	57
2.10.2. Imuno-histoquímica.....	57
2.10.3. Imunoperoxidase em monocamada celular.....	57
2.10.4. Soroneutralização.....	57
2.10.5. PCR-nested.....	57
2.11. Comitê de Ética.....	57
2.12. Análise Estatística.....	57
3. RESULTADOS.....	57
3.1. Evolução Clínica.....	57
3.2. Métodos de escarificação e o tipo de inóculo usado.....	58
3.3. Achados anátomo-histopatológicos.....	58
3.4. Imuno-histoquímica.....	58
3.5. Anticorpos totais e neutralizantes contra VACV.....	59
3.6. PCR-nested.....	59
4. DISCUSSÃO.....	62
5. CONCLUSÕES.....	63
CAPÍTULO 3: Acompanhamento clínico, hematológico e bioquímico de vacas lactantes experimentalmente inoculadas com o vírus da vaccínia bovina e reinoculadas ou imunodeprimidas.....	64
RESUMO.....	64
1. INTRODUÇÃO.....	66
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	66
2.1. Local do experimento e instalações.....	66
2.2. Animais inoculados.....	66
2.3. Alimentação dos animais.....	67
2.4. Avaliação clínica.....	67
2.5. Delineamento experimental.....	67

2.6. Tratamento dos animais experimentais.....	67
2.6.1. Fase 1: Inoculação do VACV-GP2 em vacas lactantes.....	67
2.6.2. Fase 2: Animais imunodeprimidos.....	68
2.6.3. Fase 2: Animais reinoculados.....	68
2.7. Ordenha.....	68
2.8. Material coletado.....	68
2.8.1. Soro sanguíneo.....	68
2.8.2. Sangue total.....	68
2.8.3. Suabes das lesões orais e crostas dos tetos.....	69
2.8.4. Leite.....	69
2.9. Testes realizados.....	69
2.9.1. Imunoperoxidase em monocamada celular.....	69
2.9.2. Soroneutralização.....	69
2.9.3. Testes hematológicos e bioquímicos.....	69
2.9.4. PCR-nested.....	70
2.9.5. Isolamento viral.....	70
2.10. Destino dos animais.....	70
2.11. Comitê de Ética.....	70
2.12. Análise Estatística.....	70
3. RESULTADOS.....	70
3.1. Evolução clínica.....	70
3.1.1. Fase 1: Animais inoculados.....	70
3.1.2. Fase 2: Animais imunodeprimidos.....	71
3.1.3. Fase 2: Animais reinoculados.....	71
3.2. Mastite clínica e subclínica.....	71
3.3. Produção de leite.....	72
3.4. Anticorpos totais e neutralizantes contra VACV.....	72
3.4.1. Fase 1: Animais inoculados.....	72
3.4.2. Fase 2: Animais imunodeprimidos.....	72
3.4.3. Fase 2: Animais reinoculados.....	72
3.5. PCR-nested.....	72
3.6. Isolamento viral.....	72
3.7. Patologia clínica.....	72
3.7.1. Fase 1: Animais inoculados.....	72
3.7.2. Fase 2: Animais imunodeprimidos.....	73

3.7.3. Fase 2: Animais reinoculados.....	73
3.8. Achados macroscópicos dos tecidos após o abate dos animais.....	73
4. DISCUSSÃO.....	78
4.1. Fase 1: Animais inoculados.....	78
4.2. Fase 2: Animais imunodeprimidos e reinfectedados.....	81
5. CONCLUSÕES.....	81
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	83
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85
ANEXO 1.....	90
ANEXO 2.....	92
ANEXO 3.....	93
ANEXO 4.....	94
ANEXO 5.....	95
ANEXO 6.....	96
ANEXO 7.....	97
ANEXO 8.....	98

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

FIGURA 1: Micrografia eletrônica de partículas de <i>Orthopoxvirus</i> mostrando formato característico de ladrilho e envelope externo.....	23
FIGURA 2: Representação esquemática da estrutura de vírus do gênero <i>Orthopoxvirus</i>	24
FIGURA 3: Representação esquemática das características estruturais do DNA do VACV.....	24
FIGURA 4: Diagrama do ciclo de multiplicação dos poxvírus.....	26
FIGURA 5: Eletromicrografia de transmissão do poxvírus e, em destaque, as membranas de cada partícula viral.....	26
FIGURA 6: Ocorrência de varíola bovina no Brasil, período de 2000-2009.....	29
FIGURA 7: Lesão em dedos e na face palmar de ordenhadores infectados com VACV na região de Itajubá/MG.....	32
FIGURA 8: Lesão em vestíbulo nasal, periorbitária e intraorbitária em ordenhadores infectados com VACV na região de Itajubá/MG.....	32
FIGURA 9: Lesões em tetos de vacas lactantes de um surto de vaccínia bovina (VB) na região do Serro/MG.....	32
FIGURA 10: Lesões ulceradas em bezerros (boca e focinho) em um foco de VB na região de Mariana/MG.....	32

CAPÍTULO 1: Evolução clínico-patológica da vaccínia bovina em vacas secas inoculadas experimentalmente com VACV-GP2

FIGURA 11: Estrutura no LANAGRO onde ocorreu a inoculação e o acompanhamento das vacas secas mestiças experimentalmente infectadas pelo VACV-GP2.....	38
FIGURA 12: Escarificação e inoculação dos tetos das vacas secas mestiças experimentalmente infectados com o vírus da VB.....	38
FIGURA 13: Média dos valores da temperatura corporal das vacas experimentalmente inoculadas com VACV-GP2 divididas por grupos (G1, G2 e G3) a partir da inoculação (T0) até o sacrifício para G1 e G2 (T4 e T9, respectivamente) e até T14 para G3.....	42
FIGURA 14: Detalhes da evolução das lesões nos tetos das vacas experimentalmente inoculadas com VACV-GP2.....	42
FIGURA 15: Cortes histológicos do teto anterior direito (TAD) da vaca 01 experimentalmente inoculada com VACV-GP2 e necropsiada no 4ºd.p.i. Coloração H&E.....	46
FIGURA 16: Cortes histopatológicos dos tetos anteriores da vaca 02 experimentalmente inoculada com VACV-GP2 e necropsiada no 9ºd.p.i. Coloração H&E.....	46
FIGURA 17: Cortes histológicos do TAD da vaca 05 experimentalmente inoculada com VACV-GP2 e biopsia realizada no 17ºd.p.i. Coloração H&E.....	47

FIGURA 18: Cortes histológicos das glândulas mamárias anteriores direitas das vacas 01 e 02 experimentalmente inoculadas com VACV-GP2 e necropsiadas no 4° e 9° d.p.i., respectivamente. Coloração H&E.....	47
FIGURA 19: Cortes histológicos dos linfonodos retromamários anteriores direitos das vacas 01 e 02 experimentalmente inoculadas com VACV-GP2 e necropsiadas no 4° e 9° d.p.i., respectivamente. Coloração H&E.....	47
FIGURA 20: Cortes histológicos dos tetos anteriores das vacas 01 e 02 experimentalmente inoculadas com VACV-GP2 e necropsiadas no 4° e 9° d.p.i., respectivamente. Coloração pela técnica de IHQ.....	48
FIGURA 21: Corte histológico da glândula mamária da vaca 01 experimentalmente inoculada com VACV-GP2 e necropsiada no 4° d.p.i. Coloração pela técnica de IHQ.....	48
FIGURA 22: Corte histológico do linfonodo retromamário da vaca 02 experimentalmente inoculada com VACV-GP2 e necropsiada no 9°d.p.i. Coloração pela técnica de IHQ.....	48

CAPÍTULO 2: Métodos de inoculação para reprodução da vaccínia bovina em bovinos

FIGURA 23: Métodos de escarificação nos tetos das vacas experimentalmente inoculadas com VACV-GP2.....	56
FIGURA 24: Evolução das lesões nos tetos das vacas 08 e 09 experimentalmente inoculadas com VACV-GP2.....	60
FIGURA 25: Média dos valores da temperatura corporal das vacas do dia da inoculação (T0) até a cicatrização total das lesões (T17).....	60
FIGURA 26: Diferença entre as lesões desenvolvidas nos tetos escarificados com agulha hipodérmica, agulha bifurcada e lixa no 7° d.p.i. na vaca 09 experimentalmente inoculada com o VACV-GP2.....	61
FIGURA 27: Corte histológico do TAD da vaca 09 escarificado com agulha bifurcada e necropsiada no 17°d.p.i. Coloração H&E.....	61
FIGURA 28: Corte histológico do TAD (A) e da glândula mamária (B) da vaca 09 necropsiada no 17° d.p.i. indicando imunomarcações (setas) em macrófagos perivasculares na derme profunda e em células acinares, respectivamente. Coloração pela técnica de IHQ. (100X).....	61

CAPÍTULO 3: Acompanhamento clínico, hematológico e bioquímico de vacas lactantes experimentalmente inoculadas com o vírus da vaccínia bovina e reinoculadas ou imunodeprimidas

FIGURA 29: Delineamento experimental das fases 1 e 2 do experimento 3 que representam, respectivamente, a inoculação experimental do vírus da VB em vacas lactantes e o tratamento imunodepressor e reinoculação em vacas lactantes previamente inoculadas com VACV-GP2.....	67
FIGURA 30: Escarificação com lixa e inoculação do VACV-GP2 re-isolado com auxílio de pipeta automática nos tetos das vacas lactantes.....	68
FIGURA 31: Evolução das lesões nas vacas lactantes experimentalmente inoculadas com VACV-GP2	74

FIGURA 32: Evolução das lesões na vaca 62 lactante experimentalmente inoculada com VACV-GP2. 4º d.p.i. Vesícula e pápula (seta); 5º e 7º d.p.i. úlcera (seta); 10º d.p.i. úlcera e crosta (seta); 15º e 18º d.p.i. fase de cicatrização.....	74
FIGURA 33: Média dos valores da temperatura corporal dos animais experimentalmente infectados com VACV-GP2 no dia da inoculação (T0) até o 27º d.p.i. (T27).....	75
FIGURA 34: Média dos valores da temperatura corporal dos animais imunodeprimidos do primeiro dia de tratamento com dexametasona (T0) até o 10º dia de acompanhamento (T10).....	75
FIGURA 35: Média dos valores da temperatura corporal dos animais reinoculados do dia da inoculação (T0) até o 15º d.p.i. (T15).....	75
FIGURA 36: Lesões de VB nos tetos das vacas lactantes reinoculadas com VACV-GP2 no 5º d.p.i.....	76
FIGURA 37: Média da CCS dos oito animais experimentalmente inoculados com VACV-GP2 do T0 (dia da inoculação) até T32 (32º d.p.i.).....	77
FIGURA 38: Total da produção de leite diária (em porcentagem) dos oito animais experimentalmente inoculados com VACV-GP2 do T0 (dia da inoculação) até T32 (32º d.p.i.).....	77
FIGURA 39: Valores Médios de leucócitos totais, linfócitos e neutrófilos das vacas lactantes experimentalmente inoculadas com VACV-GP2 em relação aos tempos de coleta.....	77
FIGURA 40: Valores médios de leucócitos totais, linfócitos e neutrófilos (das vacas imunodeprimidas com dexametasona em relação ao tempo de tratamento.....	77

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA

TABELA 1: Subfamília *Chordopoxvirinae* e seus representantes dos gêneros.....24

TABELA 2: Amostras de VACV isoladas no Brasil entre os períodos de 1963 a 2005 e seus respectivos hospedeiros.....29

CAPÍTULO 1: Evolução clínico-patológica da vaccínia bovina em vacas secas experimentalmente inoculadas com VACV-GP2

TABELA 3: Característica clínica das lesões dos tetos das vacas experimentalmente inoculadas com VACV-GP2 no momento da eutanásia (G1 e G2) e biopsia dos tetos (G3) e os tecidos coletados de cada grupo que foram submetidos às técnicas de histopatologia e imuno-histoquímica.....40

TABELA 4: Períodos de coletas das amostras de sangue dos animais de cada grupo experimentalmente inoculados com VACV-GP2 para obtenção do soro.....40

TABELA 5: Característica e evolução das lesões nos tetos das vacas experimentalmente inoculadas com VACV-GP2.....43

TABELA 6: Descrição histopatológica dos tecidos das vacas experimentalmente inoculadas com VACV-GP2 em diferentes fases de evolução das lesões.....44

TABELA 7: Descrição das imunomarcações dos tecidos das vacas experimentalmente inoculadas com VACV-GP2 em diferentes fases de evolução das lesões.....45

CAPÍTULO 2: Métodos de inoculação para reprodução da vaccínia bovina em bovinos

TABELA 8: Métodos de escarificação e inoculação nos tetos das vacas 07, 08 e 09 experimentalmente inoculadas com VACV-GP2.....56

TABELA 9: Evolução das lesões nos tetos das vacas experimentalmente inoculadas com VACV-GP2 clonado (IN1) e VACV-GP2 não clonado (IN2).....59

CAPÍTULO 3: Acompanhamento clínico, hematológico e bioquímico de vacas lactantes experimentalmente inoculadas com o vírus da vaccínia bovina e reinoculadas ou imunodeprimidas.

TABELA 10: Evolução das lesões nos tetos das vacas lactantes experimentalmente inoculadas (Fase 1) e das vacas reinoculadas (Fase 2) com VACV-GP2.....76

LISTA DE ABREVIATURAS

µL – Microlitro
ALT – alanina aminotransferase
AN – anticorpos neutralizantes
ARAV – Vírus Araçatuba
AST – aspartase aminotransferase
AT – anticorpos totais
ATCC – American Type Cell Collection
BAV – Vírus BeAN 58058
bpm – batimentos por minuto
CCS – contagem de células somáticas
CEV – Vírus envelopado célula associado
CHCM – concentração de hemoglobina corpuscular média
CI – Corpúsculo de inclusão
CMT – California Mastitis Test
CPXV – *Cowpox virus*
CTGV – Cantagalo vírus
d.p.i. – dias pós inoculação
DMS - Dexametasona
ECMC – Ectromelia virus
ECP – Efeito citopático
EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético
EEV – Vírus envelopado extracelular
EV – Vírus extracelular
FIOCRUZ – Instituto Oswaldo Cruz
GGT – gamma glutamiltransferase
GP2 – Guarani vírus 2
ID - imunodeprimido
HCM – hemoglobina corpuscular média
HE – hematoxilina-eosina
ICB – Instituto de Ciências Biológicas
ICTV – International Committee on Taxonomy of Viruses
IEV – Vírus envelopado intracelular

IHQ – imuno-histoquímica
IM - intramuscular
IMA – Instituto Mineiro de Agropecuário
IMV – Vírus maduro intracelular
IN1 – inóculo 1
IN2 – inóculo 2
IPMC – imunoperoxidase em monocamada celular
ITRs – regiões terminais invertidas
IV – vírus maduro
LANAGRO – laboratório Nacional Agropecuário
LO - linfócito
LRM – linfonodo retromamário
LT – leucócitos totais
MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MCA – membrana corioalantoica
MEM – meio mínimo essencial
MF - multifocal
mL – Mililitro
mpm – movimentos por minuto
MN – mononucleares
MO - macrófagos
MPXV – *Monkeypox virus*
MURV – Muriaé virus
nm – nanômetro
NO - neutrófilos
OMS – Organização Mundial de Saúde
OPXV – *Orthopoxvirus*
PB – Proteína Bruta
PBS – Tampão salina fosfato
PMN - Polimorfonucleares
PSTV – Vírus Passatempo
PV – peso vivo
RI - reinfestado
r.p.m. – Rotações por minuto
SAV – SPAN 232 vírus

SN – soroneutralização
TAE – teto anterior esquerdo
TAD – teto anterior direito
TPE – teto posterior esquerdo
TPD – teto posterior direito
UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais
UFP/ml – Unidades formadoras de placa / mililitro
VACV - *Vaccinia virus*
VACV-BR – *Vaccinia virus* amostras brasileiras
VACV-GP1 – *Vaccinia virus* amostra Guarani P1
VACV-GP2 – *Vaccinia virus* amostra Guarani P2
VACV-WR -*Vaccinia virus* amostra Western Reserve
VARV – *Variola vírus*
VB – Vaccínia Bovina
VBH – Vírus Belo Horizonte
VCM – volume corpuscular médio
VG – Volume glomerular ou hematócrito
WV – Vírus envelopado.

APRESENTAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Esta dissertação consiste de três capítulos. O Capítulo 1, “Estudo clínico, histopatológico e imuno-histoquímico em diferentes fases de evolução da Vaccínia Bovina em vacas secas inoculadas experimentalmente com *Vaccinia virus* (VACV)” teve como foco a reprodução da Vaccínia Bovina (VB) em seis vacas secas mestiças e avaliação clínica, histopatológica e imuno-histoquímica de diferentes estágios da doença nesses animais. Como as características das lesões observadas neste primeiro experimento diferiram das infecções naturais, realizou-se um segundo experimento, cujo objetivo principal foi determinar o melhor método de inoculação capaz de reproduzir as lesões de VB encontradas no campo. Este experimento foi descrito no Capítulo 2, “Métodos de inoculação para reprodução da Vaccínia bovina em bovinos”, sendo utilizadas três vacas mestiças (duas secas e uma em lactação). Após ser determinado o melhor inóculo e o melhor método de escarificação, foi realizado o experimento 3, descrito no Capítulo 3, “Acompanhamento clínico, análises hematológica e bioquímica e estudo da reinoculação e imunodepressão em vacas lactantes experimentalmente inoculadas com o vírus da Vaccínia Bovina”. O experimento 3 foi dividido em duas fases. Na primeira fase foi feita a inoculação de oito vacas mestiças em lactação, seguido pelo acompanhamento clínico, análises hematológicas e bioquímicas associadas à infecção. Na segunda fase algumas destas vacas foram reinoculadas e outras imunodeprimidas a fim de observar o reaparecimento de sinais clínicos e estudar uma possível reativação do VACV em animais imunodeprimidos, respectivamente.

RESUMO GERAL

A presente dissertação foi dividida em três experimentos cujos objetivos foram reproduzir a vaccínia bovina (VB) em vacas secas e lactantes mestiças através da inoculação experimental com *Vaccinia virus* amostra GP2 (VACV-GP2). O objetivo do experimento 1 foi estudar a evolução clínico-patológica das lesões e a localização do vírus por imuno-histoquímica em períodos distintos da doença. Nesse experimento, seis vacas secas mestiças, divididas em três grupos, tiveram os tetos escarificados com auxílio de agulha hipodérmica em sítio delimitado, localizado na área central de cada teto. Dois grupos foram eutanasiados e necropsiados em fases diferentes de evolução da doença e em um grupo realizou-se apenas a biopsia dos tetos nos locais onde apareceram lesões. No experimento 2, três vacas mestiças foram inoculadas a fim de analisar o melhor método para escarificação de pele em tetos e a patogenicidade de dois inóculos diferentes contendo VACV-GP2. Uma vaca foi sacrificada no 17º d.p.i., período em que todos os tetos já haviam cicatrizado. Os objetivos do experimento 3 foram realizar os estudos clínico, hematológico e bioquímico associados à infecção e observar os efeitos da imunodepressão artificial e da reinoculação com VACV-GP2 em vacas lactantes previamente infectadas pelo vírus. Esse experimento foi dividido em duas fases, sendo que na fase 1, oito vacas mestiças em fases distintas de lactação foram inoculadas com o VACV e na fase 2, as vacas inoculadas nos experimentos 1 e 3 (parte 1) foram reinoculadas ou imunodeprimidas. Em todos os experimentos os animais foram acompanhados durante 32 dias e foi realizado o exame clínico em dias alternados. Além disso, foram coletadas amostras de sangue, fezes, suabe oral e leite e as técnicas realizadas foram IPMC, soroneutralização e PCR. Nas necropsias, foram coletados diversos tecidos para realização das técnicas de HE e IHQ. No experimento 3 foram acrescentadas as análises de bioquímica sérica e hemograma, além da contagem de células somáticas do leite. De maneira geral, observou-se que o período de incubação do VACV em bovinos é curto, e que o padrão de evolução das lesões ocorreu de maneira similar nos três experimentos, o qual também foi similar ao padrão de evolução de lesões observado em infecções naturais pelo VACV em bovinos. No acompanhamento clínico, foi observado que a infecção experimental do VACV em bovinos causa uma linfadenopatia local e não foi detectada hipertermia nos bovinos experimentalmente inoculados, nem outras alterações clínicas nesses animais. Alterações histopatológicas significativas foram observadas nos tetos, glândulas mamárias e linfonodos retromamários dos animais inoculados dos experimentos 1 e 2, em três fases diferentes da doença: ulcerativa, crostosa e cicatrização. O VACV foi detectado, através da técnica de IHQ, nos tetos, glândula mamária e linfonodos retromamários dos animais da fase inicial (4º d.p.i) e da fase intermediária (9º d.p.i) da evolução da doença e na fase final, de cicatrização (17º d.p.i). Foi observado também que a mastite pode ser exacerbada pela VB e que houve queda de cerca de 30% na produção de leite nos animais infectados, assim como aumento significativo no número das células somáticas. Em relação ao perfil hematológico, foram observadas linfopenia e neutrofilia, que podem estar associados, respectivamente, com a infecção viral e a inflamação da glândula mamária. Mediante as condições experimentais às quais as vacas foram submetidas, foi possível concluir que a reinfecção pelo VACV pode ocorrer em animais previamente infectados. Suspeita-se também de que o VACV pode persistir e multiplicar em vacas imunodeprimidas, uma vez que houve aumento no título de anticorpos nesse grupo de animais. Por fim, alguns resultados do presente estudo sugerem que o VACV pode disseminar-se sistemicamente no organismo do bovino, uma vez que o DNA viral foi detectado nas lesões de mucosa oral.

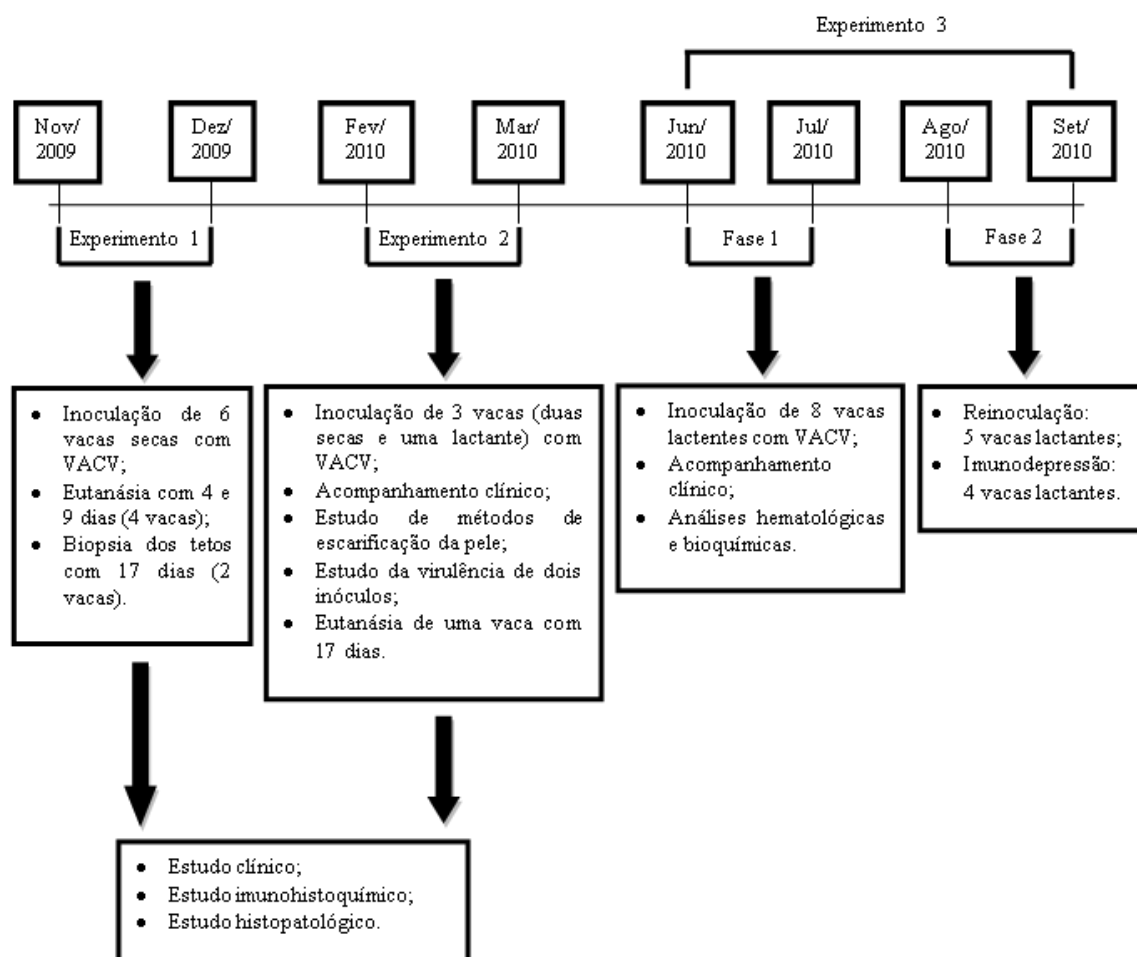
Palavras-chave: *Vaccinia virus*, infecção experimental, bovinos, reinfecção e imunossupressão

MAIN ABSTRACT

This dissertation was divided into three experiments whose aims were to reproduce the bovine vaccinia (BV) in crossbred dairy and dry cows through the experimental inoculation with *Vaccinia virus* Guarani P2 (VACV-GP2). Experiment 1 studied the clinical and pathological evolution of the lesions and the localization of the virus by immuno-histochemistry in different stages of the disease. In this experiment, the teats of six crossbred dry cows, divided into three groups, were scarified with a hypodermic needle in the central area of each teat. Two groups were euthanized and necropsied in different stages of the disease, while in a third group, a biopsy was performed in the inoculated area of the teats. In the experiment 2, three crossbred cows were inoculated in order to analyze different scarification methods and the pathogenicity of two different inocula with VACV-GP2. One cow was euthanized on the 17th day post-inoculation (d.p.i), period in which the lesions were healed. The aims of experiment 3 were to carry out clinical, hematological and biochemical analysis associated to the infection and to observe the effects of immunodepression and re-infection with VACV-GP2 in dairy cows previously infected by VACV. The experiment was divided into two parts. In part 1, eight crossbred dairy cows were inoculated with VACV-GP2 and in part 2, the cows from experiment 1 and 3 (part 1) were immunodepressed or reinfected. All animals in experiments 1, 2 and 3 were observed for 32 days and clinical examination was done every other day. Moreover, blood, faeces, oral swab and milk samples were collected daily and the techniques employed were IPMA, seroneutralization and PCR. Several tissues were collected in necropsies and analysed through HE and IHC. Biochemical and hematological analysis and somatic cell count (SCC) in milk were done only in experiment 3. In all experiments it was observed that the incubation period was short and the evolution of the lesions was similar among the animals experimentally infected. Moreover, these lesions were also similar to the ones in cows naturally infected. Through clinical monitoring, it was observed that experimental infection of VACV in bovines causes local lymphadenopathy. Neither hyperthermy nor clinical alterations were detected. In the inoculated animals from experiments 1 and 2, histological alterations were observed in the teats, mammary glands and mammary lymph nodes in the three different phases of the disease, i.e., ulcerative, crust and healing. Through IHC, the VACV was detected in teats, as well as in mammary glands and mammary lymph nodes on the 3th, 9th and 17th d.p.i. During the experiment the mastitis was exacerbated by BV, which was shown by the increase of SCC in milk, and the dairy cows had intense decrease in milk production. Lymphopenia and neutrophilia, which may be associated with viral infection and mastitis, respectively, were observed in the hematological analysis. In the experimental conditions which the cows were tested, it was possible to conclude that reinfection by VACV can occur in previously infected animals. There is a suspicion that the VACV can persist and multiply in immunodepressed bovines, once that there was an increase in antibodies titers in these animals. Lastly, some results suggest that the VACV can spread systematically in cattle, since the viral DNA was detected in the oral mucosa lesions.

KEY-WORDS: *Vaccinia virus*, experimental infection, bovines, reinfection and immunodepression.

ORGANOGRAMA DOS EXPERIMENTOS



INTRODUÇÃO GERAL

O termo “varíola bovina” é utilizado popularmente para descrever uma doença caracterizada pelo aparecimento de lesões cutâneas localizadas no úbere e tetas das vacas, apesar de três diferentes vírus, pertencentes à família *Poxviridae*, poderem estar envolvidos na sua etiologia. As lesões causadas por estes vírus são indistinguíveis e apresentam-se nas formas proliferativas, ulceradas ou em crostas.

Dentro do gênero *Orthopoxvirus* (OPXV), o “cowpox” genuíno e o *Vaccinia virus* (VACV), podem causar este tipo de lesão. O vírus da pseudovaríola, pertencente ao gênero *Parapoxvirus*, causa lesões clinicamente muito semelhantes às produzidas pelos OPXV (Fenner, 2000). Todas elas são zoonoses (Mazur *et al.*, 2000; Lewis-Jones, 2004) e a transmissão destas enfermidades entre os animais ocorre principalmente através das mãos dos ordenhadores ou equipamentos de ordenha mecânica. A penetração dos vírus se dá por soluções de continuidade em lesões pré-existentes nas tetas e úbere das vacas (Trindade *et al.*, 2003).

Desde o final da década de 90 houve um aumento exacerbado do número de relatos de surtos de uma doença semelhante à varíola bovina em diferentes regiões do país. Desde então surtos foram relatados nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Mato Grosso, Espírito Santo, Bahia e Goiás, comprometendo milhares de vacas e grande número de ordenhadores (Schatzmayr *et al.*, 2000; Trindade *et al.*, 2003; Nagasse-Shugara *et al.*, 2004; Lobato *et al.*, 2005). Como exemplo, no ano de 2003, somente em Minas Gerais, foram notificados 21 focos da doença, acometendo 645 animais em 11 municípios localizados nas regiões Centro-Oeste, Leste e Alto Paranaíba. Em 2004, foram notificados 35 focos e 1.147 animais doentes em 27 municípios abrangendo principalmente as regiões Leste, Central, Alto Paranaíba e Triângulo Mineiro (Madureira, 2009).

Em vários focos o diagnóstico laboratorial foi realizado chegando-se à conclusão de se tratar de um OPXV, mais precisamente um VACV. Por esse motivo, e para evitar confusões com o nome “varíola”, que desperta receio entre as

pessoas devido à varíola humana, foi proposto o nome de “**Vaccínia Bovina**” (VB) para essa enfermidade.

A origem e o hospedeiro natural do VACV são desconhecidos, mas há indícios que apontam que o VACV pertence a uma linhagem independente dos OPXVs, e não está diretamente relacionado com o *Cowpox virus* (CPXV) ou *Varíola virus* (VARV) (Trindade *et al.*, 2007).

A VB vem se caracterizando por lesões nas tetas e/ou úbere que se iniciam com pápulas vermelhos seguidos por edema e dor local. Em seguida, surgem vesículas e, 3 a 4 dias depois, elas evoluem para pústulas umbilicadas envoltas por tecido inflamatório e úlceras com tecido negrecido (Trindade *et al.*, 2007). Lesões nos lábios, focinho e cavidade oral dos bezerros que mamam nas vacas acometidas são frequentemente observadas. Em humanos, a infecção tem se caracterizado pela presença de lesões ulcerativas e pustulares principalmente nas mãos, acometendo também antebraços e face, além de febre, dor, mal estar, e linfadenopatia (Lobato *et al.*, 2005).

A disseminação da doença dentro da propriedade é rápida e tem alta taxa de ataque sendo que os principais prejuízos relatados pelos produtores referem-se à ocorrência de mamite e infecções secundárias, queda brusca na produção de leite, gastos com medicamentos, afastamento temporário do ordenhador com contrato de um novo empregado e acometimento de bezerros que mamam nas vacas doentes, levando ao emagrecimento desses animais (Lobato *et al.*, 2005).

A emergência de casos de VB, levando a grandes prejuízos econômicos e a ocorrência da doença nos seres humanos e animais deixa clara a necessidade de investigação, pesquisa e de investimento dos órgãos federais e estaduais de vigilância sanitária da saúde humana e animal, para uma melhor avaliação de medidas de controle para esta doença. A VB é subnotificada e, quando ocorre a notificação, a doença é encontrada em fase avançada, o que dificulta o acompanhamento clínico do início até a resolução da mesma. Além disso, é muito complicada a coleta de materiais para estudos laboratoriais, pois acarreta em estresse dos animais e dos próprios ordenhadores podendo

prejudicar o manejo da fazenda. Em relação à patogenicidade, há poucas descrições na literatura e, normalmente, são descritas em camundongos. A ação do vírus no organismo de bovinos ainda é bastante obscura. Não há na literatura mundial relatos sobre um estudo sistêmico como exame clínico completo, histopatologia, imunohistoquímica bem como um perfil hematológico e bioquímico desde o início da infecção até sua resolução.

Por isso, esse trabalho teve como objetivo realizar a inoculação experimental em vacas tanto secas quanto lactantes com a amostra VACV Guarani P2 (GP2), a fim de estudar minuciosamente a patogenicidade viral desde a penetração do vírus na pele, a formação das lesões e evolução até a cicatrização total. O presente trabalho também permitiu uma análise detalhada de cada animal através de exames clínicos completos e de testes hematológico, bioquímico, histopatológico e imunohistoquímico.

REVISÃO DE LITERATURA

1. Família *Poxviridae*

1.1. Os poxvírus e a estrutura da partícula viral

Os vírus pertencentes à família *Poxviridae* são os maiores e mais complexos vírus conhecidos, capazes de infectar hospedeiros vertebrados e invertebrados. Medem cerca de 220-450nm X 140-260nm e apresentam-se em forma ovóide ou de tijolo (FIGURA 1), com corpúsculos laterais quando partícula madura (Buller e Palumbo, 1991). Possuem genoma de DNA fita dupla linear, são envelopados e se multiplicam no citoplasma das células infectadas, fato raro entre os vírus de genoma DNA (Fenner, 2000). A FIGURA 2 ilustra os elementos estruturais principais, tais como cerne, corpúsculos laterais, membrana e envelope (revisado por Buller e Palumbo, 1991; Drazen, 2002).

O cerne é a estrutura mais interna da partícula viral e se apresenta bicôncavo, onde são encontrados as enzimas, o DNA viral e fatores

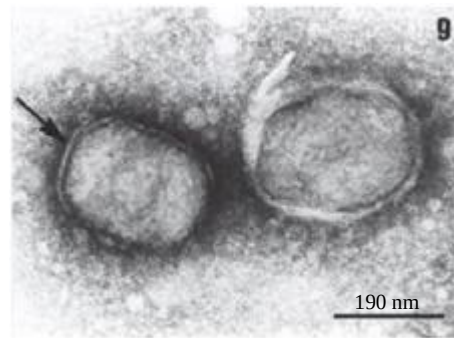


Figura 1: Micrografia eletrônica de partículas de *Orthopoxvirus*, contrastada negativamente pelo molibdato de amônio, mostrando formato característico de tijolo e envelope externo (seta). Fonte: Bersano *et al.*, 2003.

de transcrição de genes precoces. Os corpúsculos laterais encontram-se dispostos nos dois lados do cerne, ambos envoltos por uma membrana e cujas funções e composição química ainda não são bem definidas. A membrana externa é uma bicamada lipoprotéica de origem celular que circunda o cerne e frequentemente forma túbulos, os quais são responsáveis pelo aspecto irregular da superfície da partícula viral. Algumas formas virais apresentam uma membrana adicional, denominada envelope, também de natureza lipoprotéica, constituindo o componente mais externo do vírus. Tanto a membrana externa quanto o envelope desempenham um papel importante na interação do vírus com o hospedeiro (revisado por Sodeik e Krijnse-Locker, 2002).

De acordo com o tipo de hospedeiro que infectam, os poxvírus são classificados em duas subfamílias: *Chordopoxvirinae*, que infectam vertebrados e *Entomopoxvirinae*, que infectam insetos. A subfamília *Chordopoxvirinae* pode ser subdividida em oito gêneros, sendo que os gêneros e membros protótipos estão listados na TABELA 1. O VACV, pertencente ao gênero *Orthopoxvirus* (OPXV), é o vírus mais estudado. (Fenner, 2000; Pastorett e Vanderplasschen, 2003).

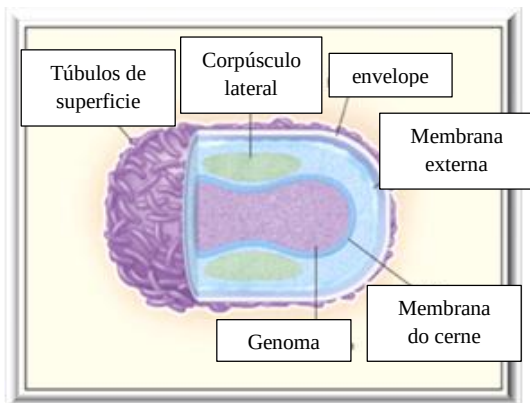


Figura 2: Representação esquemática da estrutura de vírus do gênero *Orthopoxvirus*.
Fonte: adaptado de Drazen, 2002.

Tabela 1: Subfamília *Chordopoxvirinae* e seus representantes dos gêneros.

FAMÍLIA: <i>Poxviridae</i>	
SUBFAMÍLIA: <i>Chordopoxvirinae</i>	
GÊNERO	PROTÓTIPO
<i>Orthopoxvirus</i>	<i>Vaccinia virus</i>
<i>Parapoxvirus</i>	<i>Pseudocowpox virus</i>
<i>Capripoxvirus</i>	<i>Sheeppox virus</i>
<i>Suipoxvirus</i>	<i>Swinepox virus</i>
<i>Leporipoxvirus</i>	<i>Myxoma virus</i>
<i>Avipoxvirus</i>	<i>Fowlpox virus</i>
<i>Yatapoxvirus</i>	<i>Tanapox virus</i>
<i>Molluscipoxvirus</i>	<i>Molluscum contagiosum virus</i>

Fonte: ICTV, 2003. (adaptado)

[HTTP://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/index.htm](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/index.htm)

1.2. Estrutura do genoma

O genoma dos poxvírus é constituído por uma molécula de DNA dupla-fita linear, covalentemente fechada nas extremidades, variando de 130kb (*Parapoxvirus*) a 300kb (*Avipoxvirus*) e codificando aproximadamente 200 genes. Este tamanho relativamente grande

do genoma permite aos poxvírus codificarem proteínas não-essenciais para seu ciclo de multiplicação, mas que modulam sua patogenicidade. A ausência de infecções latentes e a não-integração no genoma do hospedeiro justificam a importância de genes que protegem os poxvírus do sistema imune durante uma infecção (Moss, 2001; Hughes e Friedman, 2005).

A região central do genoma dos poxvírus, sobretudo dos OPXV, é altamente conservada, e codifica principalmente proteínas estruturais e enzimas envolvidas no metabolismo do ácido nucléico. Nas extremidades do genoma são observadas as regiões terminais invertidas (ITRs), sequências idênticas dispostas em orientações contrárias, que codificam vários genes responsáveis pela interação vírus-hospedeiro, conferindo a cada poxvírus características únicas de patogênese e imunomodulação (Esposito e Knight, 1985; Moss, 2001). As duas fitas de DNA são conectadas em suas porções terminais por sequências nucleotídicas de fitas simples em A + T (alças), contendo aproximadamente 100 bases (FIGURA 3) (Moss, 2001).

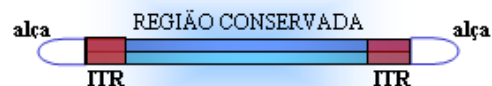


Figura 3: Representação esquemática das características estruturais do DNA do VACV.
Fonte: Abrahão, 2006.

1.3. Multiplicação viral

O ciclo de multiplicação, que ocorre no citoplasma, pode ser dividido em cinco fases distintas: adsorção e penetração, transcrição imediatamente precoce, replicação do DNA, transcrição intermediária, tardia, montagem e liberação das partículas virais (Moss, 1996; Fenner, 2002; Trindade *et al.*, 2003). A partícula viral possui quase todos os elementos necessários para a sua multiplicação, incluindo RNA polimerase dependente de DNA, enzima de metilação, poli A polimerase e fatores de transcrição de genes precoces (Fenner, 2002).

Inicialmente acontece a adsorção e fusão dos vírus nas membranas celulares, com liberação do nucleocapsídeo no citoplasma. Em seguida, se dá a síntese dos mRNAs imediatamente precoces, com a tradução de proteínas do tipo fator de crescimento, de escape do sistema imune, enzimas, fatores importantes para a replicação do DNA e transcrição precoce. Posteriormente, o DNA é liberado e sua replicação é iniciada. Nesta fase, recombinações gênicas podem ocorrer. Após a replicação, genes intermediários são transcritos e os mRNAs traduzidos em proteínas estruturais, enzimas e fatores de transcrição precoces que serão empacotados. Finalmente acontece a montagem dos vírus e novas partículas virais imaturas são formadas (Moss, 1996; Fenner, 2002) (FIGURA 4).

Podem ser formadas as seguintes partículas virais: vírus maduro (IV); vírus maduros intracelulares (IMV); vírus envelopados intracelulares (IEV); vírus envelopados extracelulares (EEV) e vírus envelopados célula-associados (CEV) (Moss, 2001). Atualmente, vem sendo utilizada uma nova nomenclatura para as partículas virais dos poxvírus. Moss (2006) propôs as seguintes alterações: os IMV foram classificados como vírus maduros (MV) e possuem uma única membrana formada por uma bicamada lipídica. Os IEV foram classificados como vírus envelopados (WV) por apresentarem um envelope composto por duas membranas que circundam o MV. As partículas EEV e CEV foram denominadas vírus extracelulares (EV) e possuem uma membrana a menos que os WV (FIGURA 5).

Os IMVs são as formas mais abundantes e estáveis, sendo responsáveis pela infecção entre hospedeiros. Já os CEVs e EEVs são importantes na disseminação viral dentro do hospedeiro (Smith e Kotwal, 2002).

1.4. Patogênese dos poxvírus

Estudos de patogênese envolvem a interação da expressão genética do agente infeccioso com a resposta a infecções do hospedeiro. Esta dinâmica irá ditar a gravidade e o resultado do processo da doença (Buller e Palumbo, 1991). Embora a histologia patológica da varíola tenha sido extensivamente estudada na primeira

metade do século 20, ainda há muito para se estudar sobre a patogênese ou a participação do sistema imune nesta (Fenner *et al.*, 1989; Brandt e Jacobs, 2001).

As doenças causadas pelos vírus da família *Poxviridae* podem ser do tipo localizadas ou sistêmicas. Estas diferenças nos quadros clínicos estão intimamente ligadas à espécie de vírus envolvido e ao tipo de hospedeiro. Mais precisamente a genética do patógeno e os sítios primários de infecção nos hospedeiros são determinantes para definir as formas de multiplicação e disseminação dos vírus e para as respostas apresentadas a infecções pelos hospedeiros (Fenner *et al.*, 1989; Buller e Palumbo, 1991).

A porta de entrada do vírus no hospedeiro varia de acordo com a espécie do vírus e o hospedeiro envolvido. O trato respiratório é a via de infecção mais recorrente entre os OPXV, e constitui a provável via de entrada de *Camelpox virus*, *Variola virus* (VARV) e *Monkeypox virus* (MPXV). O trato gastrointestinal também representa uma porta de entrada para os OPXV, como Ectromelia vírus (ECTV) e MPXV. Para o *Cowpox virus* (CPXV), a via oral é a maior fonte de infecção em gatos domésticos e felinos habitantes de zoológicos, através da predação de roedores contaminados (Coras *et al.*, 2005). As infecções causadas por VACV e CPXV ocorrem através de microabrasões na pele, e estão associadas com lesões ulcerativas nas tetas e úberes do gado, e nas mãos de ordenhadores.

Em camundongos, o VACV causa infecções localizadas, em sítios primários de infecções, que são lesões existentes na pele. No local de entrada do vírus, ocorre a multiplicação 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 (revisado por Fenner *et al.*, 1989).

Fenner e colaboradores (1988) em um experimento clássico utilizaram ECTV para propor um modelo de patogênese viral sistêmica *in vivo*. Segundo esses estudos, as partículas virais se multiplicam inicialmente em um sítio primário de infecção (a pele) e em seguida, atingem a corrente sanguínea, causando viremia primária.

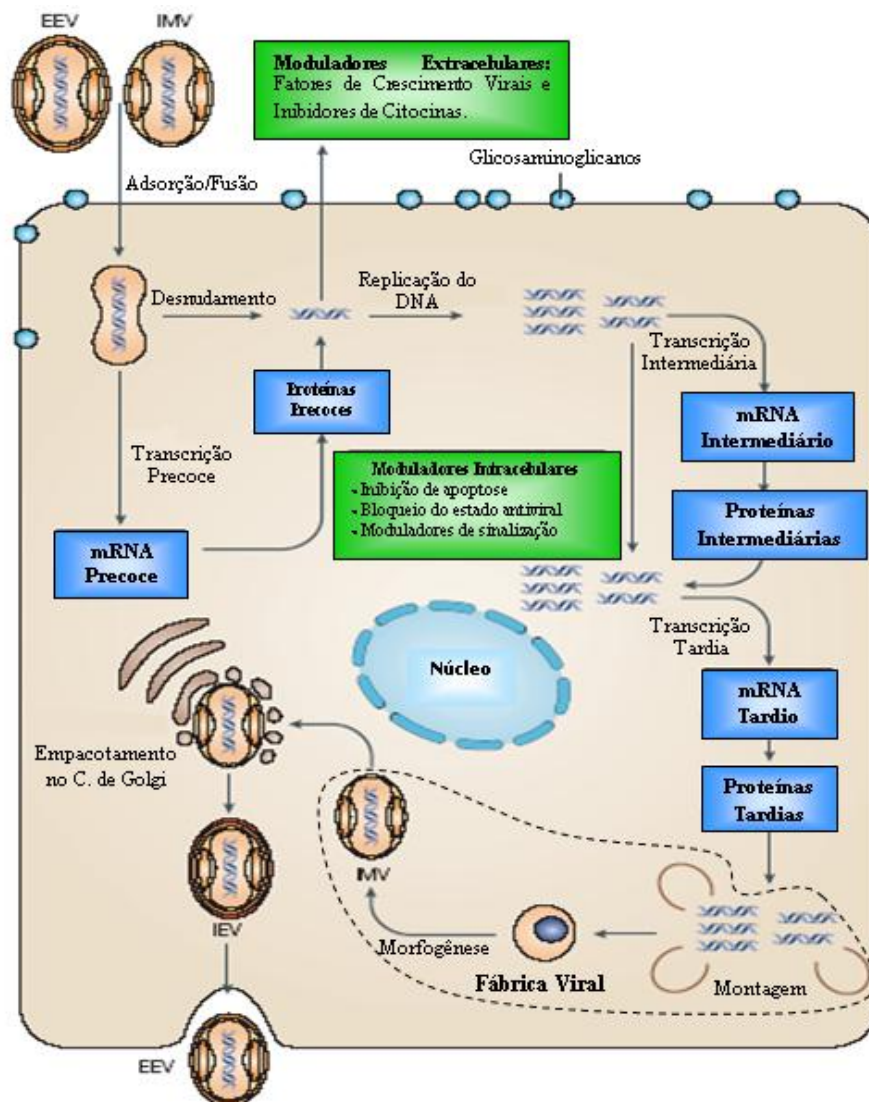


Figura 4: Diagrama do ciclo de multiplicação dos poxvírus. EEV - vírus envelopados extracelulares; IMV - vírus maduros intracelulares; IEV - vírus envelopados intracelulares. Fonte: McFadden, 2005 – modificado por Abrahão, 2006.

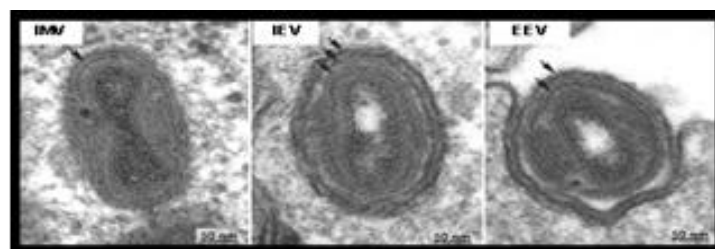


Figura 5: Eletromicrografia de transmissão de IMV (A), IEV (B) e EEV (C). As setas indicam as membranas presentes nas partículas (50 nm). Fonte: Moss, 2006 – modificado.

A disseminação do vírus no organismo ocorre tanto em associação com células sanguíneas, quanto livres no plasma. Órgãos muito vascularizados, como fígado e baço, são então infectados, assim como os linfonodos regionais. Após alguns dias, ocorre a viremia secundária, quando as partículas virais migram para o sítio trópico de multiplicação, a pele, causando lesões ulcerativas generalizadas. Neste estágio, os tecidos hepático e esplênico podem apresentar necrose avançada, causando falência orgânica (Fenner *et al.*, 1989; revisado por Esteban e Buller, 2005). Estudos recentes mostram que o VACV não tem ação localizada como sempre foi relatado. Ferreira e colaboradores (2008a) inocularam por via intranasal, camundongos com várias amostras de VACV-BR e foi detectado DNA viral em vários órgãos. Abrahão e colaboradores (2009b) também inocularam camundongos por via intranasal a fim de estudar uma possível eliminação do vírus pelas fezes. As fezes foram coletadas diretamente do ânus dos camundongos e partículas virais viáveis foram detectadas nas fezes em até 20 dias após a inoculação, mostrando que o vírus circula pelo organismo animal.

2. Gênero *Orthopoxvirus* (OPXV)

O gênero OPXV compreende vírus de vertebrados que são idênticos morfológicamente e são antigenicamente relacionados (Damaso *et al.*, 2000; Moss, 2001; Breman e Henderson, 2002), existindo dez espécies com uma ampla distribuição geográfica e um variado espectro de hospedeiros (Loparev *et al.*, 2001). Quatro espécies de *Orthopoxvirus* infectam humanos: *Variola virus* (VARV), *Monkeypox virus* (MPXV), *Cowpox virus* (CPXV) e *Vaccinia virus* (VACV) (Buller e Palumbo, 1991). Outras espécies, incluindo o CPXV e o VACV, são importantes patógenos animais: *Ectromelia virus* (ECTV), *Camelpox virus*, *Racconpox virus*, *Volepox virus*. Outras duas não estão ainda bem caracterizadas: *Taterapox virus* e *Uasin Gishu disease virus* (Loparev *et al.*, 2001).

2.1. *Vaccinia virus* (VACV)

O VACV é o protótipo do gênero OPXV e apresenta um amplo espectro de hospedeiros (McFadden, 2005). Este vírus foi utilizado na Campanha de Erradicação da Varíola da Organização Mundial da Saúde (OMS) nas décadas de 60 e 70 do século passado. As características que o levaram a ser utilizado como amostra vacinal foram: não produzir lesões generalizadas, ser menos patogênico e apresentar menor virulência que o VARV (Fenner *et al.*, 1989; Esposito e Fenner, 2001).

A origem e o hospedeiro natural do VACV são desconhecidos, mas há indícios de que o VACV pertence a uma linhagem independente dos OPXV, e não está diretamente relacionado com o CPXV ou VARV (Trindade *et al.*, 2007; Drumond *et al.*, 2008). Algumas teorias tentam explicar a sua origem: seria um híbrido do CPXV e VARV; teria derivado do CPXV por meio de passagens repetidas em animais ou do VARV após adaptação em animais e humanos; ou ainda, seu hospedeiro natural estaria atualmente extinto (Buller e Pallumbo, 1991; Trindade *et al.*, 2007).

Mesmo cessada a campanha de vacinação contra a varíola, em 1980, nos últimos anos, começaram a ser registrados vários surtos de *Vaccinia* bovina causados por VACV acometendo gado leiteiro e ordenhadores (revisado por Abrahão, 2006).

2.2. VACV no Brasil

No Brasil, o isolamento de amostras de VACV tem sido relatado desde a década de 60, em diferentes áreas geográficas, principalmente na região sudeste (TABELA 2).

Em 1984 ocorreu um surto em fazendas no município de Prata, MG. Neste surto, 4.800 vacas foram acometidas apresentando lesões vesiculares nas tetas e úberes, e os bezerros apresentavam lesões ulcerativas na gengiva. Além disso, houve o acometimento de ordenhadores. Estudos mostraram ser um OPXV o agente causador do surto, entretanto nenhuma caracterização molecular foi feita (Silva *et al.*, 1986). Porém, desde o final da

década de 90, novos surtos em fazendas brasileiras vêm ocorrendo atingindo tanto bovinos leiteiros quanto ordenhadores (FIGURA 6 e TABELA 2). Através do isolamento e caracterização molecular foi comprovado que estes surtos foram causados por amostras de VACV (Fonseca *et al.*, 1998; Damaso *et al.*, 2000; Schatzmayr *et al.*, 2000; Nagasse-Shugahara *et al.*, 2004; Lobato *et al.*, 2005; Trindade *et al.*, 2008; Silva-Fernandes *et al.*, 2009).

Em Minas Gerais, os primeiros surtos em bovinos iniciaram-se na Zona da Mata, em 1999. Desde então, vários surtos foram identificados 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). Estes autores observaram uma rápida disseminação da doença dentro da propriedade, com alta taxa de ataque e também observaram uma tendência à sazonalidade na ocorrência dos surtos, sendo que a maioria dos focos ocorreu no período seco do ano, entre maio a setembro. Foi no Estado de Minas Gerais, em um surto de VACV ocorrido na zona rural da cidade de Resplendor em 2005, que Abrahão e colaboradores (2010) detectaram através da PCR e do sequenciamento do material genético uma co-infecção do *Pseudocowpox virus* (PCPXV), denominado PCPV-Resplendor, com o VACV em um ordenhador. Recentemente, numa mesma propriedade da região do Serro (MG) foi diagnosticado, através da PCR realizada pelo Instituto Biológico (SP), a co-infecção do PCPXV e VACV em vacas (dados não publicados, IMA, 2011). Como esses foram os únicos relatos a respeito de uma co-infecção entre PCPXV e VACV, não se sabe exatamente qual é a prevalência do PCPXV em Minas Gerais.

Quanto ao tipo de manejo, tanto em propriedades com ordenha manual quanto em propriedades com ordenha mecânica houve relatos de surtos da doença. No entanto, somente vacas em lactação e bezerros que mamam em vacas doentes foram acometidos. Lobato e colaboradores (2005) fizeram um estudo dos aspectos clínicos e epidemiológicos da doença em um surto de Vaccinia Bovina ocorrido na Zona da Mata Mineira, o qual

acometeu seres humanos e bovinos. Esses autores observaram que a taxa de ataque é extremamente alta, podendo chegar a 100% em propriedades de ordenha manual e 30% em ordenha mecânica.

Sabe-se que a transmissão de uma vaca para outra dentro do rebanho ocorre pelas mãos dos ordenhadores ou pelas teteiras das ordenhadeiras, e a penetração dos vírus se dá por soluções de continuidade em lesões pré-existentes nas tetas e úbere das vacas (Fenner *et al.*, 1989; Damaso *et al.*, 2000). Entre fazendas, a doença pode ser transmitida pela introdução de animais doentes no rebanho e por ordenhadores que entram em contato com animais doentes em outras propriedades (Lobato *et al.*, 2005; Megid *et al.*, 2008). Outros fatores, como, por exemplo, manipulação de latões de leite contaminados e presença de roedores peridomésticos que podem funcionar como reservatórios do vírus são citados (Lobato *et al.*, 2005). Em um surto ocorrido em 2005 no município de Mariana/MG, roedores peridomésticos foram capturados e neles foi isolado o VACV em amostras de tecidos indicando essa espécie como importante transmissora da VB (Abrahão *et al.*, 2009a).

Além do aspecto econômico na pecuária, a Vaccinia bovina tem importância para a saúde pública, pois se trata de uma zoonose (Madureira, 2009). Entre os problemas causados, destacam-se a dificuldade de ordenhar as vacas, a queda na produção de leite, mamite, transmissão para o bezerro, transmissão para o homem e afastamento do ordenhador (Lobato *et al.*, 2005).

A evolução sobre o estudo da VB tem sido realizada devido a uma parceria entre o Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA), a Escola de Veterinária da UFMG, a Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) e o Laboratório de Vírus do ICB/UFMG. Com essa parceria tem sido feito um levantamento das propriedades rurais de Minas Gerais, além de alertar médicos e profissionais da saúde acerca das características e possíveis tratamentos para a doença. Porém, tem-se observado que a incidência da doença é muito maior do que o número de focos que são registrados (Madureira, 2009). O acometimento de pequenas propriedades rurais e de acesso médico precário favorece a subnotificação dos

casos (Trindade *et al.*, 2009). Por ser uma zoonose emergente, de característica vesicular e que causa grandes prejuízos econômicos é necessário uma maior atenção e fiscalização dos órgãos de Saúde Pública (Lobato *et al.*, 2005).

2.3. *Vaccinia virus* Guarani P2 (VACV-GP2)

O VACV-GP2 foi isolado a partir de lesões nas tetas de uma vaca, em um surto confirmado de VB ocorrido em 2001, no município de Guarani, localizado na região sudoeste de Minas Gerais (Trindade *et al.*, 2003). Durante um inquérito epidemiológico ocorrido na região, foram coletadas crostas das tetas de duas vacas doentes. Elas pertenciam a duas fazendas diferentes, P1 e P2, distantes cerca de 10 quilômetros. A partir do isolamento viral, soroneutralização e microscopia de força atômica, ambos os vírus isolados foram caracterizados como sendo amostras de VACV. No entanto, a partir de diagnóstico molecular realizado através do sequenciamento dos genes A26L, B18R e E3L e estudos filogenéticos apontaram que as amostras apresentavam divergências moleculares suficientes para serem agrupadas em clados diferentes da árvore filogenética, sendo denominadas GP1 e GP2.

O VACV-GP2 alinhou-se com amostras brasileiras de VACV isoladas a partir de surtos de VB (ARAV, CTGV e PSTV). Já a amostra GP1, foi agrupada com as amostras VACV *Western Reserve* (VACV-WR) e VBH. Estes resultados mostraram que existe diversidade nas amostras isoladas no Brasil e reforça a hipótese de que estas amostras não possuem uma única origem, mas múltiplas origens. Ademais, ambas as amostras não se alinham com as amostras de VACV Lister ou IOC, as quais foram utilizadas nas campanhas de vacinação para erradicação da varíola humana no Brasil, afastando a hipótese de que as amostras circulantes no Brasil seriam provenientes das amostras vacinais citadas (Trindade *et al.*, 2005).

Além de apresentarem diferenças genéticas, o VACV-GP1 e VACV-GP2 também apresentam diferenças quanto à virulência em camundongos experimentalmente inoculados, sendo que o GP1, VBH, SAV e BAV causaram doença e morte nos animais inoculados e GP2, ARAV e

PSTV não causaram nenhum sinal clínico (Ferreira *et al.*, 2008b).

3. Características das lesões

3.1. Sinais clínicos

As lesões causadas pelos poxvírus são indistinguíveis clinicamente, entretanto, as infecções causadas por *Parapoxvirus* tendem a ser mais brandas (Reis *et al.*, 1970; Mazur *et al.*, 2000; Moss, 2001; Lewis-Jones, 2004). Além disso, por ter características vesiculares, a VB entra no diagnóstico diferencial de qualquer doença cuja lesão tenha essa característica, tais como a mamilite herpética, causada pelo herpesvírus bovino-2 e a febre aftosa, causada por um aphtovírus.

Trindade e colaboradores (2007) relataram, após o acompanhamento de um ordenhador doente, que as lesões em humanos iniciam-se com uma coceira local que evolui para um edema. Três dias após esses sinais iniciais, o paciente apresentou febre, dor de cabeça, exaustão e vesículas surgiram nas mãos. Após um período de 3 a 4 dias, estas vesículas evoluíram para lesões ulcerativas e pústulas umbilicadas circundadas por uma intensa reação inflamatória, bastante doloridas, além de dores nas mãos e dedos (FIGURA 7). O paciente ainda apresentou infecção bacteriana secundária nas lesões e linfadenite axial, cervical e inguinal. Devido a todos esses sinais, o ordenhador teve que se afastar do trabalho e ficar hospitalizado por 10 dias.

Da Silva e colaboradores (2008) também acompanharam um surto de Vaccinia Bovina e escreveram um relato sobre a doença em três humanos. Esses autores observaram que os pacientes desenvolveram um quadro de toxemia, desidratação, mialgia e artralgia. Além das lesões nas mãos e antebraço, dois deles apresentavam lesões nas regiões periorbitária e vestibulo nasal (FIGURA 8). Os autores também relataram que as lesões em humanos surgem de 5 a 7 dias após o contato com as tetas infectadas por VACV. Na infecção humana por CPXV o período de incubação é de sete dias, enquanto que nas infecções por MPXV, o período de incubação é de 12 dias após o contato com animais doentes (Lewis-Jones, 2004). Como a doença é auto-limitante, a resolução completa do quadro clínico em

humanos ocorre em cerca de 30 dias após o início dos sintomas (Schatzmayr *et al.*, 2000; Da Silva *et al.*, 2008; Silva-Fernandes *et al.*, 2009).

Há também uma provável transmissão horizontal entre humanos, pois foram relatados casos com lesões semelhantes em outras pessoas da família, que viviam na mesma casa (Lobato *et al.*, 2005), porém essa não parece ser uma via de transmissão muito frequente.

O acompanhamento dos bovinos doentes desde o início da infecção até a resolução completa é bastante dificultado no campo. Normalmente, quando um surto é notificado, a doença já se encontra em estado avançado. Mas existem relatos sobre a evolução das lesões em bovinos infectados, ocorrendo, primeiramente, o desenvolvimento de um eritema cutâneo característico, que se inicia com o aparecimento de pequenas pápulas, as quais evoluem para vesículas umbilicadas, pústulas, úlceras e crostas e terminam por cicatrizar (FIGURA 9) (Bremner e Henderson, 2002; Trindade *et al.*, 2003; Lobato *et al.*, 2005). Em fazendas com bezerro ao pé, é comum observar o acometimento dos bezerros que desenvolvem lesões no focinho, lábios e mucosa oral (FIGURA 10). Como as lesões são bastante dolorosas, esses animais não conseguem se alimentar direito, causando perda de peso.

Lauder e colaboradores (1971) realizaram um experimento no qual inocularam VACV intradermicamente nos tetos de três vacas, sendo o único relato na literatura sobre a infecção experimental de VACV em vacas. Esses autores descreveram detalhadamente os achados clínicos nos animais inoculados. Foi observado que, no 3º dia pós inoculação (d.p.i.), os animais já apresentaram lesões com uma zona central de coloração cinza esbranquiçada com exsudato e na periferia, uma área eritematosa e inflamada. No 5º d.p.i. uma das vacas apresentou ulcerações profundas com irregularidades e intensa inflamação do tecido adjacente. As crostas desenvolveram-se no 6º d.p.i. com aspecto amarronzado e, ao redor, uma área com coloração cinza-esbranquiçada. No úbere também foi observado esses tipos de lesões.

Ainda foi descrito por esses autores que o tamanho das lesões varia no próprio animal, existindo tetos que apresentaram lesões bem arredondadas e pequenas, enquanto outros tetos

desenvolveram lesões maiores, arredondadas a ovaladas, e com as bordas irregulares.

Utilizando camundongos como modelo animal, Ferreira e colaboradores (2008a) inocularam amostras de VACV intradermicamente, através da escarificação da face plantar da pata direita posterior, sendo feito acompanhamento diário dos animais. A partir do 2º d.p.i. foi observado um aumento no volume das patas quando comparado com as não inoculadas. No 4º d.p.i. ocorreu o surgimento de vesículas envolvidas por lesões ulcerativas que variavam de tamanho entre os animais. Entre os dias 10 e 12 p.i. foi descrito uma diminuição do inchaço e uma evolução das vesículas para pústulas. As crostas passaram a surgir no 18º d.p.i. e a completa cicatrização ocorreu no dia 20 p.i. A integridade cutânea de todos os camundongos foi restabelecida.

Em relação ao período de incubação do VACV em bovinos, Lauder e colaboradores (1971) observaram o surgimento das lesões entre o 2º e 3º d.p.i., ou seja, o período entre a penetração do vírus na pele, sua multiplicação e o desenvolvimento de lesões é bastante rápido.

Esses autores descreveram que aos 42 d.p.i., todos os animais apresentaram os tetos cicatrizados, sendo que o local da cicatriz era detectável. Através dos acompanhamentos de surtos e depoimentos dos proprietários e ordenhadores, Lobato e colaboradores (2005) descreveram um curso clínico de 15 a 30 dias, nos animais acometidos.

Nas vacas as lesões normalmente estão confinadas às tetas e partes inferiores do úbere. O desenvolvimento de dor nas tetas acometidas pode interferir com a liberação do leite e a vaca normalmente se resente quando está sendo ordenhada (Madureira, 2009). A ocorrência de mastite e infecções secundárias concomitantes nas vacas afetadas é um achado clínico comum (Lobato *et al.*, 2005).

A febre é um sinal sistêmico bastante relatado em infecções por Poxvírus principalmente em humanos. Em um surto de varíola suína no estado de São Paulo, Bersano e colaboradores (2003) relatam que não houve alteração no estado geral dos animais em uma das granjas, porém, em outra foi observado febre, prostração, perda de apetite e emagrecimento.



Figura 7: Lesão nos dedos e face palmar de ordenhadores infectados com VACV na região de Itajubá/MG. Fonte: Da Silva *et al.*, 2008.



Figura 8: Lesão em vestíbulo nasal, periorbitária e intraorbitária em ordenhadores infectados com VACV na região de Itajubá/MG. Fonte: Da Silva *et al.*, 2008.

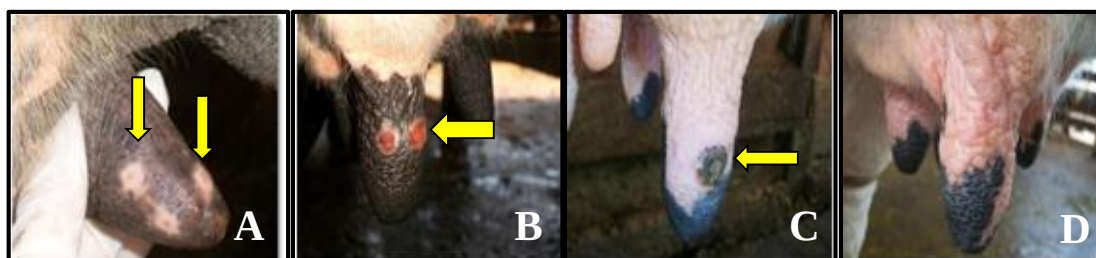


Figura 9: Lesões (setas) em tetos de vacas em lactação de um surto de Vaccinia bovina (VB) na região do Serro/Minas Gerais (A- vesícula; B- úlcera; C- crosta; D- cicatrização). Fonte: arquivo LPVA (2011).



Figura 10: Lesões ulceradas (setas) em bezerros (boca e focinho) num foco de VB em Mariana/MG. Fonte: Lobato *et al.*, 2005.

Prostração e perda de peso também foram descritos em camundongos inoculados com VACV (Ferreira *et al.*, 2008a). Lauder e colaboradores (1971) citam a ocorrência de um estado febril em um dos bovinos inoculados com VACV no 1º d.p.i.

3.2. Achados histopatológicos

Algumas das alterações histopatológicas associadas às infecções causadas por poxvirus incluem degeneração hidrópica das células epidérmicas e a presença de corpúsculos de inclusões e vacúolos intracitoplasmáticos e intranucleares, além de hiperplasia epidérmica acentuada com acantose (Kennedy e Miller, 1993).

Em uma inoculação experimental em suínos com vírus do gênero *Suipox*, Bersano e colaboradores (2003) observaram, no corte de pele, vesículas e uma acentuada infiltração dermal de células mononucleares e polimorfonucleares, predominantemente perivasculares. Notou-se também áreas de proliferação dos queratinócitos e ainda outras áreas em degeneração formando vesículas com células em lise e células baloniformes com corpúsculo de inclusão eosinofílico. Alguns corpúsculos encontravam-se entre os restos celulares. Além disso, havia áreas maiores com intenso infiltrado inflamatório, pústulas rompidas na superfície da epiderme e áreas em início de reparo.

Ferreira e colaboradores (2008a), através da inoculação intranasal com várias amostras de VACV em camundongos, realizaram estudos histopatológicos dos seguintes órgãos dos camundongos: baço, rins, pulmões, cérebro, coração e fígado. O pulmão foi o órgão que apresentou maiores alterações histopatológicas por ter sido o sítio primário de penetração do vírus. Os principais achados foram pneumonia intersticial com aumento da espessura dos septos inter-alveolares devido ao intenso infiltrado de células mononucleares, além de edema. Necrose e hemorragia focais também foram observadas. Lesões intestinais envolvendo íleo distal e ceco tais como erosão na mucosa e infiltração por linfócitos e plasmócitos na lâmina própria, com distorção das vilosidades e hiperplasia linfóide proeminente nas placas de Peyer também foram

descritas. Nos cortes de pulmão, usando o teste de imuno-histoquímica, foi detectada a presença de VACV.

O único relato de um estudo histopatológico em bovinos experimentalmente inoculados com VACV foi descrito por Lauder e colaboradores (1971), através da realização de biópsia nos tetos inoculados. No 1º d.p.i. foi realizada a primeira biópsia a qual, microscopicamente, consistia de uma pequena área de microvesículas coalescentes, com o acúmulo de leucócitos polimorfonucleares na derme adjacente. Na camada espinhosa da epiderme foram observadas degeneração hidrópica e corpúsculo de inclusão intracitoplasmático do tipo Guarnieri. Ao redor da lesão, havia edema e hiperplasia da epiderme. Algumas células mononucleares perivasculares foram observadas na derme profunda. Outra biópsia foi realizada no 4º d.p.i. e a epiderme apresentava necrose completa na área central da lesão com invasão de leucócitos polimorfonucleares e macrófagos. A derme adjacente estava intensamente congesta e corpúsculo de inclusão também foi observado em células epiteliais. A epiderme adjacente ainda se encontrava hiperplásica e com edema. Sincícios se formaram nas áreas onde haviam observado microvesículas. A derme encontrava-se congesta e edematosa com intenso infiltrado de células mononucleares ao redor dos vasos. Esses autores também realizaram a microscopia eletrônica e detectaram partículas virais no citoplasma das células epiteliais.

Saurini e colaboradores (2010) realizaram biópsia em tetos de vacas naturalmente infectadas com VACV e nas lesões foram observados hiperqueratose, acantose e degeneração balonosa da epiderme com áreas de infiltrado mononuclear difusas na derme. Em alguns casos, corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos foram observados. O grupo ainda realizou o teste de imuno-histoquímica e foram detectadas imunomarcações em todas as amostras, principalmente nos queratinócitos da epiderme e em corpúsculos de inclusão.

3.3. Achados hematológicos e bioquímicos

Não há na literatura nenhum relato sobre os perfis hematológico e bioquímico de animais infectados por poxvirus. Paredes e

colaboradores (2006) realizaram o hemograma e bioquímica sérica de uma mulher, na região sul do Peru, com lesão periorbital esquerda causada pelo *Pseudocowpox virus* e nenhuma alteração nesses exames foi detectada.

O varíola vírus causa, em humanos, alterações no hemograma tais como: linfocitose com abundância de células atípicas e células mononucleares ativadas. Em casos muito graves, ocorre o aparecimento de muitas células imaturas causando uma reação leucemóide. Além disso, há trombocitopenia devido ao quadro hemorrágico (Matanzo e Heras, 2002).

4. Mastite

Sabe-se que as lesões da VB são bastante dolorosas, principalmente no momento da ordenha, levando à retenção do leite na glândula mamária o que favorece a proliferação de bactérias, causando a mastite. Dessa forma, a mastite é um achado clínico comum em vacas infectadas por VB e é uma das maiores reclamações feitas pelos proprietários devido ao prejuízo econômico que causa. Lobato e colaboradores (2005) relataram que 43% dos animais acometidos por VB apresentaram mastite ou outro tipo de infecção secundária durante ou após o aparecimento dos sinais clínicos. Não há na literatura relatos a respeito de uma possível ação direta do VACV na glândula mamária.

A mastite é considerada a principal doença que afeta os rebanhos leiteiros no mundo e aquela que proporciona as maiores perdas econômicas na sua exploração. Os principais componentes para o custo da mastite são: perdas de produção de leite em função da mastite subclínica; custos dos casos de mastite clínica; custos dos descartes e mortes; e prejuízos da indústria por redução na qualidade e rendimento industrial de derivados (Santos, 2001).

A resposta inflamatória da glândula mamária à colonização e multiplicação bacteriana

apresenta como consequência direta o aumento do número de leucócitos originários do sangue que são transportados para dentro do lúmen alveolar. Estes leucócitos de origem sanguínea, somados às células de descamação do epitélio glandular secretor, são denominados de células somáticas do leite (CCS) (Santos,2001).

Considera-se glândula mamária sadia aquela que possui CCS menor que 300.000 células/ml de leite. Além disso, mudanças na composição do leite devido à mastite ocorrem pelo aumento da permeabilidade vascular, permitindo passagem de substâncias do sangue para o leite, como sódio, cloro, imunoglobulinas e proteínas séricas. Ocorrem também pela extensa lesão às células epiteliais produtoras de leite reduzindo a excreção de componentes do leite produzidos pela glândula mamária. A intensidade dessas mudanças dependerá da severidade da mastite e do estágio em que ela se encontra (Santos,2001).

A redução na produção do leite por infecção na glândula mamária se dá pelo dano físico às células epiteliais secretoras da glândula, assim como pela alteração na permeabilidade vascular do alvéolo secretor (Santos,2001). Segundo Wilson e colaboradores (1997), a intensidade da perda de produção dependerá da severidade da infecção, da duração, da idade do animal, da época do ano, do estado nutricional e do microorganismo causador. Os microorganismos que mais causam prejuízos são, em ordem de importância: *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus* sp., *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium bovis* e *Staphylococcus* spp.

A CCS tem sido utilizada como ferramenta importante no diagnóstico da mastite subclínica em rebanhos, principalmente após o surgimento dos equipamentos eletrônicos. Depois de realizado esse diagnóstico, é possível avaliar a perda de produção em leite pela mastite e baseado em sua incidência, traçar um plano de controle (Santos,2001).

Capítulo 1: Evolução clínico-patológica da Vaccínia bovina em vacas secas inoculadas experimentalmente com *Vaccinia virus* (VACV)

RESUMO

Este experimento teve como objetivo reproduzir a Vaccínia bovina (VB) em vacas secas mestiças através da inoculação experimental com *Vaccinia virus*-GP2 (VACV-GP2) a fim de estudar a evolução clínico-patológica das lesões e a localização do vírus por imuno-histoquímica em períodos distintos da doença. Seis vacas secas mestiças tiveram os tetos escarificados com auxílio de agulha hipodérmica em sítio delimitado, localizado na área central de cada teto. Toda a superfície do teto foi inoculada com suspensão viral contendo 2×10^6 UFP/100µl de MEM. Os animais foram divididos em três grupos (G1, G2 e G3), sendo que os animais do G1 e G2 foram eutanasiados e necropsiados em fases diferentes de evolução da doença. Nos animais do G3 realizou-se apenas a biópsia dos tetos nos locais onde apareceram lesões. Durante todos os dias foi realizado o exame clínico completo, até o dia do sacrifício para G1 e G2; e até o 32ºd.p.i. para G3. Amostras de soros foram coletadas em dias determinados (T0, T4, T9, T17, T23 e T26) e submetidas aos testes de imunoperoxidase em monocamada celular (IPMC) e de soroneutralização (SN) por redução de placa. Entre o 2º e 3ºd.p.i., todos os tetos já apresentavam lesões. Os animais do G1 foram sacrificados no 4ºd.p.i., com lesões na fase ulcerativa, enquanto os do G2 foram eutanasiados no 9ºd.p.i., em fase de crosta. Já a biópsia dos tetos das vacas do G3 foi realizada no 17ºd.p.i. quando todas as lesões já estavam cicatrizadas. Amostras de tetos de todos os grupos, glândula mamária e linfonodos retromamários dos G1 e G2 foram submetidos à histopatologia e imuno-histoquímica. Crostas das lesões também foram coletadas e submetidas à reação de polimerização em cadeia (PCR). No 4ºd.p.i. foi observada, nos tetos, uma dermatite pionecrótica focal intensa com infiltrado linfo-histiocitário multifocal intenso. No 9ºd.p.i. foi observada uma dermatite linfo-histiocitária multifocal moderada a intensa com sinais de regeneração tecidual e corpúsculo de inclusão intracitoplasmático em células epiteliais. No 17ºd.p.i. observou-se cicatrização tecidual completa e focal. Na glândula mamária foi observado, no 4º e 9ºd.p.i., infiltrado de mononucleares periacinar, principalmente de linfócitos, sendo este moderado a intenso e multifocal. Os linfonodos retromamários apresentaram moderada hiperplasia de folículos linfóides. Em todos os tecidos analisados aos 4º e 9ºd.p.i., exceto glândula mamária de 9º d.p.i., apresentaram imunomarcações intracitoplasmáticas em células epiteliais e inflamatórias, entretanto nos tetos de 17d.p.i. essas não foram observadas. A lesão da VB foi reproduzida, porém, de maneira bem localizada, diferindo das lesões observadas no campo. Os animais soroconverteram e nas crostas foi detectado DNA de VACV e realizado o isolamento viral. O PI foi curto e o curso da doença foi mais rápido quando comparado com vacas naturalmente infectadas.

PALAVRAS-CHAVE: Vaccínia bovina, inoculação experimental, histopatologia e imuno-histoquímica

ABSTRACT

The aim of this experiment was to reproduce bovine vaccine (BV) in crossbred dry cows through the experimental inoculation with *Vaccinia virus* Guarani P2 (VACV-GP2) in order to study the clinical and pathological evolution of the lesions and the localization of the VACV-GP2 by immuno-histochemistry in different stages of the disease. Six crossbred dry cows were intradermically inoculated with VACV-GP2 in central area of each teats. These areas were scarified with hypodermic needle and the teats were inoculated with 2×10^6 PFU/100 μ l of MEM. The cows were divided into three groups (G1, G2 and G3). The animals of G1 and G2 were euthanized at the 4th and 9th days post inoculation (d.p.i.), respectively, while in cows of G3, a biopsy was performed on the teats in the area inoculated at the 17th d.p.i. Clinical examination was realized every day in order to analyze if BV could cause systemic alterations. Serum samples were collected in determinate days (T0, T4, T9, T17, T23 e T26) to realize immunoperoxidase monolayer cell assay (IPMA) and serum neutralization test (SN). All cows had typical lesions of BV, in the inoculated area, between the 2nd and 3rd d.p.i. The teats of the cows euthanized at the 4th d.p.i. showed papules and ulcerative lesions while the teats of the cows euthanized at 9th d.p.i. had scabs. When the biopsy was realized, the teats were healed. For this study were analyzed teats, mammary gland and mammary lymph nodes with histopathological and immuno-histochemistry analysis. Moreover, scabs were collected from lesions and these were submitted to PCR and virus isolation. In the histopathological analysis it was observed in teats at the 4th d.p.i. an intense focal pionicrotic dermatitis and severe multifocal mononuclear cell infiltration in the dermis. At the 9th d.p.i. it was observed a moderate to intense multifocal mononuclear cell infiltration dermatitis, recent signs of tissue regeneration and intracytoplasmic inclusion bodies e in epithelial cells. At the 17th d.p.i., the epidermis was completely healed. In mammary glands and mammary lymph nodes at the 4th and the 9th d.p.i., mastitis and lymphoid hyperplasia were diagnosed, respectively. All tissues at 4th and 9th d.p.i. showed immunolabelling in inflammatory and epithelial cells, except the mammary gland at the 9th d.p.i. In teats at the 17th d.p.i. immunolabelling was not observed. In this study, BV lesions were reproduced, with a incubation period and VACV viable viral particles were isolated. All cows showed total and neutralizing antibodies against VACV-GP2, but the lesions developed only in the scarified area, differing of the lesions in naturally infected animals.

KEYWORDS: bovine vaccine, experimental inoculation, histopathological and immuno-histochemistry

1. INTRODUÇÃO

Os vírus pertencentes à família *Poxviridae* causam um amplo espectro de manifestações clínicas dependendo da espécie viral e do seu hospedeiro. Estas manifestações variam desde uma infecção localizada, geralmente auto-limitada, até uma infecção sistêmica, com o comprometimento de vários órgãos e alta morbidade e mortalidade (revisado por Fenner *et al.*, 1989; Tscharke *et al.*, 2002).

A vaccínia bovina (VB) é uma zoonose emergente que vem causando vários surtos no Brasil nos últimos anos, sendo o VACV o agente etiológico dessa doença. A principal forma de transmissão para o homem é através do contato direto com tetos lesados de vacas doentes. A mastite normalmente ocorre concomitantemente com as infecções do VACV e é responsável por grandes perdas econômicas. A porta de entrada do VACV se dá através de lesões de continuidade na pele, sendo que, em humanos, a multiplicação do vírus ocorre no local da infecção e a partir daí o vírus é drenado para os linfonodos adjacentes causando linfadenopatia local (Fenner *et al.*, 1989). As lesões nos bovinos e humanos tendem a evoluir da mesma forma: iniciando com pápulas, vesículas, e evoluindo para úlceras, crostas e cicatrização (Buller e Palumbo, 1991).

Estudos da patogênese do VACV tem sido realizados com frequência em camundongos (Tscharke e Smith, 1999; Ferreira, 2008a e 2008b; Abrahão, 2009b), porém, nesta espécie não há como mimetizar as lesões dos tetos e/ou úberes que ocorrem em bovinos. Em bovinos não existem muitos estudos sobre a patogenia da VB. Os relatos da doença em vacas normalmente descrevem as lesões macroscópicas observadas nos tetos e/ou úberes de vacas (Lobato *et al.*, 2005; Trindade *et al.*, 2007), mas um estudo histopatológico completo que envolve os tetos, a glândula mamária e os linfonodos retromamários ainda não foi descrito.

Devido à falta de informação sobre a patogenia do VACV em bovinos foi proposto inocular os tetos de vacas secas com uma amostra de VACV, o Guarani P2 (GP2), isolado de um

bovino em um surto de VB no município de Guarani no Estado de Minas Gerais, a fim de estudar a ação do vírus, analisando macro e microscopicamente as lesões que podem surgir associadas à infecção viral.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Local do Experimento e Instalações

O experimento foi realizado no Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO), no município de Pedro Leopoldo-MG e os animais foram alojados em três baias de concreto com dimensões de 3,5 x 3,5 m separadas entre si por parede, totalizando dois animais por baia. A cama dos animais era de serragem e feno e era trocada diariamente. A área do experimento era telada e com acesso restrito. Os dejetos (fezes e cama) eram descartados diariamente em fossas 3,0 x 2,5m, abertas na área experimental e, em seguida, cobertos com cal e terra. Os efluentes da lavagem das baias foram descartados em fossa séptica exclusiva para as baias de inoculação (FIGURA 11).

2.2. Animais inoculados

Foram utilizadas seis vacas secas mestiças, variando de meio sangue à 5/8 holandesa, entre 5 a 10 anos de idade e que apresentavam tetos e úberes íntegros verificados através da inspeção e palpação dos mesmos. Todas as vacas eram soronegativas para *Orthopoxvirus* pelo teste de soroneutralização (SN). Desses animais, dois foram originados da Fazenda Modelo da UFMG localizada em Pedro Leopoldo-MG. As outras quatro vacas eram originárias do município de Jaboticatubas-MG e estavam gestantes. As vacas foram alojadas nas baias uma semana antes do início do experimento para adaptação. Em todas foram aplicadas vermífugos e banhos carrapaticidas, além de brincos com numeração entre 01 a 06.

2.3. Alimentação dos animais

Foram fornecidos um fardo de feno de Tyfton tipo B e 1,5 Kg de ração com 18% de proteína bruta (PB) para vaca seca, para cada animal, duas vezes ao dia. O sal mineral foi dado na quantidade de 50g, por animal, por dia e a água foi fornecida “*ad libidum*”.

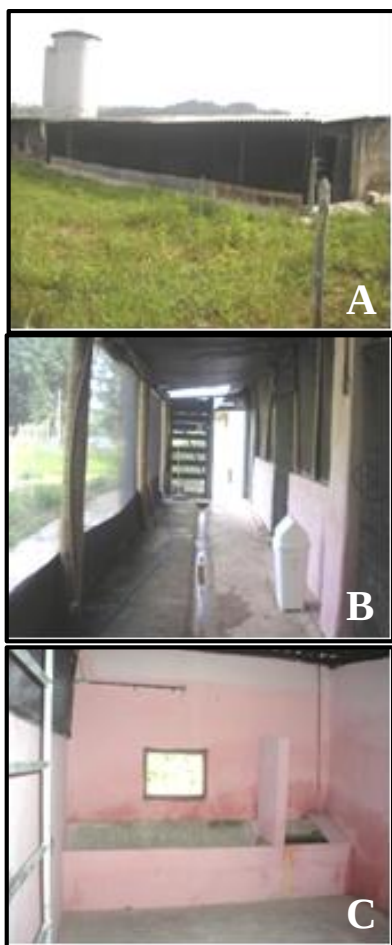


Figura 11: Estrutura no LANAGRO onde ocorreu a inoculação e o acompanhamento das vacas secas mestiças experimentalmente infectadas pelo VACV-GP2. (A) visão externa das baias; (B) visão interna do corredor que dá acesso às baias; (C) visão interna de uma das baias.

2.4. Vírus utilizado

Para inocular os animais foi utilizada a amostra viral VACV GP2, isolado de vacas com lesões nas tetos durante um surto de VB ocorrido em 2001 no município de Guarani/MG, caracterizado sorológica e molecularmente como um VACV (Trindade *et al.*, 2006). O vírus foi multiplicado, purificado e clonado de acordo com Campos e Kroon (1993) e a titulação viral foi determinada segundo Trigueiro (2004). O título viral obtido foi de 10^9 unidades formadoras de placas por mililitro (UFP/mL).

2.5. Escarificação e inoculação

A pele dos quatro tetos de cada vaca foi delimitada, com caneta própria de pele, na área central cranial com uma régua geométrica (FIGURA 12A) e a epiderme foi escarificada no local delimitado com o auxílio de uma agulha hipodérmica (22 G1, 0,70 x 25 mm). A inoculação viral foi realizada, primeiramente, no local escarificado e, posteriormente, no restante do teto (FIGURA 12B). Para cada teto foram utilizados 100 μ l de suspensão contendo 2×10^6 UFP/ml de VACV-GP2.

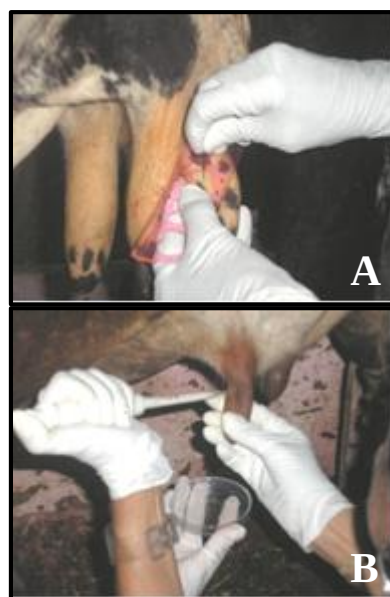


Figura 12: Escarificação e inoculação em tetos de vacas secas mestiças experimentalmente infectados com vírus da VB. (A) Escarificação da área cranial do teto delimitada com régua geométrica e (B) inoculação do teto no local escarificado e nas demais partes do teto com VACV-GP2.

2.6. Acompanhamento dos animais

Após a inoculação, de acordo com a evolução das lesões nos tetos das vacas, os animais foram divididos em três grupos. O grupo 1 (G1), constituído pelas vacas 01 e 03, foi eutanasiado no 4º dia pós-infecção (d.p.i.), momento que apresentavam pápulas e úlceras, enquanto as vacas 02 e 04, apresentando crostas e processo de cicatrização nos tetos, foram selecionadas para o grupo 2 (G2) e sacrificadas aos 9 d.p.i. No grupo 3 (G3), constituído pelas vacas 05 e 06, foi realizada biopsia dos tetos, no local das

lesões, no 17º d.p.i., quando as lesões estavam totalmente cicatrizadas. Os animais do G3 estavam no terço inicial de gestação e, com isso, não foram sacrificados a fim de obter um estudo sobre transmissão vertical após o nascimento dos bezerros. A biopsia foi feita, após anestesia local, pelo Professor Dr. Valentim Arabicano Gheller do Departamento de Clínica e Cirurgia da Escola de Veterinária da UFMG. Os tecidos coletados foram conservados em formol 10%. Para o presente estudo foram feitas análises histopatológicas e imuno-histoquímicas (IHQ) dos tetos, das glândulas mamárias (GM) e dos linfonodos retromamários (LRM) (TABELA 3).

Um dia antes da inoculação (T0) até o 32º d.p.i. (T32) foi realizado exame clínico de acordo com o protocolo elaborado pelo nosso grupo (ANEXO 1), baseado nas orientações de Dirksen e colaboradores (1993). Também foi desenvolvido um mapa dermatológico para indicar o local e o tipo das lesões (eritema, vesículas, pápulas, úlceras, crostas e cicatrização) (ANEXO 2). O exame clínico foi sempre realizado na parte da manhã, entre 8 e 10 horas, com duração aproximada de 20 minutos por animal.

Apesar das vacas estarem secas, o movimento de ordenha era realizado duas vezes ao dia nos tetos a fim de mimetizar o manejo das vacas na infecção natural.

2.7. Ordenha

Como citado no item anterior, o movimento de ordenha foi realizado duas vezes ao dia a fim de mimetizar o manejo das vacas na infecção natural, pois os relatos da doença são descritos em vacas em lactação (Lobato *et al.*, 2005; Trindade *et al.*, 2006; Abrahão *et al.*, 2010). Foi utilizado um par de luvas por animal e, para cada teto foi estipulado um tempo mínimo de 30 segundos para realização dos movimentos.

2.8. Eutanásia

O procedimento de eutanásia foi realizado conforme preconiza o Comitê de Ética em experimentação animal (CETEA), sendo utilizada sedação prévia com xilazina (0,2mg/Kg PV IM) seguida de administração de tiopental em superdosagem (50mg/Kg PV EV).

2.9. Material coletado

2.9.1. Amostras de tecidos

Os animais eutanasiados foram necropsiados e destes coletados os seguintes tecidos: linfonodos (supramamários, ilíacos internos, mesentéricos, bronquiais e submandibulares); fragmentos de baço, fígado, íleo, cólon, ceco, pulmão, rim, tonsila, glândula mamária e pele na região inoculada. Posteriormente, foram feitas alíquotas dos tecidos que tiveram o seguinte destino: fixação no tampão formalina a 10% e nitrogênio líquido para, posteriormente, serem conservados a -70°C. As necropsias foram realizadas em local apropriado no LANAGRO - Pedro Leopoldo.

As vacas 01 e 04, pertencentes a G1 e G2, respectivamente, encontravam-se no primeiro terço de gestação. Tecidos placentários, cordão umbilical, pulmão e fígado fetais foram coletados e mantidos no nitrogênio líquido para, posteriormente, serem conservados a -70°C.

2.9.2. Soro sanguíneo

Amostras de sangue de cada vaca foram coletadas em dias determinados para obtenção do soro. No dia da inoculação (T0) e no 4º d.p.i. (T4) houve coleta de todos os grupos, no 9º d.p.i. (T9) foi obtido sangue dos grupos G2 e G3 e nos dias 17, 23 e 26 após a inoculação (T17, T23 e T26) a coleta foi realizada apenas nos animais do G3 (TABELA 4). Os sangues foram coletados na artéria coccígea em tubos vacutainer de 10 mL sem adição de anticoagulante. Após retração do coágulo à temperatura ambiente, as amostras eram centrifugadas de acordo com Madureira, 2009. Os soros foram alíquotados em microtubos, identificados e conservados a 20°C negativo.

2.9.3. Crostas

Crostas das lesões foram coletadas em microtubos sem meio para conservação e mantidas no gelo e, posteriormente, conservadas a -70°C até o momento do processamento.

2.10. Testes realizados

2.10.1. Análise histopatológica

Foi realizada análise histopatológica dos tetos, GM e LRM, como citado no item 2.6 do respectivo capítulo. Os tecidos fixados em formol 10% foram processados e embebidos em

Tabela 3: Características clínicas das lesões dos tetos das vacas experimentalmente inoculadas com VACV-GP2 no momento da eutanásia (G1 e G2) e biópsia dos tetos (G3) e os tecidos coletados de cada grupo que foram submetidos às técnicas de histopatologia e imuno-histoquímica.

GRUPOS	G1	G2	G3
d.p.i. da eutanásia ou biópsia	Eutanásia no 4ºd.p.i.	Eutanásia no 9ºd.p.i.	Biópsia dos tetos no local da lesão no 17ºd.p.i
Característica clínica das lesões no momento da eutanásia ou biópsia	Lesões em pápulas e úlceras	Lesões crostosas	Lesões cicatrizadas
Tecidos submetidos à histopatologia e IHQ	Tetos, GM e LRM	Tetos, GM e LRM	Tetos

Tabela 4: Períodos de coletas das amostras de sangue dos animais de cada grupo experimentalmente inoculados com VACV-GP2 para obtenção do soro.

Momento da coleta	T0	T4	T9	T17	T23	T26
Grupos	G1, G2 e G3	G1, G2 e G3	G2 e G3	G3	G3	G3

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).

2.10.2. Imuno-histoquímica

Para a padronização do teste de IHQ foi escolhido o corte de teto do animal 01 do G1. Posteriormente, o teste foi realizado nos fragmentos de tetos, GM e LRM.

Foram testados as seguintes diluições do anticorpo primário policlonal produzido a partir de coelhos imunizados com VACV-GP2: 1:50, 1:100, 1:200, 1:500 e 1:1000. Soluções de bloqueio com caseína a 2%, soro normal de cabra e leite em pó a 2% também foram testados, assim como o cromógeno a ser utilizado na revelação (DAB – 3,3 diaminobenzidine tetrahydrochloride, Sigma, USA e AEC – 3-amino 9 ethyl carbazole, Sigma, USA). Como controles negativo e positivo foram utilizados cortes do teto da vaca 01 usado na padronização, o qual havia sido previamente testado com positivo para VACV por PCR e isolamento viral. Para o controle negativo omitiu-se o anticorpo primário. Os anticorpos secundário e terciário (Streptavidina conjugada com peroxidase) utilizados foram os

do Kit DAKO LSAB + System-HRP (Dako, EUA).

O protocolo foi adaptado de um trabalho de Ferreira e colaboradores (2008b). Foi realizada recuperação antigênica usando proteinase K 0,05%, por 5 minutos. O anticorpo secundário foi incubado por 45 minutos. O AEC foi acrescentado em tampão acetato pH 5,0 a 50 nM e peróxido de hidrogênio a 30% (v/v).

2.10.3. Imunoperoxidase em monocamada celular (IPMC)

Amostras de soros coletadas foram submetidas ao teste de IPMC para detecção de AT. O teste foi padronizado para VACV no Laboratório de Pesquisa em Virologia Animal da Escola de Veterinária (LPVA) (Gerber *et al.*, 2012).

2.10.4. Soroneutralização

Amostras de soros coletadas foram submetidas ao teste de SN por inibição de placa para investigar a presença de anticorpos neutralizantes contra VACV-GP2. O soro foi aquecido a 56°C por 30 minutos e usado em ensaio de neutralização do vírus como descrito por Lobato e colaboradores (2005). O título de neutralização foi expresso como a recíproca da maior diluição que apresentou 50% de inibição

da formação de placa, quando comparados aos controles positivos e negativo.

2.10.5. PCR-nested

A reação de PCR-nested, para amplificação de parte do gene do fator de crescimento viral (*vgf*), foi realizada de acordo com Abrahão e colaboradores (2010) para detectar DNA viral nas amostras de crostas coletadas dos tetos e dos tecidos fetais coletados na necropsia. A PCR-nested foi realizada no Laboratório de Vírus do Instituto de Ciências Biológicas – ICB/UFMG.

2.10.6. Isolamento e purificação viral

O isolamento viral nas crostas foi realizada no Laboratório de Vírus do ICB/UFMG conforme Trindade e colaboradores (2006) e a purificação do vírus foi realizada segundo Joklik, 1962.

2.11. Comitê de Ética

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), com número de protocolo é 167/09.

2.12. Análise Estatística

Foi realizada a análise estatística da temperatura corporal dos animais em relação aos dias pós infecção. Foi usado o Teste de TUKEY, considerando significância para $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1. Exame clínico e análise macroscópica dos tecidos

Em relação à postura, comportamento, parâmetros vitais, coloração, umidade e integridade das mucosas, pele e pelos, com exceção da pele dos tetos inoculados, e demais sistemas, não foi detectado nenhum tipo de alteração durante o exame clínico. Os LRM apresentaram-se aumentados de volume à palpação a partir do 6º d.p.i., nos animais do G2 e nos do G3. Nos animais do G3, esse aumento de volume foi observado até o 16º d.p.i. Nos outros linfonodos examinados não foi observada nenhuma alteração à palpação. A FIGURA 13 mostra a média da variação de temperatura corporal de cada grupo durante o experimento. Não houve diferença estatística entre as médias

de cada grupo em relação ao tempo para $p < 0,05$.

Três dias após realização dos movimentos de ordenha nos tetos, três vacas (uma de cada grupo) começaram a secretar, em pouca quantidade, líquido esbranquiçado e aguado, semelhante ao leite. As vacas do G2 e do G3 secretaram até o 9º d.p.i.

Na necropsia foi observado que os LRM dos dois animais do G1 encontravam-se aumentados de tamanho, sugestivos de hiperplasia linfóide, no 4º d.p.i. Nenhuma outra alteração macroscópica foi observada nos órgãos das vacas necropsiadas. Na necropsia do G2 foi constatado o aumento de volume dos LRM. Nos demais linfonodos não foi observado nenhuma alteração macroscópica.

3.2. Evolução das lesões

Todos os animais apresentaram lesões características da VB em todos os tetos. As lesões apresentaram-se localizadas, restritas à área de escarificação, mesmo o vírus tendo sido espalhado por toda a superfície dos tetos. Eritema no local da inoculação foi observado no 2º d.p.i. nos animais com os tetos despigmentados. As lesões nos tetos iniciaram-se com vesículas e pápulas (FIGURAS 14A e 14B), sendo que quatro animais apresentaram estas lesões iniciais no 3º d.p.i. e os outros dois, no 4º d.p.i. As pápulas e vesículas evoluíram para úlceras que foram detectadas nos animais do G1 a partir do 4º d.p.i. Por esta razão foram os primeiros animais a serem sacrificados (FIGURA 14C). Nos outros grupos, todos os animais apresentaram ulcerações em pelo menos um dos tetos nos 5º, 6º e 7º d.p.i. As crostas foram detectadas em pelo menos um dos tetos no 5º d.p.i. nos animais do G2 e G3, sendo que no 9º d.p.i., todos os tetos de ambos grupos apresentaram crostas (FIGURAS 14D), o que levou à decisão de sacrificar as vacas do G2. As lesões encontravam-se no estágio inicial de cicatrização a partir do 9º d.p.i. (FIGURA 14E). No 12º d.p.i. os tetos de um dos animais do G3 estavam completamente cicatrizados, enquanto do outro, a cicatrização completa foi observada no 14º d.p.i. (FIGURA 14F). Apenas em G3 foi possível fazer o acompanhamento clínico completo desde o período de incubação até a

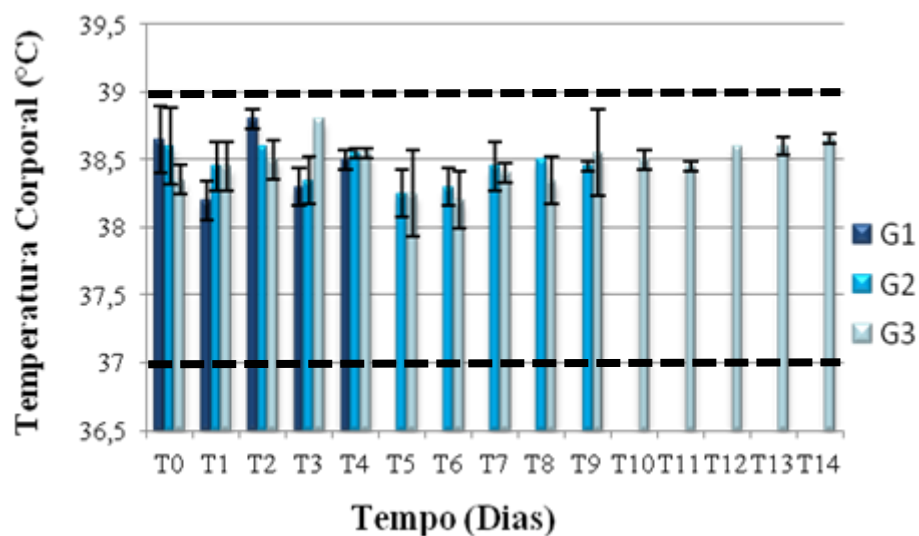


Figura 13: Média dos valores da temperatura corporal (TC) das vacas experimentalmente inoculadas com VACV-GP2 divididas por grupos (G1, G2 e G3) a partir da inoculação (T0) até o sacrifício para G1 e G2 (T4 e T9, respectivamente) e até T14 para o G3. Linhas horizontais tracejadas indicam o intervalo de referência fisiológica para a TC na espécie bovina (Dirksen *et al.*, 1993). Linhas verticais pretas indicam erro padrão. Não houve diferença estatística entre as médias da TC dos animais de cada grupo em relação ao tempo para $p < 0,05$.

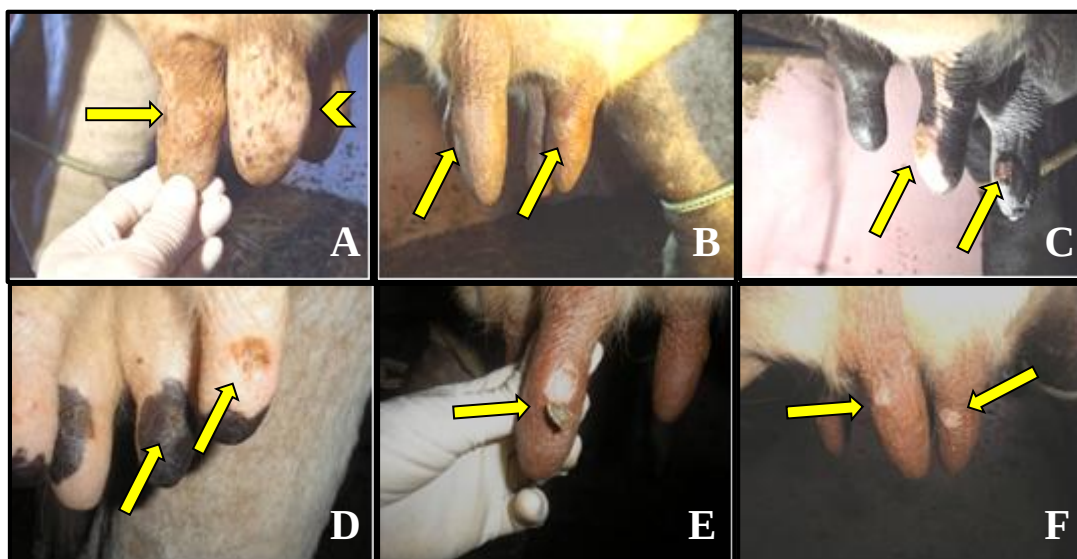


Figura 14: Detalhes da evolução das lesões nos tetos das vacas experimentalmente inoculadas com VACV-GP2. (A) Vesículas (seta) no teto posterior direito (TPD) e pápula (cabeça de seta) no teto anterior direito (TAD) no 3°d.p.i.; (B) Pápulas (setas) nos quatro tetos no 3°d.p.i.; (C) Úlceras (setas) nos tetos anterior esquerdo e posterior esquerdo (TAE e TPE) no 4°d.p.i.; (D) Crostas nos tetos AE, PE e PD no 5°d.p.i.; (E) Início da fase de cicatrização no TAD com perda de crosta (seta) no 9°d.p.i.; (F) Tetos cicatrizados (setas).

cicatrização total, já que os animais do G1 e G2 foram sacrificados precocemente (TABELA 5).

3.3. Anticorpos totais (AT) e Anticorpos Neutralizantes (AN) contra VACV

Todos os animais soroconverteram. A soroconversão foi detectada a partir do 4º d.p.i., sendo que no T29, as vacas do G3 ainda apresentavam títulos de AT. Os dois animais do G3 apresentaram AN no 23º e 26º d.p.i.

3.4. Coleta de crostas

Foram coletadas crostas de três vacas com lesões nos tetos, sendo que uma vaca pertencia ao G1 e as outras duas pertenciam ao G3.

3.5. PCR-nested

Foi detectado DNA de VACV nas amostras de crostas coletadas das lesões dos animais. Porém, nos tecidos fetais não foi encontrado DNA viral de VACV.

3.6. Isolamento viral

Em todas as crostas coletadas foi realizado o isolamento do VACV-GP2 com título de 10⁸ UFP/grama de crosta.

3.7. Padronização da técnica de imuno-histoquímica

A diluição do anticorpo primário que apresentou melhor resultado na padronização da técnica para VACV-GP2 foi 1:50, a solução de bloqueio escolhida foi o leite em pó a 2% e o cromógeno utilizado foi o AEC.

3.8. Achados histopatológicos

Os achados microscópicos nos tetos foram condizentes com os achados macroscópicos como úlceras, crostas e cicatrização nos períodos de 4, 9 e 17 d.p.i., respectivamente. O infiltrado inflamatório nos tetos foi misto, composto por neutrófilos, piócitos, linfócitos e macrófagos. O infiltrado inflamatório foi diminuindo com a evolução das lesões. Os LRM

dos G1 e G2 apresentaram hiperplasia linfóide moderada. Nas glândulas mamárias do 4º e 9º d.p.i. foi observado infiltrado linfocitário periacinar multifocal de intensidade moderada a intensa, sugestivo de mastite. Os achados histopatológicos observados foram descritos na TABELA 6.

Tabela 5: Característica e evolução das lesões nos tetos das vacas experimentalmente inoculadas com VACV-GP2.

d.p.i.	Característica das lesões nos tetos
0	Inoculação
2	Eritema
3-4	Pápulas e vesículas
4-7	Úlceras
5-9	Crostas
9	Início da fase de cicatrização
12-14	Cicatrização completa em todos os tetos

3.9. Imuno-histoquímica

O teste de IHQ foi realizado nos mesmos tecidos que foram submetidos às análises histopatológicas descritas no item anterior. Imunomarcações tiveram distribuição multifocal e foram detectadas no citoplasma de células epiteliais dos tetos e glândulas mamárias e em células inflamatórias de todos os tecidos dos G1 e G2 indicando a presença de proteína do VACV intracelular. A intensidade e quantidade das imunomarcações foram diminuindo com evolução das lesões. Na glândula mamária, as imunomarcações não foram observadas no G2. A descrição das imunomarcações estão detalhadamente relatadas no TABELA 7.

Tabela 6: Descrição histopatológica dos tecidos das vacas experimentalmente inoculadas com VACV-GP2 em diferentes fases de evolução das lesões.

Grupos (d.p.i.)	TETOS	Glândula Mamária	LRM
G1 (4º d.p.i.)	Necrose focal da epiderme e parte da derme superficial e formação de crosta (FIGURA 15 A); Intenso infiltrado neutrofílico focal na epiderme e intenso infiltrado linfo-histiocitário perivascular multifocal a coalescente nas dermes superficial e profunda (FIGURA 15B); Destrução da queratina com edema, formação de crosta e moderado infiltrado neutrofílico na área adjacente à lesão e infiltrado linfo-histiocitário na derme (FIGURA 15C). Diagnóstico: Dermatite necro-purulenta focal intensa	Infiltrado linfo-histiocitário periacinar moderado a intenso multifocal (FIGURA 18A). Diagnóstico: Mastite	Moderada hiperplasia folicular linfóide difusa (FIGURA 19A). Diagnóstico: hiperplasia linfóide moderada difusa.
G2 (9º d.p.i.)	Hiperplasia epidermal com regeneração focal, caracterizada pela presença de várias células em mitose, na camada espinhosa e infiltrado linfo-histiocitário perivascular intenso multifocal a coalescente na derme superficial e perivascular discreto a moderado multifocal a coalescente na derme profunda (FIGURA 16A); Angiogênese e proliferação de tecido conjuntivo fibroso moderado focal na derme superficial (FIGURA 16B); Crosta na camada de queratina e epiderme delgada com restos celulares e infiltrado neutrofílico moderado a intenso (FIGURA 16C) Corpúsculo de inclusão intracitoplasmático eosinofílico em células epiteliais (FIGURA 16D); Diagnóstico: Dermatite focal moderada subaguda com sinais de regeneração tecidual	Infiltrado linfo-histiocitário periacinar moderado a intenso multifocal (FIGURA 18B). Diagnóstico: Mastite	Moderada hiperplasia folicular linfóide difusa (FIGURA 19B). Diagnóstico: hiperplasia linfóide moderada difusa
G3 (17ºd.p.i.) Biopsia	Reepitelização focal com fibroblastos jovens e moderada proliferação de tecido conjuntivo na derme superficial, angiogênese e infiltrado mononuclear perivascular (FIGURAS 17A e 17B). Diagnóstico: Cicatrização	Não realizado	Não realizado

Tabela 7: Descrição das imunomarcações dos tecidos das vacas experimentalmente inoculadas com VACV-GP2 em diferentes fases de evolução das lesões.

Grupos (d.p.i.)	TETOS	Glândula Mamária	LRM
G1 (4° d.p.i.)	Imunomarcação intracitoplasmática multifocal moderada em células epidérmicas da camada escamosa adjacentes à área lesionada, em células epiteliais lesionadas e em macrófagos (FIGURA 20A).	Imunomarcação intracitoplasmática multifocal discreta em células epiteliais glandulares e em macrófagos na região intersticial da glândula (FIGURA 21).	Imunomarcação intracitoplasmática discreta a moderada e macrófagos e linfócitos multifocal nas regiões medular e cortical.
G2 (9° d.p.i.)	Imunomarcação intracitoplasmática multifocal discreta em células epidérmicas da camada escamosa adjacentes à área lesionada, em células epiteliais lesionadas e em macrófagos (FIGURA 20B).	Nenhuma imunomarcação foi observada	Imunomarcação intracitoplasmática discreta a moderada e macrófagos e linfócitos multifocal nas regiões medular e cortical (FIGURA 22).
G3 (17° d.p.i.) Biopsia	Nenhuma imunomarcação foi observada	Teste não realizado	Teste não realizado

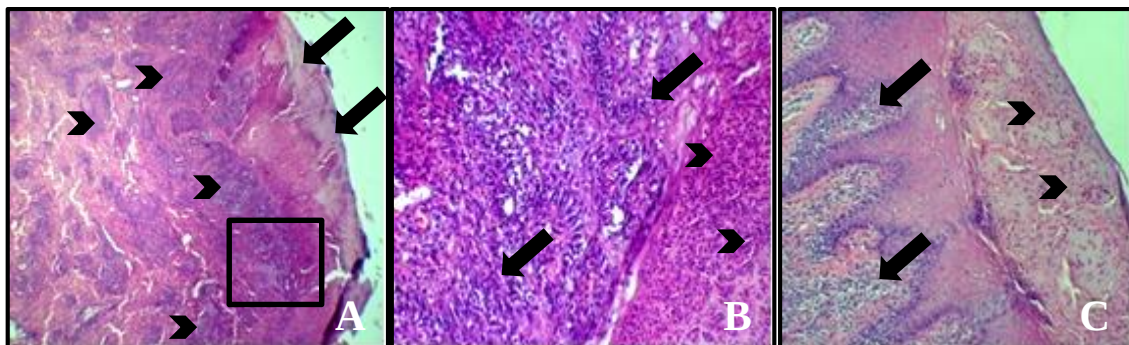


Figura 15: Cortes histológicos do teto anterior direito (TAD) da vaca 01 experimentalmente inoculada com VACV-GP2 e necropsiada no 4ºd.p.i. Coloração H&E. (A) Necrose focal do epitélio com infiltrado inflamatório intenso (cabeças de setas) e formação de crosta (setas) (40X). (B) Infiltrado neutrofílico (cabeças de setas) e linfo-histiocitário (setas) no local lesionado representando, em maior aumento, a região delimitada na figura A (200X). (C) Área adjacente à lesão com edema, formação de crosta e infiltrado neutrofílico (cabeças de setas) e infiltrado linfo-histiocitário na derme (setas) (100X).

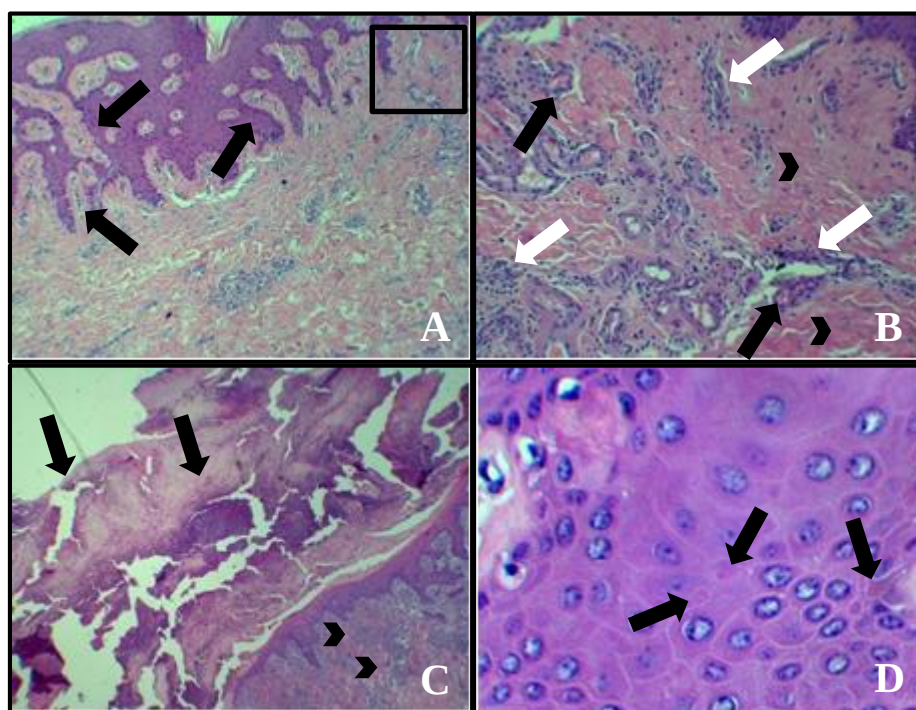


Figura 16: Cortes histológicos dos tetos anteriores da vaca 02 experimentalmente inoculada com VACV-GP2 e necropsiada no 9ºd.p.i. Coloração H&E. (A) Hiperplasia epidermal com formação de “papilas” dérmicas (setas pretas) e proliferação de tecido conjuntivo fibroso, infiltrado linfo-histiocitário e angiogênese na derme (área delimitada) (40X); (B) Tecido conjuntivo fibroso (cabeças de setas), infiltrado linfo-histiocitário (setas brancas) e angiogênese (setas pretas) representando, em maior aumento, a área delimitada na figura A (200X). (C) Crosta (setas) e infiltrado linfo-histiocitário (cabeças de setas pretas) (100X). (D) Corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos eosinofílicos em células epiteliais (setas) (400X).

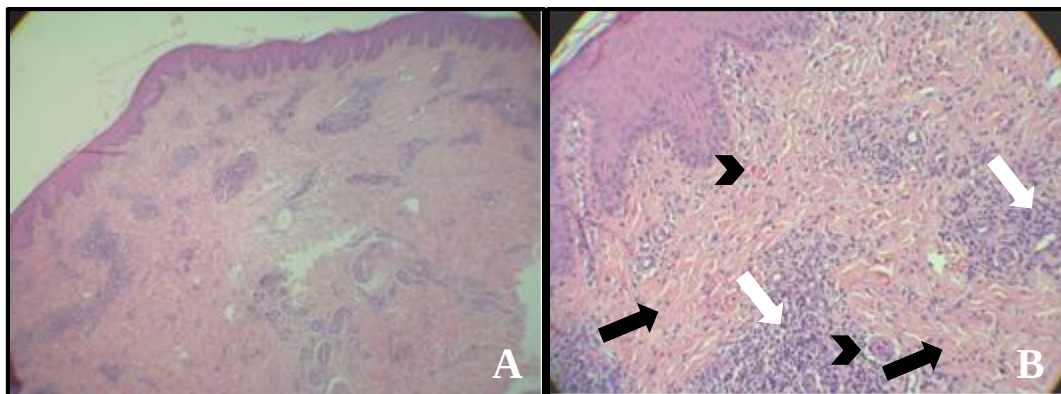


Figura 17: Cortes histológicos do TAD da vaca 06 experimentalmente inoculada com VACV-GP2 e biópsia realizada no 17ºd.p.i. Coloração H&E. (A) Epitélio regenerado (40X); (B) Epitélio regenerado mostrando em detalhes a fibroplasia (setas pretas), angiogênese (cabeça de seta) e infiltrado mononuclear perivascular (setas brancas) aumento, a região delimitada na figura A (400X).

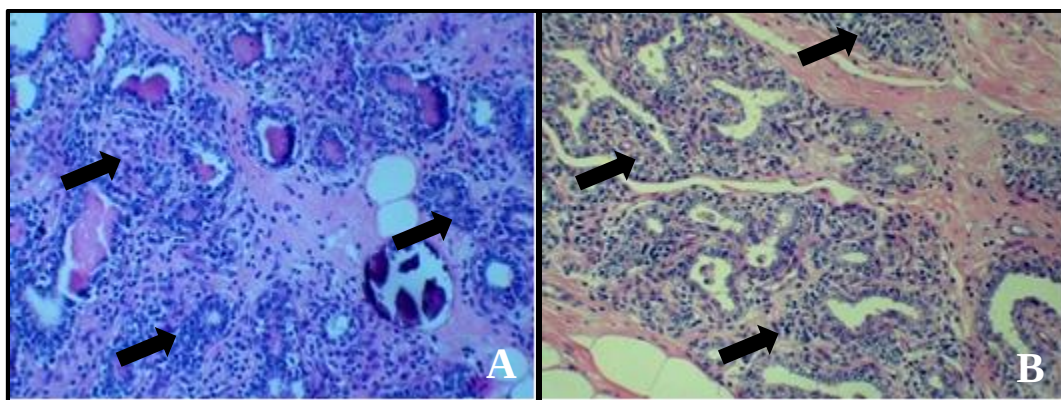


Figura 18: Cortes histológicos das glândulas mamárias anteriores direitas das vacas 01 (A) e 02 (B) experimentalmente inoculadas com VACV-GP2 e necropsiadas no 4º e 9ºd.p.i., respectivamente. Coloração H&E. Infiltrado mononuclear (setas) multifocal moderado periácinar, com predomínio de linfócitos (100X).

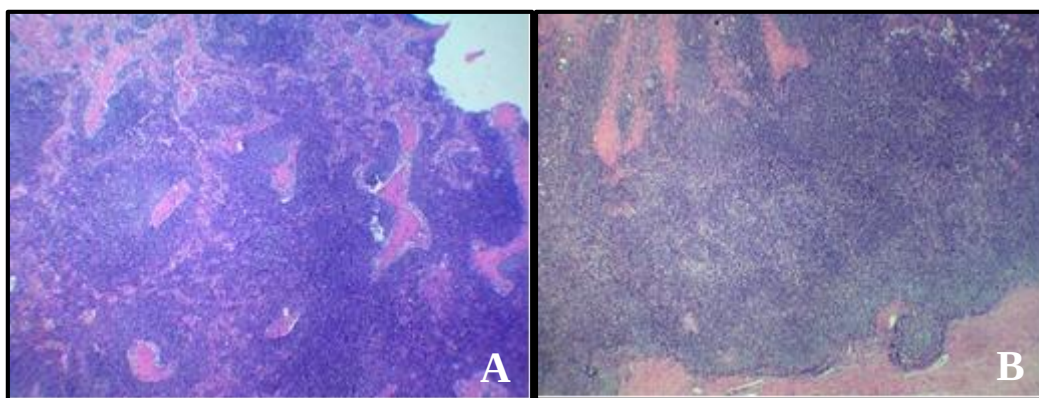


Figura 19: Cortes histológicos dos linfonodos retromamários direitos das vacas 01 (A) e 02 (B) experimentalmente inoculadas com VACV-GP2 e necropsiadas no 4ºd.p.i. e no 9ºd.p.i., respectivamente. Coloração H&E. Hiperplasia de tecido linfóide (100X).

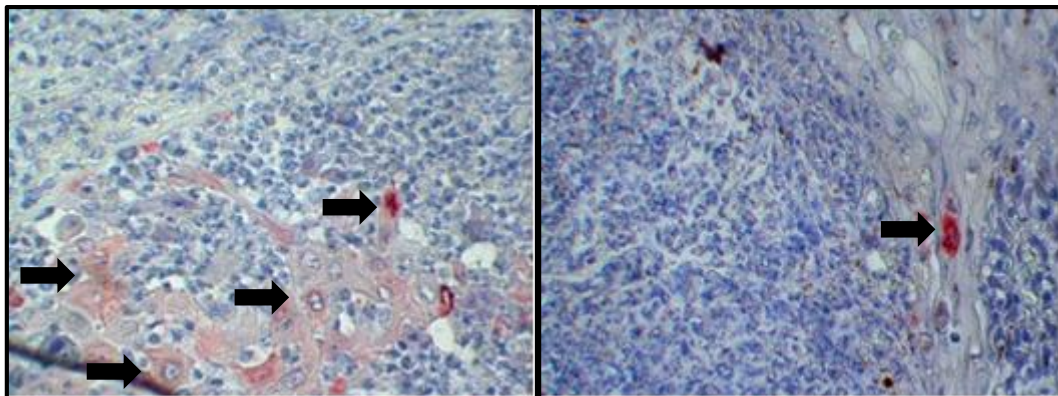


Figura 20: Cortes histológicos dos tetos anteriores das vacas 01 (A) e 02 (B) experimentalmente inoculadas com VACV-GP2 e necropsiadas no 4º e 9ºd.p.i., respectivamente. Coloração pela técnica de IHQ. Imunomarcacão intracitoplasmática com coloração róseo-avermelhada em células epiteliais (A) e em macrófagos (B)(setas) (400X).

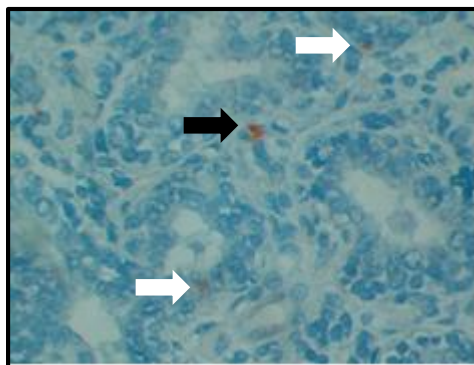


Figura 21: Corte histológico da glândula mamária da vaca 01 experimentalmente inoculada com VACV-GP2 e necropsiada no 4ºd.p.i. Coloração pela técnica de IHQ. Imunomarcacão intracitoplasmática (róseo-avermelhada) em células do epitélio acinar (setas brancas) e em macrófago (seta preta) (100X).

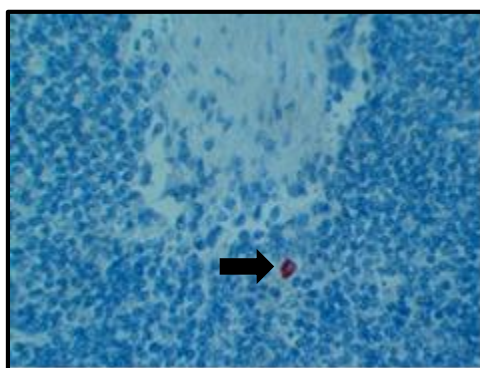


Figura 22: Corte histológico de linfonodo retromamário da vaca 02 experimentalmente inoculada com o VACV-GP2 e necropsiada no 9ºd.p.i. Coloração pela técnica de IHQ. Imunomarcacão intracitoplasmática em macrófago (seta) (400X).

4. DISCUSSÃO

No presente estudo a VB foi reproduzida em todos os tetos inoculados e todas as vacas soroconverteram a partir do 4ºd.p.i. A produção precoce de anticorpos totais pode ser um indicativo da presença de células de memória contra o VACV mostrando que essas vacas já tiveram um contato prévio com o vírus em algum momento de suas vidas.

As lesões ficaram restritas à área escarificada, manifestando um caráter localizado, apesar de toda a superfície dos tetos ter sido inoculada e ter-se realizado o movimento de ordenha diariamente. Essas lesões diferiram do padrão das lesões observadas em infecções naturais. No campo, a distribuição das lesões é multifocal e extensa, às vezes acometendo o teto em toda a sua extensão. Porém, tem-se observado que as propriedades acometidas permitem que o bezerro mame na mãe após a ordenha (Lobato *et al.*, 2005; Madureira, 2009). Sabe-se que, para o vírus penetrar na pele, é necessário uma lesão pré-existente no epitélio e o ato de sucção do bezerro pode intensificar as lesões no teto e espalhar o vírus pelo mesmo. Isso pode explicar as lesões multifocais causadas pelo VACV nos tetos e úberes das vacas em lactação infectadas naturalmente com VB. Além disso, o animal após a ordenha é liberado para o pasto e este, quando seco, pode causar cortes na pele do teto e do úbere, transformando-se em porta de entrada para o vírus, o que não ocorreu no experimento, pois as vacas ficaram confinadas com camas de serragem e feno que eram trocadas diariamente.

O acometimento da pele do úbere também é descrito por Schatzmayr e colaboradores (2000) e Lobato e colaboradores (2005), porém, no presente estudo não foi identificada nenhuma lesão característica neste local, talvez, pelas mesmas razões descritas acima.

No G3 foi possível acompanhar todos os estágios de evolução da VB até a cicatrização. Foi observado um período de incubação (PI) curto do VACV, entre três e quatro dias. Lauder e colaboradores (1971) ao inocularem experimentalmente vacas, sem bezerro ao pé, com vírus da VB, também observaram um PI curto, de dois dias. Além disso, o curso da doença ocorreu entre 12 e 14 dias. Lobato e

colaboradores (2005) relataram um intervalo variando entre 15 e 30 dias para a resolução da doença em infecções naturais. Como as lesões tiveram um caráter localizado e focal, diferentemente do observado em campo, o curso da doença nos animais experimentais pode ter sido, por esse motivo, mais rápido, tendendo a cicatrizar mais precocemente.

De acordo com figura 13, observamos que os animais não apresentaram hipertermia. Lauder e colaboradores (1971) ao aferirem diariamente a temperatura corporal das vacas inoculadas mencionaram que uma delas apresentou temperatura retal de 39,9°C no 3ºd.p.i. Dirksen e colaboradores (1993) comentaram que as infecções viróticas em bovinos são, às vezes, acompanhadas por uma curva de hipertermia bifásica, na qual o primeiro pico é devido à viremia e o segundo à infecção bacteriana secundária, caso ocorra. A aferição da temperatura uma vez ao dia pode não ter sido suficiente para detectar o pico febril, caso este tenha ocorrido.

No exame clínico foi detectado o aumento de volume dos linfonodos retromamários através da palpação. Este aumento pode ocorrer devido à hiperplasia de folículos linfóides após a drenagem do antígeno do local da infecção, por via linfática aferente, causando ativação e proliferação dos linfócitos nos linfonodos adjacentes (Janeway *et al.*, 2002). Em humanos, é descrita a ocorrência de linfadenomegalia (Schatzmayr *et al.*, 2000; Lobato *et al.*, 2005; Trindade *et al.*, 2007; Da Silva *et al.*, 2008; Silva-Fernandes *et al.*, 2009), porém em bovinos ainda não havia sido relatado este achado clínico. De acordo com Fenner e colaboradores (1989), o aumento de volume dos linfonodos adjacentes às lesões em humanos infectados pelo VACV ocorre devido à multiplicação do vírus no local da infecção com subsequente disseminação para os linfonodos adjacentes causando linfadenopatia local. O mesmo pode ocorrer em bovinos infectados com o VACV, já que os linfonodos retromamários recebem a linfa drenada da região do úbere (Godinho *et al.*, 1981). Os linfonodos retromamários estavam aumentados no momento da necropsia dos animais eutanasiados no 4ºd.p.i., sendo a única alteração macroscópica observada. Nos demais animais, o aumento de volume dos linfonodos

retromamários ocorreu a partir do 6º d.p.i, detectado através da palpação, sendo confirmada hiperplasia linfóide na histologia do G2, no 9º d.p.i. Nos animais do G3 foi observada uma regressão dos linfonodos no 17º d.p.i., ou seja, período em que não havia mais doença clínica nos tetos. Isso sugere que a linfadenopatia local foi devido à infecção causada pelo VACV, conforme ocorre em humanos.

Os achados histopatológicos da pele condizem com os achados clínicos, ou seja, lesões mais ulcerativas e agudas no 4º d.p.i., enquanto no 9º d.p.i., observou-se lesão mais avançada, com características típicas de cronicidade, tendendo à cicatrização. Além disso, as lesões histológicas no tecido cutâneo são compatíveis com algumas lesões de tecido de biópsia descritas por Lauder e colaboradores (1971) no mesmo período após infecção. Porém, estes autores também descreveram formação de sincícios e corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos em células epiteliais nesta mesma fase da infecção. Como a epiderme estava bastante destruída em todos os tetos observados, isso pode ter dificultado a observação dos corpúsculos nessa fase. No 9º d.p.i. os corpúsculos de inclusão foram observados, mas em quantidade bem pequena. Nesta fase, já havia início de regeneração da epiderme e diminuição do infiltrado neutrofílico, o que provavelmente facilitou a detecção do corpúsculo nos citoplasmas de células epiteliais e, também entre restos celulares na camada espinhosa. Kennedy e Miller (1993) ao descreverem lesões causadas por poxvírus, citam a degeneração hidrópica como achado comum nessas infecções. Lauder e colaboradores (1971) observaram essas alterações apenas no 1º d.p.i., o que pode justificar o fato dessas lesões não terem sido observadas nos tetos analisados do presente experimento, pois a análise histopatológica foi iniciada a partir do 4º d.p.i. No 17º d.p.i., a derme e epiderme já estavam cicatrizadas como foi observado macroscopicamente.

As imunomarcações detectadas nos tetos diminuíram de acordo com a evolução das lesões, indicando que o vírus tende a não permanecer no local inoculado nas fases mais avançadas da doença. Além disso, o VACV foi detectado em macrófagos na região perivascular

da derme, o que sugere uma via de circulação do vírus em vasos linfáticos e/ou sanguíneos, explicando as imunomarcações nos demais tecidos analisados, principalmente nos LRM. A única descrição da IHQ em teto de bovinos foi feita por Saurini e colaboradores (2010). Estes autores realizaram biópsia em teto de vacas naturalmente infectadas e, através da IHQ, detectaram imunomarcação apenas em queratinócitos.

Na glândula mamária foi observado infiltrado linfohistiocitário periacinar moderado indicando mastite. Kennedy e Miller (1993), ao descreverem lesões em glândula mamária causadas por mastite bacteriana, citam a presença de um fluido seroso nos ácinos, com descamação e vacuolização do epitélio acinar e que leucócitos podem estar em pequenas quantidades ou ausentes tanto no alvéolo quanto no septo. Na fase crônica, observa-se formação de granulomas e fibrose, e atrofia glandular também pode ocorrer (Kennedy e Miller, 1993). Além disso, esses autores relatam também a ocorrência da mastite em vacas secas, apesar da predisposição ser bem menor do que em vacas em lactação. Apesar de não ter sido observado nenhuma alteração no epitélio glandular, a mastite diagnosticada pode ter sido causada pelo VACV, já que este foi detectado no epitélio acinar através da IHQ.

Importante comentar que as imunomarcações observadas nas células epiteliais e inflamatórias ficaram delimitadas no citoplasma celular, pois o ciclo de reprodução do VACV é citoplasmático. Os achados da imunohistoquímica em outros tecidos são o primeiro relato descrito e sinalizam uma possível disseminação sistêmica do vírus indicando que há possibilidade de encontrá-lo em outros tecidos.

Não foi detectado DNA viral em tecidos fetais sugerindo que a transmissão vertical pode não ocorrer na VB. Nas crostas coletadas o DNA viral foi detectado e foi possível isolar o VACV-GP2 indicando a presença de vírus viável nas lesões.

5. CONCLUSÕES

- A VB foi reproduzida experimentalmente em todos os animais inoculados;
- As lesões manifestaram caráter localizado, diferindo das lesões observadas em vacas naturalmente infectadas;
- O período de incubação foi curto, entre 2 e 3 dias;
- A resolução da VB neste trabalho se deu com 12-14 dias após o surgimento dos primeiros sintomas;
- As lesões nos tetos e o aumento dos linfonodos retromamários foram as principais alterações clínicas apresentadas pelas vacas inoculadas com VACV;
- A hiperplasia linfóide dos linfonodos retromamários foi o único achado macroscópico à necropsia sugestivo de infecção por VACV;
- As lesões histopatológicas observadas nos tetos foram condizentes com as fases das lesões;
- Foi demonstrado à IHQ que o vírus tende a desaparecer rapidamente do local da inoculação e que se dissemina para os linfonodos regionais.

Capítulo 2: Métodos de inoculação para reprodução da vaccínia bovinaVaccínia bovina em bovinos

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi analisar o melhor método para escarificação de pele em tetos e a patogenicidade de dois inóculos diferentes contendo VACV-GP2 na tentativa de reproduzir as lesões sugestivas de VB semelhantes às que ocorrem em animais naturalmente infectados. Três vacas mestiças foram inoculadas, sendo duas secas e uma em lactação. Nessas vacas foram testados diferentes métodos de escarificação, incluindo: lixa, agulha hipodérmica e agulha bifurcada (usada na vacinação contra bouba aviária), e também foram testados dois tipos de inóculos de um mesmo isolado: VACV-GP2 clonado com várias passagens em cultivo celular; e VACV-GP2 não clonado, re-isolado das crostas de vacas do experimento 1. No momento da escarificação e inoculação, os tetos foram divididos em regiões cranial e caudal. A quantidade do inóculo usada por região foi 10^6 UFP/50 μ l de MEM. Duas vacas tiveram uma das regiões escarificadas, mas não foram inoculadas a fim de observar uma possível transmissão de uma região para outra. As tetas foram analisadas e soros foram coletados diariamente durante 31 dias e, em dias alternados, era realizado o exame clínico completo. Os soros coletados foram submetidos ao teste de IPMC e de SN. A partir do 2º d.p.i., os animais já apresentaram vesículas. A agulha hipodérmica causou uma intensa reação inflamatória e uma grande sensibilidade à palpação nos tetos. A reação inflamatória dificultou a visibilidade das lesões típicas de VACV. As escarificações feitas com a lixa e a agulha bifurcada provocaram uma reação inflamatória menos intensa e as lesões ficaram mais nítidas. Já entre os inóculos utilizados, aparentemente, não apresentaram a mesma virulência, sendo o VACV-GP2 re-isolado pareceu ser mais patogênico, sendo responsável pelo surgimento de um número maior de lesões nos tetos. Nas regiões que foram escarificadas e não foram inoculadas não houve detecção de lesões. Uma das vacas secas foi sacrificada no 17º d.p.i., período em que todos os tetos já haviam cicatrizado. Diferentes tecidos foram coletados para análise por histopatologia e imuno-histoquímica. Conforme o experimento 1, foram analisados apenas tetos, glândula mamária e linfonodos retromamários. Nos tetos observou-se reepitelização e tecido conjuntivo fibroso na derme, porém havia hiperplasia epidermal associada a uma dermatite linfohistiocitária multifocal discreta. Na glândula mamária e nos linfonodos retromamários não foi observada nenhuma alteração. Não foram observadas imunomarcações nos tecidos analisados. A lixa e o inóculo contendo VACV GP2 re-isolado foram melhores para reproduzir a VB. Houve soroconversão de todos os animais.

PALAVRAS-CHAVE: Métodos de escarificação, infecção experimental em bovinos, vaccínia bovina.

ABSTRACT

The purpose of this experiment was to analyze different scarification methods and the pathogenicity of two different inocula with VACV-GP2 in order to reproduce the lesions suggestive of BV similarly in cows naturally infected with VACV. Two crossbred dry cows and one crossbred lactating cow had their teats divided into cranial and caudal regions. In the teats were tested three methods to scarify: sandpaper, bifurcated needle and hypodermic needle. Moreover, were tested two inocula: cloned VACV-GP2 and VACV-GP2 non-cloned, re-isolated from scabs one cow from experiment 1. Each inoculum contained 10^6 PFU/ 50 μ L of MEM. The dry cows had regions of the teats scarified, but didn't receive inoculum and the lactating cow received VACV-cloned GP2 cloned in posterior teats and non-cloned VACV-GP2 in anterior teats. Daily, the teats were examined and serum samples were collected during 31 days and, in alternate days, a clinical exam was realized. The serum samples were submitted to IPMA and SN tests. Vesicles were observed at the 2nd d.p.i. The hypodermic needle caused intense inflammatory reaction and great sensibility in the teats. The sandpaper and bifurcated needle didn't cause intense inflammatory reaction and the lesions were typical of BV. Visually, the inoculum with cloned VACV-GP2 showed to be less virulent than the VACV- GP2 non-cloned. One dry cow was euthanized at 17th d.p.i. and teats, mammary gland and mammary lymph nodes were submitted to histopathological and immuno-histochemistry analysis. In the teats were observed regeneration of epithelium and hyperplasia in epidermis and fibrous connective tissue with discrete mononuclear infiltrate in dermis. In the mammary gland and mammary lymph nodes no changes were observed. In the immuno-histochemistry no immunolabeling was observed no immunostaining in the tissues. All animals produced antibodies against VACV-GP2. Sandpaper and non-cloned VACV-GP2 were the best to reproduce BV.

KEYWORDS: Inoculation methods, experimental inoculation in cows, bovine vaccine.

1. INTRODUÇÃO

A família *Poxviridae* é epiteliotrópica podendo causar doença cutânea e/ou sistêmica (Ginn *et al.*, 2007). O VACV causa infecções em sítios primários, através de lesões existentes na pele, onde ocorre a multiplicação viral (Fenner *et al.*, 1989). As lesões desenvolvem-se tipicamente em sequência iniciada com máculas eritematosas e evoluindo para pápulas e vesículas, úlceras e crostas, que tendem a cicatrizar entre 15 a 30 dias (Trindade *et al.*, 2003; Lobato *et al.*, 2005). Os bovinos são os hospedeiros mais comumente descritos e roedores são descritos como reservatórios (Abrahão *et al.*, 2009a). Quase sempre os ordenhadores são afetados (Damaso *et al.*, 2000; Trindade *et al.*, 2003; Lewis-Jones, 2004; Nagasse-Shugahara *et al.*, 2004).

Sabe-se que a transmissão de uma vaca para outra dentro do rebanho ocorre pelas mãos dos ordenhadores ou pelas teteiras das ordenhadeiras e que a taxa de ataque é extremamente alta podendo chegar a 100% em propriedades de ordenha manual e 30% em propriedades de ordenha mecânica (Lobato *et al.*, 2005). Entre fazendas, a doença pode ser transmitida pela introdução de animais doentes no rebanho e por ordenhadores que entram em contato com animais doentes em outras propriedades (Lobato *et al.*, 2005; Megid *et al.*, 2008). Outros fatores, como, por exemplo, manipulação de latões de leite contaminados (Madureira, 2009) e presença de roedores peridomésticos que podem funcionar como reservatórios do vírus são citados (Abrahão 2009b).

Além da doença ser subnotificada, normalmente, quando um foco é descoberto, as lesões já se encontram em estágio avançado, o que dificulta um acompanhamento desde o início das lesões até a cicatrização total. Na inoculação experimental realizada em vacas secas, descrita no Capítulo 1, as lesões apresentaram uma distribuição localizada em cada área da escarificação e inoculação, não reproduzindo de forma semelhante a doença observada no campo. As vacas naturalmente infectadas apresentam lesões com distribuição multifocal, muitas vezes acometendo todo o teto. Diante dessas observações foi proposto um

segundo experimento em vacas secas e em lactação a fim de testar diferentes maneiras de escarificação da pele do teto para melhor reproduzir a VB. Além disso, foram testados dois tipos de inóculos originados de uma mesma amostra de VACV, sendo um produzido com o VACV-GP2, isolado do município de Guarani, no estado de Minas Gerais, em 2001, clonado e o outro, com o VACV-GP2 re-isolado de vacas experimentalmente inoculadas (vaca 06 do experimento 1) sem selecionar uma população específica.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Local do experimento e instalações

O experimento foi realizado no LANAGRO-Pedro Leopoldo, nas instalações descritas no item 2.1, Capítulo 1.

2.2. Animais inoculados

Para este experimento, três vacas mestiças entre 6 a 12 anos de idade foram selecionadas. Duas eram originárias da Fazenda Modelo da UFMG em Pedro Leopoldo/MG, uma seca e a uma em lactação identificadas como animais 09 e 08, respectivamente. A outra vaca teve origem numa fazenda do município de Capim Branco/MG e estava seca, identificada como 07. Os animais eram soronegativos para *Orthopoxvirus* e possuíam integridade dos tetos e úbere à inspeção e palpação. Os animais foram alojados nas baias uma semana antes do início do experimento para adaptação e todos foram vermifugados. A vaca lactante (08) encontrava-se no terço inicial de gestação. Os animais foram mantidos individualmente em cada baia.

2.3. Alimentação dos animais

A alimentação fornecida aos animais está de acordo com o item 2.3, Capítulo 1. Para a vaca em lactação foi fornecida ração 18% PB para lactantes.

2.4. Vírus utilizado

Dois tipos de inóculos contendo variantes da amostra de VACV-GP2 foram utilizados na inoculação.

Inóculo 1 (IN 1): VACV-GP2 isolado de vacas com lesões nas tetas em surtos de VB ocorridos em 2001, no município mineiro de Guarani

(Trindade *et al.*, 2006). O vírus foi multiplicado, purificado e clonado a partir de placa viral selecionada e, posteriormente, multiplicado e purificado em cultivo celular. O título viral obtido foi de 10^9 UFP/mL (Trigueiro, 2004). Esta amostra viral foi também usada na inoculação das vacas do experimento 1 (Item 2.4., Capítulo 1).

Inóculo 2 (IN 2): VACV-GP2 re-isolado das crostas das lesões da vaca 06 do experimento 1 (Capítulo 1). Esse vírus foi multiplicado e purificado (Campos e Kroon, 1993), mas não foi clonado. Título viral obtido foi de 10^8 UFP/mL (Trigueiro 2004).

2.5. Escarificação e inoculação

Os tetos foram divididos, com auxílio de uma caneta marcadora, em região cranial e caudal. Os quatro tetos de cada vaca tiveram a pele escarificada e foi feito um inóculo com 50 µl de suspensão por área contendo 10^6 UFP de cada inóculo contendo VACV-GP2. A concentração do inóculo foi menor do que usada no experimento 1 (Capítulo 1). Foram escolhidos três métodos diferentes para escarificar a pele do teto: agulha bifurcada (utilizada na vacinação de boubas aviária), agulha hipodérmica (22 G1, 0,70 x 25 mm) e lixa com 120 de granulagem (FIGURA 23). A escarificação com agulha bifurcada foi realizada de forma pontual na pele, sendo que primeiramente foram feitos os furos na pele para depois inoculá-la. Já com a lixa, foram realizados na pele 10 movimentos verticais, começando na inserção do teto no úbere, promovendo escoriações, sem sangramento. Com a agulha hipodérmica foram feitas linhas paralelas na vertical e horizontal causando discreto sangramento.

Os animais 07 e 09 tiveram tetos com áreas que foram apenas escarificadas, sem inoculação do vírus com o propósito de observar uma possível transmissão de uma região inoculada para outra. Ambos tiveram o mesmo tipo de escarificação e inoculação, porém, a vaca 07 recebeu o inóculo 1, enquanto a vaca 09 foi inoculada com o inóculo 2. A vaca 08, devido à lactação, recebeu os dois inóculos, sendo que os tetos anteriores receberam o inóculo 2 e os posteriores, o inóculo 1. Cada teto, de cada vaca, teve um método de escarificação diferente que estão

representados na TABELA 8. Antes de cada escarificação, os animais foram sedados utilizando xilazina 2% (1mg/kg).

2.6. Acompanhamento clínico

Os animais foram examinados um dia antes da inoculação (T0) e até o final do experimento, 30 dias pós-inoculação (30 d.p.i. ou T30), a fim de acompanhar a evolução das lesões e avaliar alguma alteração sistêmica associada à infecção, além de analisar os métodos de escarificação e os inóculos utilizados. Os tetos eram examinados detalhadamente todos os dias e em dias alternados era feito o exame clínico. O exame clínico seguiu o protocolo desenvolvido pelo grupo como descrito no item 2.6, Capítulo 1.

Como no experimento 1 as vacas do grupo G3 não foram eutanasiadas, pois estas estavam prenhes, a vaca 09 foi escolhida para ser submetida à eutanásia e necropsiada no 17º d.p.i., mesmo período da biopsia dos tetos das vacas 05 e 06 do G3 (Capítulo 1, item 2.6.) para que os mesmos tecidos estudados no capítulo 1 fossem submetidos à análise por histopatologia e imuno-histoquímica na mesma fase da doença.

2.7. Ordenha

A vaca em lactação era ordenhada duas vezes ao dia com o uso de luvas e o leite era descartado nas fossas, juntamente com os dejetos sólidos, conforme explicado no item 2.1, Capítulo 1. Vale ressaltar que tanto nos tetos anteriores quanto nos posteriores da vaca 08 o ordenhador usou um par de luvas diferente devido à inoculação com inóculos diferentes. Assim como no experimento 1, era realizado o movimento de ordenha nas vacas secas (07 e 09) nas mesmas condições descritas no item 2.7 e com a mesma finalidade. A vaca 07 após três dias de ordenha passou a liberar pouca secreção leitosa durante quatro dias que também foi descartada na fossa.

2.8. Eutanásia

O procedimento de eutanásia foi realizado conforme preconiza o Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) descrito no item 2.8., Capítulo 1.



Figura 23: Métodos de escarificação nos tetos das vacas experimentalmente inoculadas com VACV-GP2 utilizando agulha bifurcada (A), agulha hipodérmica (B) e lixa (C). Marcações em azul nos tetos representam as divisões dos mesmos para realizar a escarificação e inoculação.

Tabela 8: Métodos de escarificação e inoculação nos tetos das vacas 07, 08 e 09 experimentalmente inoculadas com VACV-GP2.

Animal	VACA 07 (SECA)							
Tetos	TAE*		TAD*		TPE*		TPD*	
Regiões dos tetos	Cranial	Caudal	Cranial	Caudal	Cranial	Caudal	Cranial	Caudal
Inóculo	Inóculo 1	Não inoculado	Inóculo 1	Não inoculado	Inóculo 1	Não inoculado	Inóculo 1	Não inoculado
Área escarificada	Delimitada na área central	Toda área escarificada	Toda área escarificada	Toda área escarificada	Toda área escarificada	Toda área escarificada	Toda área escarificada	Toda área escarificada
Ferramenta para escarificar	Agulha bifurcada	Agulha bifurcada	Agulha bifurcada	Agulha bifurcada	Lixa	Lixa	Agulha Hipodérmica	Agulha Hipodérmica
Animal	VACA 08 (LACTANTE)							
Tetos	TAE*		TAD*		TPE*		TPD*	
Regiões dos tetos	Cranial	Caudal	Cranial	Caudal	Cranial	Caudal	Cranial	Caudal
Inóculo	Inóculo 2	Inóculo 2	Inóculo 2	Inóculo 2	Inóculo 1	Inóculo 1	Inóculo 1	Inóculo 1
Área escarificada	Toda área escarificada	Toda área escarificada	Toda área escarificada	Delimitada na área central	Toda área escarificada	Toda área escarificada	Toda área escarificada	Delimitada na área central
Ferramenta para escarificar	Lixa	Agulha Hipodérmica	Agulha bifurcada	Agulha bifurcada	Lixa	Lixa	Agulha bifurcada	Agulha bifurcada
Animal	VACA 09 (SECA)							
Tetos	TAE*		TAD*		TPE*		TPD*	
Regiões dos tetos	Cranial	Caudal	Cranial	Caudal	Cranial	Caudal	Cranial	Caudal
Inóculo	Inóculo 2	Não inoculado	Inóculo 2	Não inoculado	Inóculo 2	Não inoculado	Inóculo 2	Não inoculado
Área escarificada	Delimitada na área central	Toda área escarificada	Toda área escarificada	Toda área escarificada	Toda área escarificada	Toda área escarificada	Toda área escarificada	Toda área escarificada
Ferramenta para escarificar	Agulha bifurcada	Agulha bifurcada	Agulha bifurcada	Agulha bifurcada	Lixa	Lixa	Agulha Hipodérmica	Agulha Hipodérmica

2.9. Material coletado

2.9.1. Amostras de tecidos

A vaca 09 foi eutanasiada e necropsiada no 17ºd.p.i. e foram coletados os mesmos tecidos dos animais do G1 e G2 do Experimento 1 descritos no subitem 2.9.1., item 2.9., Capítulo 1, exceto tecidos fetais pois esta vaca não estava prenhe. Posteriormente, foram feitas alíquotas dos tecidos que tiveram o seguinte destino: fixação no tampão formalina a 10% e nitrogênio líquido para, posteriormente, serem conservados a -70°C. As necropsias foram realizadas em local apropriado no LANAGRO - Pedro Leopoldo.

2.9.2. Soro sanguíneo

Diariamente amostras de sangue eram coletadas em tubos sem anti-coagulante para obtenção do soro. A forma de coleta, o processamento e o armazenamento dos soros estão de acordo com o subitem 2.9.2., item 2.9., Capítulo 1.

2.9.3. Suabe da lesão oral e crostas dos tetos

Durante o experimento, os animais 07 e 09 apresentaram úlceras bem delimitadas na mucosa oral e suabes foram esfregados no local das lesões e colocados em microtubos sem nenhum conservante. Até o armazenamento a -70°C, os suabes foram mantidos resfriados. Crostas dos tetos de todos os animais foram coletadas e conservadas conforme subitem 2.9.3., item 2.9., Capítulo 1.

2.10. Testes realizados

2.10.1. Análise histopatológica

Realizada conforme subitem 2.10.1., item 2.10., Capítulo 1. Para o presente trabalho foram analisados tecidos dos tetos, glândula mamária (GM) e linfonodos retromamários (LRM) da vaca 09.

2.10.2. Imuno-histoquímica

A IHQ foi realizada nos mesmos tecidos descritos acima de acordo com a padronização realizada no experimento 1 descrita no subitem 2.10.2., item 2.10. e item 3.9., Capítulo 1.

2.10.3. Imunoperoxidase em monocamada celular

Amostras de soros coletadas foram submetidas ao teste de IPMC conforme descrito no subitem 2.10.3., item 2.10., Capítulo 1.

2.10.4. Soroneutralização

Amostras de soros coletadas foram submetidas ao teste de SN por inibição de placa conforme descrito no subitem 2.10.4., item 2.10., Capítulo 1.

2.10.5. PCR-nested

As amostras de crostas coletadas dos tetos e dos suabes friccionados nas lesões orais foram submetidos à PCR-nested conforme subitem 2.10.5., item 2.10., Capítulo 1.

2.11. Comitê de Ética

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), cujo número do protocolo é 167/09.

2.12. Análise Estatística

Foi realizada a análise estatística da temperatura corporal dos animais em relação ao tempo (dias). Foi usado o Teste de TUKEY considerando significância para $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1. Evolução clínica

Todos os animais desenvolveram lesões em todos os tetos que foram inoculados. As áreas escarificadas, porém não inoculadas, não apresentaram lesão em nenhum momento do experimento. As lesões ficaram restritas às soluções de continuidade previamente realizadas. Foi observado também que as lesões em cada animal não surgiram simultaneamente, assim como a evolução das mesmas.

O período de incubação foi curto, entre 2 e 3 dias, com o surgimento de vesículas e pápulas independente do método de escarificação e do inóculo utilizado (FIGURAS 24A e 24B). Estas evoluíram para úlceras no 4ºd.p.i. (FIGURA 24C). Na vaca 08, as úlceras foram observadas até o 7ºd.p.i., enquanto na vaca 09 foram até o

8ºd.p.i. Na vaca 07, que recebeu apenas o inóculo 1 (IN1), as úlceras foram pequenas e brandas e evoluíram rapidamente para crosta. Isto também foi observado nos tetos da vaca 08 que receberam o IN1. As crostas iniciaram no 4ºd.p.i. nos tetos escarificados com agulha hipodérmica, independente do tipo de inóculo. No 5º d.p.i., todos os tetos da vaca 07 tinham crostas, iniciando o estágio de cicatrização enquanto nas demais vacas este estágio foi observado a partir do 9ºd.p.i. (FIGURA 24D). No 10ºd.p.i. a vaca 07 apresentou os tetos completamente cicatrizados e na vaca 08, a resolução das lesões ocorreu no 11ºd.p.i. nos tetos inoculados com IN1 e no 14ºd.p.i. nos tetos inoculados com IN2. Já na vaca 09, a cicatrização total dos tetos escarificados com agulha bifurcada e lixa ocorreu entre 15 e 16ºd.p.i. e com a escarificação com agulha hipodérmica, no 17ºd.p.i. A evolução das lesões para cada inóculo utilizado está resumidamente descrita na TABELA 9. Em relação à área escarificada, foi observado que o curso das lesões foi mais rápido nos tetos focalmente escarificados, independente do inóculo utilizado. A área do teto com escarificação delimitada na região central na vaca 07, cicatrizou com 6 d.p.i. e nas vacas 08 e 09 a cicatrização dessa área ocorreu no 10º d.p.i.

Ao exame clínico foi observado nas vacas 07 e 09, no 6ºd.p.i. e 7ºd.p.i., respectivamente, úlcera arredondada e bem delimitada na mucosa oral (FIGURA 24E) que cicatrizaram após 48 horas. Os suabes friccionados nas lesões orais e as crostas coletadas do epitélio dos tetos foram positivos para VACV-GP2 pelo método de PCR. Além disso, foi detectado através da palpação, o aumento de volume dos linfonodos retromamários a partir do 6ºd.p.i. Na vaca 08, em lactação, os LRM ficaram reativos até o final do experimento e a vaca foi diagnosticada com mastite. No dia da necropsia da vaca 09, os estes linfonodos não se encontravam aumentados de volume, enquanto na vaca 07, foi detectado aumento até o 17ºd.p.i. Nenhuma vaca teve hipertermia durante o experimento e não houve diferença estatística entre a média do grupo em relação ao tempo para significância de $p < 0,05$. A variação de temperatura corporal dos animais está representada na FIGURA 25.

3.2. Métodos de inoculação e o inóculo usado

Em relação às ferramentas utilizadas para escarificar, o uso da agulha hipodérmica em toda a região do teto promoveu uma intensa reação inflamatória com sangramento, edema e aumento da temperatura local, observada à palpação, além de intensa sensibilidade ao toque, quando comparado com os demais tetos. O uso da lixa e da agulha bifurcada foi menos agressivo ao tecido, com isso, foi mais fácil observar a evolução das lesões (FIGURA 26). A escarificação focalmente delimitada apresentou caráter localizado e um curso mais rápido como ocorreu no experimento 1.

Aparentemente, o uso dos dois inóculos apresentou diferença na virulência quando comparadas as lesões nos tetos da vaca 08 que recebeu os dois inóculos e entre a vaca 07 e 09, as quais os tetos receberam a mesma forma de escarificação, porém, inóculos diferentes. As lesões causadas pelo IN2 foram maiores e a fase ulcerativa foi mais severa e, além disso, o curso da doença foi mais longo.

O teto inoculado com IN2 e escarificado com agulha hipodérmica apresentou lesões com curso mais prolongado quando comparado com as demais escarificações e o mesmo inóculo.

3.3. Achados anátomo-histopatológicos

Na necropsia realizada na vaca 09 no 17ºd.p.i., não foi observada nenhuma alteração macroscópica nos órgãos que fossem possivelmente relacionadas com a infecção viral. A análise histopatológica foi realizada nos tetos, glândula mamária e LRM. Macroscopicamente, todas as lesões nos tetos haviam cicatrizado nesse período e os achados histológicos foram condizentes com uma cicatrização. Foram observadas reepitelização com hiperplasia epidermal e presença de queratina. Na derme superficial havia fibroblastos jovens com moderada proliferação de tecido conjuntivo, associada à dermatite linfocitocitária moderada multifocal (FIGURA 27). Na glândula mamária e nos LRM não foi observada nenhuma alteração.

3.4. Imuno-histoquímica

O teste de IHQ foi realizado nos mesmos tecidos submetidos às análises histopatológicas descritas no item anterior. Em apenas um teto (

TPD) e em um quarto da glândula mamária (GMPE) foi observada imunomarcção localizada em macrófagos perivasculares na derme profunda e macrófagos e células acinares, respectivamente (FIGURAS 28A e 28B). Nos linfonodos retromamários foi detectada apenas uma imunomarcção em macrófago. As imunomarcções foram discretas com diminuição da intensidade da coloração. Esses achados são condizentes com a hipótese descrita no Capítulo 1 de que o vírus tende a não permanecer no local primário de infecção e em tecidos próximos ao sítio primário à medida que as lesões evoluem para cicatrização.

3.5. AT e AN contra VACV-GP2

Os animais soroconverteram a partir do 7ºd.p.i. Não foi detectado anticorpo neutralizante contra VACV-GP2 em nenhum dos animais.

3.6. PCR-nested

As amostras de suabes coletadas das lesões na mucosa oral e de crostas coletadas das lesões dos tetos nos dias 8 e 9 p.i. foram positivas para VACV-GP2 na PCR-nested.

Tabela 9: Evolução das lesões nos tetos das vacas experimentalmente inoculadas com VACV-GP2 clonado (IN1) e VACV-GP2 não clonado (IN2).

Característica das lesões nos tetos inoculados com IN1	d.p.i.	Característica das lesões nos tetos inoculados com IN2
Inoculação	0	Inoculação
Vesículas e pápulas	2-3	Vesículas e pápulas
Úlceras	4-5	—
—	4-8	Úlceras
Crostas	4-5	—
Fase de cicatrização	5-9	—
—	5-9	Crosta
—	9-16	Fase de cicatrização
Cicatrização completa em todos os tetos	10-11	—
—	14-17	Cicatrização completa em todos os tetos

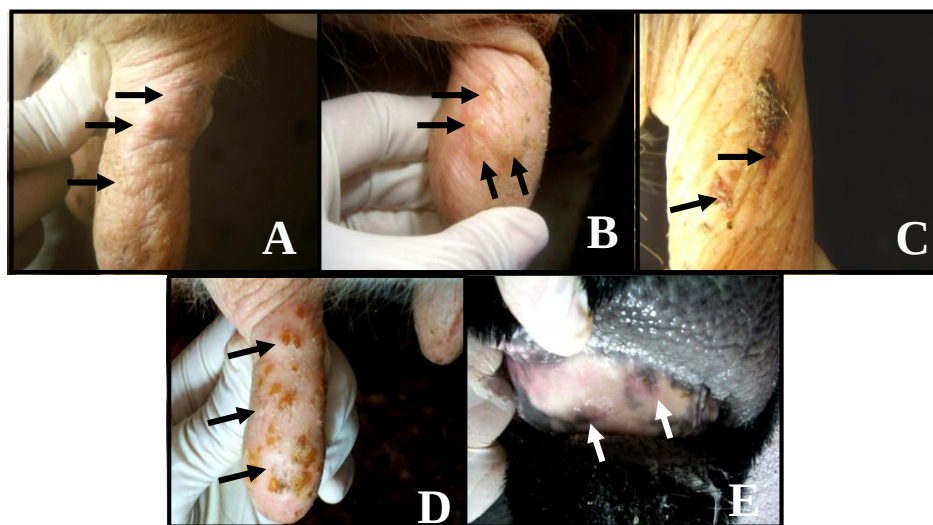


Figura 24: Evolução das lesões nos tetos das vacas experimentalmente inoculadas com VACV-GP2. (A) Pápulas na face cranial do TPE I da vaca 08 (setas) no 3ºd.p.i. (escarificação com lixa e inoculação com IN1); (B) Vesículas na face caudal do TPD da vaca 09 (setas) no 3ºd.p.i. (escarificação delimitada com agulha hipodérmica); (C) Úlcera com crosta na face caudal do TAD da vaca 08 (setas) no 8ºd.p.i. (escarificação delimitada com agulha bifurcada e inoculação com IN2); (D) Crostas na face cranial do TAE da vaca 09 (setas) no 7ºd.p.i. (escarificação com lixa e inoculação com IN2); (E) úlceras circulares na mucosa oral (setas) da vaca 07 no 6ºd.p.i.

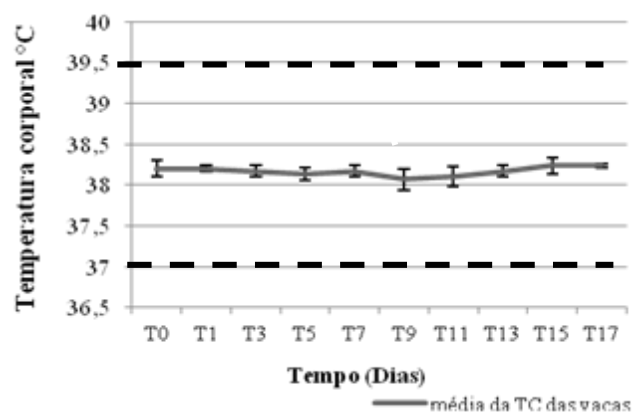


Figura 25: Média dos valores da temperatura corporal das vacas do dia da inoculação (T0) até a cicatrização total das lesões (T17). Linhas horizontais pontilhadas indicam o intervalo de referência fisiológica para a temperatura corporal (TC) na espécie bovina (Dirksen *et al.*, 1993). Linhas verticais indicam o erro padrão. Não houve diferença estatística entre as médias da TC dos animais em relação ao tempo para $p < 0,05$.

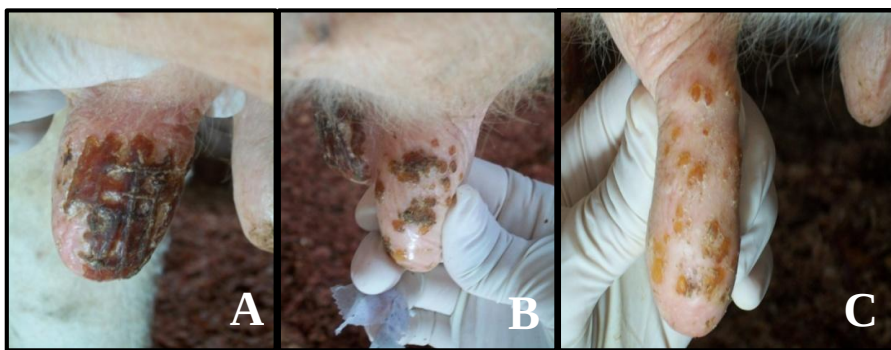


Figura 26: Diferença entre as lesões desenvolvidas nos tetos escarificados com agulha hipodérmica (A), agulha bifurcada (B) e lixa (C) no 7º d.p.i. na vaca 09 experimentalmente inoculada com VACV-GP2. A lesão causada pela agulha hipodérmica não foi semelhante às lesões típicas de poxvírus, como observado nas figuras B e C.

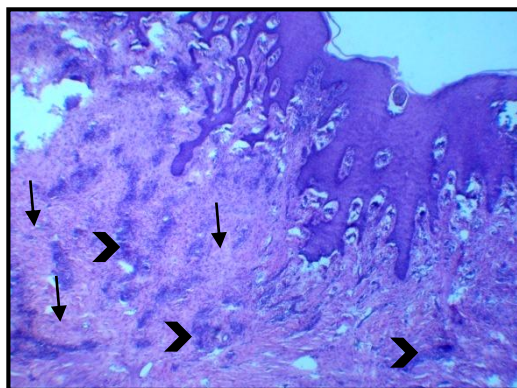


Figura 27: Corte histológico do teto anterior direito (TAD) da vaca 09 escarificado com agulha bifurcada e necropsiada no 17º d.p.i. Coloração H&E. Hiperplasia epidermal com reconstituição do epitélio e tecido conjuntivo com fibroplasia (setas) e moderado infiltrado linfo-histiocitário perivascular (cabeça de seta) (40X).

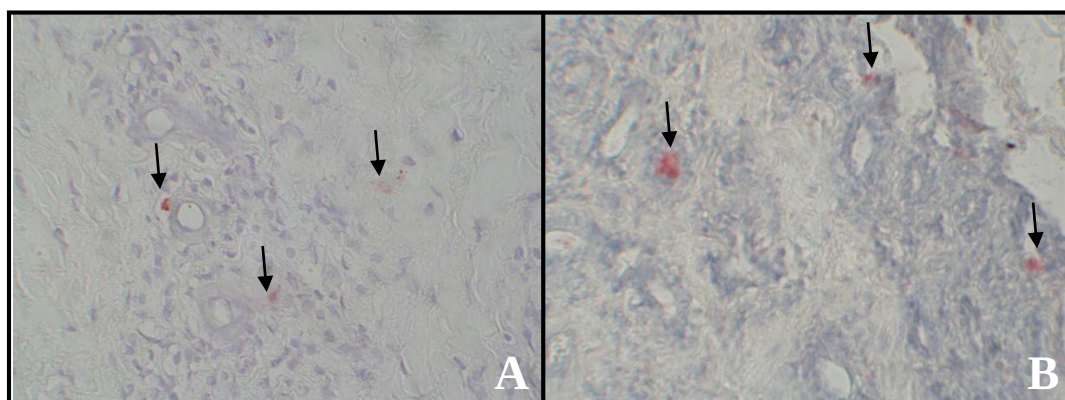


Figura 28: Corte histológico do TAD (A) e da glândula mamária (B) da vaca 09 necropsiada no 17º d.p.i. indicando imunomarcações (setas) em macrófagos perivasculars na derme profunda e em células acinares, respectivamente. Coloração pela técnica de IHQ. (100X)

4. DISCUSSÃO

A VB foi reproduzida em todos os tetos inoculados, independente do tipo de escarificação e do inóculo utilizado. Os animais soroconverteram e, à medida que os títulos de anticorpos aumentaram, as lesões iam diminuindo de intensidade. Quando foi atingido o pico máximo dos títulos de anticorpos, as lesões já haviam cicatrizado. Porém, em infecções naturais, foi observada a ocorrência de reinfecção em estágios diferenciados da lesão cujos animais apresentaram títulos altos de anticorpos neutralizantes contra o VACV (Madureira, 2009), ou seja, lesões reapareceram na presença de anticorpos contra o vírus. Não existe um estudo específico na literatura a respeito da resposta imunológica do bovino ao VACV, sendo relatadas no presente experimento apenas as observações descritivas entre a evolução das lesões e a resposta humoral.

As lesões ficaram restritas ao local escarificado e inoculado, sendo que nas áreas onde houve apenas escarificação, não houve desenvolvimento de lesões, mesmo sendo realizado o movimento de ordenha. Lesões nos úberes também não foram observadas. Como discutido no Capítulo 1, alguns fatores tais como a vaca solta no pasto e o bezerro ao pé, podem contribuir com as soluções de continuidade no epitélio e disseminação do vírus no teto e/ou úbere. Nas vacas experimentalmente inoculadas foi necessário escarificar e inocular toda área do teto para reproduzir lesões disseminadas conforme é observado em animais naturalmente infectados. Além disso, o ordenhador usou pares de luvas diferentes por animal o que também não contribuiu para disseminar o vírus, pois sabe-se que o ordenhador é um fator importante na disseminação do VACV de um teto para outro em um mesmo animal, assim como de uma vaca para outra (Lobato *et al.*, 2005; Madureira, 2009).

A escarificação realizada com agulha hipodérmica causou uma inflamação intensa no teto, o que dificultou a observação e o acompanhamento da evolução das lesões. Na fase de crosta houve formações lineares, acompanhando o traçado da agulha. Porém, a doença no teto foi confirmada devido à detecção de DNA do VACV-GP2 nas crostas coletadas

no 8º e 9º d.p.i. No experimento 1, a escarificação também foi realizada com agulha hipodérmica, porém a escarificação foi bem delimitada na área central dos tetos, não causando reação inflamatória intensa. Nos tetos onde foram feitas escoriações com agulha bifurcada e lixa, o acompanhamento da evolução das lesões tornou-se mais nítido. No entanto, as lesões desenvolvidas nos tetos escarificados com a lixa, aproximaram-se mais do padrão observado no campo, por promover múltiplas lesões distribuídas pelos tetos. Em uma inoculação experimental de herpes vírus bovino tipo-2 (BoHV-2), Gibbs e colaboradores (1973) não conseguiram reproduzir a doença após escarificação cutânea com agulha, que resultou em eritema e edema no local. Por outro lado, Almeida e colaboradores (2008) relataram o desenvolvimento de lesões típicas de BoHV-2 nos tetos levemente escoriados por fricção com esponja áspera de limpeza, cuja ação na pele é semelhante à ação promovida pela lixa.

A passagem seriada em cultura de células pode levar à uma redução da virulência do vírus no hospedeiro original (De Castro *et al.*, 2002), o que pode explicar as diferenças observadas nas lesões na mesma vaca e na resolução mais rápida (10 dias) descrita no animal inoculado apenas com o IN1. A diferença do tempo de incubação do VACV observada nos tetos escarificados com agulha bifurcada e lixa e nos escarificados com agulha hipodérmica pode estar relacionada com a intensa reação inflamatória local causada pela agulha hipodérmica, dificultando a identificação da lesão, da mesma forma que dificultou o acompanhamento clínico da evolução dessas lesões. Dessa forma, as lesões manifestadas nos tetos escarificados com lixa e inoculados com IN2 foram as que mais mimetizaram as lesões em animais naturalmente infectados com VB, tanto no tipo de lesão (disseminada no teto) quanto na duração do curso clínico.

Como observado no experimento 1, não foi detectada hipertermia nos animais e a média da TC das vacas não apresentou diferença estatística em relação ao tempo considerando a significância de $p < 0,05$. No presente estudo, a aferição da temperatura foi realizada em dias alternados, o que pode ter diminuído a probabilidade de detectar febre nas vacas, caso esta tenha ocorrido. A hipertermia também pode estar associada à infecção bacteriana secundária,

a qual não foi observada nas vacas durante o exame clínico.

Os LRM, assim como no experimento 1, foram detectados, via palpação, com aumento de volume a partir do 6º d.p.i., com regressão dos mesmos após a cicatrização das lesões, comprovada na histopatologia da vaca 09. Esses achados reforçam a hipótese de que a VB causa linfadenopatia em bovinos assim como relatado em humanos (Fenner *et al.*, 1989).

Além disso, dois animais apresentaram ulcerações bem delimitadas na mucosa oral e o DNA do VACV-GP2 foi detectado via PCR nas amostras de suabes friccionados nessas lesões. Essas úlceras sugerem uma disseminação viral sistêmica. Dirksen e colaboradores (1993) citam que vacas podem lamber os tetos na tentativa de amenizar a dor local, porém tal comportamento não foi observado durante o experimento, pelo menos durante os momentos da presença humana no local. Ferreira e colaboradores (2008a) realizaram um estudo sobre a patogenia de diferentes amostras de VACV, inclusive o GP2, em camundongos, usando a inoculação intranasal, e o DNA viral foi detectado em vários órgãos, comprovando que o vírus age sistemicamente quando inoculado por esta via. Não existem muitos dados sobre a patogenia da VB em bovinos usando escarificação e inoculação do VACV no local escarificado, que parece ser a provável via de infecção primária em casos de VB que ocorrem a campo, como foi feito no presente estudo. Além disso, este experimento também permitiu que fossem estudadas possíveis vias de eliminação do vírus, bem como a ocorrência de DNAmia. Os resultados obtidos até o momento, demonstram a presença do DNA do VACV-GP2 em amostras de sangue, fezes e leite (dados não publicados) vários dias após a infecção, corroborando com a hipótese de distribuição sistêmica do vírus.

Os achados histopatológicos e imuno-histoquímicos nos tetos, glândula mamária e

LRM parecem estar diretamente relacionados às lesões clínicas observadas na vaca 09 ao ser examinada. Apesar de terem sido observados sinais de cicatrização nos tetos como os observados nos tetos das vacas do G3 do experimento 1, a vaca 09 ainda apresentava uma hiperplasia epidermal associada a dermatite linfohistiocitária. Essa dermatite pode estar relacionada ao tempo de cicatrização das lesões, o qual ocorreu no 17º d.p.i. (dia da necropsia), na vaca 09, enquanto nas vacas 05 e 06 do experimento 1 ocorreu aos 12 e 14 dias, respectivamente, sendo a biopsia realizada no 17º d.p.i. Nenhuma imunomarcagem foi observada nos tecidos analisados, mostrando que o VACV tende a desaparecer do local inoculado à medida que as lesões vão cicatrizando, usando o método de IHQ. Porém, os estudos realizados pelo grupo mostram que até 25 dias após a cicatrização das lesões, ocorreu detecção do DNA viral em fezes, leite e sangue, sendo um indício de que o VACV fica circulando no organismo do bovino após a resolução da doença.

5. CONCLUSÕES

- A VB foi reproduzida experimentalmente em todos os animais inoculados;
- O uso de lixa e o inóculo com VACV-GP2 re-isolado mimetizaram melhor a VB observada em infecções naturais, tanto na distribuição das lesões quanto no tempo de permanência destas nos tetos;
- O aparecimento das lesões está diretamente relacionado à presença de soluções de continuidade na pele;
- O período de incubação é extremamente curto (2 dias);
- As lesões nos tetos, na mucosa oral e a linfadenopatia local foram os únicos achados clínicos associados com a VB

Capítulo 3: Acompanhamento clínico, hematológico e bioquímico de vacas lactantes experimentalmente inoculadas com o vírus da vaccínia bovina e reinoculadas ou imunodeprimidas

RESUMO

O presente experimento teve como objetivo reproduzir a VB em vacas lactantes experimentalmente inoculadas com VACV-GP2 e realizar estudos clínico, hematológico e bioquímico associados à infecção. Além disso, o trabalho propôs também observar os efeitos da imunodepressão artificial e da reinoculação com VACV-GP2 em vacas lactantes previamente infectadas pelo VACV. Por isso, o experimento foi dividido em duas fases. Na fase 1, oito vacas mestiças em fases distintas de lactação foram inoculadas com o VACV. Os tetos foram divididos em regiões cranial e caudal e foram escarificados com lixa em toda a extensão das regiões delimitadas. A concentração do inóculo foi a mesma do experimento 2 (10^6 UFP/50 μ L, para cada região do teto), sendo que o vírus utilizado foi o VACV-GP2 re-isolado do experimento 1. O teto posterior esquerdo (TPE) de cada vaca foi escarificado, mas não foi inoculado. Os tetos foram observados diariamente até o 32º d.p.i. O exame clínico foi realizado em dias alternados e amostras de soro foram coletadas todos os dias para realizar os testes de IPMC e de SN. A produção individual do leite foi mensurada diariamente e amostras de leite foram submetidas à contagem de células somáticas (CCS). Testes bioquímicos e hematológicos foram realizados, semanalmente e duas vezes por semana, respectivamente. Antes da inoculação, sete dos oito animais apresentaram CCS alta, acima de 400×10^3 céls/mL de leite. Esta foi aumentando no decorrer do experimento atingindo valores médios superiores a 10000×10^3 céls/mL e intensa queda na produção de leite foi observada. Entre o 2º e o 4º d.p.i. todos os tetos apresentavam lesões. As lesões e o curso da doença foram similares à VB observada a campo. Os TPE não desenvolveram lesões e nos dias 9, 11 e 22 foram observadas úlceras na mucosa oral de alguns animais. Na hematologia foi observada neutrofilia e linfocitose que podem estar associadas à infecção viral e mastite. Na bioquímica sérica não foi detectado nenhuma alteração associada à VB. Na fase 2, as vacas inoculadas nos experimentos 3 e 1, descritos, respectivamente, no capítulo 3 (fase 1) e capítulo 1 foram reinoculadas ou imunodeprimidas. Na reinoculação foram utilizados cinco vacas, sendo duas re-inoculadas aos 240 d.p.i. (vacas 05 e 06 do experimento 1) e três com 70 d.p.i. (vacas do experimento 3- fase1). As vacas 05 e 06 não apresentavam AT e AN contra VACV-GP2 no dia da inoculação (T0), enquanto duas vacas da fase 1 ainda tinham AT e AN contra VACV-GP2 em títulos altos. A terceira vaca da fase 1 apresentou apenas títulos de AN no T0. A escarificação foi feita com uso de lixa e o inóculo utilizado foi o mesmo do experimento 3 (fase 1), na mesma concentração. Os animais foram acompanhados durante 15 dias. Já no grupo submetido ao tratamento de imunodepressão foram utilizadas quatro vacas inoculadas no experimento 3 (fase 1) com 70 d.p.i. Essas vacas receberam uma dose de 0,1mg/kg IM de dexametasona durante 5 dias consecutivos. Amostras de soro dos dois grupos foram coletadas para realização de IPMC, SN e análise bioquímica. Sangue total foi coletado para o hemograma. Exame clínico foi realizado diariamente nos animais imunodeprimidos durante 12 dias, enquanto no grupo reinfestado, o mesmo foi realizado em dias alternados por 15 dias, sendo os tetos analisados todos os dias. Nos animais reinfestados, quatro desenvolveram lesões características de VB nos tetos e o DNA viral foi detectado nas crostas. O período de incubação foi entre o 2º e o 3º d.p.i. e o curso da doença foi entre 9º e 10º d.p.i. As lesões foram mais brandas nos animais com 70 d.p.i. e a resolução da doença foi mais rápida. Nos animais reinfestados nenhuma alteração na patologia clínica foi detectada. Os títulos de AT e AN aumentaram após a re-inoculação, sendo que nas vacas reinoculadas após 70 dias o aumento foi mais discreto. No grupo imunodeprimido os testes bioquímicos e hematológicos apresentaram, na média, leucocitose acentuada a partir do segundo dia de tratamento e linfopenia a partir do quarto dia de tratamento, indicando que a dose de dexametasona utilizada nos animais foi imunodepressora. Lesões ulcerativas na mucosa oral foram observadas em duas vacas deste grupo e os títulos de AT e AN aumentaram discretamente, sugerindo uma reativação e multiplicação do VACV-GP2.

PALAVRAS-CHAVE: vacas lactantes, vaccínia bovina, patologia clínica, reinfecção e imunodepressão

ABSTRACT

This experiment aimed to reproduce the BV in dairy crossbred cows infected experimentally with VACV-GP2 in order to realize clinical, hematological and biochemical analysis associated to the infection. Moreover, another objective of the study was to observe the effects of immunodepression and re-infection with VACV-GP2 in dairy cows previously infected by VACV. Therefore, the experiment was divided in two parts. In part 1, eight crossbred dairy cows were inoculated with VACV-GP2. The teats were divided in cranial and caudal regions and were scarified in all extension with sandpaper. The viral concentration was 10^6 PFU/50 μ L per region and the VACV-GP2 used was isolated from crusts of cows from experiment 1. The left posterior teats (LPT) were scarified, but weren't inoculated. The teats were observed daily, during 32 days, and clinical examination was realized in alternate days. Serum samples were collected in order to realize SN, IPMA and biochemical analysis and total blood samples were submitted to hematological analysis. The individual milk production was measured and milk samples were collected for somatic cell count (SCC). Before inoculation, seven cows had SCC above 400,000 cells/mL of milk. During the experiment the SCC was increasing until an average rate of $10,000 \times 10^3$ cells/mL e all the cows had intense decrease in milk production. The teats developed lesions similar to the ones observed in animals naturally infected and the incubation period was between 2nd to 4st d.p.i. The LPT did not presented lesions at any moment and at the 9th, 11th and 22nd d.p.i. some cows showed ulcers in the oral mucosa. In the hematological analysis it was detected lymphocytosis and neutrophilia. At the biochemical analysis, it was not observed any changes associated with BV. In part 2, the immunodepression was realized in four cows inoculated in the part 1 and the reinfection was realized in three cows inoculated in part 1 and two cows inoculated in experiment 1 (chapter 1). Before the beginning of part 2, one cow inoculated in part 1 did not have neutralizing antibodies titers against VACV-GP2, as well as the two cows inoculated in the experiment 1. The cows were immunodepressed with dexamethasone (0,1mg/kg IM) during five consecutive days and the cows were monitored for 12 days. The reinoculated group received the same viral concentration used in part 1 of this study. The teats were scarified in all extension with sandpaper and the cows were monitoring during 15 days. Serum and blood samples were collected in both groups in order to realize the same tests of part 1. The immunodepressed cows did not showed lesions in teats, but two of them presented ulcers in the oral mucosa, which were PCR positive. The antibodies titers increased during monitoring. The reinfected animals showed lesions in teats and the crusts collected were PCR positive. The incubation period was between 2 to 3 d.p.i. and clinical course was between 9 to 10 d.p.i. In the cows from the part 1 of the experiment and then reinoculated, had smaller lesions and the clinical course was faster than the cows of the experiment 1 that were reinoculated. The hematological and biochemical analysis demonstrated that the dose of dexamethasone was effective in promoting immunodepression. The reinoculated cows did not show any changes in clinical pathology analysis. In this experiment it was observed that viral multiplication in immunodepressed animals could occur and that the reappearance of the BV lesions in cows experimentally reinfected could also occur.

KEY-WORDS: dairy cows, bovine vaccinia, clinical pathology, reinfection and imunodepression.

1. INTRODUÇÃO

A VB é uma zoonose emergente responsável por vários surtos no Brasil, principalmente no Estado de Minas Gerais, desde 1999. Trindade e colaboradores (2007) descreveram que as lesões se iniciam com pontos vermelhos nos tetos e/ou úberes seguidos por edema e dor local. Em seguida surgem vesículas e, de 3 a 4 dias depois, as mesmas evoluem para pústulas umbilicadas envoltas por tecido inflamatório e úlceras com tecido enegrecido. Lesões nos lábios, focinho e cavidade oral dos bezerros que mamam nas vacas acometidas são frequentemente observadas. Em humanos, a infecção tem se caracterizado pela presença de lesões ulcerativas e pustulares principalmente nas mãos, acometendo também antebraços e face, além de febre, dor intensa, mal estar, e linfadenopatia (Schatzmayr *et al.*, 2000; Lobato *et al.*, 2005; Silva-Fernandes *et al.* 2009).

A detecção da VB em vacas infectadas naturalmente ocorre, na maioria das vezes, quando as lesões características encontram-se em fase avançada ou em processo de cicatrização. Além disso, a disseminação da VB dentro da propriedade é rápida e tem alta taxa de ataque e a falta de informação do produtor faz com que a doença seja subnotificada. Assim, a adoção de medidas de controle e de um tratamento eficaz contra o VACV torna-se difícil. Os surtos de VB acarretam grandes prejuízos na propriedade, sendo que a ocorrência de mastite, infecções secundárias bacterianas, queda brusca na produção leiteira, acometimento de bezerros, gastos com medicamentos, e o afastamento temporário do ordenhador doente e contrato de um novo empregado, são as principais reclamações relatadas pelos produtores (Lobato *et al.*, 2005; Trindade *et al.*, 2006 e 2007; Da Silva *et al.*, 2008).

Em relação à epidemiologia da doença, várias informações foram obtidas através de acompanhamentos de propriedades-foco e de humanos infectados (Trindade *et al.*, 2003; Nagasse-Shugara *et al.*, 2004; Lobato *et al.*, 2005; Da Silva *et al.*, 2008), além de estudos com animais silvestres (Abrahão *et al.*, 2010) e inoculação experimental em camundongos (Tscharke e Smith, 1999; Ferreira *et al.*, 2008a e 2008b; Abrahão *et al.*, 2009b). Porém, a patogenia da VB e a ação do VACV no organismo do bovino ainda são bastante

obscuras. Não há na literatura mundial relatos que abordem um estudo clínico completo da VB, desde a fase inicial até a cicatrização total das lesões, como também não foi descrito um perfil hematológico e bioquímico dos animais infectados.

Como já foram realizados pelo nosso grupo dois experimentos pilotos que avaliaram o melhor inóculo e o melhor método de escarificação que causando lesões que mimetizam a doença no campo, o objetivo desse trabalho foi desenvolver a infecção experimental de vacas adultas em lactação com a amostra de VACV, Guarani P2 (GP2), re-isolada da crosta do animal 06 do experimento 1, a fim de realizar um estudo minucioso do curso da doença, desde o período de incubação até a total cicatrização das lesões. Foi proposto também traçar o perfil hematológico e bioquímico desses animais associados à infecção para um melhor esclarecimento da ação do vírus no organismo de bovinos. Além disso, também foi proposto a reinoculação e imunodepressão de vacas previamente inoculadas com VACV-GP2, com o propósito de avaliar, clinicamente, uma possível reinfecção da VB e realizar uma tentativa de reativar o VACV, respectivamente.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Local do Experimento e instalações

O experimento foi desenvolvido no LANAGRO/Pedro Leopoldo, conforme item 2.1, capítulo 1.

2.2. Animais inoculados

Foram utilizadas oito vacas mestiças em lactação, sem bezerro ao pé, entre 3 a 10 anos de idade, soronegativas para *Orthopoxvirus*, testadas previamente pelo teste de soroneutralização (SN), com os tetos e úberes íntegros. Desses animais, cinco foram originadas da Fazenda Modelo da UFMG/Pedro Leopoldo-MG. As outras três vacas foram originadas de uma fazenda comercial, no município de Confins-MG. Os animais foram alojados nas baias uma semana antes do início do experimento para adaptação e todos foram vermifugados e submetidos ao exame clínico e análise minuciosa dos tetos. As vacas foram identificadas como 13, 14, 15, 22, 25, 58, 62 e 65.

2.3. Alimentação dos Animais

Foram fornecidos um fardo de feno de Tyfton tipo B e 1,5 Kg de ração própria para vaca em lactação, com 18% de Proteína Bruta (PB), para cada animal, duas vezes ao dia. Sal mineral foi fornecido na quantidade de 50g/animal/dia e água foi fornecida “*ad libidum*”. Após o término do experimento da fase 1, todos os animais foram suplementados com vitamina A, D, E.

2.4. Avaliação Clínica

O exame clínico seguiu o protocolo produzido pelo grupo conforme item 2.6, Capítulo 1.

2.5. Delineamento experimental

O presente experimento foi dividido em duas fases: a primeira fase abordou a inoculação experimental do VACV e o acompanhamento clínico em vacas lactantes e, a segunda, o tratamento de imunodepressão e o estudo de reinoculação em vacas lactantes previamente inoculadas com VACV. O experimento está esquematizado abaixo na FIGURA 29.

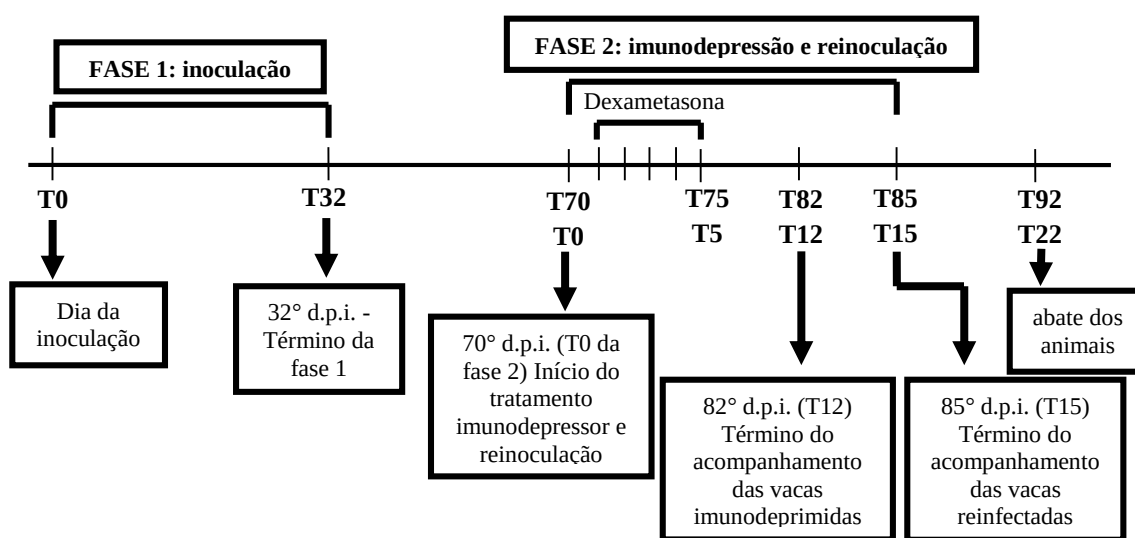


Figura 29: Delineamento experimental das fases 1 e 2 do experimento 3 que representam, respectivamente, a inoculação experimental do vírus da VB em vacas lactantes e o tratamento imunodepressor e reinoculação em vacas lactantes previamente inoculadas com VACV-GP2.

2.6. Tratamento dos animais experimentais

2.6.1. Fase 1: Inoculação do VACV nos animais lactantes

Para realizar a escarificação e a inoculação, os tetos foram divididos em região cranial e caudal para que a solução de continuidade e a distribuição da amostra viral fossem realizadas de maneira homogênea na superfície do teto. Delimitações foram feitas a 1,5 cm acima do óstio de cada teto para evitar formação de lesões nesta região, facilitando assim a coleta de amostras de leite. Foram feitas escarificações em toda área de cada região dos tetos com o auxílio de uma lixa, realizando 10 movimentos ascendentes e 10 descendentes. Três tetos de

cada vaca foram inoculados com 50 µl de suspensão contendo 10^6 UFP/ml de VACV-GP2, por região, sendo que o teto posterior esquerdo (TPE) de cada vaca foi escarificado, porém, não foi inoculado, ficando como controle negativo (FIGURA 30).

O inóculo utilizado foi a amostra de VACV-GP2 re-isolado das vacas inoculadas do experimento 1 (Capítulo 1). Os animais foram examinados antes da inoculação (T0) e até o final do experimento, 32 dias após (32 d.p.i. ou T32), a fim de acompanhar a evolução das lesões e avaliar alguma alteração sistêmica associada à infecção. Os tetos eram examinados detalhadamente todos os dias e em dias alternados era feito o exame clínico.

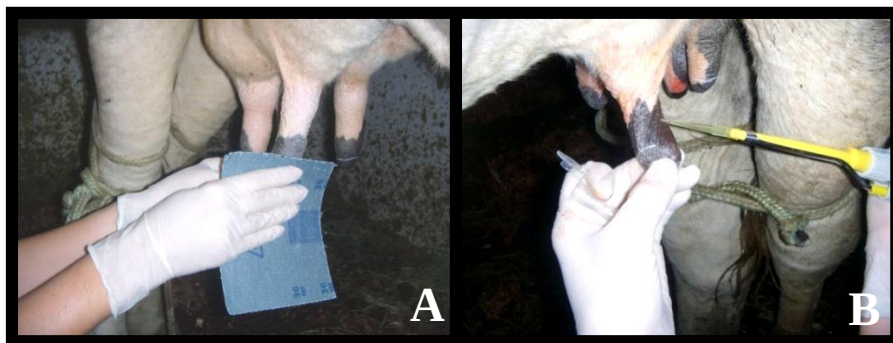


Figura 30: Escarificação com lixa (A) e inoculação do VACV-GP2 re-isolado com auxílio de pipeta automática (B), respectivamente, nos tetos de vacas lactantes.

2.6.2. Fase 2: Animais imunodeprimidos

O tratamento imunodepressor foi realizado aos 70 d.p.i. em quatro vacas da primeira fase: 14, 22, 25 e 58. Foi usada dexametasona (DMS), na dose de 0,1mg/Kg por dia, por via intramuscular (IM), durante cinco dias consecutivos (Iketani *et al.*, 2002). O exame clínico foi realizado diariamente durante 12 dias (T0 ao T12). No T0, todas as vacas apresentaram títulos de anticorpos totais (AT) e anticorpos neutralizantes (AN), exceto vaca 14, cujos AN não foram detectados.

2.6.3. Fase 2: Animais reinoculados

Cinco vacas foram utilizadas na reinoculação: 13, 15 e 62, da fase 1, e 05 e 06 oriundas do experimento 1, as quais haviam sido inoculadas há 70 (70° d.p.i.) e 240 (240° d.p.i.) dias, respectivamente. A forma de escarificação e a concentração do inóculo utilizado foram as mesmas utilizadas nos animais da fase 1 do experimento, item 2.6.1, deste capítulo. Todos os tetos foram escarificados e inoculados, incluindo o TPE usado como controle negativo na primeira fase. O exame clínico foi realizado em dias alternados, porém os tetos foram examinados diariamente durante 15 dias (T0 a T15). No T0, as vacas 15 e 62 apresentaram títulos de AT e AN, enquanto as vacas 05 e 06 não possuíam anticorpos contra VACV-GP2. A vaca 13 apresentou apenas títulos de AN.

2.7. Ordenha dos animais

As vacas da primeira e da segunda fases eram ordenhadas duas vezes por dia através da

ordenha manual e com auxílio de luvas. Antes de cada ordenha fazia-se o pré-dipping com iodo glicerinado a 1%, apenas na região do óstio de cada teto, inclusive do TPE. O TPE era o primeiro a ser ordenhado e, posteriormente, os tetos inoculados, para evitar contaminação. O “California Mastitis Test” (CMT) foi realizado diariamente a fim de detectar mastite clínica e subclínica e a avaliação do teste foi feita segundo Dirksen e colaboradores (1993). Os animais imunodeprimidos e reinfetados também eram ordenhados todos os dias como descrito acima. O pré e pós-dipping também foram realizados conforme acima relatado. As vacas 05 e 06 utilizadas na reinfecção pariram em abril e maio, respectivamente, e estavam lactantes. Amostras de leite foram coletadas e o restante era descartado na fossa para dejetos sólidos conforme descrito no item 2.1, Cap. 1.

2.8. Material coletado

2.8.1. Soro sanguíneo

Diariamente, amostras de sangue das vacas de ambas as fases foram coletadas em tubos sem anti-coagulante para obtenção do soro. A forma de coleta, o processamento e o armazenamento dos soros estão de acordo com o subitem 2.9.2, item 2.9, Capítulo 1.

2.8.2. Sangue total

Amostras de sangue foram coletadas na veia coccígea, sendo que o sangue total foi coletado em tubos à vácuo com anticoagulante EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) e mantido refrigerado a 4°C até o momento do processamento.

2.8.3. Suabes das lesões orais e crostas dos tetos

Suabes foram friccionados em lesões ulcerativas e bem delimitadas que foram observadas na mucosa oral de alguns animais de ambas as fases. Os suabes foram colocados em microtubos sem conservante. Até o armazenamento a -70°C , os suabes foram mantidos resfriados. Crostas das lesões dos tetos foram coletadas dos animais inoculados e dos quatro animais reinfetados que apresentaram lesões nos tetos. As crostas coletadas foram conservadas conforme subitem 2.9.3, item 2.9, Capítulo 1.

2.8.4. Leite

O leite era pesado individualmente e, após a pesagem, retirava-se uma amostra de cada animal em frascos contendo bronopol mantidos sob refrigeração a 4°C , para realização da técnica de contagem das células somáticas (CCS), a qual foi realizada no Laboratório de Análise de Leite da Escola de Veterinária da UFMG. É importante ressaltar que a pesagem do leite e a CCS foram realizadas para os animais imunodeprimidos e reinfetados, porém, os dados ainda não foram computados. A análise a ser mostrada no presente trabalho abordou apenas os animais referentes à inoculação (Fase 1 do experimento).

2.9. Testes realizados

2.9.1. Imunoperoxidase em monocamada celular

Amostras de soros coletadas foram submetidas ao teste de IPMC conforme descrito no subitem 2.10.3, item 2.10, Capítulo 1.

2.9.2. Soroneutralização

Amostras de soros coletadas foram submetidas ao teste de SN por inibição de placa conforme descrito no subitem 2.10.4, item 2.10, Capítulo 1.

2.9.3. Testes hematológicos e bioquímicos

Sangue total e soro foram coletados, em diferentes tempos, para análise do perfil hematológico e bioquímico, respectivamente, dos animais inoculados e reinoculados com VACV, assim como dos animais imunodeprimidos. É importante ressaltar que

nos animais imunodeprimidos, os testes tiveram o objetivo de comprovar a eficiência do protocolo utilizado para a imunodepressão. Para os animais inoculados, o hemograma e esfregaço sanguíneo foram realizados nos tempos: T0, T1, T4, T8, T11, T15, T18, T22, T25 e T29. A bioquímica sérica foi realizada nos tempos T0, T1, T8, T15, T22 e T29. Para as vacas reinfetadas, todos os testes foram analisados nos tempos T0, T4, T8 e T14. Nas vacas imunodeprimidas os testes foram realizados nos tempos T0, T1, T2, T4, T5, T6, T7, T9 e T12, com exceção da bioquímica sérica que não foi realizada no T12. O sangue total e o soro coletados foram enviados para o Laboratório de Patologia Clínica da Escola de Veterinária da UFMG para realização dos exames hematológicos (hemograma e leucograma) e bioquímicos, respectivamente, segundo Harvey (2001) e Thrall (2004).

As variáveis analisadas no hemograma e leucograma foram: concentração de hemácias ($10^6/\mu\text{l}$), concentração de hemoglobina (g/dL), hematócrito ou volume globular [VG (%)], volume corpuscular médio (VCM (fl)), concentração de hemoglobina corpuscular média [CHCM (g/dL)], hemoglobina corpuscular média [HCM (pg)], plaquetas ($10^3/\mu\text{l}$), proteína plasmática total (g/dL), fibrinogênio (g/dL), leucócitos totais ($10^3/\mu\text{l}$), linfócitos ($10^3/\mu\text{l}$), neutrófilos segmentados ($10^3/\mu\text{l}$), neutrófilos bastonetes ($10^3/\mu\text{l}$), eosinófilos ($10^3/\mu\text{l}$), monócitos ($10^3/\mu\text{l}$), basófilos ($10^3/\mu\text{l}$), mielócitos ($10^3/\mu\text{l}$) e metamielócitos ($10^3/\mu\text{l}$). Os valores de referência adotados foram de acordo com Jain (1993).

Na bioquímica sérica foram analisados: enzima alanina aminotransferase (U/I) (ALT); enzima aspartase aminotransferase (U/I) (AST), enzima gamma glutamiltransferase (U/I) (GGT), glicose (mg/dL), proteínas totais (g/dL), bilirrubina total (mg/dL), albumina (g/dL), globulina (g/dL), uréia (mg/dL), creatinina (mg/dL), fosfatase alcalina (U/I), colesterol (mg/dL), cálcio (mg/dL) e fósforo (mg/dL). Os valores de referência adotados foram de acordo com Meyer *et al.* (1995).

Com o sangue “*in natura*” eram confeccionados três esfregaços sanguíneos por animal destinados à contagem diferencial de leucócitos. O esfregaço sanguíneo foi usado para a

contagem diferencial de leucócitos e as lâminas foram coradas pelo método panótico para realização da leitura.

2.9.4. PCR-nested

As amostras de crostas coletadas dos tetos e amostras dos suabes friccionados nas lesões orais foram submetidos à PCR-nested conforme subitem 2.10.5, item 2.10, Capítulo 1.

2.9.5. Isolamento viral

O isolamento das crostas dos animais 15 e 62, os quais foram reinoculados, foi realizado pelo grupo no Laboratório de Virologia Animal da Escola de Veterinária e o protocolo utilizado foi conforme o subitem 4.9.6 do Capítulo 1.

2.10. Destino dos animais

Todos os animais foram destinados ao abate em um frigorífico comercial da cidade de Pedro Leopoldo uma semana após o término da fase 2 e com recuperação clínica plena nos tetos. O abate foi acompanhado pelo grupo a fim de coletar tecidos para análises histopatológicas e para detecção do VACV por PCR e isolamento viral, os quais ainda estão em processamento.

2.11. Comitê de Ética

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e o número do protocolo é 167/09.

2.12. Análises Estatísticas

A CCS e os parâmetros hematológicos e bioquímicos foram comparados de acordo com o tempo de coleta, ou seja, momento antes da inoculação (T0) comparado com os momentos após a inoculação (T1 a T32, fase 1; e T1 a T12 ou T15, fase 2). O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para avaliar a normalidade da distribuição das variáveis analisadas. Para as variáveis paramétricas e não paramétricas foram utilizados os testes Newman Keuls e Kruskal-Wallis, respectivamente. A significância foi considerada quando $p < 0,05$. Para pesagem do leite foi realizado o teste de Friedmann. As significâncias consideradas foram $p < 0,05$ e $p < 0,01$. Para a média de temperatura corporal das vacas das fases 1 e 2 em relação ao tempo

(dias) foi usado o teste de TUKEY considerando significância para $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1. Evolução clínica

3.1.1. Fase 1: animais inoculados

Todos os animais desenvolveram lesões típicas de VB nos tetos infectados. Os TPEs de todas as vacas, que foram escarificados, mas não inoculados, não apresentaram lesões durante o experimento (FIGURA 31A). O surgimento e a evolução das lesões não ocorreram simultaneamente nos animais. Foi observado em três animais o reaparecimento de vesículas e pápulas em tetos com ulcerações, o que provavelmente sugere uma reinfecção. No 2º d.p.i. os locais inoculados já apresentavam-se eritematosos e, entre o 3º e o 5º d.p.i. começaram a surgir vesículas e pápulas em pelo menos um dos tetos inoculados de cada vaca (FIGURA 31B), sendo que quatro animais manifestaram essas lesões no 3º d.p.i., dois no 4º d.p.i. e dois no 5º d.p.i. No 5º d.p.i. todos os animais apresentaram lesões ulcerativas em pelo menos um dos tetos inoculados (FIGURA 31C). As úlceras foram observadas até o 10º d.p.i. em três animais, até o 15º d.p.i. em quatro animais, e em uma vaca até o 30º d.p.i. As crostas começaram a surgir no 6º d.p.i. em dois animais, sendo que no 10º d.p.i., todos os animais apresentaram lesões crostosas em pelo menos um dos tetos inoculados (FIGURA 31D). No 18º d.p.i., todos os animais, com exceção de uma vaca, entraram no estágio de cicatrização. Três vacas tiveram os tetos completamente cicatrizados no 22º d.p.i., em duas a resolução completa ocorreu no 24º d.p.i., e no 27º d.p.i. as demais vacas apresentaram cicatrização completa (FIGURAS 31E), com exceção de apenas uma vaca, cuja cicatrização total ocorreu apenas no 32º d.p.i. É importante ressaltar que as lesões só foram observadas no local escarificado e inoculado.

Durante o experimento, três dos oito animais inoculados apresentaram úlceras bem delimitadas na mucosa oral, sendo que dois (vacas 14 e 25) manifestaram no 9º d.p.i. e um (vaca 22) apresentou a lesão no 11º d.p.i. Na vaca 22, a úlcera reapareceu no mesmo local no 22º d.p.i. (FIGURA 31F). Após 48 horas a mucosa apresentava-se completamente íntegra.

Suabes foram friccionados nessas úlceras. Todos os suabes e crostas foram positivos para VACV pela técnica de PCR-nested. A FIGURA 32 mostra a evolução das lesões em uma mesma vaca.

Os linfonodos retromamários apresentaram aumento de volume em cinco animais no 18ºd.p.i. e nos demais, no 19ºd.p.i., permanecendo assim até o final do experimento. Nos outros linfonodos examinados não foi observada nenhuma alteração. Em relação à postura; comportamento; parâmetros vitais; umidade das mucosas; pele e pêlos, com exceção da pele dos tetos inoculados, e demais sistemas, não foi detectado nenhum tipo de alteração nos animais durante o exame clínico. Os animais não manifestaram hipertermia. A média da temperatura corporal dos animais está representada na FIGURA 33 e não houve diferença estatística da TC das vacas em relação ao tempo (dias) para $p < 0,05$.

3.1.2. Fase 2: animais imunodeprimidos

Os animais imunodeprimidos não desenvolveram lesões nos tetos. Durante os cinco dias de tratamento até o 8º dia, todos os animais apresentaram alteração na consistência e coloração do leite, com queda brusca na produção. Este passou de líquido esbranquiçado para pastoso amarelado, voltando ao normal no 9º dia após a primeira aplicação. Além disso, as vacas 14 e 58 apresentaram lesões ulceradas bem delimitadas na mucosa oral no 5º e 8ºd.p.i., respectivamente e, DNA viral foi detectado nos suabes coletados, através da técnica de PCR. Nos demais sistemas, não foi observada nenhuma alteração clínica. A temperatura corporal média dos animais por dia variou de 37,48°C a 38,95°C apresentando diferença estatística nos tempos T6 e T7 em relação a T0 para $p < 0,05$ (FIGURA 34). Os LRM encontravam-se aumentados e mastite foi detectada em todos os animais desde o T0 até o fim do acompanhamento clínico.

3.1.3. Fase 2: animais reinfectedos

Os animais reinfectedos não manifestaram nenhuma alteração clínica sistêmica durante o exame, sendo que a temperatura corporal média dos animais por dia variou de 38,02°C a 38,32°C e não houve diferença estatística em relação ao tempo (FIGURA 35). Quatro, dos

cinco animais, desenvolveram lesões, sendo que as vesículas e pápulas foram observadas nas vacas 05 e 06 no 2º d.p.i. e, nas vacas 15 e 62, no 4º e 5ºd.p.i., respectivamente. A evolução para úlcera ocorreu entre o 4º e 6º d.p.i. em todos os animais, sendo que nas vacas 15 e 62 as úlceras foram menores e menos severas. No 7º d.p.i todas as vacas encontravam-se no estágio de cicatrização. A resolução da doença ocorreu no 9ºd.p.i. nas vacas 15 e 62 e no 10ºd.p.i. nas outras duas. As lesões foram menores e as úlceras evoluíram para crosta de um dia para outro quando comparadas com as dos animais da fase 1. Além disso, o curso da doença foi mais rápido que nos demais experimentos realizados (FIGURAS 36A a 36D). A vaca 13 não apresentou lesão (FIGURA 36E). Os LRM encontravam-se aumentados e mastite foi detectada em todos os animais desde o T0 até o fim do acompanhamento clínico. A TABELA 10 descreve, resumidamente, a evolução das lesões nos animais inoculados (Fase 1) e nos re-inoculados (Fase 2).

3.2. Mastite clínica e subclínica

Para o presente experimento, a CCS foi descrita apenas para as vacas inoculadas (fase 1 do experimento). Os valores de CCS apresentaram-se altos no T0, em média de 3.900×10^3 cél/mL (células por mililitro). No decorrer do experimento, os valores de CCS foram aumentando em relação ao T0, exceto no T1. No T29, T31 e T32 esses valores ultrapassaram os 10.000×10^3 cél/mL. Houve diferença estatística no T9 e entre T15 e T32, quando comparados com T0 para $p < 0,05$ (FIGURA 37). Apenas a mastite clínica era tratada nas vacas em lactação, por 3 dias consecutivos, sendo aplicada uma dose diária do medicamento (Mastifin, Ouro Fino), por teto.

Dois dias após o término do tratamento observava-se recidiva.

3.3. Produção de leite

A produção de leite também foi descrita apenas para os animais inoculados (fase 1 do experimento). Após a inoculação dos animais foi observado uma queda na produção do leite entre T1 e T32 que representou, em média, 32,94% de perda em relação a T0. A FIGURA 38 mostra a perda média, em porcentagem, da

produção diária dos animais. A queda do leite foi estatisticamente diferente nos tempos T20, T23, T25, T26, T28 e T30 para $p < 0,05$ e nos tempos T21, T24, T27, T29 e T31 considerando $p < 0,01$.

3.4. Anticorpos totais (AT) e anticorpos neutralizantes (AN) contra VACV

3.4.1. Fase 1: animais inoculados

A soroconversão dos oito animais inoculados foi detectada a partir do 10º d.p.i. e, no 30º d.p.i., os títulos de AT mantiveram-se altos. A partir do T16 foram detectados, em todas as oito vacas inoculadas, AN com título de 20. Os títulos continuaram aumentando até o final do estudo, alcançando título de 80 AN no T32.

3.4.2. Fase 2: animais imunodeprimidos

Nos animais imunodeprimidos foram detectados AT contra VACV dez dias antes do início dos experimentos, sendo que os títulos variaram entre 180 a 1620. Um dia antes do tratamento houve queda nos títulos, variando em 180 a 540. No 4º dia de tratamento, os títulos aumentaram em todos os animais, atingindo um valor de 4860 e permanecendo assim até o 12º dia.

Nos animais 22 e 58 foram detectados AN contra VACV dez dias antes do início do experimento, permanecendo assim até um dia antes do início do tratamento. Houve um aumento discreto do título de AN, exceto na vaca 14, que não apresentou AN em nenhum momento testado.

3.4.3. Fase 2: animais reinoculados

As vacas 13, 15 e 62 apresentaram títulos de AT contra VACV entre 20 a 4860, dez dias antes da reinoculação, enquanto, nas vacas 05 e 06 não foram detectados AT. Um dia antes da reinoculação, os títulos das três vacas caíram, sendo que na vaca 13 o título zerou e nas vacas 62 e 15 o título foi de 540 e 1640, respectivamente. No T0 as vacas 05 e 06 permaneceram sem título de AT. Após a reinoculação, os títulos de AT aumentaram discretamente nas vacas com 70 d.p.i. (vacas 13, 15 e 62). Já nas vacas com 240 d.p.i. (05 e 06), o aumento foi mais abrupto. As vacas 13, 15 e 62 apresentaram títulos de AN contra VACV entre 20 e 80, dez dias antes da reinoculação, enquanto nas outras duas, não foram detectados

AN. Um dia antes da reinoculação os títulos de AN das três vacas permaneceram os mesmos. Após a reinoculação, os títulos de AN aumentaram discretamente nos animais com 70 d.p.i. e mais abruptamente nos animais com 240 d.p.i.

3.5. PCR-nested

Nas crostas coletadas dos animais inoculados (fase 1) e reinoculados (fase 2) em diferentes dias após a inoculação, assim como os suabes das lesões orais coletados dos animais inoculados (vacas 14, 22 e 25) e imunodeprimidos (vacas 14 e 58) foi detectado DNA do VACV-GP2 através da técnica de PCR-nested padronizada por Abrahão e colaboradores (2010).

3.6. Isolamento viral

Foi realizado o isolamento do VACV-GP2 da crosta das vacas 15 e 62. Das crostas dos demais animais o isolamento não foi realizado até o presente momento.

3.7. Patologia Clínica

3.7.1. Fase 1: animais inoculados

Na média geral dos oito animais no decorrer do experimento, não foi observada alteração no eritograma e trombograma, apesar de ter sido observada diferença estatística significativa para as variáveis CHCM e plaquetas. Na análise individual, apenas um animal apresentou queda no VG, nas concentrações de hemácia e hemoglobina, sendo o mesmo animal no qual foi detectado hemoparasitose por *Babesia bovis* no esfregaço sanguíneo.

No leucograma, foi observada uma leucocitose discreta em todos os tempos, exceto T1. A leucocitose foi acompanhada por uma neutrofilia discreta com um leve desvio para esquerda nos tempos T0, T1 e T4. Além disso, uma linfocitose discreta foi observada a partir do T8, oscilando entre os tempos com valores entre os intervalos de referência para a espécie. A FIGURA 39 mostra as variações entre cada análise de leucócitos totais, linfócitos e neutrófilos. Entre os leucócitos totais não houve diferença estatística dos tempos após a inoculação em relação ao dia da inoculação (T0). As variáveis linfócitos e neutrófilos apresentaram diferença estatística nos tempos

T1, T4, T11 e T15, T22, T25, respectivamente, em relação a T0 considerando $p < 0,05$. Os valores das variáveis do hemograma e leucograma juntamente com a análise estatística estão indicados no ANEXO 4.

Na bioquímica sérica os animais apresentaram uma hiperproteinemia e hiperglobulinemia em todos os tempos analisados. Um aumento discreto na enzima AST foi observado no T0 e a partir do T4 houve uma queda brusca nos valores dessa enzima, atingindo níveis basais ou discretamente abaixo dos valores mínimos de referência. Um discreto aumento na GGT ocorreu nas três primeiras análises, assim como ocorreu para a enzima ALT no T4. As variáveis creatinina, albumina, bilirrubina total, fosfatase alcalina, GGT, colesterol e cálcio não apresentaram diferença estatística entre os tempos em relação a T0. As demais variáveis tiveram tempos estatisticamente diferentes quando comparados com T0 para $p < 0,05$. Os valores das variáveis e a análise estatística estão indicados no ANEXO 3.

3.7.2. Fase 2: animais imunodeprimidos

Nos animais tratados com dexametasona, não foi observada alteração no eritrograma e trombograma. No leucograma ocorreu uma leucocitose acentuada a partir do T1, juntamente com uma neutrofilia até o T3. A partir do T5 houve uma queda brusca nos valores dessas variáveis causando diferença estatística entre os tempos, porém, os valores mantiveram-se entre os intervalos de referência para a espécie. Uma queda de linfócitos foi observada a partir do T1, sendo que os animais apresentaram linfopenia a partir do T5. Entre o T1 e o T6 ocorreu inversão na proporção entre linfócitos e neutrófilos. No final do experimento, os valores começaram a voltar

para os parâmetros normais (FIGURA 40). Todas essas variáveis apresentaram diferença estatística e as demais não tiveram significância (ANEXO 6).

Na bioquímica sérica houve aumento na glicose a partir do T1, sendo que no T4 ocorreu uma hiperglicemia. A partir do T5 observou-se uma queda nesses valores, permanecendo entre o intervalo de referência. Um aumento nas enzimas AST e GGT foi observado a partir do T7 e do T1, respectivamente, apresentando diferença estatística entre os tempos. Já os valores de ALT não tiveram alterações, apesar de a estatística ter demonstrado diferença significativa entre os tempos. A partir do T6 a concentração de cálcio sanguínea demonstrou uma queda discreta. Em todos os tempos analisados os animais manifestaram hiperproteinemia e hiperglobulinemia (ANEXO 5).

3.7.3. Fase 2: animais reinfetados

Nos animais reinfetados, nenhuma alteração na análise hematológica foi observada e apenas a variável neutrófilo segmentado apresentou diferença estatística entre os tempos. Na bioquímica foram observadas hiperproteinemia e hiperglobulinemia em todos os tempos analisados e as únicas variáveis que apresentaram tempos estatisticamente significativos foram a proteína total, a bilirrubina total e a GGT (ANEXOS 7 e 8).

3.8. Achados macroscópicos dos tecidos após o abate dos animais

Todos os órgãos da linha de inspeção foram analisados macroscopicamente e, em uma das vacas foi detectado *Eurytrema pancreaticum*. Nos demais órgãos não foi observada nenhuma alteração significativa.

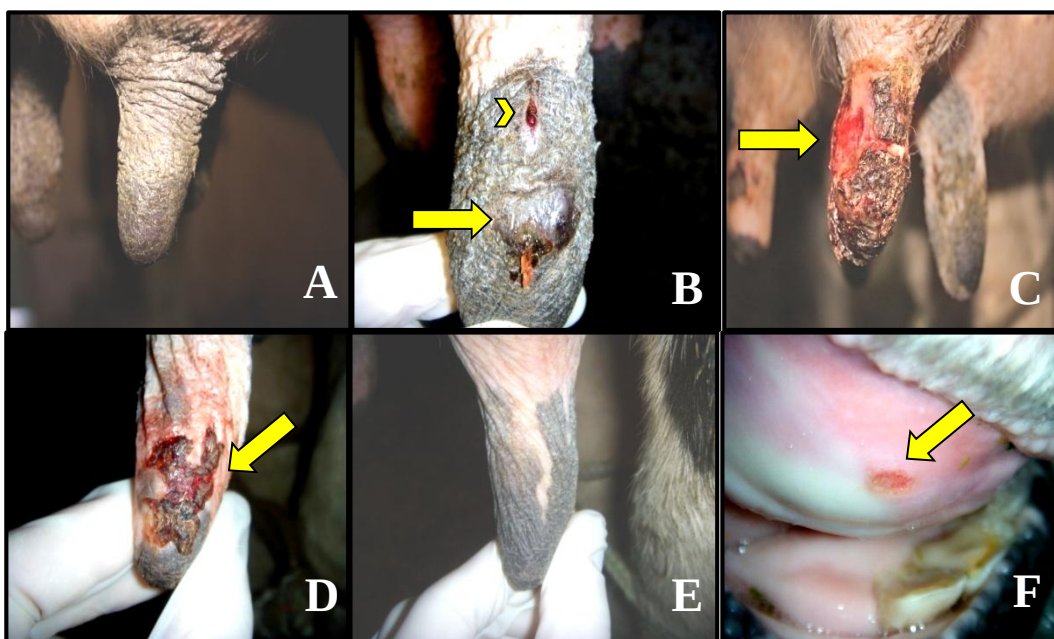


Figura 31: Evolução das lesões nas vacas lactantes experimentalmente inoculadas com VACV-GP2. (A) Teto posterior esquerdo (TPE), que não foi inoculado e não desenvolveu lesões (8ºd.p.i.); (B) Vesícula (cabeça de seta) e pápula (seta) (4ºd.p.i.); (C) Úlcera (seta) (10ºd.p.i.); (D) Crosta (seta) (7ºd.p.i.); (E) Teto cicatrizado (25ºd.p.i.); (F) lesão ulcerada na mucosa oral (seta) (7ºd.p.i.).

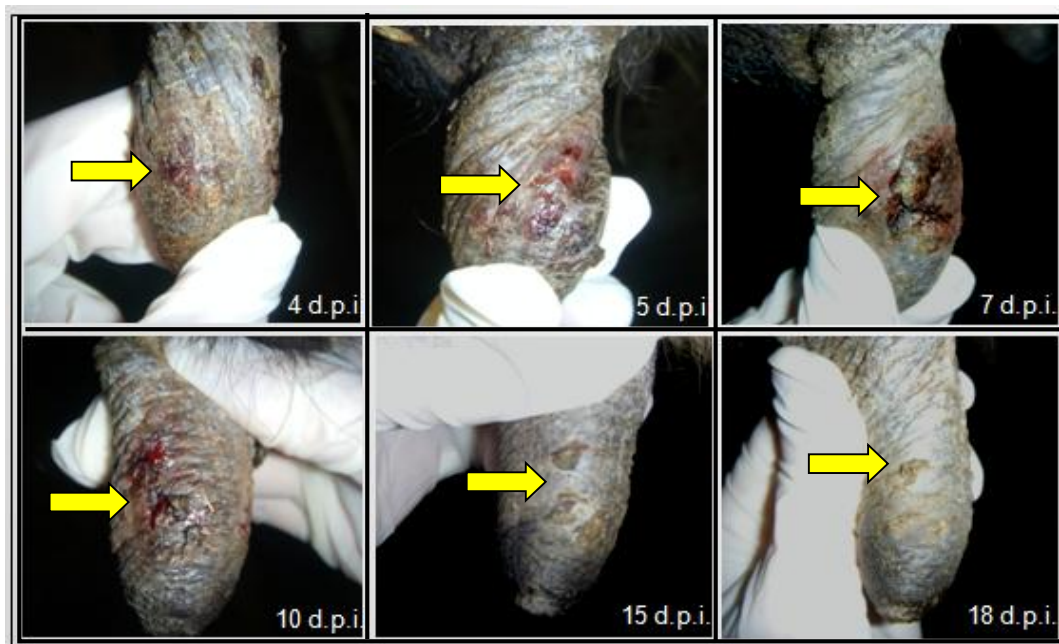


Figura 32: Evolução das lesões na vaca 62 experimentalmente inoculada com VACV-GP2. 4º d.p.i. Vesícula e pápula (seta); 5º e 7º d.p.i. úlcera (seta); 10º d.p.i. úlcera e crosta (seta); 15º e 18º d.p.i. fase de cicatrização.

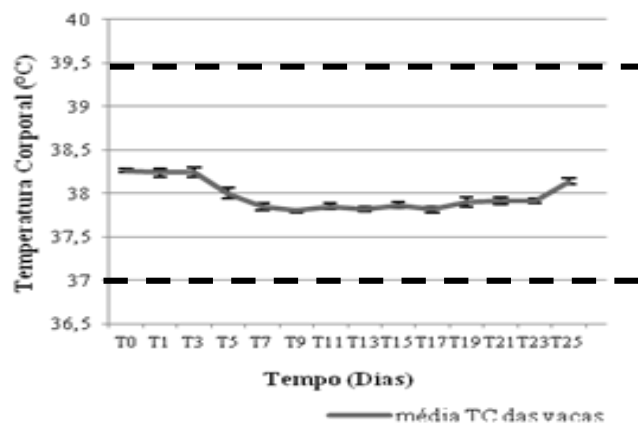


Figura 33: Média dos valores da temperatura corporal (TC) dos animais no dia da inoculação (T0) até o 27º d.p.i. (T27). Linhas horizontais pontilhadas indicam o intervalo de referência fisiológica para a TC na espécie bovina (Dirksen *et al.*, 1993). Linhas verticais pretas indicam o erro padrão. Não houve diferença estatística entre as médias da TC dos animais em relação ao tempo para $p < 0,05$.

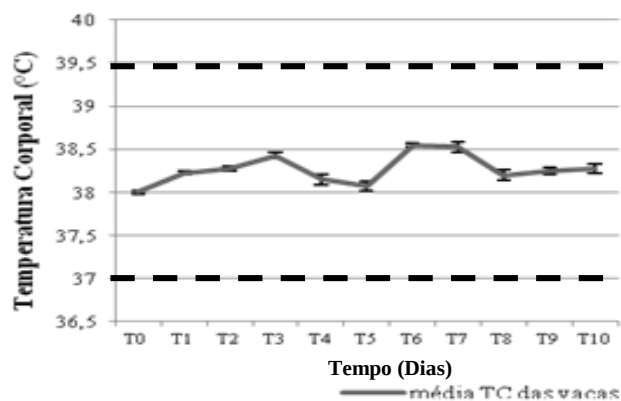


Figura 34: Média dos valores da temperatura corporal (TC) dos animais imunodeprimidos do primeiro dia de tratamento com dexametasona (T0) até o 10º dia de acompanhamento (T10). Linhas horizontais pontilhadas indicam o intervalo de referência fisiológica para a TC na espécie bovina (Dirksen *et al.*, 1993). Linhas verticais indicam o erro padrão. Houve diferença estatística nos tempos T6 e T7 em relação ao T0 para $p < 0,05$.

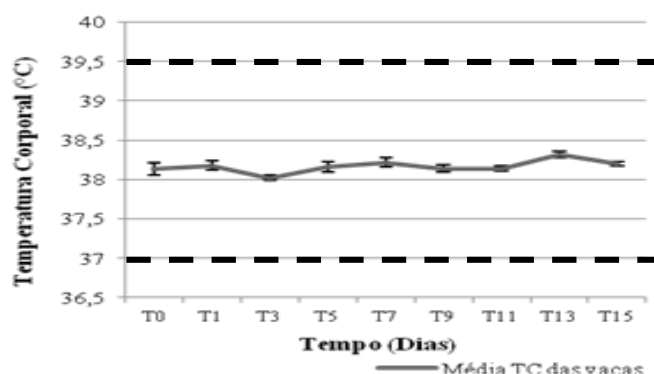


Figura 35: Média dos valores da temperatura corporal (TC) dos animais reinoculados do dia da inoculação (T0) até o 15º d.p.i. (T15). Linhas horizontais pontilhadas indicam o intervalo de referência fisiológica para a TC na espécie bovina (Dirksen *et al.*, 1993). Linhas verticais indicam o erro padrão. Não houve diferença estatística nos tempos após reinoculação em relação ao T0 para $p < 0,05$.

Tabela 10: Evolução das lesões nos tetos das vacas lactantes experimentalmente inoculadas (Fase 1) e das vacas reinoculadas (Fase 2) com VACV-GP2.

d.p.i. (inoculação - Fase 1)	Características das lesões	d.p.i. (reinoculação – Fase 2)
0	Inoculação	0
2	Eritema	-----
3 - 5	Vesículas e pápulas	2 - 5
5 - 30	Úlceras	4 - 6
6 - 31	Crostas	5 - 9
18	Fase de cicatrização	7
22 - 32	Cicatrização completa	9 - 10

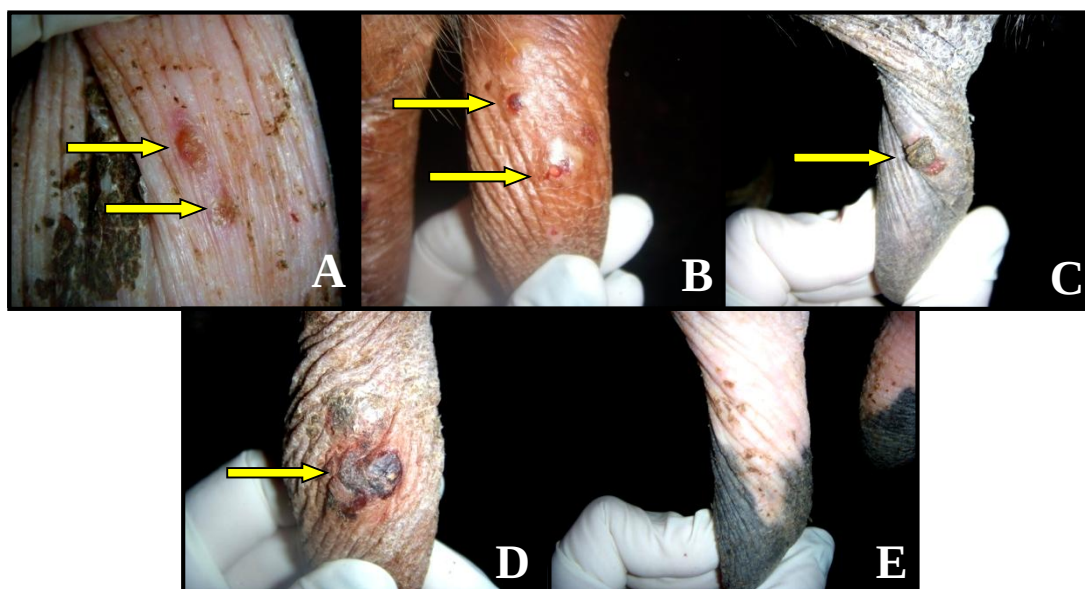


Figura 36: Lesões de VB nos tetos das vacas lactantes reinoculadas com VACV-GP2 no 5ºd.p.i. - (A e B) Vesículas (setas) vacas 05 e 06, respectivamente; (C e D) Crostas com ulcerações (setas) vacas 62 e 06, respectivamente; (E) Teto do animal reinoculado (vaca 13), que não desenvolveu lesões sugestivas de VB, mostrando somente lesões associadas à escarificação.

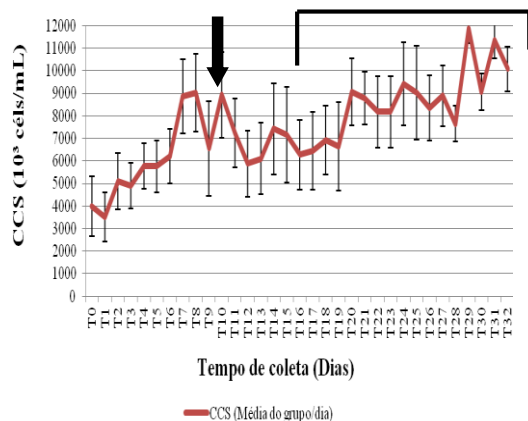


Figura 37: Média da CCS dos oito animais experimentalmente inoculados com VACV-GP2 do T0 (dia da inoculação) até T32 (32 d.p.i.). As barras finas verticais indicam erro padrão. Os tempos indicados por seta e delimitados por colchete indicam diferença estatística ($p < 0,05$) quando comparados com T0.

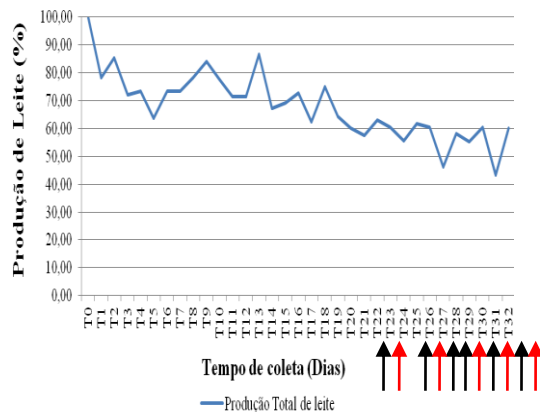


Figura 38: Total da produção de leite diária (em porcentagem) dos oito animais experimentalmente inoculados com VACV-GP2 do T0 (dia da inoculação) até T32 (32 d.p.i.). Os tempos indicados por setas representam diferença estatística em relação a T0. Setas vermelhas consideram $p < 0,01$ e para os tempos indicados com setas pretas considerar $p < 0,05$.

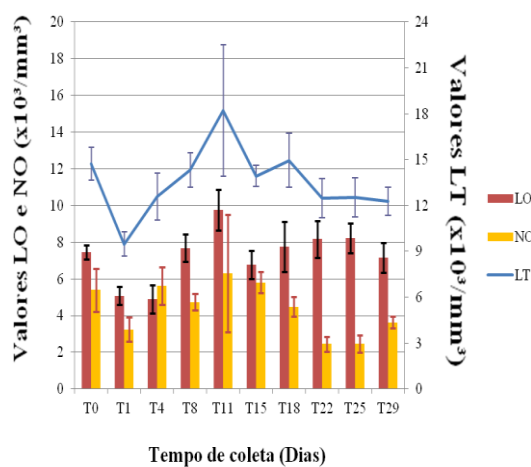


Figura 39: Valores médios de leucócitos totais (LT), linfócitos (LO) e neutrófilos (NO) das vacas lactantes experimentalmente inoculadas com VACV-GP2 em relação aos tempos de coleta. O eixo da esquerda representa os valores dos LO e NO e o eixo da direita representa os valores dos LT. As barras verticais representam o erro padrão. Valores de referência para LT, LO e NO são $4,0-12,0 \times 10^3/\text{mm}^3$; $2,5-7,5 \times 10^3/\text{mm}^3$; $0,6-4,0 \times 10^3/\text{mm}^3$, respectivamente (Jain, 1993). A variável LT não apresentou diferença estatística entre os tempos, enquanto LO e NO apresentaram diferença entre T1, T4, T11 e T15, T22, T25, respectivamente, para $p < 0,05$.

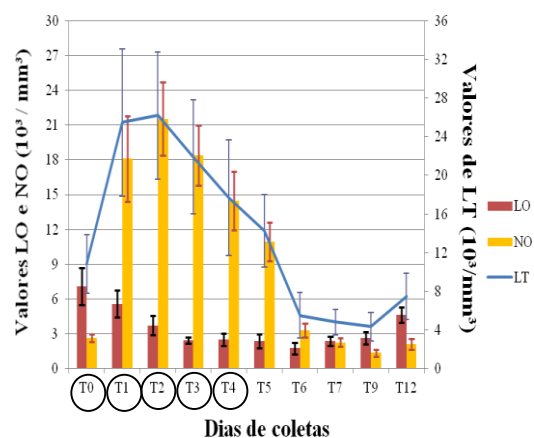


Figura 40: Valores médios de leucócitos totais (LT), linfócitos (LO) e neutrófilos (NO) das vacas imunodeprimidas com dexametasona em relação ao tempo de tratamento. O eixo da esquerda representa os valores dos LO e NO e o eixo da direita representa os valores dos LT. As barras verticais representam o erro padrão. Valores de referência para LT, LO e NO são $4,0-12,0 \times 10^3/\text{mm}^3$; $2,5-7,5 \times 10^3/\text{mm}^3$; $0,6-4,0 \times 10^3/\text{mm}^3$ (Jain, 1993). Tempos circulos em preto representam os dias de tratamento com dexametasona. Os LT e LO apresentaram diferença estatística entre todos os tempos em relação a T0 para $p < 0,05$. Os NO tiveram os tempos T1 a T5 diferença significativa quando comparados com T0.

4. DISCUSSÃO

4.1. Fase 1

No presente estudo, a VB foi reproduzida em todos os animais inoculados. As lesões manifestaram um caráter disseminado, devido ao tipo de escarificação realizado, mimetizando as lesões encontradas em vacas naturalmente infectadas. Assim como aconteceu nos demais experimentos, as lesões ficaram restritas ao local da escarificação realizada. O TPE, o qual foi apenas escarificado e não inoculado, não apresentou lesão em nenhum momento do experimento. O TPE era o primeiro teto a ser ordenhado, com uso de luvas, sendo que para cada animal usava-se um par de luvas, o que pode justificar o fato deste teto não ter desenvolvido lesão, além de indicar que não houve contaminação de um teto para outro.

Em tetos na fase ulcerativa foi observado o reaparecimento de vesículas e pápulas sugerindo a ocorrência de uma reinfecção local dos tetos durante o curso clínico da VB. Essa reinfecção em um mesmo teto no mesmo surto também é observada na infecção natural. O ato de ordenhar pode proporcionar a disseminação do vírus no local, além de intensificar a solução de continuidade provocada pela própria doença, causando o surgimento de novas lesões. Não houve também acometimento do úbere, como descrito por Schatzmayr e colaboradores (2000) e Lobato e colaboradores (2005) em infecções naturais.

As lesões passaram por todos os estágios conforme o descrito em surtos de vacas naturalmente infectadas: pápulas, vesículas, , úlceras, crostas e cicatrização (Damaso *et al.*, 2007; Lobato *et al.*, 2005). O período de incubação (PI) do VACV também foi curto, entre o 3° e o 5° d.p.i., como observado nos dois experimentos anteriores e por Lauder e colaboradores (1971).

O curso da VB no presente experimento foi mais prolongado do que nos experimentos anteriores, se estendendo até o 22° e o 25° d.p.i., em média, com exceção de uma vaca, cujo curso durou 32 dias. Estes dados estão de acordo com o observado em vacas naturalmente infectadas (Lobato *et al.*, 2005). A diferença dos tempos de cicatrização pode estar relacionada com fatores individuais, idade, doenças concomitantes, condição corporal, raça, período

de lactação, estado imunológico, entre outros, os quais podem influenciar a resposta do animal a uma doença (Dirksen *et al.*, 1993). A quantidade de inóculo aplicada, assim como a distribuição das lesões nos tetos também podem interferir no tempo de resolução da VB, ou seja, lesões focalmente localizadas tendem a cicatrizar mais precocemente do que as lesões disseminadas, como observado no experimento 1.

As alterações clínicas observadas estão de acordo com os experimentos anteriores. Como o exame clínico foi realizado em dias alternados, a probabilidade em detectar o pico febril do bovino, caso ocorra, foi pequena, assim como ocorreu no experimento 2. Porém, o fato da febre não ter sido detectada em nenhum experimento, sugere que a VB não promove hipertermia, pelo menos nas condições experimentais às quais os animais foram submetidos.

As lesões detectadas na mucosa oral foram positivas para VACV pelo teste de PCR. Assim, esses achados reafirmam a hipótese de distribuição sistêmica do VACV no bovino como descrito no experimento 2. Porém, não podemos descartar a hipótese dessas vacas terem mamado ou lambido os próprios tetos ou os tetos da outra vaca com a qual dividia a baía.

No exame clínico também foi detectado o aumento de volume dos LRM. Porém, o aumento foi detectado a partir do 18° d.p.i., enquanto que nos demais experimentos esse fato ocorreu a partir do 6° d.p.i. Essa diferença de tempo pode estar relacionada com a mastite diagnosticada nas vacas em lactação do presente experimento. A mastite é um processo inflamatório e, como tal, causa dor, vermelhidão, calor e edema, devido aos efeitos das citocinas e outros mediadores da inflamação sobre os vasos sanguíneos locais (Janeway *et al.*, 2002). O edema gera um aumento de volume da glândula e, consequentemente, ao endurecimento da pele e do subcutâneo (Dirksen *et al.*, 1993). Com isso, a palpação dos linfonodos retromamários torna-se dificultada, levando a erro de diagnóstico. Além disso, a mastite também promove o aumento dos LRM e como esta foi identificada no T0, os linfonodos já estariam aumentados inicialmente.

Na VB, a mastite é relatada como sendo causada por infecção bacteriana secundária às lesões

causadas pelo VACV (Lobato *et al.*, 2005; Trindade *et al.*, 2006; Damaso *et al.*, 2007; Da Silva *et al.*, 2008; Madureira, 2009). Em búfalos infectados por *Buffalopox virus* (Singh *et al.*, 2007) a mastite causa enormes prejuízos, como perda de tetos, queda na produção de leite, descarte de animais e gastos com medicamentos. Acredita-se que a VB predispõe à retenção de leite nos animais devido à dor provocada pelas lesões, principalmente no momento da ordenha (Madureira, 2009). O leite retido na glândula é um excelente meio de cultivo para as bactérias, que multiplicam e causam a inflamação da glândula mamária. A mastite foi uma alteração detectada antes da inoculação dos animais no experimento 3 através da CCS. De acordo com Santos (2001), uma glândula mamária é considerada sadia quando a CCS for menor que 300.000 céls/mL de leite. No decorrer do experimento 3, observou-se um aumento da CCS em relação ao T0, exceto no T1, chegando a atingir níveis médios acima de 10.000×10^3 céls/mL nos tempos finais de coleta. Além disso, no decorrer do experimento as vacas manifestaram mastite clínica, ou seja, com formação de grumos. A infecção da glândula mamária causa danos físicos às células epiteliais secretoras da glândula e leva à alteração na permeabilidade vascular do alvéolo secretor, resultando na redução da produção do leite (Santos, 2001). Logo, a queda na produção de leite observada no presente experimento pode ter sido causada pela mastite. Segundo Wilson e colaboradores (1997), a intensidade da perda de produção dependerá da severidade da infecção, da duração, da idade do animal, da época do ano, do estado nutricional e do microorganismo causador. No experimento 3 foi computado uma queda total na produção de 32,94%. Por isso, o ideal é que o proprietário faça uma boa higienização do curral e da sala de ordenha, além da realização do pré-dipping e pos-dipping, juntamente com assepsia das teteiras e/ou mãos dos ordenhadores. A água sanitária é uma excelente opção como desinfetante, pois é barata e fácil de adquirir. Além disso, pode ser usado tanto na desinfecção das instalações e equipamentos de ordenha quanto nos tetos e mãos dos ordenhadores. Lobato e colaboradores (2005) recomendam diluir a água sanitária quatro vezes o que equivale a 6g/L de cloro ativo. Estudos comprovaram que 5g/L de cloro ativo são suficientes para desativar o VACV (De

Oliveira *et al.*, 2010) e essa quantidade também é eficaz para eliminar os principais agentes causadores da mastite, tais como *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*, por um período de exposição de 6 minutos (Reynold, 1989).

Ao analisarmos o eritrograma e o trombograma no experimento 3, todos os valores encontravam-se dentro dos limites de referência propostos por Jain (1993), com as variáveis CHCM e contagem de plaquetas apresentando diferenças significativas ($p < 0,05$) ao longo dos tempos. Durante o experimento foi detectada uma vaca com hemoparasitose, causada por *Babesia bovis*, o que explica a queda individual nas concentrações de hemácias e de hemoglobina e do VG a partir do T4. Porém, não houve interferência desses valores na média dessas variáveis, mantendo-as no intervalo considerado normal para a espécie na fase adulta.

Em bovinos, diferentemente das outras espécies domésticas, a proporção de linfócitos é maior do que a de neutrófilos. A inversão dessa proporção é indicativa de inflamação (Jain, 1993). Em todos os tempos do experimento 3, com exceção do T1, ocorreu leucocitose discreta utilizando-se os valores de referência para a espécie bovina (Jain, 1993). Entretanto, Costa (1994) e Fagliari (1998), ao estudarem o perfil hematológico de bovinos adultos criados no Brasil, observaram valores médios das contagens de leucócitos totais e, consequentemente, das contagens diferenciais dos leucócitos, muito superiores aos propostos por Jain (1993). Os valores observados nos resultados do leucograma do presente experimento são próximos aos relatados na literatura brasileira para a espécie. Não obstante, no experimento foi observada mastite em todos os animais, e foram detectadas duas vacas (14 e 22) que possuíam parasitas como o *Eurytrema pancreaticum* e *Babesia bovis*, respectivamente. Todos esses achados poderiam influenciar diretamente o hemograma e a bioquímica sérica. A leucose enzoótica bovina (LEB), mesmo no estágio subclínico, eleva o número de linfócitos circulantes (Cockerell e Reyes, 2000) e, com isso, poderia estar associada à linfocitose. Ao estabelecer os valores de referência de leucograma para bovinos sadios no Brasil, Costa (1994) e Fagliari (1998) citam que o maior número de leucócitos totais em relação aos valores do hemisfério norte são causados

principalmente pelo aumento dos linfócitos, devido ao grande desafio ambiental ao qual os animais brasileiros estão submetidos. Um fator muito importante que deve ser levado em consideração é o estresse da coleta das amostras, em que o animal, devido ao medo e à excitação, libera adrenalina e esta causa uma neutrofilia e linfocitose fisiológicas. Na linfocitose e neutrofilia mediadas por adrenalina não ocorrem alterações morfológicas das células, como presença de neutrófilos tóxicos e grandes concentrações de linfócitos reativos (Paes *et al.*, 2009). Linfócitos reativos, em pequenas concentrações, foram detectados no presente experimento e podem estar relacionados com a VB ou com o estresse da coleta, sem que seja possível, com os dados obtidos no presente experimento, determinar a provável causa dessa alteração.

A mastite é um processo infeccioso da glândula mamária que no início causa neutropenia, pois os ruminantes possuem um compartimento de reserva medular de neutrófilos muito pequeno (Kramer, 2000; Taylor, 2000). À medida que ocorre aceleração na resposta medular em relação à demanda de granulócitos, a produção passa a ser maior do que o recrutamento no tecido, invertendo o quadro para neutrofilia regenerativa com desvio para esquerda. Paes e colaboradores (2009) relatam que as inflamações do tecido cutâneo e do trato urinário inferior não levam à neutrofilia, pois os mediadores são perdidos na pele ou na urina. Taylor (2000) e Paes e colaboradores (2009) citam que os ruminantes são pouco responsivos à leucocitose, o que determina menor sensibilidade ao leucograma como marcador de inflamação. As proteínas plasmáticas tais como haptoglobulina e fibrinogênio são indicadores mais sensíveis às inflamações agudas e crônicas em ruminantes do que o leucograma (Taylor, 2000). Houve aumento da globulina e das proteínas séricas desde o T0. Como a albumina encontra-se dentro dos valores de referência, a hiperproteinemia ocorreu devido ao aumento das globulinas. A hiperglobulinemia pode ser causada por aumento das globulinas alfa (α) e beta (β) e/ou por causa da produção de gama (γ) globulinas, também conhecidas como imunoglobulinas (Weiss e Walcheck, 2008). O VACV causa inflamação local e pode provocar reatividade dos linfonodos adjacentes. Além disso, títulos de AT e AN contra VACV foram detectados. A mastite também ativa linfócitos e

promove a hiperplasia de folículos linfóides dos linfonodos retromamários, o que pode explicar, juntamente com a infecção pelo VACV, a hiperglobulinemia detectada. As taxas de fibrinogênio, principal proteína de fase aguda positiva em ruminantes, não apresentaram diferenças estatísticas, mantendo-se, durante os tempos, no intervalo dos limites de referência para bovinos saudáveis, ou seja, não houve indicativo de inflamação.

Em relação às enzimas analisadas, o aumento de GGT pode ter ocorrido devido a uma colestase. Já os aumentos dos níveis de ALT e AST indicam lesão hepática e/ou muscular ou hiperatividade hepática (Hoffmann e Solter, 2008). Foi observado um discreto aumento da atividade da GGT nos tempos T0, T1 e T2, enquanto nos demais tempos, os valores não apresentaram alteração. Esse aumento pode estar relacionado com o animal no qual foi detectado *Eurytrema pancreaticum*, parasita que vive nos canalículos biliares de ruminantes. Apesar dessa alteração ter sido detectada, a GGT não apresentou diferenças significativas estatisticamente. A enzima ALT não tem significado clínico em relação a lesões hepáticas em herbívoros, pois a ALT catalisa a reação de alanina, produzindo piruvato que é a principal fonte de energia dos carnívoros e não dos herbívoros. Já a AST catalisa a reação do aspartato produzindo oxaloacetato, principal fonte de energia dos herbívoros. Logo, esta enzima é a principal indicadora de lesão hepática nos bovinos, apesar de também ter concentração aumentada nas lesões musculares (Hoffmann e Solter, 2008). No presente experimento, as enzimas ALT e AST apresentaram atividade média discretamente acima dos valores de referência para a espécie nos tempos T1 e T0 e T1, respectivamente. Nos tempos seguintes, a ALT apresentou-se dentro dos limites de referência ao passo que a AST apresentou valores médios discretamente abaixo dos limites de referência nos tempos T8, T22 e T29. Pode-se sugerir que as alterações nos momentos iniciais, como as mudanças de manejo às quais os animais foram submetidos, podem ter ocasionado alterações hepáticas e musculares. O aumento da ALT e AST pode ser justificado pela lesão nos tetos e pelas lesões no jarrete causadas pela corda para contenção do animal durante as coletas. Como não foi feita a medição da creatinafosfoquinase (CPK), enzima presente no músculo, não podemos

afirmar se a causa do aumento da ALT e AST foi devido à lesão muscular. Nos momentos seguintes, a atividade enzimática média fora dos limites de referência poderia ser atribuída aos valores de referência internacionais utilizados na interpretação dos resultados. O fósforo apresentou diferença estatística, porém seus valores encontram-se dentro do intervalo de referência.

4.2. Fase 2

A dose de dexametasona (DMS) utilizada nas vacas foi suficiente para promover a imunodepressão nos animais, o que foi comprovado nos testes hematológicos e bioquímicos. O glicocorticóide causa leucocitose acentuada devido à neutrofilia, pois ocorre comprometimento das moléculas de adesão dos neutrófilos do compartimento marginal, causando um aumento destes na circulação. Além disso, ocorre estímulo da medula óssea para liberar granulócitos na circulação (Paes *et al.*, 2009). O glicocorticóide também causa uma linfopenia, por impedir a ativação e multiplicação de linfócitos através da inibição das interleucinas 1 e 2 (Rang *et al.*, 1997). No fígado, o glicocorticóide atua estimulando a neoglicogênese e o aumento do glicogênio hepático o que pode explicar o aumento gradativo das enzimas hepáticas. O aumento observado nas taxas de glicose também é consequência do tratamento com DMS. Outra consequência da aplicação de DMS é a queda na produção de leite devido à inibição da lactogênese (Greco e Stabenfeldt, 2004), podendo justificar também a alteração da viscosidade e da coloração do leite observados durante o período de tratamento. Apesar dos animais apresentarem títulos de AT e AN antes da primeira aplicação de DMS, os títulos aumentaram no decorrer do experimento, ao invés de diminuírem devido à depressão do sistema imune. Isso sugere persistência e multiplicação do VACV no organismo das vacas submetidas ao tratamento imunodepressivo e, assim, pode-se explicar o aparecimento das lesões na mucosa oral em dois animais, das quais foi detectado DNA viral.

Os animais submetidos à reinfecção pelo VACV-GP2 desenvolveram lesões compatíveis

com a VB novamente, nas condições experimentais às quais as vacas foram submetidas. A severidade das lesões variou entre os animais reinoculados após 240 e 70 d.p.i. Os animais reinoculados após 240 dias manifestaram lesões mais severas, multifocais e o curso da doença foi mais longo. Cabe aqui ressaltar que nos animais reinfectedos, após 70 dias da infecção inicial, ainda foram detectados títulos de AT e AN, um dia antes da reinfecção, o que pode justificar a surgimento de lesões mais brandas e, conseqüentemente, uma resolução mais rápida. Ou seja, a presença de anticorpos contra o VACV promoveu uma proteção parcial nessas vacas. Além disso, em geral, as lesões nos animais reinfectedos foram menores, com fase ulcerativa mais branda do que nos animais inoculados pela primeira vez. No decorrer do experimento houve um aumento no título dos anticorpos, o que explica a hiperproteinemia e hiperglobulinemia detectadas através dos testes bioquímicos. Porém, por menor e mais branda que seja a lesão no teto da vaca, esta permanece sendo uma fonte de infecção para humanos e outros animais.

5. CONCLUSÕES

- A VB foi reproduzida experimentalmente em todos os animais inoculados conforme observado em infecções naturais;
- As lesões manifestaram caráter disseminado de acordo com a área de escarificação (solução de continuidade);
- Um mesmo teto pode ser reinfectedo durante uma infecção por VACV;
- O período de incubação foi curto, entre 3 e 5 dias;
- A VB causa linfadenopatia local em bovinos;
- A VB pode ter ação sistêmica em bovinos;
- Animais previamente infectados com VACV e imunodeprimidos artificialmente não apresentam lesões sugestivas de VB nos tetos;

- Devido ao aumento dos títulos de AT e AN observados nos animais imunodeprimidos, além das lesões orais serem positivas na PCR, suspeita-se que ocorra reativação e multiplicação viral nesses animais;
- Em vacas reinfectedas a doença ocorre de forma mais branda e o período patente é menor.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo a VB foi reproduzida em todos os tetos inoculados e permitiu a realização de uma pesquisa detalhada e ampla sobre a doença em três experimentos.

De maneira geral, observou-se que o período de incubação do VACV em bovinos é curto, e que o padrão de evolução das lesões ocorreu de maneira similar nos três experimentos, o qual também foi similar ao padrão de evolução de lesões observado em infecções naturais pelo VACV em bovinos. Além disso, foi possível observar que a distribuição das lesões está associada à presença de soluções de continuidade na pele, que foram produzidas por escarificação nos três experimentos, mesmo após a realização de movimento de ordenha nos tetos lesionados.

Foi possível estabelecer que o melhor método de escarificação foi obtido com a utilização de lixa, e o melhor inóculo foi o VACV-GP2 re-isolado, baseando-se na reprodução de lesões nos animais experimentais, as quais foram similares às lesões que são observadas em vacas naturalmente infectadas.

Foi feito o acompanhamento clínico da fase inicial até cicatrização das lesões, assim como os perfis hematológico e bioquímico associados à infecção. Do acompanhamento clínico, pode-se concluir que a infecção experimental do VACV em bovinos causa uma linfadenopatia local, como é observado em humanos. Além disso, pode-se dizer que a VB não causa hipertermia em bovinos experimentalmente inoculados, e nem outras alterações clínicas nesses animais, de acordo com o protocolo de exame clínico utilizado no presente estudo. Em relação aos perfis hematológico e bioquímico, as alterações detectadas provavelmente podem estar de acordo com os perfis desses mesmos parâmetros observados em animais naturalmente infectados, uma vez que a mastite é frequentemente observada em animais acometidos pela VB a campo e que os desafios parasitários são achados comuns no rebanho bovino brasileiro.

Alterações histopatológicas significativas foram observadas nos tetos, glândulas mamárias e linfonodos retromamários dos animais inoculados dos experimentos 1 e 2, em três fases diferentes da doença: ulcerativa, crostosa e cicatrização. O VACV pôde ser detectado, através da técnica de IHQ, nos tetos dos animais da fase inicial (4º d.p.i) e da fase intermediária (9º d.p.i) da evolução da doença e na fase final, de cicatrização (17º d.p.i). A imunomarcagem foi observada com menor intensidade e quantidade, o que sugere a ausência ou menor multiplicação do vírus no local primário de infecção, após a fase aguda da doença. Imunomarcagem positiva também foi observada nas glândulas mamárias e nos linfonodos retromamários dos animais aos 4º, 9º e 17º d.p.i, o que sugere uma possível infecção local por via ascendente e disseminação por via linfática do VACV.

Foi observado também que a mastite pode ser exacerbada pela VB e que houve queda de cerca de 30% na produção de leite nos animais infectados, assim como aumento significativo no número de células somáticas. Essas alterações provavelmente ocorreram como consequência da inflamação da glândula mamária. Apesar da análise histopatológica ter demonstrado indícios de inflamação da glândula mamária e da detecção do antígeno de VACV no epitélio acinar, mais estudos são necessários para saber se há mastite viral concomitantemente com mastite bacteriana.

Mediante as condições experimentais às quais os animais foram submetidos, é possível concluir que a reinfecção pelo VACV pode ocorrer em animais previamente infectados. Suspeita-se também de que o VACV pode persistir e multiplicar em vacas imunodeprimidas, uma vez que houve aumento no título de anticorpos nesse grupo de animais.

Alguns resultados do presente estudo sugerem que o VACV pode disseminar-se sistemicamente no organismo do bovino, uma vez que o DNA viral foi detectado nas lesões de mucosa oral. Além disso, outros estudos realizados pelo grupo têm demonstrado a presença de DNA de VACV em amostras de sangue total, fezes e leite dos animais experimentalmente inoculados, mesmo após a cicatrização das lesões. Estudos sobre a viabilidade viral e a quantificação da carga viral estão em andamento. A partir desses resultados será possível comprovar a disseminação sistêmica do vírus no organismo de bovinos. Testes imunológicos também foram realizados com o intuito de estudar o perfil imunológico de animais experimentalmente infectados com VACV.

O próximo passo será o estudo histopatológico e imuno-histoquímico dos demais tecidos coletados das vacas dos experimentos 1, 2 e 3, assim como a realização das técnicas de PCR e isolamento viral nos mesmos tecidos. Esses dados ajudarão a esclarecer alguns aspectos importantes da infecção pelo VACV em bovinos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abrahão, J. S. **Deteção de *Vaccinia virus* em espécimes clínicos utilizando a reação em cadeia polymerase.** *Monografia de conclusão de curso.* Departamento de microbiologia – Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Minas Gerais, 2006.
2. 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.*, n.6, p.1141-1146, 2009a.
3. Abrahão, J. S.; Trindade, G. S.; Ferreira, J. M. S. *et al.* **Long-lasting stability of *Vaccinia virus* strains in murine feces: implications for virus circulation and environmental maintenance.** *Arch. Virol.*, vol.154, p.1551-1553, 2009b. DOI: 10.1007/s00705-009-0470-1.
4. Abrahão, J. S.; Silva-Fernandes, A. T.; Lima, L. S. *et al.* ***Vaccinia virus* infection in monkeys, Brazilian Amazon.** *Emerg. Infect. Dis.*, vol.16, n.6, p.976-979, 2010. DOI: 103201/eid1606.091187.
5. Almeida, S. R.; Diel, D. G.; Rissi, D. R. *et al.* **Caracterização clínico-patológica da mamilite aguda em ovelhas lactantes infectadas experimentalmente com herpesvirus bovino 2.** *Pesq. Vet. Bras.*, vol.28, n.1, p.87-94, 2008.
6. 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.269-278, 2003.
7. Brandt, T. A. and Jacobs, B. L. **Both carboxy- and amino-terminal domains of the *Vaccinia virus* interferon resistance gene, E3L, are required for pathogenesis in a mouse model.** *Journal Virol.*, v.75, n.2, p.850-856, 2001.
8. Breman, J. G. and Henderson, D. A. **Diagnosis and management of smallpox.** *The New England Journal of Medicine*, v.346, n.17, p.1300-1308, 2002.
9. Buller, R. M. L. and Palumbo, G. J. **Poxvirus Pathogenesis.** *Microbiol. Reviews*, v.55, n.1, p.80-122, 1991.
10. Campos, M. A. S. and Kroon, E. G. **Critical period for reversible block of *Vaccinia virus* replication.** *Rev. Brasil. Microbiol.*, n.24, p.104-110, 1993.
11. Cockerell, G. L. and Reyes, R. A. **Bovine Leukemia Virus-Associated lymphoproliferative disorders.** In: Feldman, B. F.; Zinkl, J. G.; Jain, N. C. *Schalm's Veterinary hematology*, 5ª ed., 2000, cap.90, p.614-619.
12. Coras, B.; Essbauer, S.; Pfeffer, M. *et al.* **Cowpox and a cat.** *Lancet*, v.365, n.9457, p.446, 2005.
13. Costa, J. N. **Leucograma de zebuínos (*Bos indicus*, Linnaeus, 1758) sadios da raça nelore criados no estado de São Paulo: influência dos fatores etários e sexuais.** 1994, 125f. *Dissertação de Mestrado em Clínica Veterinária*, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.
14. Da Silva, A. C.; Reis, B. B.; Ricci Junior, J. E. R. *et al.* **Infecção em humanos por varíola bovina na microrregião de Itajubá, Estado de Minas Gerais: relato de caso.** *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.41, n.5, p.507-511, 2008.
15. Damaso, C. R. A.; Esposito, J. J.; Condit, R. C. *et al.* **An emergent poxvirus from humans and cattle in Rio de Janeiro State: *Cantagalo virus* may derive from brazilian smallpox vaccine.** *J. Virol.*, v.277, p.439-449, 2000.
16. Damaso, C. R. A.; Reis, S. A.; Jesus, D. M. *et al.* **A PCR-based assay for detection of emerging *Vaccinia*-like viruses isolated in Brazil.** *Diag. Microb. Infect. Dis.* V.57, p.39-46, 2007.
17. De Castro, M. E. B.; Araujo, S.; Ribeiro, M. Z. *et al.* **Análise fenotípica de dois variantes de *Anticarsia gemmatilis* MNPV multiplicados durante passagem seriada em cultura de células.** *Boletim de Pesq. e Desenv.*, EMBRAPA, 2002.

18. De Oliveira, T. M. L.; Rehfeld, I. S.; Siqueira, J. M. F. *et al.* **Vaccinia virus is not inactivated after thermal treatment and cheese production using experimentally contaminated milk.** *Foodb. Path. Dis.*, v.7, n.12, p.1491-1496, 2010. DOI:10.1089/fpd.2010.9507.
19. Diniz, S.; Trindade, G. S.; Fonseca, F. G. *et al.* **Surto de varíola murina em camundongos suíços em biotérios – Relato de caso.** *Arq. Med. Vet. e Zootec.*, v.53, n.2, p.152-156, 2001.
20. Dirksen, G.; Gründer, H. D.; Stöber, M. In: **Rosenberger: Exame clínico dos bovinos.** 3ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A. 1993, 419p.
21. Drazen, J. M. **Smallpox and bioterrorism.** *N. Engl. J. Med.*, v.346, n.17, p.1262-1263, 2002.
22. Drumond, B. P.; Leite, J. A.; Fonseca, F. G. *et al.* **Brazilian Vaccinia virus strain are genetically divergent and differ from the Lister vaccine strain.** *Microb. Infect.* In press, 2008.
23. Esposito, J. J. and Knight, J. C. **Orthopoxvirus DNA: a comparison of restriction profiles nd maps.** *J. Virol.*, v.143, n.1, p.230-251, 1985.
24. Esposito, J. J. and Fenner, F. **Poxviruses.** In: Fields, B. N.; Knipe, D. M.; Howley, P. M.; Griffin, D. E. *Fields' Virology.* Philadelphia, PA: Lippincott-Raven Publishers. 2001, p.2885-2921.
25. Esteban, D. J. and Buller, R. M. **Ectromellia virus: the causative agent of mousepox.** *J. Gen. Virol.*, v.86, n.10, p.2645-2659, 2005.
26. Fagliari, J. J.; Santana, A. E.; Lucas, F. A. *et al.* **Constituintes sanguíneos de bovinos lactantes, desmamados e adultos das raças Nelore (Bos indicus) e holandesa (Bos taurus) e de bubalinos (Bubalus bubalis) da raça Murrah.** *Arq. Bras. Med. Vet. e Zootecn.*, v.50, n.3, p.263-271, 1998.
27. Fenner, F.; Henderson, D. A.; Arita, I. *et al.* **Smallpox an its eradication.** *World Health Organization,* Geneva – Suíça, p.230-243, 1988. Acessado dia 22/03/2011 em: <http://whglibdoc.who.int/smallpox/9241561106.pdf>.
28. Fenner, F.; Wittek, R.; Dumbell, K. R. *et al.* **The Orthopoxviruses.** 1ªed. Academic Press, 1989. San Diego – California, 432p.
29. Fenner, F. **Adventures with poxvirus of vertebrates.** *FEMS Microb. Reviews*, v.24, p.123-133, 2000.
30. Fenner, F. Richaman, D. D.; Whitley, R. *et al.* **Poxviruses in clinical virology.** *Am. Soc. Microb. Press.* Washington, DC-USA, p.359-374, 2002.
31. Ferreira, J. M. S.; Abrahão, J. S.; Drumond, B. P. *et al.* **Vaccinia virus: shedding and horizontal transmission in a murine model.** *J. Gen. Virol.*, v.89, p.2986-2991, 2008a.
32. Ferreira, J. M. S.; Drumond, B. P.; Guedes, M. I. M. C. *et al.* **Virulence in murine model shows the existence of two distinct populations of brazilian Vaccinia virus strain.** *PloS One*, v.3, n.8, e3043, 2008b.
33. Fonseca, F. G.; Lanna, M. C. S.; Campos, M. A. S. *et al.* **Morfologia and molecular characterization of the poxvirus BeAn 58058.** *Arch. Virol.*, v.143, p.1171-1186, 1998.
34. Gerber, P. F.; Matos, A. C. D.; Guedes, M. I. M. C. **Validation of on immunoperoxidase monolayer assay for total anti-Vaccinia virus antibody titration.** *J. Vet. Diag. Investig.*, 2012, trabalho aceito.
35. Gibbs, E. P. J.; Johnson, R. H.; Osborne, A. D. **Experimental studies of the epidemiology of bovine herpes mammillitis.** *Res. Vet. Sci.*, v.14, p.139-144, 1973.
36. Ginn, P. E.; Mansell, J. E. K. L.; Rakich, P. M. **Skin and appendages.** In: Jubb, K. V. F.; Kennedy, P. C.; Palmer, N. C. *Pathology of Domestic Animals.* 5ªed. San Diego – California: Elsevier. 2007, v.1, cap.5, p.553-674.
37. Godinho, H. P.; Cardoso, F. M.; Do Nascimento, J. F. **Anatomia dos ruminantes domésticos.** Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Morfologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte-MG, Brasil. 1981, p.173.

38. Greco, D. and Stabenfeldt, G. H. **O Sistema Endócrino**. In: Cunningham, J. G. *Tratado de Fisiologia Veterinária*, 3ª ed., Guanabara Koogan, 2004, cap.32, p-333-349.
39. Harvey, J. W. **Atlas of veterinary hematology**. Philadelphia: *Saunders Company*, 2001, 228p.
40. Hoffmann, W. E. and Solter, P. F. **Diagnostic Enzymology of Domestic animals**. In: Kaneko, J. J.; Harvey, J. W.; Bruss, M. L. *Clinical Biochemistry of domestic animals*. 6ªed., San Diego – California: *Elsevier*. 2008, cap.12, p.351-378.
41. Hughs, A. L. and Friedman, R. **Poxvirus genome evolution by gene gain and loss**. *Mol. Phylog. Evol.*, v.35, n.1, p.186-195, 2005.
42. ICTV International Committee on Taxonomy of viruses, 2003. The big picture book of viruses: *Poxviridae*. Acessado dia 5/04/2011 em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Index.htm>
43. Iketani, Y.; Inoshima, Y.; Asano, A. *et al.* **Persisten parapoxvirus infection in cattle**. *Microb. Immunol.*, v.46, n.4, p.285-291, 2002.
44. Jain, N. C. **Cattle: Normal hematology with comments on response to disease**. In: *Schalm's veterinary hematology*. 5ªed. Philadelphia: *Lea & Febiger*.1993, cap.7, p.178-206.
45. Janeway, C. A.; Travers, P.; Walport, M. *et al.* **O desenvolvimento e a sobrevivência dos linfócitos**. In: *Imunobiologia: O sistema imune na saúde e na doença*. 5ªed. Porto Alegre: *Artmed*. 2002, cap.7, p.243-315.
46. Joklik, W. K. **The purification of four strains of poxvirus**. *J. Virol.*, v.18, p.9-18, 1962.
47. Kennedy, P. C. and Miller, R. B. **The female genital system**. In: Jubb, K. V. F.; Kennedy, P. C.; Palmer, N. C. *Pathology of domestic animals*. 4ªed. San Diego – California: *Elsevier*. 1993, v.3, cap.4, p.349-469.
48. Kramer, J. W. **Normal hematology of cattle, sheep and goats**. In: Feldman, B. F.; Zinkl, J. G.; Jain, N. C. *Schalm's Veterinary hematology*. 5ªed. 2000, cap.166, p.1075-1084.
49. Lanna, M. C. **Propriedades biológicas dos poxvirus silvestres cotia e BeAN 58058 isolados no Brasil**. Belo Horizonte/MG, Brasil. Universidade Federal de Minas Gerais, *Dissertação de mestrado*, 105p., 1980.
50. Lauder, I. M.; Murray, M.; Pirie, H. M. **Experimental vaccinia infection of cattle: a comparison with other virus infections of cow's teats**. *Vet. Rec.*, v.89, n.22, p.571-578, 1971.
51. Leite, J. A.; Trindade, G. S.; Lobato, Z. I. P. *et al.* **Emerging Orthopoxvirus outbreaks affecting humans and cattle in Oliveira – Minas Gerais**. In: 14º Encontro Nacional de virologia, Florianópolis. *Virus Reviews & Research – J. Bras. Soc. Virol.* 2003, v.8, p.78-78.
52. Leite, J. A.; Drumond, B. P.; Trindade, G. S. *et al.* **Passatempo virus, a Vaccinia virus strain, Brazil**. *Emerg. Infect. Dis.*, n.11, p.1935-1938, 2005.
53. Lewis-Jones, S. **Zoonotic poxvirus infections in humans**. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, v.17, p.81-89, 2004.
54. Lobato, Z. I. P.; Frois, M. C. M.; Trindade, G. S. *et al.* **Varíola bovina – zoonose reemergente avança em Minas Gerais**. *V&Z em Minas*, v.83, p.18-20, 2004.
55. Lobato, Z. I. P.; Frois, M. C. M.; Trindade, G. S. *et al.* **Surto de varíola bovina causada pelo vírus Vaccinia na região da Zona da Mata Mineira**. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.57, n.4, p.423-429, 2005.
56. Loparev, V. N.; Massung, R. F.; Esposito, J. J. *et al.* **Detection and differentiation of old world orthopoxviruses: restriction fragment lenght polymorphism of the crmB gene region**. *J. Clin. Microbiol.*, v.39, n.1, p.94-100, 2001.
57. Lopes, O. S.; Lacerda, J. P. G.; Fonseca, I. E. M. *et al.* **Cotia virus: a new agent isolated from sentinel mice in São Paulo, Brazil**. *Am. J. Med. Hyg.*, v.14, p.156-157, 1965.
58. Lopes, O. S.; Sacchet, L. A.; Coimbra, T. L. M. **Report from the Arbovirus laboratory**. *Ins. Adolfo Lutz* – São Paulo, Brazil, 1975.

59. Madureira, M. C. **Vaccinia bovina** **Vaccinia bovina no Estado de Minas Gerais, 2005-2007.** 2009, 146f. *Tese de doutorado*, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte/MG.
60. Marques, J. T.; Trindade, G. S.; Da Fonseca, F. G. *et al.* **Characterization of ATI, TK and IFN genes in the BeAn 58058 virus, a naturally attenuated wild Orthopoxvirus.** *Virus Genes*, v.23, p.291-301, 2001.
61. Matanzo, A. T and Heras, C. A. **Recomendaciones de actuación y respuesta ante La aparición de um caso o de um brote de viruela.** *Red nacional de vigilância epidemiológica.* Instituto De salud Carlos III. 2002, 43p.
62. Mazur, C.; Ferreira, I. I.; Rangel Filho, F. B. *et al.* **Molecular characterization of brazilian isolates of Orf virus.** *Vet. Microbiol.*, v.73, p.253-259, 2000.
63. McFadden, G. **Poxvirus tropism.** *Nat. Ver. Microbiol.*, v.3, n.3, p.253-259, 2000.
64. Megid, J.; Apolinário, C. M.; Langoni, H. *et al.* **Short report: Vaccinia virus in humans and cattle in southwest region of São Paulo State, Brazil.** *Am. J. Med. Hyg.*, v.79, n.5, p.647-651, 2008.
65. Meyer, D. J.; Coles, E. H.; Rich, L. J. **Medicina de laboratório veterinário – interpretação e diagnóstico.** São Paulo: Roca. 1995, 308p.
66. Moss, B. **Poxviridae: The viruses and their replication.** In: Fields, B. N.; Knipe, D. M.; Howley, P. M and Griffin, D. E. *Field's Virology.* 3^{ed}. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven Publishers. 1996, v. 2, p. 2849-2883.
67. Moss, B. **Poxviridae: The viruses and their replication.** In: Fields, B. N.; Knipe, D. M.; Howley, P. M and Griffin, D. E. *Field's Virology.* 4^{ed}. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven Publishers. 2001, p. 2849-2883.
68. Moss, B. **Poxvirus entry and membrane fusion.** *J. Virol.*, v.344, n.1, p.48-54, 2006.
69. Nagasse-Shugahara, T. K.; Kisieli, J. J.; Ueda-Ito, M. *et al.* **Human vaccine-like virus outbreaks in São Paulo and Goiás states, Brazil: virus detection, isolation and identification.** *Rev. Inst. Med. Trop.*, v.46, p.315-322, 2004.
70. Paes, P. R. O.; Leme, F. O. P.; Carneiro, R. A. **Hematologia dos animais domésticos.** FEPMVZ, *Caderno Didático.* Universidade Federal de Minas Gerais. 2009, 118p.
71. Pastoret, P. P. and Vanderplasschen, A. **Poxviruses as vaccine vectors. Comparative immunology.** In: *Microbiology & Infectious diseases.* 2003, cap.26, p.343-355.
72. Rang, H. P.; Dale, M. M., Ritter, J. M. **Sistema endócrino.** In: *Farmacologia.* 3^{ed}. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1997, cap.21, p.332-361.
73. Reis, R.; Figueiredo, J. B.; Pacheco, M. **Varíola bovina – aspectos clínicos, características do vírus e observações sobre vacinação.** *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.20, 1970.
74. Reynolds, J. E. F. **Martindale. The extra pharmacopeia.** 29^aed. London: Royal Pharmaceutical Society. 1989, 958p.
75. Santos, M. V. **Contagem de células somáticas e qualidade do leite e derivados.** *Anais interleite*, Belo Horizonte, 2001.
76. Saurini, N. O.; Quixabeira, J.; Ubiali, D. G. *et al.* **Diagnóstico de varíola bovina através da técnica de imuno-histoquímica em bovinos de leite no Estado de Mato Grosso.** In: *VI Encontro Nacional de Diagnóstico Veterinário*, 2010, Campo Grande/MS. VI ENDIVET, 2010.
77. Schatzmayr, H. G.; De Lemos, E. R. S.; 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.625-627, 2000.
78. Silva-Fernandes, A. T.; Travassos, C. E. P. F.; Ferreira, J. M. S. *et al.* **Natural human infections with Vaccinia virus during bovine Vaccinia outbreaks.** *J. Cli. Virol.*, n.44, p.308-313, 2009.

79. 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.105-114, 2007.
80. Smith, S. A and Kotwal, G. J. **Immune response to poxvirus infections in various animals.** *Crit. Rev. Microbiol.*, v.28, n.3, p.149-185, 2002.
81. Sodeik, B. and Krijnse-Locker, J. **Assembly of *Vaccinia virus* revisited: membrane synthesis or acquisition from the host?** *Trends Microbiol.*, v.10, n.1, p.15-24, 2002.
82. Taylor, J. A. **Leukocyte Responses in Ruminants.** In: Feldman, B. F.; Zinkl, J. G.; Jain, N. C. *Schalm's Veterinary Hematology*. 5^aed. 2000, cap.57, p.391-401.
83. Thrall, M. A. **Veterinary hematology and clinical chemistry.** Philadelphia: *Lippincott Williams & Wilkins*. 2004, 518p.
84. Trigueiro, R. C. **Imunoenvasão em Orthopoxvirus isolados no Brasil: análise dos genes B18R e E3L.** *Dissertação de mestrado em Microbiologia*, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. 2004, 156p.
85. Trindade, G. S.; Da Fonseca, F. G.; Marques, J. T. *et al.* **Araçatuba virus: a *Vaccinia*-like vírus associated with infection in humans and cattle.** *Emerg. Infec. Dis.*, n.9, p.155-160, 2003.
86. Trindade, G. S.; Da Fonseca, F. G.; Marques, J. T. *et al.* **Belo Horizonte virus: a *Vaccinia*-like vírus lacking the A-type inclusion body gene isolated from infected mice.** *J. Gen. Virol.*, v.85, n. Pt7, p.2015-2021, 2004.
87. 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. Hyg.*, v.75, n.3, p.486-490, 2006.
88. 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.1370-1372, 2007. DOI: 10.1128/JCM.00920-06.
89. Trindade, G. S.; Yu Li; 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. Met.*, n.152, p.63-71, 2008. DOI: 10.1016/j.jviromet.2008.05.028.
90. Trindade, G. S.; Guedes, M. I. M. C.; Drumond, B. P. *et al.* **Zoonotic *Vaccinia virus*: clinical and immunological characteristics in a naturally infected patient.** *Cli. Infect. Dis.*, v.48, n.3, p.37-40, 2009. DOI: 10.1086/595856.
91. Tscharke, D. C. and Smith, G. L. **A model for *Vaccinia virus* pathogenesis and immunity based on intradermal injection of mouse ear pinnae: short communication.** *J. Gen. Virol.*, v.80, p.2751-2755, 1999.
92. Tscharke, D. C.; Reading, P. C.; Smith, G. L. **Dermal infection with *Vaccinia virus* reveals roles for virus proteins not seen using other inoculation routes.** *J. Gen. Virol.*, v.83, n.Pt8, p.1977-1986, 2002.
93. Weiss, D. J and Walcheck, B. **Neutrophil Function.** In: Kaneko, J. J.; Harvey, J. W.; Bruss, M. L. *Clinical Biochemistry of domestic animals*. 6^aed. San Diego, California: *Elsevier*. 2008, cap.11, p.334-350.
94. Wilson, D. J.; Gonzalez, R. N.; Das, H. H. **Bovine mastitis pathogens in New York and Pennsylvania: Prevalence and effects on somatic cells count and milk production.** *J. Dairy Scie.*, v.80, p.2592-2598, 1997.

ANEXO 1

PROTOCOLO DE EXAME CLÍNICO PARA EXPERIMENTO VACCINIA

1-INSPEÇÃO À DISTÂNCIA

	Ativo (que está fazendo?)
COMPORTAMENTO	
	Inativo (como está?)
	Normal
Estação	
	Alterado (como?)
POSTURA	
	Qual?
Decúbito	
	Alterado (como?)

2-PARÂMETROS

Frequência Respiratória
Temperatura
Frequência de rume
Frequência cardíaca

3-EXAME DE MUCOSAS (coloração (qual?), integridade (íntegra/alterada→como?) e umidade (úmida/seca/fluxo))

Direita
Oculares
Esquerda
Esclerótica e Vasos episclerais (aspecto)

Direita

Nasais

(frequência respiratória e temperatura do ar expirado)

Esquerda

Oral

Tempo de reperfusão capilar (imediato ou aumentado)

Vulvo-vaginal

4-EXAME DE LINFONODOS (tamanho, mobilidade, temperatura, sensibilidade, consistência e superfície)

Parotídeos

Retrofaringeanos

Submandibulares

Normais/alterados→qual(is) parâmetros

Cervicais superficiais

Subilíacos (atenção especial)

Retromamários (atenção especial)

5-EXAME DE PELE E ANEXOS

Inspeção geral (aspecto de pelo e pele)

Inspeção direta/indireta (lupa)→descrição detalhada dos achados por região dermatológica (atenção especial no úbere e tetas)

Palpação direta→Temperatura, sensibilidade, espessura e elasticidade por região dermatológica (atenção especial no úbere e tetas)

6-DEMAIS SISTEMAS

Exame de todas as funções vitais manifestadas

Exame de urina (físico macro e química seca →tira)

Exame de fezes (forma, quantidade, cor, odor, consistência, partículas e corpos estranhos)

Apetite / Sede

ANEXO 2

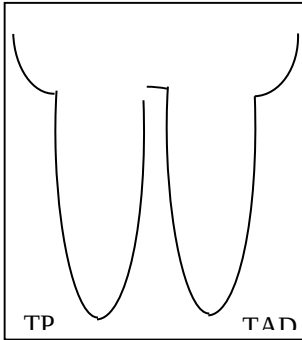
MAPA DERMATOLÓGICO TETOS/ÚBERE

Animal:

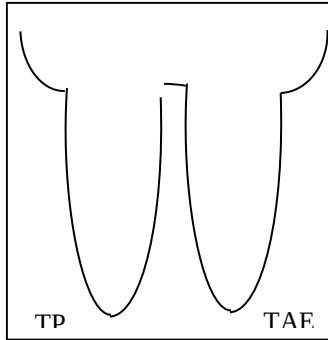
Data:

Responsáveis:

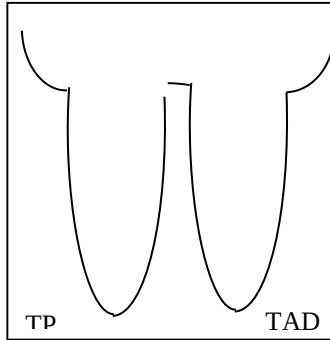
Vista lateral Direita



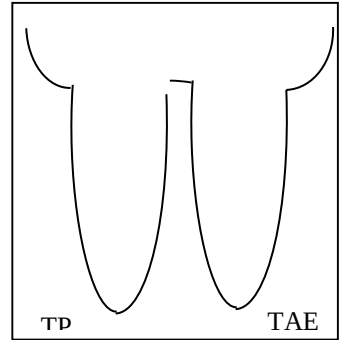
Vista lateral Esquerda



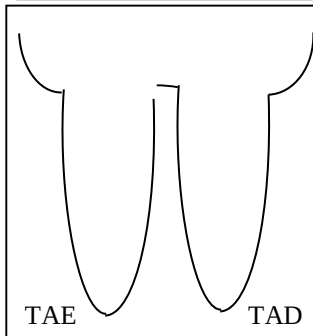
Vista Medial Direita



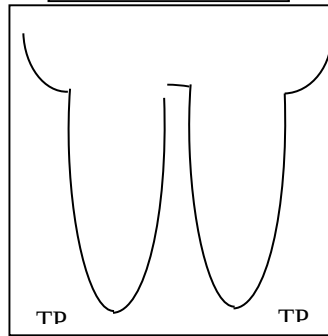
Vista Medial Esquerda



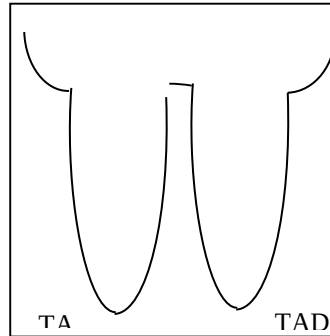
Vista Cranial TA



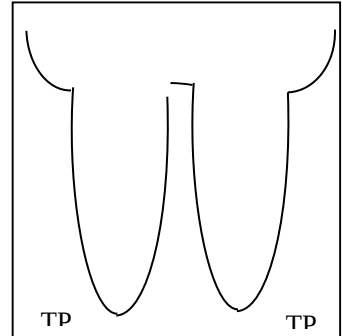
Vista Cranial TP



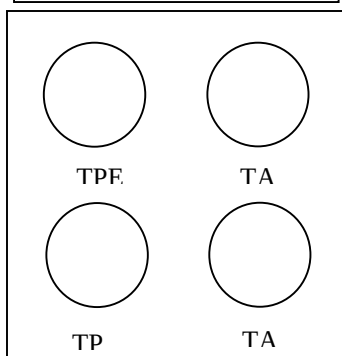
Vista Caudal TA



Vista Caudal TP



Vista Ventral dos tetos



OBSERVAÇÕES:

Nº de lesões: _____

Característica das lesões: ____ vesículas; ____ pápulas; ____ úlceras; ____ crostas; ____ cicatrizadas; ____ outros.

ANEXO 3

Média, desvio padrão e análise estatística da bioquímica sérica por tempo de coleta dos oito animais experimentalmente inoculados com VACV-GP2 (Fase 1- Experimento 3).

Variáveis	T0	T1	T8	T15	T22	T29
GLIC*	50,00 ^{AB} ± 9,04	51,75 ^{AB} ± 7,72	45,00 ^B ± 5,98	43,25 ^B ± 5,04	56,75 ^A ± 8,38	56,13 ^A ± 4,67
URÉIA	45,75 ^{AB} ± 3,24	45,38 ^{AB} ± 1,19	46,88 ^{AB} ± 2,42	46,50 ^B ± 2,56	49,88 ^A ± 7,83	49,50 ^{AB} ± 3,42
CREAT*	0,89 ^A ± 0,21	0,74 ^A ± 0,05	0,79 ^A ± 0,19	0,68 ^A ± 0,24	0,64 ^A ± 0,34	0,81 ^A ± 0,27
ALB*	2,70 ^A ± 0,22	2,75 ^A ± 0,29	2,63 ^A ± 0,19	2,56 ^A ± 0,54	2,39 ^A ± 0,80	2,60 ^A ± 0,42
GLOB*	5,43 ^B ± 0,48	5,40 ^B ± 0,75	5,70 ^B ± 0,53	5,23 ^B ± 0,96	6,84 ^A ± 1,04	5,58 ^B ± 0,58
PT*	8,13 ^{AB} ± 0,64	8,15 ^B ± 0,91	8,33 ^B ± 0,59	7,79 ^B ± 1,32	9,23 ^A ± 0,89	8,18 ^B ± 0,73
BT*	0,18 ^A ± 0,04	0,15 ^A ± 0,05	0,15 ^A ± 0,03	0,16 ^A ± 0,06	0,16 ^A ± 0,03	0,17 ^A ± 0,04
FA*	62,13 ^A ± 46,82	56,75 ^A ± 40,81	51,20 ^A ± 49,58	46,50 ^A ± 50,50	35,38 ^A ± 20,09	63,50 ^A ± 64,83
AST	136,00 ^A ± 35,19	113,13 ^{AC} ± 45,28	54,63 ^{BC} ± 18,35	58,00 ^{BC} ± 13,94	53,38 ^{BC} ± 18,96	49,50 ^B ± 14,78
GGT	22,38 ^A ± 7,33	22,25 ^A ± 6,96	21,75 ^A ± 3,37	16,88 ^A ± 4,67	12,88 ^A ± 8,61	12,88 ^A ± 7,72
ALT	40,13 ^{AB} ± 4,73	42,38 ^A ± 6,23	38,38 ^{AB} ± 3,89	36,50 ^B ± 2,78	37,38 ^{AB} ± 2,97	36,00 ^B ± 2,27
COL*	90,88 ^A ± 23,47	89,25 ^A ± 28,49	78,50 ^A ± 25,55	80,00 ^A ± 28,98	85,88 ^A ± 23,11	81,38 ^A ± 23,29
Ca*	9,46 ^A ± 0,49	9,15 ^A ± 0,91	9,09 ^A ± 0,88	7,99 ^A ± 1,78	8,60 ^A ± 0,95	8,99 ^A ± 0,87
P*	7,55 ^A ± 1,13	7,55 ^A ± 0,99	7,98 ^A ± 1,23	7,49 ^A ± 0,89	5,81 ^B ± 1,69	7,06 ^A ± 0,82

*GLIC = glicose; CREAT = creatinina; ALB = albumina; GLOB = globulina; PT = Proteína Total; BT = Bilirrubina Total; COL = colesterol; Ca = Cálcio e P = Fósforo. Letras diferentes na mesma linha representam significância estatística para p<0,05 para os testes de Kruskal-Wallis e Newman Keuls. Valores de referência segundo Meyer e colaboradores (1995).

ANEXO 4

Média, desvio padrão e análise estatística do hemograma por tempo de coleta dos oito animais experimentalmente inoculados com VACV-GP2 (Fase 1- experimento 3).

Variáveis	T0	T1	T4	T8	T11	T15	T18	T22	T25	T29
HEM*	7,10 ^A ± 1,01	5,97 ^A ± 0,88	6,25 ^A ± 1,03	6,26 ^A ± 0,80	6,83 ^A ± 1,17	6,49 ^A ± 1,34	6,86 ^A ± 1,49	6,73 ^A ± 1,31	6,43 ^A ± 1,06	6,55 ^A ± 1,24
HB*	10,52 ^A ± 1,38	8,23 ^A ± 2,22	8,81 ^A ± 1,34	9,41 ^A ± 1,27	9,58 ^A ± 1,57	9,21 ^A ± 1,63	9,46 ^A ± 1,74	9,35 ^A ± 1,59	9,21 ^A ± 1,25	9,03 ^A ± 1,46
VG*	27,52 ^A ± 2,95	27,75 ^A ± 4,06	27,25 ^A ± 3,92	28,63 ^A ± 4,14	28,25 ^A ± 3,85	26,88 ^A ± 3,81	27,88 ^A ± 4,16	27,63 ^A ± 3,42	28,13 ^A ± 2,64	27,25 ^A ± 3,15
VCM*	39,12 ^A ± 4,45	46,45 ^A ± 0,22	43,92 ^A ± 3,74	45,72 ^A ± 3,28	41,92 ^A ± 5,22	40,65 ^A ± 6,20	41,40 ^A ± 4,32	41,80 ^A ± 5,00	44,30 ^A ± 4,52	41,81 ^A ± 3,85
CHCM*	38,18 ^A ± 2,16	29,10 ^C ± 4,80	32,31 ^B ± 0,79	32,94 ^B ± 0,86	33,78 ^B ± 1,55	35,75 ^B ± 3,65	33,79 ^B ± 1,53	33,69 ^B ± 2,11	32,64 ^B ± 1,61	33,28 ^B ± 1,54
HCM*	14,89 ^A ± 1,43	13,52 ^A ± 2,22	14,19 ^A ± 1,28	15,04 ^A ± 0,85	14,16 ^A ± 1,92	14,37 ^A ± 1,32	13,95 ^A ± 1,11	14,00 ^A ± 1,00	14,41 ^A ± 1,01	13,88 ^A ± 0,87
PLT*	305,00 ^C ± 92,81	448,25 ^{BC} ± ± 139,03	759,25 ^A ± 193,45	764,50 ^A ± 206,75	742,50 ^A ± 119,73	539,50 ^B ± 152,78	515,00 ^B ± 185,57	466,38 ^{BC} ± ± 138,07	576,13 ^{AB} ± ± 114,87	407,75 ^{BC} ± ± 93,86
PPT*	7,92 ^A ± 0,51	7,98 ^A ± 0,63	7,75 ^A ± 0,49	7,80 ^A ± 0,48	7,98 ^A ± 0,53	7,60 ^A ± 0,60	7,70 ^A ± 0,43	7,85 ^A ± 0,50	7,75 ^A ± 0,45	7,60 ^A ± 0,43
FBG*	437,50 ^A ± 226,38	375,00 ^A ± ± 166,90	525,00 ^A ± 148,80	450,00 ^A ± 119,52	675,00 ^A ± 148,80	387,50 ^A ± 172,69	475,00 ^A ± 148,80	325,00 ^A ± 148,80	400,00 ^A ± 151,19	
LT*	14750 ^A ± 3032,21	9483,75 ^A ± ± 2267,31	12587,5 ^A ± ± 4317,22	14331,25 ^A ± ± 3194,30	18212,5 ^A ± ± 12185,05	13937,5 ^A ± ± 2011,35	14962,5 ^A ± ± 4964,43	12492,5 ^A ± ± 3637,75	12522,5 ^A ± ± 3583,30	12285 ^A ± 2595,73
LINF*	7457,25 ^{AB} ± ± 1113,14	5079 ^B ± 1396,40	4914,25 ^B ± ± 2162,31	7689,88 ^{AB} ± ± 2130,74	9758,88 ^A ± ± 3082,17	6771,75 ^{AB} ± ± 2193,20	7759,25 ^{AB} ± ± 3889,30	8171,38 ^{AB} ± ± 2806,74	8240,63 ^{AB} ± ± 2301,10	7152,38 ^{AB} ± ± 2256,10
NEUT. SEG.*	5393,38 ^{AB} ± ± 3275,80	3244,5 ^{AB} ± ± 1855,80	5626,13 ^{AB} ± ± 2892,85	4741,75 ^{AB} ± ± 1273,79	6307,25 ^{AB} ± ± 9078,56	5811,5 ^A ± 1606,16	4471,13 ^{AB} ± ± 1508,50	2463,13 ^B ± ± 1148,86	2472 ^B ± 1317,33	3638,63 ^{AB} ± ± 924,63
NEUT. BAS*	147,13 ^A ± 241,52	136,13 ^A ± ± 385,02	217,13 ^A ± 271,30	13,13 ^A ± 37,12	0 ^A	0 ^A	31,38 ^A ± 59,02	0 ^A	0 ^A	9,25 ^A ± 26,16
EOSIN*	1291,88 ^A ± ± 782,07	736,13 ^A ± ± 627,58	1276,13 ^A ± ± 651,15	1440,75 ^A ± 1290,64	1528,63 ^A ± ± 1021,30	960,625 ^A ± ± 742,91	2097,25 ^A ± ± 1804,55	1379,38 ^A ± ± 762,91	1375,63 ^A ± ± 597,78	885,75 ^A ± 204,23
MONOC*	415,75 ^A ± 423,12	241,75 ^A ± ± 228,63	412,63 ^A ± 364,30	337,13 ^A ± 262,76	565,88 ^A ± 340,12	290,125 ^A ± ± 236,28	469 ^A ± 354,48	313,88 ^A ± 212,36	303,25 ^A ± 190,66	523,38 ^A ± 148,87
BASOF*	0 ^A	34,75 ^A ± 48,02	136,13 ^A ± 99,45	109 ^A ± 100,31	51,88 ^A ± 108,53	103,5 ^A ± 120,94	134,5 ^A ± 172,25	161,13 ^A ± 121,74	131,13 ^A ± 122,24	75,75 ^A ± 105,05
MIEL*	0 ^A	6,25 ^A ± 17,68	0 ^A	0 ^A	0 ^A	0 ^A	0 ^A	0 ^A	0 ^A	0 ^A
METAMIEL*	0 ^A	6,25 ^A ± 17,68	5,13 ^A ± 14,50	0 ^A	0 ^A	0 ^A	0 ^A	0 ^A	0 ^A	0 ^A

*HEM = hemácias; HB = hemoglobina; PLT = plaquetas; LT = Leucócitos Totais; LIN = Linfócitos; NEUT.SEG. = Neutrófilos segmentados; NEUT. BAS = Neutrófilos bastonetes; EOSIN = Eosinófilos; BASOF = Basófilos; MIEL = Mielócitos; METAMIEL = Metamielócitos. Letras diferentes na mesma linha representam significância estatística para p<0,05 para os testes de kruskal-Wallis e Newman Keuls. Os zeros representam resultados e o espaço em branco na coluna T29 indica perda da variável FBG neste tempo. Valores de referência segundo Jain (1993).

ANEXO 5

Média, desvio padrão e análise estatística da bioquímica sérica por tempo de coleta dos quatro animais imunodeprimidos com dexametasona. (Fase 2 – experimento 3).

Variáveis	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T9
GLICOSE	45,00 ^B ± 4,24	99,75 ^A ± 5,73	98,50 ^A ± 13,33	93,75 ^A ± 7,93	105,25 ^A ± 34,06	75,00 ^A ± 12,20	78,75 ^A ± 32,51	42,25 ^B ± 3,20	48,00 ^B ± 11,60
UREIA	46,50 ^A ± 2,38	47,25 ^A ± 2,63	47,00 ^A ± 2,16	49,00 ^A ± 2,58	49,00 ^A ± 1,15	53,00 ^A ± 5,29	56,50 ^A ± 6,61	54,00 ^A ± 3,37	48,00 ^A ± 2,83
CREAT*	0,73 ^A ± 0,13	0,73 ^A ± 0,05	0,80 ^A ± 0,08	0,88 ^A ± 0,15	1,00 ^A ± 0,08	0,88 ^A ± 0,13	0,75 ^A ± 0,24	0,93 ^A ± 0,10	0,63 ^A ± 0,05
ALB*	2,63 ^A ± 0,13	2,88 ^A ± 0,38	3,13 ^A ± 0,53	2,90 ^A ± 0,34	2,88 ^A ± 0,30	2,80 ^A ± 0,29	2,80 ^A ± 0,24	2,70 ^A ± 0,14	2,73 ^A ± 0,21
GLOB*	5,65 ^A ± 0,45	5,40 ^A ± 0,87	5,18 ^A ± 1,23	5,18 ^A ± 1,02	5,25 ^A ± 0,85	4,73 ^A ± 0,50	4,15 ^A ± 0,25	4,43 ^A ± 0,40	4,35 ^A ± 0,25
PT*	8,23 ^A ± 0,51	8,28 ^A ± 0,94	8,30 ^A ± 0,97	8,08 ^A ± 1,05	8,13 ^A ± 0,92	7,48 ^A ± 0,67	6,95 ^A ± 0,44	7,13 ^A ± 0,44	7,03 ^A ± 0,34
BT*	0,37 ^A ± 0,06	0,37 ^A ± 0,10	0,37 ^A ± 0,13	0,61 ^A ± 0,09	0,67 ^A ± 0,06	0,52 ^A ± 0,05	0,98 ^A ± 0,43	0,56 ^A ± 0,07	0,59 ^A ± 0,18
FA*	119,00 ^A ± 140,04	126,75 ^A ± 143,55	136,75 ^A ± 148,40	158,50 ^A ± 146,51	185,00 ^A ± 137,40	200,75 ^A ± 146,41	187,75 ^A ± 68,34	162,25 ^A ± 82,72	128,75 ^A ± 85,74
AST	69,75 ^B ± 10,21	77,00 ^B ± 12,25	78,25 ^B ± 10,80	94,25 ^B ± 20,34	94,75 ^B ± 29,86	99,50 ^B ± 27,87	109,25 ^B ± 32,44	163,75 ^A ± 41,22	145,50 ^A ± 28,60
GGT	17,50 ^B ± 3,70	23,25 ^B ± 5,00	22,25 ^B ± 7,68	30,75 ^B ± 4,35	39,00 ^{AB} ± 16,33	49,25 ^{AB} ± 35,95	62,25 ^A ± 47,01	61,50 ^A ± 39,28	61,75 ^A ± 44,71
ALT	33,50 ^{ABC} ± 4,80	33,75 ^{AB} ± 4,35 ^C	35,75 ^{AB} ± 5,44	37,00 ^A ± 2,64	36,00 ^{AB} ± 4,24	34,50 ^{AB} ± 5,58 ^C	32,00 ^{AB} ± 6,48 ^C	24,75 ^{BC} ± 4,80	21,00 ^C ± 5,00
COL*	73,00 ^A ± 10,70	73,25 ^A ± 13,15	78,50 ^A ± 16,09	86,25 ^A ± 12,50	87,50 ^A ± 10,34	73,75 ^A ± 14,80	77,50 ^A ± 14,20	71,50 ^A ± 10,41	65,25 ^A ± 14,77
Ca*	9,00 ^{ABC} ± 0,65	9,60 ^A ± 1,09	9,35 ^{AB} ± 1,11	8,75 ^{ABC} ± 0,40	8,38 ^{ABC} ± 0,26	8,28 ^{ABC} ± 0,15	7,50 ^{BC} ± 0,37	7,55 ^{AC} ± 0,60	7,28 ^C ± 1,06
P*	6,40 ^{ABC} ± 0,94	4,38 ^{CD} ± 1,01	3,98 ^D ± 1,08	5,58 ^{BCD} ± 0,67	6,03 ^{ABC} ± 0,87 ^D	6,33 ^{ABC} ± 1,14	7,13 ^A ± 0,94	6,78 ^{AB} ± 1,36	7,38 ^A ± 1,18

*CREAT = creatinina; ALB = albumina; GLOB = globulina; PT = Proteína Total; BT = Bilirrubina Total; COL = colesterol; Ca = Cálcio e P = Fósforo. Letras diferentes na mesma linha representam significância estatística para p<0,05 para os testes de Kruskal-Wallis e Newman Keuls. Valores de referência segundo Meyer e colaboradores (1995).

ANEXO 6

Média, desvio padrão e análise estatística do hemograma por tempo de coleta dos quatro animais imunodeprimidos com dexametasona (Fase 2 – Experimento 3).

Variáveis	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T9	T12
HEM*	5,74 ^A ± 1,12	5,55 ^A ± 1,00	5,59 ^A ± 0,77	5,60 ^A ± 0,76	5,65 ^A ± 0,83	5,04 ^A ± 1,00	5,10 ^A ± 1,10	5,30 ^A ± 1,41	5,25 ^A ± 1,39	5,59 ^A ± 0,94
HB*	8,45 ^A ± 1,47	8,25 ^A ± 1,00	8,43 ^A ± 0,79	8,50 ^A ± 0,89	8,05 ^A ± 1,23	8,15 ^A ± 1,46	8,08 ^A ± 1,40	8,23 ^A ± 1,82	8,00 ^A ± 1,87	8,03 ^A ± 1,48
VG*	26,25 ^A ± 2,50	26,75 ^A ± 2,22	27,50 ^A ± 2,08	28,50 ^A ± 3,11	28,25 ^A ± 3,59	26,50 ^A ± 3,79	26,75 ^A ± 2,50	26,50 ^A ± 3,32	26,75 ^A ± 3,86	29,00 ^A ± 4,08
VCM*	46,68 ^A ± 6,46	49,15 ^A ± 7,37	49,76 ^A ± 5,63	51,21 ^A ± 4,69	50,19 ^A ± 2,92	53,17 ^A ± 4,50	53,79 ^A ± 8,27	52,25 ^A ± 11,56	52,73 ^A ± 9,01	52,13 ^A ± 1,86
CHCM*	32,02 ^A ± 2,75	30,80 ^A ± 2,10	30,66 ^A ± 2,21	29,95 ^A ± 2,78	28,53 ^A ± 1,93	30,62 ^A ± 1,38	30,00 ^A ± 2,71	30,77 ^A ± 4,15	29,57 ^A ± 3,37	27,53 ^A ± 1,72
HCM*	14,85 ^A ± 1,36	15,02 ^A ± 1,26	15,17 ^A ± 0,97	15,26 ^A ± 0,90	14,25 ^A ± 1,28	16,25 ^A ± 1,10	15,98 ^A ± 1,13	15,72 ^A ± 1,08	15,37 ^A ± 0,91	14,33 ^A ± 0,59
PLT*	341,00 ^A ± 174,36	311,00 ^A ± 95,70	334,50 ^A ± 146,64	293,25 ^A ± 98,01	428,75 ^A ± 65,40	410,25 ^A ± 72,55	291,50 ^A ± 96,86	277,50 ^A ± 138,65	279,25 ^A ± 130,50	269,50 ^A ± 116,33
LT*	10847,50 ^{CD} ± 3026,50	25475,00 ^A ± 7641,30	26200,00 ^A ± 6597,47	21900,00 ^A ± 5930,71	17650,00 ^B ± 5992,50	14225,00 ^{BC} ± 3765,97	5487,50 ^E ± 2361,15	4807,50 ^E ± 1333,98	4330,00 ^E ± 1468,58	7497,50 ^{DE} ± 2397,00
LINF*	7108,25 ^A ± 3173,65	5576,75 ^B ± 2330,63	3704,25 ^B ± 1675,70	2440,50 ^B ± 536,46	2522,25 ^B ± 1064,24	2372 ^B ± 1151,845	1746 ^B ± 1035,62	2369,00 ^B ± 846,47	2656,50 ^B ± 1056,60	4627,25 ^B ± 1377,93
NEUT. SEG.*	2611,00 ^B ± 665,93	18094,50 ^A ± 7354,60	21532,00 ^A ± 6333,32	18385,25 ^A ± 5172,02	14473,00 ^{AB} ± 5001,80	10955,25 ^{AB} ± 3338,20	3292,50 ^B ± 1135,58	2237,50 ^B ± 721,20	1334,75 ^B ± 633,70	2114,75 ^B ± 908,02
NEUT. BAS*	0 ^A	629,50 ^A ± 196,80	50,50 ^A ± 101,00	68,75 ^A ± 137,50	0 ^A	0 ^A	7,00 ^A ± 14,00	0 ^A	46,00 ^A ± 53,62	88,00 ^A ± 116,60
EOSIN*	920,75 ^A ± 504,89	70,25 ^B ± 140,50	0 ^B	0 ^B	0 ^B	0 ^B	62,00 ^B ± 62,33	42,50 ^B ± 36,20	25,25 ^B ± 50,5	160,75 ^B ± 247,61
MONOC*	210,00 ^{CD} ± 167,27	1054,25 ^A ± 559,65	712,25 ^{ABC} ± 532,93	1005,5 ^{AB} ± 728,99	654,75 ^{ABCD} ± 431,92	445,5 ^{BCD} ± 481,3	360,00 ^{CD} ± 207,06	82,50 ^D ± 41,83	242,00 ^{CD} ± 138,51	472,75 ^{ABCD} ± 133,34
BASOF*	0 ^A	0 ^A	0 ^A	0 ^A	0 ^A	0 ^A	17,75 ^A ± 35,50	78,00 ^A ± 133,09	12,75 ^A ± 25,50	14,50 ^A ± 29,00
MIEL*	0 ^A	0 ^A	0 ^A	0 ^A	0 ^A	0 ^A	0 ^A	0 ^A	0 ^A	0 ^A
METAMIEL*	0 ^A	0 ^A	0 ^A	0 ^A	0 ^A	0 ^A	0 ^A	0 ^A	0 ^A	0 ^A

*HEM = hemácias; HB = hemoglobina; PLT = plaquetas; LT = Leucócitos Totais; LIN = Linfócitos; NEUT.SEG. = Neutrófilos segmentados; NEUT. BAS = Neutrófilos bastonetes; EOSIN = Eosinófilos; BASOF = Basófilos; MIEL = Mielócitos; METAMIEL = Metamielócitos. Letras diferentes na mesma linha representam significância estatística para p<0,05 para os testes de kruskal-Wallis e Newman Keuls. Os zeros representam resultados. Valores de referência segundo Jain (1993).

ANEXO 7

Média, desvio padrão e análise estatística da bioquímica sérica por tempo de coleta dos cinco animais reinfetados experimentalmente com VACV-GP2. (Fase 2 – experimento 3).

Variáveis	T0	T4	T8	T14
GLICOSE	49,40 ^A ± 9,55	49,00 ^A ± 7,71	47,40 ^A ± 6,10	44,20 ^A ± 5,59
UREIA	46,00 ^A ± 1,41	48,80 ^A ± 5,26	51,60 ^A ± 6,54	50,40 ^A ± 3,29
CREAT*	0,74 ^A ± 0,15	0,84 ^A ± 0,38	0,76 ^A ± 0,15	0,72 ^A ± 0,28
ALB*	2,88 ^A ± 0,25	3,04 ^A ± 0,45	3,04 ^A ± 0,15	3,08 ^A ± 0,11
GLOB*	4,98 ^A ± 0,22	4,56 ^A ± 0,75	5,08 ^A ± 0,50	5,38 ^A ± 0,30
PT*	7,86 ^{BC} ± 0,40	7,60 ^C ± 0,57	8,12 ^{AB} ± 0,63	8,46 ^A ± 0,32
BT*	0,45 ^{AB} ± 0,12	0,35 ^B ± 0,17	0,39 ^B ± 0,18	0,86 ^A ± 0,08
FA*	69,40 ^A ± 20,90	69,40 ^A ± 16,65	75,20 ^A ± 19,48	79,20 ^A ± 24,52
AST	68,00 ^A ± 7,78	72,00 ^A ± 8,91	77,00 ^A ± 8,60	86,00 ^A ± 13,12
GGT	15,40 ^B ± 1,82	20,80 ^{AB} ± 6,57	24,80 ^A ± 4,03	22,60 ^A ± 8,20
ALT	40,40 ^A ± 4,72	37,80 ^A ± 4,44	40,80 ^A ± 3,50	40,00 ^A ± 5,61
COL*	80,6 ^A ± 11,84	80,80 ^A ± 9,50	85,20 ^A ± 1,79	84,40 ^A ± 4,50
Ca	9,38 ^A ± 0,64	8,66 ^A ± 0,44	8,98 ^A ± 0,87	9,28 ^A ± 0,63
P	6,80 ^A ± 0,54	6,44 ^A ± 0,69	7,42 ^A ± 0,29	6,96 ^A ± 0,38

*CREAT = creatinina; ALB = albumina; GLOB = globulina; PT = Proteína Total; BT = Bilirrubina Total; COL = colesterol; Ca = Cálcio e P = Fósforo. Letras diferentes na mesma linha representam significância estatística para $p < 0,05$ para os testes de Kruskal-Wallis e Newman Keuls. Valores de referência segundo Meyer e colaboradores (1995).

ANEXO 8

Média, desvio padrão e análise estatística do hemograma por tempo de coleta dos cinco animais reinfetados experimentalmente com VACV – GP2. (Fase 2 – experimento 3).

Variáveis	T0	T4	T8	T14
HEM*	7,04 ^A ± 0,62	6,84 ^A ± 0,79	6,84 ^A ± 0,36	6,59 ^A ± 0,91
HB *	10,02 ^A ± 0,78	9,66 ^A ± 0,60	9,54 ^A ± 0,61	9,68 ^A ± 0,71
VG*	28,40 ^A ± 1,52	28,40 ^A ± 1,34	27,32 ^A ± 1,19	27,00 ^A ± 0,71
VCM *	40,45 ^A ± 1,98	41,87 ^A ± 4,05	40,02 ^A ± 2,74	41,54 ^A ± 5,31
CHCM *	35,25 ^A ± 0,95	34,01 ^A ± 1,27	34,95 ^A ± 2,43	35,84 ^A ± 2,18
HCM *	14,26 ^A ± 0,80	14,23 ^A ± 1,30	14,00 ^A ± 1,48	14,82 ^A ± 1,35
PLT*	335,80 ^A ± 97,35	311,40 ^A ± 96,04	273,60 ^A ± 58,05	300,60 ^A ± 89,20
LT*	11886,00 ^A ± 3234,60	11102,00 ^A ± 2314,80	11032,00 ^A ± 1900,83	11770,00 ^A ± 1893,94
LINF*	5989,60 ^A ± 1831,36	5711,00 ^A ± 2899,16	6549,60 ^A ± 1253,22	7234,20 ^A ± 2112,94
NEUT. SEGM*	4803,80 ^A ± 1293,17	3816,40 ^{AB} ± 766,38	2645,60 ^B ± 889,6	3451,40 ^{AB} ± 803,92
NEUT. BAST*	58,20 ^A ± 82,75	0 ^A	34,20 ^A ± 76,47	68,00 ^A ± 64,35
EOSIN*	937,60 ^A ± 436,27	889,00 ^A ± 427,105	1149,20 ^A ± 609,27	935,40 ^A ± 152,08
MONOC*	96,80 ^A ± 90,50	269,00 ^A ± 133,00	608,60 ^A ± 248,01	54,60 ^A ± 74,83
BASOF*	0 ^A	0 ^A	26,40 ^A ± 59,03	26,40 ^A ± 59,03
MIELOC*	0 ^A	0 ^A	0 ^A	0 ^A
METAMIEL*	0 ^A	0 ^A	0 ^A	0 ^A

*HEM = hemácias; HB = hemoglobina; PLT = plaquetas; LT = Leucócitos Totais; LIN = Linfócitos; NEUT.SEG. = Neutrófilos segmentados; NEUT. BAS = Neutrófilos bastonetes; EOSIN = Eosinófilos; BASOF = Basófilos; MIEL = Mielócitos; METAMIEL = Metamielócitos. Letras diferentes na mesma linha representam significância estatística para p<0,05 para os testes de kruskal-Wallis e Newman Keuls. Os zeros representam resultados. Valores de referência segundo Jain (1993).