

Marieta Cristina Madureira

VACCÍNIA BOVINA NO ESTADO DE MINAS GERAIS, 2005 - 2007

Tese apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Medicina Veterinária.

Área de concentração: Epidemiologia

Orientadora: Profa. Dra. Zélia Inês Portela Lobato
Co-Orientadora: Profa. Dra. Giliane de Souza Trindade
Co-Orientador: Prof. Dr. João Paulo Amaral Haddad

Colaboradores:

Profa. Dra. Erna Geessien Kroon
Instituto de Ciências Biológicas da UFMG: Profa. do Departamento Microbiologia – Laboratório de Vírus

Belo Horizonte
Escola de Veterinária da UFMG
2009

M183v Madureira, Marieta Cristina, 1965–

Vaccínia bovina no estado de Minas Gerais, 2005-2007 / Marieta Cristina Madureira. – 2009.

102 p. : il.

Orientadora: Zélia Inês Portela Lobato

Co-orientadora: Giliane de Souza Trindade

Co-orientador: João Paulo Amaral Haddad

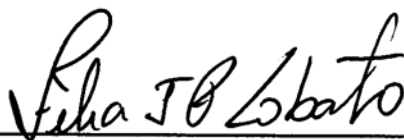
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola De Veterinária

Inclui bibliografia

1. Bovino de leite – Doenças – Teses. 2. Vaccínia – Teses.
3. Epidemiologia – Teses. I. Lobato, Zélia Inês Portela. II. Trindade, Giliane de Souza. III. Haddad, João Paulo Amaral. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. V. Título.

CDD – 636.214 089 69

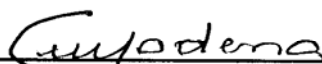
Tese defendida e aprovada em 30 de março de 2009, pela Comissão Examinadora constituída por:



Profa. Zélia Inês Portela Lobato
Orientadora



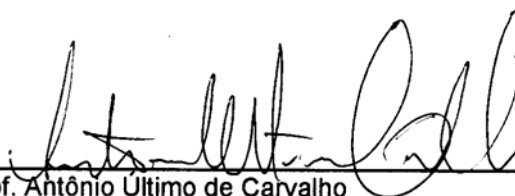
Prof. Vitor Salvador Picão Gonçalves



Profa. Celina Maria Modena



Prof. Francisco Carlos Faria Lobato



Prof. Antônio Último de Carvalho

Dedico este trabalho à minha filha Mariana,
à minha mãe Flora (*in memorian*).

AGRADECIMENTOS

À professora Zélia Inês Portela Lobato, minha orientadora, por ter me recebido e orientado para dar respostas àquelas primeiras perguntas sobre esta doença no campo, em 1999 em Muriaé, quando tudo começou. Hoje, tenho outras perguntas e, com certeza, vou fazer muitas outras porque aprendi, descobri, errei, repensei, refiz, acertei e cresci com tudo isto, especialmente com sua participação. Obrigada pela confiança depositada em mim, pela orientação e pelos ensinamentos.

À minha co-orientadora Giliane de Souza Trindade, pelas orientações e pelas sugestões apresentadas, pela presteza apresentada sempre que solicitada a sua ajuda. Aprendemos muito sobre a doença nas visitas que fizemos juntas a algumas propriedades.

Ao meu co-orientador João Paulo A. Haddad pelas orientações e contribuições no delineamento deste estudo, sobretudo na análise estatística dos resultados.

À professora Erna G. Kroon pela colaboração e pela parceria na realização de trabalhos científicos sobre a varíola bovina.

Ao professor Vitor Salvador P. Gonçalves pelas sugestões para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Instituto Mineiro de Agropecuária-IMA, na pessoa de Dr. Altino Rodrigues Neto, pela oportunidade, por valorizar o meu trabalho, pela confiança depositada em mim. Especialmente, obrigada pela ajuda e apoio diante dos muitos desafios que surgiram nesta caminhada.

Ao Sergio Luiz Lima Monteiro, um grande companheiro de trabalho, pela amizade, compreensão e constante apoio no dia a dia deste desafio. Muitas foram as dificuldades que me ajudou a superar.

Aos colegas de trabalho, companheiros de sala e de maior convívio, Gilberto, Valéria, Graciene, Therezinha, Cristina e Ronaldo pela amizade e apoio no decorrer deste curso. Aos colegas de sala mais recentes, Bruno, Vera e muitos outros, pela ajuda e companheirismo.

Aos Coordenadores Regionais, Sérgio B. Gomide, Orozimbo A. Pereira, Silvana M.C. Fonseca, Rogério Maia Vilela, pelo apoio e ajuda, em nível local, na viabilização dos trabalhos de visita às propriedades rurais. Também aos colegas de trabalho que me ajudaram na coleta de amostras nas propriedades: Geraldo, Lucivaldo, Ana Luiza, Antônio José.

Especialmente, aos colegas José Geraldo e Deobaldino, pela constante ajuda nos trabalhos de campo, pelo companheirismo e pela amizade que fomos construindo ao longo desta pesquisa. A minha conquista tem grande participação de vocês. Temos muitas histórias em comum, muitos casos engraçados inclusive.

Aos produtores rurais que participaram desta pesquisa, por me receberem tão bem em suas propriedades, com lanches com pãozinho de queijo, rosquinhas e os biscoitos de polvilho. Aprendi muito com a simplicidade e com a sabedoria de vocês. Obrigada pela confiança depositada em mim e pela enorme contribuição para a conquista destes resultados científicos. A contribuição que me deram é também para muitos outros produtores, criadores de bovinos deste estado e de muitos outros lugares por aí afora. E para tantas outras pessoas, assim espero.

À veterinária Dra. Michele Gomes, da Vigilância Epidemiológica e Zoonoses da prefeitura de Mariana, pelos contatos com muitos produtores rurais e pelo apoio na realização dos trabalhos na região de Águas Claras- Mariana, local onde ocorreram muitos casos de varíola bovina.

Aos colegas de curso e colegas de laboratório, pelo convívio e solidariedade naqueles momentos mais difíceis, pelas sugestões e ajuda, sobretudo, por ouvirem muitos desabafos: “as células morreram, o vírus sumiu, o título caiu, contaminou, vou refazer tudo... “. Muitos foram também os momentos bons que passamos juntos, que comemoramos resultados desejados e esperados, individuais ou coletivos. Em muitas situações, nosso calendário foi decisivo para a superação do stress (abafa o caso).

Ao funcionário Eduardo pela constante ajuda prestada e boa vontade demonstrada. A funcionária Doracy pela ajuda com as células e os meios de cultura. A funcionária Graziele pela paciência e cooperação demonstrada no dia a dia. Sua ajuda foi valiosa para a conquista dos resultados no laboratório e imprescindível para a realização dos retestes.

À toda a minha família, pai e irmão, com destaque para “as meninas”, irmãs de minha mãe, pelo apoio naqueles momentos de grande dificuldade e dor para mim e todos nós. Eu não sei o que seria de mim sem o carinho e apoio de todos vocês.

À minha filha Mariana, pela companhia, pelo companheirismo, pelo incentivo e pela compreensão diante dos desafios que enfrentamos juntas, durante esta conquista. Muitos foram os seus finais de semana no laboratório comigo. Obrigada pelo seu carinho. Haveremos de vencer muitos outros desafios!

Ao CNPq, pelos recursos disponibilizados para o desenvolvimento deste projeto.

À todas aquelas pessoas que, oportunamente, me apoiaram e ajudaram.

SUMARIO

	Pág.
RESUMO	13
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Família <i>Poxviridae</i> e suas características	15
2.2 Gênero <i>Parapoxvirus</i>	16
2.3 Gênero <i>Orthopoxvirus</i>	17
2.3.1 <i>Vaccinia virus</i> (VACV)	17
2.3.2 <i>Cowpox virus</i>	18
2.4 Distribuição mundial e no Brasil de <i>Vaccinia virus</i> e impactos causados	18
2.5 Patogênese das infecções por <i>poxvirus</i> e resposta imune	22
2.6 Varíola bovina por <i>Cowpox virus</i>	23
2.7 Varíola bovina por <i>Parapoxvirus</i>	23
2.8 Epidemiologia da varíola bovina causada por <i>Vaccinia virus</i>	23
2.9 Estudos do tipo caso-controle e análises estatísticas	26
3 OBJETIVOS	28
3.1. Objetivo geral	28
3.2 Objetivos específicos.....	28
4 MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1 Descrição da área	28
4.2 Delineamento do estudo caso-controle.....	29
4.2.1 Seleção de casos e controles	29
4.2.2 Definição da amostragem nas propriedades	30
4.2.3 Aplicação de questionário de investigação e coleta de dados	30
4.3 Coleta, processamento e acondicionamento das amostras	31
4.3.1 Sangue e soro sanguíneo	32
4.3.2 Epitélio afetado (crostas)	32
4.4 Teste de Soroneutralização-SN	32
4.4.1 Cultivo de células VERO	32
4.4.2 Multiplicação de vírus vaccinia	32
4.4.3 Purificação do vírus vaccinia	33
4.4.4 Titulação viral	33
4.4.5 Teste de Soroneutralização	33
4.5 Isolamento viral e diagnóstico molecular	34
4.6 Armazenamento e análise dos dados	34
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1 Características dos municípios trabalhados	35
5.2 Distribuição dos casos selecionados por meses do ano	36
5.3 Animais existentes e animais amostrados nas propriedades casos e controles selecionadas.....	37
5.4 Amostras coletadas	37
5.5 Perfil dos entrevistados	38
5.6 Estudo de caso-controle e modelo para a doença.....	39
5.6.1 Análises descritiva e univariada	39

5.6.1.1	Características estruturais das propriedades.....	39
5.6.1.2	Características do manejo sanitário.....	42
5.6.1.3	Características da ordenha.....	46
5.6.1.4	A Doença.....	48
5.6.1.5	Ordenhadores.....	60
5.6.1.6	Formas de transmissão da doença.....	68
5.7	Análise de regressão logística univariada para seleção das variáveis a serem trabalhadas no modelo para a doença.....	79
5.8	Análise multivariada.....	79
5.9	Monitoramento da curva de anticorpos neutralizantes nos rebanhos casos...	81
5.10	Pesquisa de anticorpos neutralizantes nos rebanhos controles.....	85
5.11	Descrição da doença nas propriedades estudadas.....	86
6	CONCLUSÕES	89
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	90

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Imagens do <i>Vaccinia virus</i> em microscopia eletrônica convencional em contraste negativo (A), em microscopia cryo-eletrônica (B) e em corte ultrafino (C).....	16
Figura 2	Ocorrência de varíola bovina no Brasil, período de 2000-2009, segundo MAPA.....	20
Figura 3	Ocorrência varíola bovina no Estado de Minas Gerais, por Delegacias Regionais do IMA, de 2001 a 2008.....	21
Figura 4	Localização dos municípios trabalhados no estado de Minas Gerais.....	28
Figura 5	Número de propriedades casos e controles amostradas por município trabalhado, no período de 2005 a 2007.....	30
Figura 6	Distribuição dos casos selecionados por mês de ocorrência, no período 2005-2007.....	36
Figura 7	Distribuição do tipo de piso de curral nos 25 casos e nos 47 controles.....	41
Figura 8	Percentual de curral de ordenha coberto nos 25 casos e nos 47 controles.....	41
Figura 9	Percentual de produtores que utilizavam os produtos para desinfecção do estabelecimento, das mãos e das tetas antes (a) e depois (b) do aparecimento da doença nos 25 casos.....	42
Figura 10	Distribuição da variável desinfecção do estabelecimento, das mãos e das tetas e respectivos valores de p no teste de proporção, em nível de significância 0,05, no momento da visita à propriedade.....	43
Figura 11	Tipos de produtos utilizados para a desinfecção das tetas nos casos e nos controles, no momento da visita à propriedade.....	45
Figura 12	Produção média de leite/dia antes da doença ocorrer nos 25 casos e nos 47 controles.....	46
Figura 13	Distribuição do tipo de ordenha, nos 25 casos e nos 47 controles.....	47
Figura 14	Distribuição das fontes de informação sobre a doença para os 56% dos produtores dos casos que tinham conhecimento prévio da doença.....	49
Figura 15	Localização das lesões nas vacas nas 25 propriedades casos.....	51
Figura 16	Localização das lesões nos bezerros nas 25 propriedades casos.....	52
Figura 17	Lesões típicas de varíola bovina identificadas na cavidade oral de bezerro infectado, município de Serro, ano de 2005.....	52
Figura 18	Lesões típicas de varíola bovina no focinho de bezerro infectado, município de Mariana, ano de 2006.....	53

Figura 19	Lesões típicas de varíola bovina identificadas na gengiva de bezerro infectado, município de Mariana, ano de 2006.	53
Figura 20	Lesões típicas de varíola bovina identificadas na língua de bezerro infectado, município de Sabinópolis, ano de 2007.	53
Figura 21	Lesões típicas de varíola bovina (vesículas) identificadas na teta de vaca infectada, município de Mariana, ano de 2006.	55
Figura 22	Lesões típicas de varíola bovina (vesículas) identificadas na teta de vaca infectada, município de Mariana, ano de 2006.	55
Figura 23	Lesões típicas de varíola bovina (úlceras-crostras) identificadas na teta de vaca infectada, município de Bambuí, ano de 2005.	55
Figura 24	Lesões típicas de varíola bovina (úlceras-crostras) identificadas na teta de vaca infectada, município de Mariana, ano de 2006.	56
Figura 25	Mamite observada em vaca infectada com varíola bovina, município de Paulistas, ano de 2006.	56
Figura 26	Mamite observada em vaca infectada com varíola bovina, município de Sabinópolis, ano de 2007.	57
Figura 27	Mamite observada em vaca infectada com varíola bovina, município de Sabinópolis, ano de 2007.	57
Figura 28	Mamite observada em vaca infectada com varíola bovina, com quadro de necrose do úbere e infecção sistêmica (A e B), no município de São João Evangelista, ano de 2006.	58
Figura 29	Total de litros de leite produzidos antes e após a doença e queda observada na produção nos casos.	59
Figura 30	Lesão causada por varíola bovina, no braço de ordenhador, no município de Paulistas, ano 2006.	62
Figura 31	Lesão causada por varíola bovina, no joelho de ordenhador, no município de Mariana, ano 2006.	62
Figura 32	Lesão causada por varíola bovina, na mão de ordenhador, no município de Serro, ano 2006.	62
Figura 33	Lesão causada por varíola bovina, na mão de ordenhador, no município de Mariana, ano 2006.	63
Figura 34	Distribuição dos tipos de assistência médica procurada pelos ordenhadores doentes nos 25 casos.	66
Figura 35	Percentual de propriedades casos e controles que adquiriram animais nos 30 dias anteriores a visita à propriedade.	69
Figura 36	Distribuição da variável vê muito rato nas propriedades nos casos e controles.	77
Figura 37	Curva de ROC para o Modelo construído.	80
Figura 38	Curva de anticorpos contra <i>Vaccinia virus</i> dos grupos A (sete animais) e B (seis animais), com tendência de queda dos títulos.	82
Figura 39	Curva de anticorpos contra <i>Vaccinia virus</i> do grupo C (cinco animais), com tendência de manutenção dos títulos.	82
Figura 40	Curva de anticorpos contra <i>Vaccinia virus</i> do grupo D (três animais), com tendência de aumento dos títulos.	82
Figura 41	Curvas de anticorpos contra <i>Vaccinia virus</i> apresentadas pelos animais das Fazendas 45, 46, 47, 48 e 49.	84
Figura 42	Lesões típicas de varíola bovina identificadas no úbere de vacas infectadas na fazenda 07, município de Bambuí (A), na fazenda 46, município de Mariana (B), na fazenda 040, município de Paulistas (C) e na fazenda 47, município de Mariana (D).	87
Figura 43	Lesões típicas de varíola bovina identificadas nas mãos de ordenhadores infectados no município de Mariana (A), na fazenda 040; na fazenda 47, município de Mariana (B); na fazenda 46, município de Paulistas (C).	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Subfamília <i>Chordopoxvirinae</i> e seus representantes dos gêneros.	15
Tabela 2	Gênero <i>Orthopoxvirus</i> e suas espécies, com respectivos hospedeiros e distribuição geográfica.....	17
Tabela 3	Número de propriedades casos e número de animais monitorados por categoria, por município trabalhado.	31
Tabela 4	Dados e indicadores relacionados à atividade pecuária dos municípios trabalhados.	35
Tabela 5	Número médio e total de animais existentes por propriedade, nas 72 propriedades estudadas, por categoria animal.	37
Tabela 6	Total de animais amostrados neste estudo, por categoria animal.....	37
Tabela 7	Resultados dos testes laboratoriais para crostas coletadas nos casos, por município.	38
Tabela 8	Função dos entrevistados nas 25 propriedades casos e nas 47 controles.....	38
Tabela 9	Tamanho médio dos rebanhos nos 25 casos e nos 47 controles e número médio de animais por categoria, com respectivos valores de p no teste t, em nível de significância 0,05.	40
Tabela 10	Tipos de produtos utilizados para a desinfecção do estabelecimento nos 25 casos e nos 47 controles, no momento da visita.	44
Tabela 11	Distribuição da variável frequência para desinfecção do estabelecimento, no momento da visita.	44
Tabela 12	Tipos de produtos utilizados para a desinfecção das mãos nos casos e nos controles, no momento da visita à propriedade.	45
Tabela 13	Frequências utilizadas para desinfecção das mãos e tetas nos casos e nos controles, no momento da visita à propriedade.	46
Tabela 14	Distribuição da variável número de ordenhas, nos casos e controles e respectivo valor de p, no teste X^2 , em nível de significância 0,05.	48
Tabela 15	Tempo (dias) decorrido entre o início da doença e a visita nos casos.	48
Tabela 16	Número de animais doentes (N) e taxa de ataque, por categoria animal, nos 25 casos.	50
Tabela 17	Distribuição dos sinais observados nas vacas e bezerros nas 25 propriedades casos.	54
Tabela 18	Distribuição da variável tipo de tratamento adotado nos casos.....	59
Tabela 19	Distribuição dos ordenhadores existentes e doentes, nos casos (25) e nos controles (47), segundo a idade.....	60
Tabela 20	Variáveis relacionadas aos ordenhadores nos 25 casos e nos 47 controles e respectivos valores de p no teste t.....	60
Tabela 21	Frequência dos sinais observados nos ordenhadores doentes nos 25 casos.	61
Tabela 22	Localização das lesões nos ordenhadores doentes nos 25 casos.....	63
Tabela 23	Características relacionadas com a ocorrência da doença observadas nas quatro propriedades onde a doença não acometeu os seres humanos.....	65
Tabela 24	Número médio de animais introduzidos nos casos e controles e respectivo valor de p no teste t, em nível de significância 0,05.....	70
Tabela 25	Categorias de animais introduzidos nos casos e nos controles e respectivo valor de p no teste de proporção, em nível de significância 0,05.	70
Tabela 26	Municípios de origem dos animais introduzidos nos casos e controles.	71
Tabela 27	Distribuição das variáveis entrega de leite, tem tanque de expansão, nos 25 casos e nos 47 controles e respectivos valores de p no teste de proporção, em nível de significância 0,05.	73
Tabela 28	Existência de outros animais domésticos nos 25 casos e nos 47 controles e respectivos valores de p no teste de proporção, em nível de significância 0,05.....	74

Tabela 29	Animais do mato mais comuns na região relatados pelos casos e pelos controles e respectivos valores de p no teste de proporção, em nível de significância 0,05.	75
Tabela 30	Distribuição dos animais do mato vistos próximos ao curral nos 25 casos e nos 47 controles.	76
Tabela 31	Principais locais onde os ratos foram vistos nos 25 casos e nos 47 controles e respectivos valores de p no teste de proporção, em nível de significância 0,05.	78
Tabela 32	Distribuição dos métodos utilizados para controles dos ratos nos casos e nos controles.	78
Tabela 33	Modelo proposto para a varíola bovina, construído através da análise de regressão logística múltipla.	80
Tabela 34	Vacas monitoradas e testadas na SN, por propriedade, em cinco dos 25 casos.	81
Tabela 35	Resultados gerais da SN nos rebanhos controles.	85
Tabela 36	Resultados da SN por categoria de animais, por propriedade, nos controles.	85
Tabela 37	Comparação de alguns parâmetros para descrição da ocorrência da doença em quatro propriedades casos.	87
LISTA DE QUADRO		
Quadro 1.	<i>Vaccinia virus</i> relatados no Brasil, 1965-2006.	19
LISTA DE ANEXOS		
Anexo 1	Questionário de Investigação Epidemiológica.	94
Anexo 2	Formulário para colheita das amostras – Poxvirus.	102

ABREVIATURAS

ATI	Corpúsculo de inclusão do tipo A
CEV	Vírus aderido à membrana citoplasmática
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ECP	Efeito citopático
ES	Espírito Santo
EV	Escola de Veterinária
EV	Vírus envelopado
GO	Goiás
HA	Hemaglutinina viral
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IMA	Instituto Mineiro de Agropecuária
IMV	Vírus maduro intracelular
MA	Maranhão
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MCA	Membrana corioalantóide
MEM	Meio Mínimo de Eagle
MOI	Multiplicidade de infecção
MG	Minas Gerais
MT	Mato Grosso
OR	Razão de chances ou <i>odds ratio</i>
ORF	Janelas abertas de leitura
PBS	Solução salina tamponada contendo fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RJ	Rio de Janeiro
SFB	Soro Fetal Bovino
SN	Soroneutralização
SN	Soroneutralização
SP	São Paulo
TK	Timidina quinase
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VACV	<i>Vaccinia virus</i>
VGf	Fator de crescimento
WR	Western Reserve
X ²	Tese Qui-quadrado (X ²)

RESUMO

Esse trabalho teve como objetivo pesquisar fatores associados à epidemiologia e à clínica da varíola bovina em Minas Gerais. Um estudo do tipo caso-controle foi estruturado, sendo visitadas 25 propriedades casos e 47 controles. Os dados foram coletados de janeiro-2005 a dezembro-2007. Foi aplicado um questionário de investigação para obter informações sobre as características da forma de produção e manejo, aspectos clínicos da doença, formas de introdução, presença de animais domésticos e silvestres. Casos clínicos foram rastreados e fatores envolvidos na transmissão da doença foram pesquisados. Amostras de soros sanguíneos e de epitélio lesado foram coletadas e submetidas ao teste de SN e PCR, respectivamente. A curva de anticorpos neutralizantes foi monitorada em vacas doentes por 12 a 14 meses. A presença de anticorpos neutralizantes foi investigada nas vacas sadias e seus bezerros nas propriedades controles. Anticorpos neutralizantes para Orthopoxvirus foram identificados nos rebanhos casos e controles. Um modelo para explicar a ocorrência da doença foi construído através da análise de regressão logística múltipla. O uso de desinfecção das mãos-tetas foi apontado como fator de proteção e as variáveis “transportar leite em caminhão (em latões de aço)”, e “número de vacas em lactação” foram identificadas como fatores de risco. Medidas de prevenção e controle foram propostas.

Palavras-chave: varíola bovina, *Vaccinia virus*, epidemiologia.

ABSTRACT

This study aimed to find factors related to the clinical epidemiology of bovine vaccinia in Minas Gerais. A case-control study was structured and 25 cases and 47 controls properties were visited. Data were collected from January-2005 to December-2007. In each of the sampled properties a questionnaire was applied in order to obtain information on the characteristics of the form of production and management, clinical aspects of the disease, such as introduction of the disease and presence of domestic and wild animals. Clinical cases were screened and factors involved in disease transmission properties were searched. Samples of blood serum and injured epithelium were collected and submitted to SN test and PCR, respectively. In some properties the curve of neutralizing antibodies was monitored in sick cows for 12 to 14 months. The presence of neutralizing antibodies was investigated in healthy cows and their calves in the control properties. Neutralizing antibodies to *Orthopoxvirus* were identified from cases and controls herds. One model to explain the occurrence of the disease has been constructed by multiple logistic regression analysis. The use of disinfecting hands-tits was identified as a protective factor and the variables “milk transport on trucks (in steel cans)”, and number of dairy cows” were identified as risk factors. Measures to prevent and control were proposed.

Keywords: Bovine Vaccinia, *Vaccinia virus*, epidemiology.

1 – INTRODUÇÃO

O termo “varíola bovina” é utilizado para descrever uma doença infecto-contagiosa caracterizada pelo aparecimento de lesões cutâneas localizadas no úbere e tetas das vacas em lactação. Porém, três diferentes poxvírus podem estar envolvidos na sua etiologia: *Cowpox virus* (varíola bovina genuína), *Vaccinia virus* (vírus utilizado na vacinação contra a varíola humana) e *Pseudocowpox virus* (pseudovaríola).

Todas elas são zoonoses e provocam no homem lesões semelhantes às descritas para os bovinos, localizadas principalmente nas mãos e mais raramente nos braços e antebraços (Mazur *et al.*, 2000; Lewis-Jones, 2004). As lesões causadas por estes vírus são clinicamente indistinguíveis e apresentam-se nas formas proliferativas, ulceradas ou em crostas (Bremant, Henderson, 2002).

Varíola bovina tem sido considerada como zoonose re-emergente no Brasil nos últimos anos causando prejuízo econômico para produtores e para o Estado. Apesar de não saber exatamente o vírus envolvido, a doença tem sido relatada no país desde a década de 30, com registros de casos esporádicos na década de 50 a 70, nos estados da Região Sudeste. Nas décadas de 80 e 90 alguns casos foram descritos, porém 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. Surtos ocorreram nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Bahia, Goiás, Mato Grosso e mais recentemente Maranhão, comprometendo milhares de cabeças de gado e grande número de ordenhadores.

Com base nos diagnósticos laboratoriais realizados pela Universidade Federal de Minas Gerais-UFMG (ICB e EV) e outras Universidades e Instituições de Pesquisa, o *vaccinia virus* tem sido identificado como o responsável pelos inúmeros casos ocorridos, não só no Estado de Minas

Gerais como em outras áreas do Brasil (Schatzmayr *et al.*, 2000; Trindade *et al.*, 2003; Nagasse-Shugara *et al.*, 2004; Leite *et al.*, 2005; Lobato *et al.*, 2005; Megid *et al.*, 2008). Na maioria dos surtos investigados, o diagnóstico laboratorial foi realizado a partir do isolamento viral, microscopia eletrônica e sorologia e, em alguns casos, por técnicas de biologia molecular como a reação em cadeia da polimerase (PCR) (Damaso *et al.*, 2000; Trindade *et al.*, 2003), confirmando a circulação de um *Orthopoxvirus* e mais precisamente um *vaccinia virus* (VACV). Por isto, tem-se sugerido tratar esta doença como VACCÍNIA BOVINA para não confundir com a varíola bovina genuína por *Cowpox virus*, que tem localização restrita à Europa.

Em Minas Gerais os primeiros relatos ocorreram no período de 1999-2000, na Zona da Mata. A partir de então, vários surtos de varíola bovina têm sido descritos em quase todas as regiões do Estado, em números crescentes. Já foram relatados oficialmente casos em municípios nas regiões do Vale do Rio Doce, Triângulo Mineiro/Alto Paranaíba, Sul/Sudoeste de Minas, Campo das Vertentes, Vale do Mucuri e Região Metropolitana de Belo Horizonte (IMA-2008). Nos últimos anos (2006 a 2008) a doença tem surgido em quase todas as regiões do estado, com exceção do norte e nordeste, colocando sob risco grande parte do rebanho leiteiro do estado, aproximadamente 4 milhões de vacas leiteiras, nas principais regiões produtoras de leite de Minas Gerais.

Entretanto, pouco se sabe sobre a ecologia e mecanismos de transmissão da doença, necessitando-se mais estudos para melhor conhecimento das potenciais formas de transmissão, bem como das possíveis fontes de infecção, o que é determinante para o controle da doença.

Além disso, a reemergência de casos de “varíola bovina”, levando a grandes prejuízos econômicos, com acometimento de 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 no acompanhamento destes surtos e na avaliação de medidas de controle para esta doença. Neste sentido, esta pesquisa teve como objetivo o estudo da varíola bovina no estado de Minas Gerais.

2 - REVISAO DE LITERATURA

2.1 Família *Poxviridae* e suas características

Os vírus pertencentes à família *Poxviridae* são grandes e complexos, apresentando-se em forma ovóide ou de tijolo, com

corpúsculos laterais quando partícula madura. Possuem genoma de DNA fita dupla linear, envelope e se multiplicam dentro do citoplasma das células infectadas, diferentemente de todos os outros vírus. São os maiores vírus conhecidos, medindo em média 300X230 nm (Fenner, 2000).

A família *Poxviridae* se divide em duas subfamílias: *Entomopoxvirinae* e *Chordopoxvirinae*, que têm hospedeiros diferentes; a primeira infecta insetos e a segunda vertebrados (Moss, 1996).

A subfamília *Chordopoxvirinae* é composta por oito gêneros, conforme demonstra a Tabela 1.

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>

Morfologicamente, as partículas virais dos diferentes gêneros apresentam pequenas diferenças entre si, entretanto aquelas do Gênero *Orthopoxvirus* são indistinguíveis (Fenner, 2002; Henderson, 2002;).

O cerne é a estrutura mais interna da partícula viral que contém o genoma, DNA e proteínas, com espessura de 5 nm. Lateralmente a ele ficam situados os

corpúsculos laterais. A membrana externa, de origem celular, é formada por uma bicamada lipoprotéica e circunda o cerne. Elementos tubulares, de 7 nm, cobrem a membrana externa. Uma membrana adicional, denominada envelope, de natureza lipoprotéica, pode ser vista em algumas partículas, externamente (Buller e Palumbo, 1991) (Fig.1).

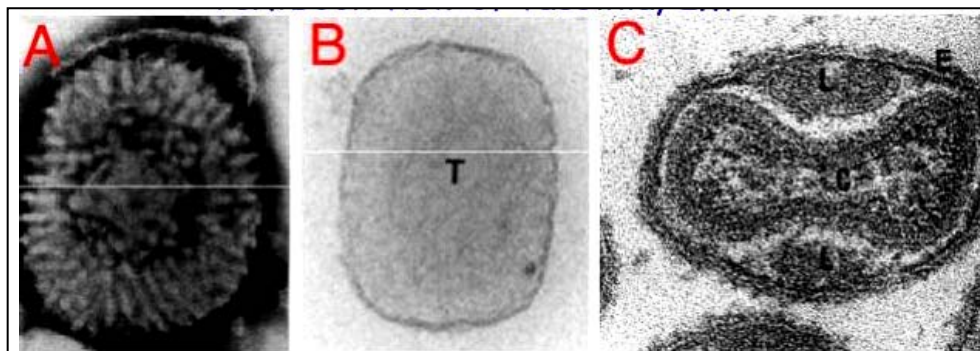


Figura 1. Imagens do *Vaccinia virus* em microscopia eletrônica convencional em contraste negativo (A), em microscopia cryo-eletrônica (B) e em corte ultrafino (C).

Fonte: <http://www.ibt.tamushsc.edu/faculty/pics/Vaccinia%20AFM-EM.jpg>

O DNA dupla fita dos poxvírus é ligado nas porções terminais por uma sequência de nucleotídeos de 100 pares de base, aproximadamente, com tamanho variando de 130 kb a 300 kb e com 136 a 260 janelas abertas de leitura (ORFs). A região central do genoma codifica principalmente proteínas estruturais e enzimas envolvidas no metabolismo do ácido nucléico, enquanto que genes relacionados à interação com o hospedeiro estão preferencialmente localizados nas regiões terminais variáveis. Repetições terminais invertidas estão localizadas nas extremidades variáveis do genoma e são importantes na codificação de genes envolvidos na interação vírus-hospedeiro e patogênese (Moss, 2001).

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 e tardia e montagem e liberação das partículas virais (Moss, 1996; Fenner, 2002; de Trindade, 2003).

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, fatores de transcrição precoces que serão empacotados. Finalmente acontece a montagem dos vírus e novas partículas virais imaturas são formadas (Moss, 1996; Fenner, 2002).

Duas partículas infecciosas são produzidas: vírus envelopado (EV) e vírus maduros intracelulares (IMV). Os EV são liberados para o meio extracelular (EEV) ou permanecem aderidos à membrana citoplasmática (CEV), enquanto os IMV permanecem dentro do citoplasma das células infectadas (da Fonseca et al., 2000; Moss, 2001).

2.2 Gênero *Parapoxvirus*

Das espécies listadas no Gênero *Parapoxvirus*, o *Pseudocowpox virus* tem maior importância para a veterinária e tem distribuição mundial, causando a pseudovariola, sendo muito comum nos rebanhos do Reino Unido (Naginton et al. 1965, citado por Gibbs et al., 1970). Esta doença causa lesões clinicamente muito semelhantes às produzidas pelos *Orthopoxvirus*, sendo esta uma doença de ocorrência muito freqüente em nosso meio (Schatzmayer et al., 2000). Nos homens lesões anelares são características e

recebem o nome de “nódulo do ordenhador”. São relativamente indolores apresentando geralmente um prurido intenso e cura de quatro a seis semanas (Mazur *et al.*, 2000; Lewis-Jones, 2004).

2.3 Gênero *Orthopoxvirus*

O Gênero *Orthopoxvirus*, um dos mais estudados e de interesse desta pesquisa, contém 10 espécies de vírus, que são antigenicamente relacionados e possuem um amplo espectro de hospedeiros, com

ampla distribuição geográfica (Damaso *et al.*, 2000; Henderson; Moss, 1999). As espécies de vírus e seus respectivos hospedeiros, bem como a sua distribuição geográfica encontram-se listados na Tabela 2.

A varíola humana causada pelo *Variola virus* encontra-se erradicada no mundo desde 1980, sendo que o último registro de sua ocorrência foi na Somália, em 1977. Já no Brasil o último caso registrado foi em 1971 (Fenner *et al.*, 1988; Fenner, 2000).

Tabela 2 – Gênero *Orthopoxvirus* e suas espécies, com respectivos hospedeiros e distribuição geográfica.

Espécies	Animais naturalmente infectados	Distribuição Geográfica
<i>Camelpox virus</i>	Camelos	África e Ásia
<i>Cowpox virus</i>	Carnívoros, vacas, humanos, ratos. Hospedeiros naturais: gerbil, outros roedores	Europa e Rússia
<i>Ectromelia virus</i>	Camundongos, hospedeiro natural desconhecido.	Europa
<i>Monkeypox virus</i>	Chipanzés, macacos, esquilos, humanos. Hospedeiros naturais: esquilos	África
<i>Raccoonpox virus</i>	Guaxinins	Estados Unidos
<i>Taterapox virus</i>	Tatera kempí (um gerbil)	África
<i>Uasin Gishu disease virus</i>	Cavalos. Hospedeiro natural desconhecido	África
<i>Vaccinia virus</i> (vírus vacinal da varíola)	Búfalos, vacas, humanos, porcos, coelhos. Hospedeiro natural desconhecido	Índia, Europa, Estados Unidos, Américas
<i>Variola virus</i>	Humanos	Mundial (erradicada)
<i>Volepox virus</i>	Voles (roedores)	Estados Unidos

Fonte: Fenner, 2000.

2.3.1 *Vaccinia virus* (VACV)

O VACV é o protótipo do Gênero *Orthopoxvirus* e possui amplo espectro de hospedeiros. Por muitos anos, foi o vírus utilizado na produção da vacina contra a varíola humana, doença grave erradicada na década de 70, em função de não produzir lesões generalizadas, ser menos patogênico e apresentar menor virulência que o *Variola virus* (Fenner, 2000).

Entre outras, amostra Western Reserve (WR), amostras conhecidas das linhagens

Lister, originada do Lister Institute, na Inglaterra, e da linhagem New York City Board of Health, originada do Laboratório Wyeth, Radnor - nos Estados Unidos, foram utilizadas nas vacinas para humanos. Além dessas, outras amostras foram utilizadas na China e na Índia (Henderson; Moss, 1999, citado por Ferreira *et al.*, 2008). No Brasil, o Instituto Butantã em São Paulo produziu milhões de doses de vacina com a linhagem VACV Lister, procedente da Inglaterra, sendo este vírus denominado aqui como Lister-Butantã (Lanna, 1980).

A sua origem é controversa e seu hospedeiro natural não é conhecido. Atualmente, acredita-se que as amostras de VACV não são mutantes de *Variola virus*. Entretanto permanecem dúvidas se elas são resultantes de um híbrido entre *Cowpox virus* e outro *Orthopoxvirus*, após milhares de passagens seriadas sob condições artificiais de cultura em laboratórios (Henderson; Moss, 1999).

As diferentes amostras de VACV apresentam níveis de virulência variados para o homem e animais. Entretanto, reações vacinais do tipo cutâneas, eczemas vacinais, vaccínia progressiva e vaccínia generalizada podem ocorrer especialmente em pessoas imunossuprimidas (Henderson e Moss, 1999; Fenner, 2000).

Entretanto, com a erradicação da varíola humana, a vacinação utilizando o VACV foi suspensa, em função do aumento dos riscos das reações vacinais adversas. Atualmente a vacinação só é recomendada para profissionais que trabalham em laboratórios, manipulando estes agentes. Também alguns grupos de risco como profissionais da área de saúde e militares, nos Estados Unidos e em alguns países da Europa, têm sido vacinados (Center for Disease Control and Prevention, 2001).

2.3.2 *Cowpox virus*

O *Cowpox virus* causa a varíola bovina verdadeira (genuína). De acordo com a literatura, a sua distribuição é restrita a Europa Continental (Fenner, 2000; Lewis-Jones, 2004). Apesar disso, existem alguns registros no Reino Unido (Collings, 1969, citado por Gibbs et al., 1970). Entretanto sua ocorrência tem sido atualmente citada como rara nas vacas enquanto o número de pessoas e gatos domésticos infectados tem aumentado (Bennett et al., 1986).

Cowpox virus foi utilizado como uma vacina efetiva por muitos anos, após Edward Jenner (1796) descobrir que pacientes inoculados com material extraído das lesões

de vacas com varíola bovina verdadeira desenvolviam uma doença similar ao *Cowpox* e tornavam-se protegidos contra a varíola humana. Jenner denominou o material extraído das vacas de “vaccine”, do latim “vacca”, que significa vaca e o processo de vacinação.

2.4 Distribuição mundial e no Brasil de *accinia virus* e impactos causados

- *Vaccinia virus* no mundo

Atualmente, com exceção do Brasil e da Índia, no mundo não existe nenhuma citação quanto à ocorrência de problemas causados em humanos e animais por VACV, naturalmente infectados. Nos outros países, após cessar a vacinação da varíola humana, os relatos de infecção por VACV referem-se a acidentes ocorridos com pessoas que trabalham em laboratórios, devido à manipulação desses agentes, ou são decorrentes de reações vacinais adversas com pessoas de grupos de riscos como, por exemplo, soldados e enfermeiros vacinados, e de infecções secundárias em outros indivíduos expostos a estas pessoas vacinadas (Kretzschmar et al., 2006; Center for Disease Control and Prevention, 2007).

Muitos casos de infecção secundárias por VACV a partir de indivíduos vacinados, ocorridos em hospitais, entre familiares e em outras circunstâncias foram relatados em muitos países da Europa e Estados Unidos, no período de 1907 a 1975 (Spekowitz, 2003).

Recentemente, foi relatada a transmissão secundária de VACV de um soldado americano vacinado para seu filho, de 28 meses de idade, que desenvolveu um quadro generalizado de “eczema vaccinatum” (Center for Disease Control and Prevention, 2007).

- *Vaccinia virus* relatados no Brasil

No Brasil, no período de 1965 a 2006, vários surtos de *Vaccinia virus* foram relatados e os vírus isolados (Quadro 1).

Quadro 1 - *Vaccinia virus* relatados no Brasil, 1965-2006.

Autor	Vírus isolado	Local	Ano	Hospedeiro
Lopes et al. (1965) Lopes et al. (1975)	Cotia (SPAn 232)	Cotia-SP	1961	Camundongos
Lanna (1980) Fonseca et al. (1998) Marques et al. (2001)	BeAn	Belém-PA	1963	Roedor silvestre
Diniz et al. (2001)	BH vírus	Belo Horizonte-MG	1993	Camundongos
Damaso et al. (2000)	Vírus Cantagalo	Cantagalo-RJ	2000	Vaca
Trindade et al. (2003)	Vírus Muriaé	Muriaé-MG	2000	Vaca
Trindade et al. (2003)	VACV Araçatuba	Araçatuba-SP	2003	Vaca
Leite (2003) Leite et al. (2005)	Vírus Passatempo	Passatempo-MG	2003	Vaca
Nagasse-Shugahara et al. (2004)	Vaccinia vírus	Estado de São Paulo e Goiás	2004	-
Trindade et al. (2006)	Guarani P1 e Guarani P2	Guarani-MG	2006	Vaca

Silva et al. (1986) relataram um surto de varíola bovina no Triângulo Mineiro, causado por um *Orthopoxvirus*, no município de Prata, estado de Minas Gerais, com envolvimento de muitas fazendas. Homens e animais foram acometidos. As vacas apresentaram lesões vesiculares nas tetas e nos úberes e os bezerros em lactação lesões na gengiva. Os ordenhadores tiveram lesões nas mãos e antebraço, além de febre e adenopatia.

Reis et al. (1970), estudando um surto de varíola bovina por vaccínia no município de Patos de Minas, em Minas Gerais, em 1970, identificaram lesões no focinho de bezerro que amamentava em vaca com lesões de varíola aguda. Os autores relataram ocorrência de mamite aguda como consequência da varíola bovina. A doença foi identificada em uma mulher responsável pela ordenha.

No Rio de Janeiro, casos de infecção por poxvírus em vacas e humanos foram relatados por Shatzmayr et al. (2000). Os achados com a utilização de microscopia eletrônica foram consistentes com infecções causadas por *Parapoxvirus* e *Orthopoxvirus*. Os autores chamaram atenção para a ocorrência de doenças causadas por poxvírus.

Lobato et al. (2005) relataram um surto de doença exantemática, caracterizada como varíola bovina, na Zona da Mata Mineira,

acometendo seres humanos e bovinos. Os aspectos clínicos e epidemiológicos da doença foram estudados e os autores constataram que os casos humanos foram registrados em 83% das propriedades. O diagnóstico laboratorial identificou o VACV como o agente etiológico do surto.

Trindade et al. (2007) relataram o tempo do curso de infecção natural em humanos por *Vaccinia vírus* e descreveram aspectos clínicos e epidemiológicos importantes desta infecção zoonótica. O diagnóstico da infecção foi baseado em procedimentos clínicos, sorológicos e moleculares. Os pacientes eram procedentes de fazendas do estado de Minas Gerais com surtos de doença vesicular e exantemática. Os pacientes tiveram contato direto com vacas doentes durante a ordenha.

Surto de varíola bovina foi descrito por Megid et al. (2008) no sudeste do Estado de São Paulo. Os autores observaram lesões em bovinos e nos seres humanos previamente vacinados e não vacinados contra varíola humana, destacando o risco da doença para a saúde humana e a necessidade de mais estudos epidemiológicos e imunológicos sobre a doença.

Trindade et al. (2007) investigaram a diversidade e as origens de vírus vaccínia isolados no Brasil nos últimos anos. Foram analisados os dados moleculares e

Ferreira et al. (2008) estudaram a transmissão horizontal de *Vaccinia vírus* em modelo murino. Os resultados encontrados sugerem que excrementos de murinos podem desempenhar papel relevante na propagação e transmissão destes vírus. Segundo os autores, talvez estes dados possam ajudar a explicar como estes vírus circulam entre seus hospedeiros naturais.

De 2001 a 2009 foram relatados ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento-MAPA (2009) casos da doença nos Estados de Minas Gerais, Bahia, Rio de Janeiro, Espírito Santo, São Paulo, Goiás, Mato Grosso e Maranhão (MAPA, 2009 - comunicação pessoal) (Figura 2).

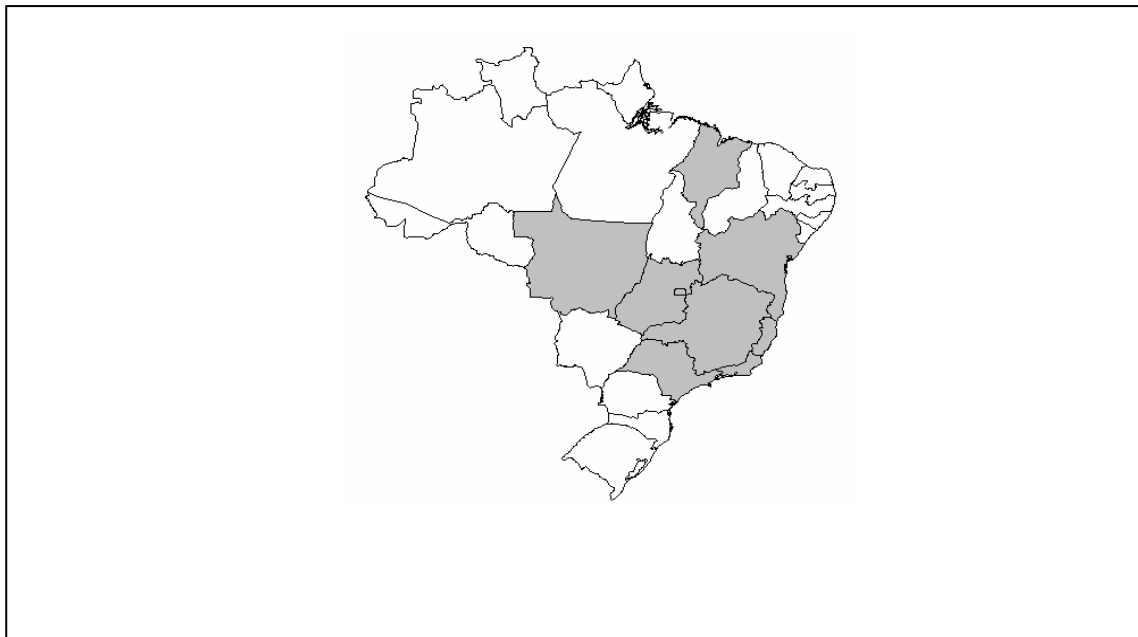


Figura 2. Ocorrência de varíola bovina no Brasil, período de 2000-2009, segundo MAPA.

Em Minas Gerais a doença já foi registrada, principalmente, nas regiões da Zona da Mata, Sudoeste Mineiro, Central Mineira, Alto Paranaíba, Rio Doce, e mais recentemente Triângulo Mineiro, Norte de Minas e Vale do Mucuri (IMA, 2009).

A Figura 3 mostra as áreas de ocorrência dos focos oficialmente relatados nos anos de 2001 a 2009, de acordo com as Delegacias Regionais do IMA (IMA, 2009). Especificamente no ano de 2003, foram notificados 21 focos, com 645 animais afetados, em 11 municípios. Já em 2004, 35 focos, com 1.147 animais doentes, em 27 municípios, em sua grande maioria diferentes daqueles acometidos em 2003, embora localizados em Delegacias

Regionais do IMA com registros de focos no ano anterior. Em 2005, um total de 26 focos foi notificado, incluindo a Zona da Mata e no Triângulo Mineiro.

Em 2006 foram registrados mais 24 novos focos, com destaque para a região do Triângulo Mineiro, Alto Paranaíba, Central Mineira e Mucuri. Nos últimos anos (2006 a 2009) a doença tem surgido em quase todas as regiões do estado, com exceção do noroeste e nordeste, colocando sob risco grande parte do rebanho leiteiro do estado, nas principais regiões produtoras de leite de Minas Gerais.

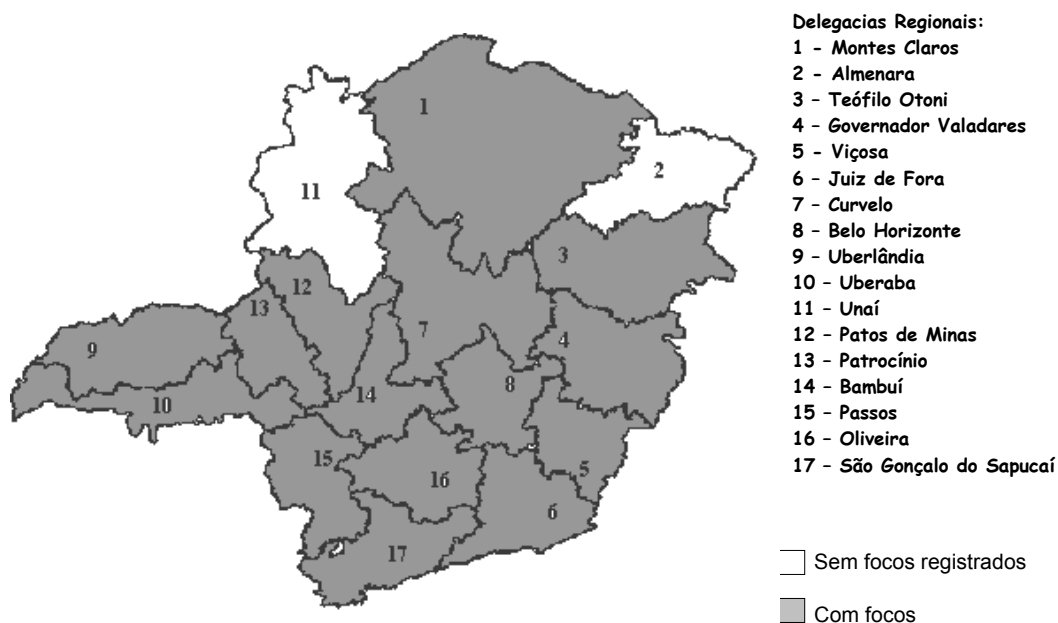


Figura 3. Ocorrência de varíola bovina no Estado de Minas Gerais, por Delegacias Regionais do IMA, de 2001 a 2008.

2.5 Patogênese das infecções por poxvírus e resposta imune

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., 1988; Buller e Palumbo, 1991).

Manifestações clínicas do tipo generalizadas são comumente descritas para as espécies *Variola virus* e *Monkeypox virus*, em humanos e em macacos, respectivamente. Nestes casos, ocorre multiplicação viral no sítio de entrada, comprometimento dos órgãos linfáticos e circulação dos vírus na corrente sanguínea (viremia primária) com conseqüente infecção de órgãos como baço e fígado e multiplicação viral nestes, com nova circulação dos vírus na corrente sanguínea (viremia secundária). Em seguida surgem as lesões características da doença em outros órgãos como rins, intestino, pulmões e pele (Fenner et al., 1988; Breman e Henderson, 2002). Para *Variola virus* a porta de entrada descrita é o trato respiratório e para *Monkeypox virus* são lesões na pele e também na mucosa oral.

Já os VACV e *Cowpox virus* causam manifestações clínicas normalmente localizadas nos sítios primários de infecção, que são lesões existentes na pele. Desta forma, ocorre multiplicação viral local e disseminação dos vírus para os linfonodos responsáveis pela drenagem das áreas afetadas e linfadenopatia localizada acentuada, sinal frequentemente observado e característico das infecções por Poxvírus. As lesões da pele iniciam-se com vasodilatação e com aparecimento de eritema cutâneo, local e regional, com formação de pequenas manchas

avermelhadas. Em seguida, as lesões evoluem para vesículas e podem evoluir para pústulas com o processo inflamatório local. As pústulas ulceram e ocorre formação de crostas que finalmente evoluem para a cicatrização e cura, deixando marcas definitivas na pele.

Para os *Pseudocowpox virus* as lesões são bastante semelhantes às anteriormente descritas, porém geralmente mais brandas quando comparadas aos VACV e *Cowpox virus* (Fenner et al., 1988; Buller e Palumbo, 1991; Mazur et al., 2000; Lewis-Jones, 2004).

Após a invasão viral, os hospedeiros montam numerosas respostas imunes, específicas e não específicas para a infecção. Muitas destas respostas envolvem a indução de anticorpos pelo sistema imune adaptativo ou células que são específicas para expressar determinantes antigênicos para patógenos estranhos (Nathanson et al., 2007).

Dentro de poucos dias, uma resposta imune humoral forte é montada e anticorpos específicos são produzidos. Normalmente a resposta imune é poderosa e a especificidade das respostas montadas pelos hospedeiros é determinada, entre outros fatores, pela natureza do agente e carga infectante. A imunidade mediada por células e anticorpos é muito importante para eliminar os vírus e para a prevenção de reinfecções. Os anticorpos têm importante papel na prevenção de infecções secundárias e na transmissão da imunidade passiva de mãe para filho para poxvírus, uma vez que se espera uma resposta imune intensa e duradoura (Smith e Kotwal, 2002; Fang e Sigal, 2005; Panchanathan et al., 2008).

Entretanto, até hoje, a resposta imune produzida para poxvírus é bastante discutida e existe pouco consenso sobre a sua capacidade de proteção para reinfecções. Alguns modelos de infecção animal têm sido usados para o estudo da

resposta imune em poxvírus. Investigações recentes de parâmetros na resposta imune na infecção secundária, com *Ectromelia vírus*, revelaram que interferon e as células TCD8 não são essenciais, contudo interações entre células B e T e anticorpos são absolutamente críticos para a recuperação de infecções secundárias. A crescente evidência de que os anticorpos são necessários tanto nas infecções primárias quanto secundárias tem derrubado o forte dogma da importância da imunidade celular para poxvirus que dominou por muito tempo (Panchanathan et al., 2008).

2.6 Variola bovina por *Cowpox vírus*

Nos casos por *Cowpox vírus* a disseminação é rápida dentro do rebanho e a imunidade é sólida, de forma que a doença tende a ocorrer em surtos repentinos de diversos meses de duração, com a subsequente imunidade protegendo os bovinos por pelo menos diversos anos (Blood e Radostitis, 1991).

As crostas da variola por *Cowpox vírus* (variola verdadeira) têm 1 a 2 cm de diâmetro e são duras, aderidas, de coloração marrom-amarelada a vermelha. Em vacas que estão em ordenha, a formação de crosta é rara, sendo a crosta substituída por uma ulceração profunda (Blood e Radostitis, 1991).

2.7 Variola bovina por *Parapoxvirus*

Num rebanho acometido por *Pseudocowpox vírus* a taxa de disseminação é relativamente lenta e o tempo de cicatrização é prolongado. A doença tende a desaparecer no rebanho depois de 18 a 21 dias, mas pode resultar na presença da doença no rebanho por até um ano (Blood e Radostitis, 1991; Fenner, 2002). Pouca imunidade se desenvolve e é provável que a doença retorne ao rebanho dentro de pouco tempo (Blood e Radostitis, 1991).

Iketani et al. (2002), inoculando bovinos experimentalmente com o vírus da pseudovariola, observaram a formação de

pequenos nódulos nos pontos inoculados 7 dias após inoculação, que desapareceram 16 dias mais tarde.

As lesões por *Pseudocowpox vírus* podem ser vistas em qualquer época do ano. Em muitos rebanhos, a pseudovariola é problema crônico e as lesões são usualmente vistas como relativamente brandas. Casos clínicos de re-infecção ocorrem nestes rebanhos no outono e primavera (Cheville e Shey, 1967; Carter, Brookbanks e Dickson, 1968, citado por Gibbs et al., 1970).

A resposta imune gerada para *Pseudocowpox vírus*, na infecção natural, é de curta duração e os animais ficam suscetíveis a reinfecção (Robinson e Lyttle, 1992, citado por Iketani et al., 2002).

Os bovinos são infectados com o vírus da pseudovariola, subcl clinicamente e persistentemente, e devem funcionar como reservatórios no campo. O vírus pode ser ativado em animais estressados ou imunossuprimidos (Iketani et al., 2002).

Num rebanho atingido por *Pseudocowpox vírus*, a maioria das vacas fica infectada, a não ser que haja imunidade proveniente de ataques prévios ou medidas de controle adequadas que tenham sido adotadas. As perdas resultam da inconveniência na hora da ordenha, por causa da sensibilidade das tetas e por casos esporádicos de mastite que se desenvolvem quando as lesões evoluem e envolvem os esfíncteres das tetas (Blood e Radostitis, 1991).

Variola bovina causada por *Pseudocowpox vírus* é uma doença relativamente benigna, a maior parte das perdas ocorrendo como resultado da dificuldade de ordenhar e de um aumento na incidência de mastite (Blood e Radostitis, 1991).

2.8 Epidemiologia da variola bovina causada por *Vaccinia vírus*

Os bovinos são os hospedeiros mais comumente descritos. Gatos domésticos e cães são esporadicamente citados.

Roedores são descritos como reservatórios. Seres humanos são quase sempre afetados. A doença no homem tem caráter ocupacional (Damaso et al., 2000; Schatzmayr et al., 2000; Diniz et al., 2001; da Fonseca et al., 2002; Trindade et al., 2003; Lewis-Jones, 2004; Nagassane-Shugahara et al., 2004; Trindade et al., 2005).

Segundo Blood e Radostitis (1991) vacas recém-paridas são mais susceptíveis, mas todos os bovinos adultos num rebanho, inclusive vacas secas, provavelmente poderiam ser afetados. Num rebanho em que a doença seja enzoótica, somente novilhas e novas introduções podem desenvolver lesões (Blood e Radostitis, 1991).

Sabe-se que a transmissão de uma vaca para outra dentro do rebanho ocorre pelas mãos dos ordenhadores ou pelas ventosas das ordenhadeiras. A penetração dos vírus se dá por soluções de continuidade em lesões pré-existentes nas tetas e úbere das vacas (Fenner et al., 1988; Blood e Radostitis, 1991).

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, 2008). Outros fatores, como, por exemplo, manipulação de latões de leite contaminados e presença de roedores silvestres que podem funcionar como reservatórios do vírus são citados (Lobato et al., 2005). Porém, o envolvimento de insetos não está descartado.

Quando a vacina contra varíola humana ocorria, ordenhadores recentemente vacinados serviam como fonte de infecção para bovinos (Blood e Radostitis, 1991).

A doença pode ser transmitida dos animais aos seres humanos que se infectam através do contato com as lesões presentes nas tetas dos animais doentes (Schatzmayr et al., 2000; Lobato et al., 2005).

Lobato et al. (2005) observaram tendência a sazonalidade, com concentração dos casos de varíola bovina (poxvírus), observados na Zona da Mata Mineira, nos meses de julho a setembro, coincidindo com o período da seca. Segundo os autores, isso poderia estar relacionado a fatores, ainda não identificados, que facilitariam a transmissão da doença e a circulação do vírus nessa época do ano. Em 84% das propriedades, houve relatos da presença de roedores, animais sabidamente susceptíveis à infecção pelo *Vaccinia vírus*.

Em rebanhos completamente sensíveis, introdução inicial do vírus pode resultar em infecção aguda com envolvimento da maioria do rebanho leiteiro. Lesões severas semelhantes podem ser observadas em animais introduzidos em rebanhos cronicamente infectados (Gibbs et al., 1970).

O período de incubação é 5 a 7 dias no homem e nos animais.

Importância econômica

Além do aspecto econômico na pecuária, a varíola bovina tem importância para a saúde pública, pois se trata de uma zoonose.

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, afastamento do ordenhador.

As taxas de ataque descritas para as vacas em lactação normalmente são muito altas. Nos casos da infecção por *Pseudocowpox vírus* a taxa de morbidade se aproxima de 100% (Blood e Radostitis, 1991). Em surtos ocorridos em Minas Gerais por *Orthopoxvirus*, Reis et al. (1970) observaram taxas de ataque de 42,2% a 100% e Lobato e colaboradores (2005), mais recentemente, identificaram índices de 80 a 100% na ordenha manual e de 25 a 30% na ordenha mecânica.

No surto da Zona da Mata Mineira, em 2005, sobre os prejuízos relatados por

produtores, os mais importantes referem-se à ocorrência de mamite, em consequência da infecção pelo vírus, queda na produção de leite, gastos com medicamentos, afastamento do ordenhador por algum tempo, com necessidade de um novo contratado, e acometimento de bezerros que mamam nas vacas doentes, levando ao emagrecimento desses animais (Lobato et al., 2005).

Sinais clínicos

As lesões causadas pelos poxvírus são indistinguíveis clinicamente (Reis et al., 1970; Mazur et al., 2000; Moss, 2001; Lewis-Jones, 2004).

Nas vacas, caracteriza-se inicialmente pelo desenvolvimento de um eritema cutâneo, seguido do aparecimento de pequenas manchas que evoluem para vesículas e crostas escuras nas tetas e mais raramente no úbere, que terminam por cicatrizar dentro de 15 a 20 dias (Bremner e Henderson, 2002).

Nas vacas as lesões normalmente estão confinadas às tetas e partes inferiores do úbere. O desenvolvimento de dor nas tetas pode interferir com a liberação do leite e a vaca normalmente se ressentir quando está sendo ordenhada.

Nos bezerros as lesões são observadas na região da boca, focinho e lábios. Lobato e colaboradores (2005) observaram que em 21% das propriedades visitadas em um surto foi mencionada a doença em bezerros.

É comum a ocorrência de mamite e infecções secundárias nas vacas afetadas (Blood e Radostitis, 1991). Lobato et al. (2005), relataram que 43% dos animais acometidos apresentaram mamite ou outro tipo de infecção secundária durante ou após o aparecimento dos sinais clínicos.

Em humanos, a infecção é caracterizada pela presença de lesões ulcerativas e pustulares principalmente nas mãos, podendo acometer antebraços e face, além de febre, dor, mal estar, e linfadenopatia

(Schatzmayer et al., 2000; Damaso et al., 2000; Nagassane-Shugahara et al., 2004; Lewis-Jones, 2004; Leite et al., 2005; Trindade et al., 2005).

Lobato et al. (2005) observaram casos humanos concomitantemente com bovinos, em 83% das propriedades envolvidas num surto, totalizando aproximadamente 110 pessoas.

Nos casos graves de infecção por *Cowpox virus* em vacas, as lesões podem se espalhar para partes internas das coxas e, raramente, para o períneo, a vulva e a boca (Blood e Radostitis, 1991). As lesões individuais são pequenas e poucas, mas graves. São dolorosas, mas cicatrizam rapidamente em duas a três semanas.

Diagnóstico laboratorial e diagnóstico diferencial

A eficiência do diagnóstico laboratorial é importante. Vírus da Varíola (cowpox) e pseudovariola podem ser isolados ao longo do curso das lesões, mas são muito mais facilmente isolados de lesões novas do que de lesões velhas (com mais de uma semana) (Rweyemamu et al., 1966; Martin et al., 1969; citados por Gibbs et al., 1970). O uso de microscopia eletrônica para rápido diagnóstico de pseudovariola e papilomatose de teta foi primeiramente registrado por Ngington et al. (1965), citado por Gibbs et al., 1970. Microscopia eletrônica pode detectar infecções múltiplas enquanto tais infecções múltiplas não poderiam ser diagnosticadas por técnicas *in vitro* (Gibbs et al., 1970). Em adição, papilomavirus pode ser facilmente identificado pela microscopia eletrônica, embora o vírus seja difícil de isolar em cultura de tecido (Naginton et al., 1965, citado por Gibbs et al., 1970). A técnica tem desvantagem na diferenciação de vaccinia e cowpox, não sendo possível diferenciar a morfologia do vírus (Gibbs et al., 1970).

Isolamento do vírus em cultivo celular é rotineiramente utilizado enquanto microscopia eletrônica não é possível, mas tem algumas desvantagens em relação a

pseudovariola porque algumas cepas falham para crescer com efeitos óbvios *in vitro* e, freqüentemente, o diagnóstico positivo demora (Naginton, 1968; citado por Gibbs et al., 1970). As vantagens do cultivo de células sobre a microscopia eletrônica são a habilidade de diferenciar vaccinia de cowpox (Kato et al., 1959) e a melhor taxa de detecção do vírus da mamilite de lesões mais velhas (Gibbs et al., 1970).

O diagnóstico laboratorial pode ser realizado a partir do isolamento viral, microscopia eletrônica e sorologia e, em alguns casos, por técnicas de biologia molecular como a reação em cadeia da polimerase (PCR) (Damaso et al., 2000; Trindade et al., 2003). O isolamento viral é realizado em membrana corioalantóide (MCA) e em monocamadas de células Vero, para detecção de efeito citopático (Diniz et al., 2001).

Amostras de soros coletados das vacas doentes podem ser submetidas ao teste de soroneutralização por inibição do número de placas, em diluições seriadas.

O teste de PCR para diagnóstico de agentes virais em materiais clínicos é realizado utilizando-se quatro genes característicos dos ortopoxvirus que codificam a enzima timidina quinase (TK), o fator de crescimento do VACV (VGF), a proteína do corpúsculo de inclusão do tipo A (ATI) e a hemaglutinina viral (HA) (Fonseca et al., 1998; Trindade et al., 2003). Após a amplificação por PCR, as amostras podem ser seqüenciadas ou submetidas aos ensaios de RFLP (Polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição) (Meyer et al., 1997).

Quanto ao diagnóstico diferencial, inicialmente deve ser realizada a diferenciação dos três agentes citados. Além desses, é recomendável que se faça o diagnóstico para várias outras enfermidades, inclusive as vesiculares, principalmente febre aftosa e estomatite vesicular.

Para Blood e Radostitis(1991) além da diferenciação destes três tipos de poxvirus, é preciso fazer o diagnóstico laboratorial diferencial para mamilite ulcerativa. A diferenciação nem sempre é fácil clinicamente. Segundo o autor não é raro que duas ou mais doenças estejam presentes em um rebanho.

Para Gibbs et al. (1970) é preciso considerar os seguintes pontos no diagnóstico diferencial de *vaccinia*, *cowpox* e pseudovariola:

- examinar todo o rebanho e não somente parte dos afetados para comparação do estágio de desenvolvimento das lesões. Isto ajuda consideravelmente na diferenciação da condição, porque as lesões mais velhas são freqüentemente semelhantes independente da causa;
- sempre que existem vesículas como as únicas lesões de tetas observadas, aftosa deve ser considerada;
- bezerras, em aleitamento, de vacas infectadas com mamilite, pseudovariola ou varíola (cowpox) podem apresentar lesões no focinho e/ou cavidade oral.

Não existe um tratamento específico para combater os vírus. A literatura consultada sugere apenas uma terapia de suporte que combate os sintomas da doença, ou seja, o tratamento sintomático.

2.9 Estudos do tipo caso-controle e análises estatísticas

Estudos dos tipos caso-controle são observacionais e longitudinais. São muito utilizados em veterinária e têm como propósito identificar características, como exposições a fatores de risco, que ocorrem em maior (ou menor) freqüência entre casos do que controles (Dohoo, 2003; Medronho, 2006).

Os casos são definidos como aqueles que desenvolveram a doença ou desfecho de interesse, enquanto que os controles não desenvolveram a doença ou desfecho de

interesse no momento em que eles são selecionados (Dohoo, 2003).

No processo de definição de seleção de casos para um estudo de caso-controle critérios acurados para a definição de caso são essenciais. É preciso definir a doença, sua severidade, e se serão incluídos casos incidentes (casos novos) ou casos prevalentes. Em geral os critérios são baseados em achados laboratoriais ou podem ser definidos clinicamente (Rouquayrol e Almeida Filho, 1999; Medronho, 2006).

Controles devem preencher os mesmos critérios utilizados para a definição de caso, com exceção dos critérios relacionados à definição da doença a ser estudada. A relação de casos e controles não precisa ser igual, mas aumentar muitas vezes os controles, além da relação de quatro controles para um caso não aumenta o poder do estudo substancialmente (Rouquayrol e Almeida Filho, 1999; Medronho, 2006). Além disso, quando o número de casos é pequeno, a precisão das estimativas pode ser melhorada através da seleção de mais de um controle por caso, mas geralmente a vantagem de aumentar o número de controles por caso é pequena, muitas vezes 3/4 controles por caso é o máximo utilizado (Dohoo, 2003).

Os estudos caso-controle podem estar sujeitos a viés de seleção e também de informação. O processo de seleção de casos e controles deve ser criterioso para não introduzir viés de seleção no estudo, que são os mais comuns de ocorrer. Para isto não ocorrer, o grupo controle deve ser composto por uma amostra representativa da população de origem dos casos. O pareamento, que pode ser aplicado nos estudos de caso-controle, consiste do procedimento pelo qual, para cada caso selecionado, são recrutados um ou mais controles idênticos com relação a certas características outras que não o fator de investigação. Tem como objetivo aumentar a eficiência do estudo, tornando possíveis variáveis de confundimento distribuídas

equitativamente entre casos e controles (Medronho, 2006).

Tradicionalmente, em estudos de caso-controle os casos são comparados aos controles com respeito à frequência de exposição através da medida de associação razão de chances (*odds ratio*-OR), que mede a força da associação entre a exposição e a doença sob estudo, identificando fatores de risco e fatores de proteção. Os testes de qui-quadrado (X^2) e teste t de Student, para as diferenças de médias e proporções, são normalmente utilizados em análises de dados obtidos de estudos caso-controle (Rouquayrol e Almeida Filho, 1999; Dohoo, 2003; Medronho, 2006).

Em epidemiologia veterinária é comum o evento de interesse apresentar características dicotômicas. Mais comumente, estas variáveis representam a presença ou ausência de uma enfermidade ou mortalidade. Nestes casos, técnicas de análise de regressão logística são as recomendadas. Quanto à significância do modelo construído, é utilizado o teste de verossimilhança e um resultado significativo, sugere que, em conjunto, as variáveis contribuem significativamente para predizer o resultado. A curva de ROC pode ser traçada e o valor encontrado para a área sob a curva indica a capacidade preditiva do modelo (Dohoo, 2003).

Entretanto, mais do que significância estatística, a interpretação dos dados deve buscar estabelecer a “significância epidemiológica” dos achados. Essa é que é a essência da análise epidemiológica (Rouquayrol e Filho, 1999). Neste sentido, uma reflexão sobre a “biologia” ou a “história natural da doença” é de grande importância (Medronho, 2006).

3 – OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Estudar os fatores ligados à epidemiologia e clínica da varíola bovina no Estado de Minas Gerais, para melhor conhecimento dos fatores ligados à transmissão, controle e imunidade conferida aos animais.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 - Estudar formas de transmissão, aspectos clínicos e manutenção da doença:

- Rastrear os casos clínicos e pesquisar fatores que podem estar envolvidos na transmissão da doença entre propriedades e dentro das propriedades;
- Identificar prováveis fatores de risco para a doença e construir um modelo para a mesma;

3.2.2 - Estudar fatores ligados à resistência à doença;

- Monitorar a curva de anticorpos neutralizantes em vacas doentes, nas propriedades casos;
- Investigar a presença de anticorpos neutralizantes nas vacas sadias e seus bezerros, nas propriedades controles.

4 – MATERIAL E MÉTODOS

4.1 – Descrição da área

O presente trabalho foi realizado no Estado de Minas Gerais e compreendeu nove municípios: Bambuí, Mariana, Mercês, Paulistas, Rio Pomba, São João Evangelista, Serro, Sabinópolis e Itamarandiba (Figura 4).

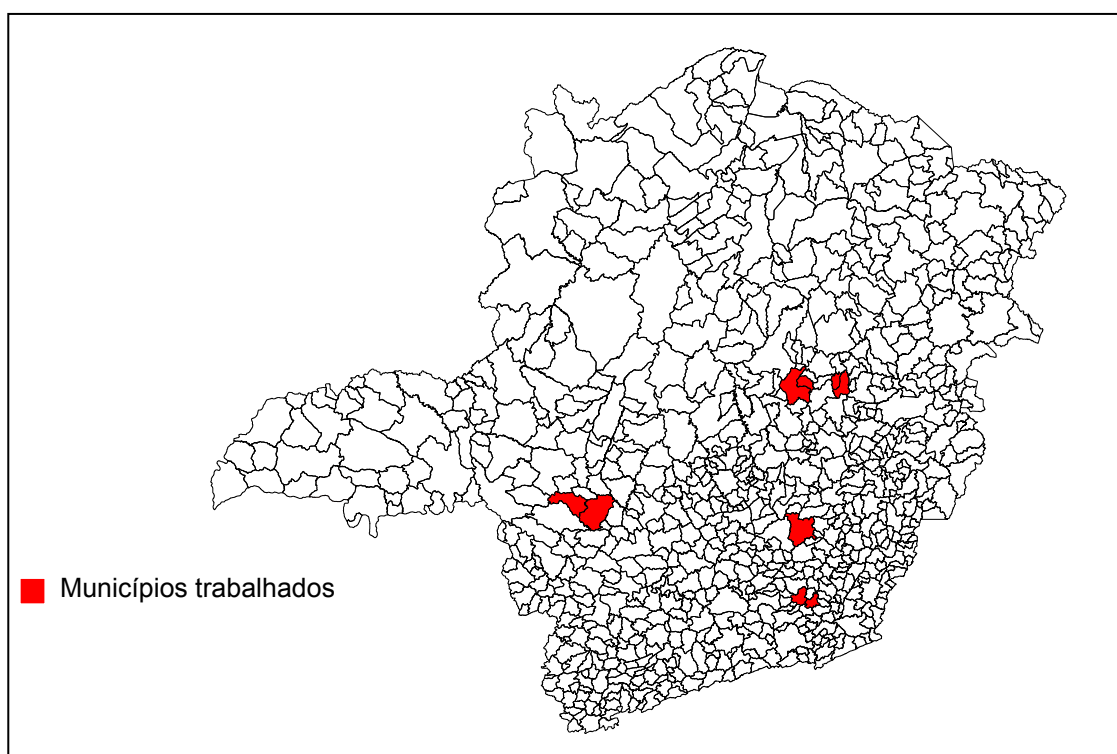


Figura 4. Localização dos municípios trabalhados no estado de Minas Gerais.

Minas Gerais tem uma extensão de 588.384,6 Km², distribuídos em um total de 853 municípios. O estado se encontra localizado na região Sudeste do Brasil e faz divisa com os Estados da Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Mato Grosso do Sul e Goiás. Predomina o clima tropical, com temperaturas médias variando entre 16°C ao sul e 26°C ao norte, com estações de chuva e seca bem definidas (IBGE, 2008).

O rebanho bovino do Estado é de 22,5 milhões de cabeças, distribuídas em 320.000 propriedades (IMA, 2008). A pecuária mineira apresenta diferentes formas de organização, com predomínio de várias regiões homogêneas de cria, cria-recría e terminação, voltadas para a produção de leite e/ou carne (Mourão, 1994; Frois, 1995).

Os municípios estudados foram aqueles onde os casos da doença ocorreram, no período de 2005 a 2007, consideradas as condições de viabilização da visita ao foco e também da participação dos produtores, em caráter voluntário.

4.2 – Delineamento do estudo de caso-controle

O estudo de caso-controle foi utilizado como forma de se identificar prováveis fatores de risco para a ocorrência da doença. A população alvo foi composta pelas propriedades rurais com criação de bovinos, existentes no Estado de Minas Gerais. Foi planejada uma amostragem de 25 casos (propriedades com casos clínicos da doença) e 50 controles (propriedades que estavam livres da doença no momento da visita), sendo esperado um total de 75 propriedades rurais. O cálculo da amostra foi feito utilizando-se o programa EPIINFO,

considerando-se o proposto por Dohoo (2003), através da seguinte fórmula: $10 \times n$ (nº de variáveis a serem consideradas no modelo de regressão logística + 1) = nº de observações necessárias no estudo. Também foi levado em conta o fato de tratar-se de doença até então rara e reemergente, buscando-se trabalhar com um número maior de controles do que casos na tentativa de eliminar erros (Medronho, 2006).

4.2.1 – Seleção das propriedades casos e controles

O critério de seleção das propriedades casos e controles foi a presença ou ausência da doença clínica no momento da visita, após criterioso exame clínico dos animais. Para os casos foram selecionadas aquelas que apresentavam a doença clínica e para os controles aquelas que não apresentavam.

Para cada propriedade foco trabalhada buscou-se trabalhar com duas propriedades controles. Uma vez definida as propriedades casos, as controles foram selecionadas considerando-se os seguintes critérios: estar localizada no mesmo município da propriedade foco e apresentar a criação de bovinos. Buscou-se selecionar uma propriedade controle vizinha ao foco e outra localizada nas proximidades no mesmo município.

Assim sendo, foram selecionadas e visitadas 25 propriedades casos e 47 controles, no período de 2005 a 2007, totalizando 72 propriedades. A Figura 5 mostra a distribuição destas propriedades por município trabalhado.

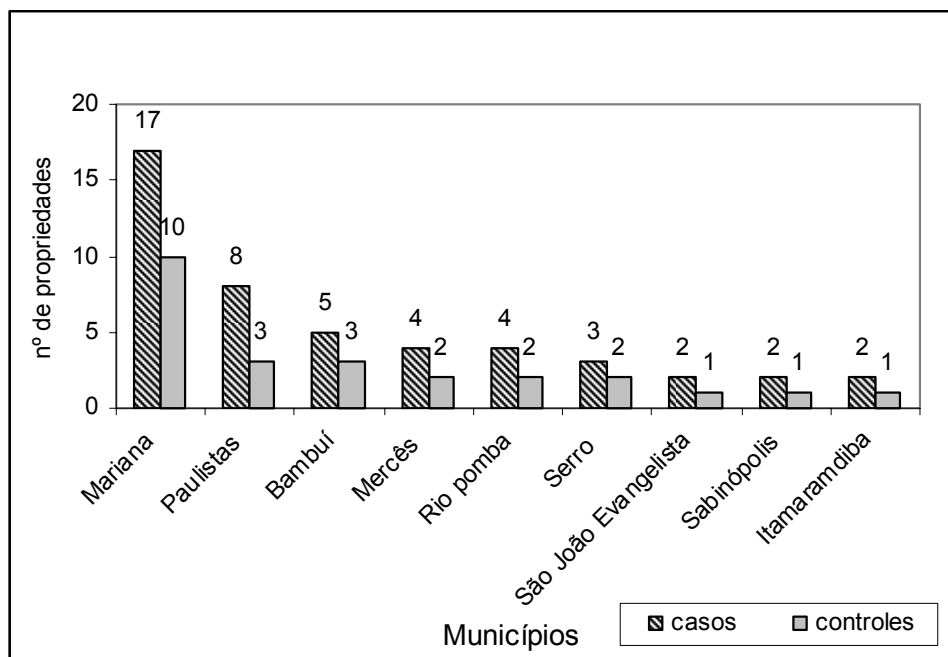


Figura 5. Número de propriedades casos e controles amostradas por município trabalhado, no período de 2005 a 2007.

As propriedades controles foram submetidas a um período de 45 dias de suspensão (30 dias de duração do curso da doença na propriedade mais 15 dias de segurança), sendo após esse período, incluídas (critério de inclusão) novamente como propriedades expostas ao risco. Este período de suspensão foi utilizado como uma forma de evitar que elas fossem classificadas como casos primários ou possíveis casos secundários relacionados ao foco primário estudado (do qual ela era controle).

Para o conhecimento da ocorrência dos casos no Estado utilizou-se das seguintes fontes de informação: sistema oficial de notificação de doenças do IMA, veterinários autônomos ou veterinários do serviço de defesa sanitária animal municipal, produtores rurais e outros agentes da comunidade local.

4.2.2 – Definição da amostragem nas propriedades

Em cada uma das propriedades trabalhadas (casos e controles) o número de animais

estudados amostrados foi definido em função do número de vacas em lactação existentes na propriedade, sendo amostradas para rebanhos com até 30, de 31 a 60, de 61 a 90 ou acima de 91 vacas em lactação, 5, 7, 9 ou 10 vacas respectivamente, e quando possível seus bezerros também.

4.2.3 – Aplicação do questionário de investigação e coleta de dados

Os contatos com os produtores rurais para a viabilização deste estudo foram realizados, previamente, através das fontes de informação já citadas e, posteriormente, pelo pesquisador ou outro médico veterinário do IMA no momento da visita à propriedade. Nesta mesma ocasião foram repassados esclarecimentos sobre o estudo (importância, objetivos, papel do produtor...) e foi solicitada a autorização formal para realização dos trabalhos de coleta dos dados/informações e de coleta de amostras.

Em todas as propriedades casos e controles foi aplicado um questionário de

investigação. Em 83,3% das propriedades as entrevistas foram realizadas pelo pesquisador e o restante por médicos veterinários do IMA treinados para tal. As entrevistas foram realizadas com o produtor rural ou o responsável pela propriedade.

Este questionário de investigação epidemiológica serviu como um instrumento para obter informações específicas sobre a caracterização da forma de produção e de manejo, aspectos clínicos da doença nos animais e no homem, forma de introdução e transmissão da doença, presença de animais domésticos e silvestres, entre outras (ANEXO-1). O mesmo já havia sido padronizado e utilizado em outro estudo sobre varíola bovina realizado na Zona da Mata Mineira (Lobato et al., 2005), com a participação do pesquisador, se mostrando adequado. Entretanto pequenas modificações foram feitas.

Após a aplicação do questionário, utilizou-se máquina fotográfica para registro de imagens de lesões no homem e nos animais e, assim como de alguns procedimentos relacionados ao manejo dos animais e ao uso de utensílios como, por exemplo, latão de aço para transporte do leite.

Todas as propriedades consideradas no presente estudo foram cadastradas com o

uso do GPS e tiveram sua posição geográfica exata registrada, pelo sistema de coordenadas, e anotada no questionário.

4.3 – Coleta, processamento e acondicionamento das amostras

Nas propriedades casos foram coletados epitélios lesados (crostas) das tetas quando estas estavam presentes e soros das vacas e de seus bezerros, para o diagnóstico etiológico. Nas propriedades controles foram coletados soros das vacas e de seus bezerros. As amostras foram coletadas pelo pesquisador, com auxílio de alguns veterinários do IMA e, eventualmente, com o auxílio de veterinário da prefeitura do município onde se encontrava localizada a propriedade.

Na maioria das propriedades, a coleta de material foi realizada uma única vez. Somente em 1/3 das propriedades casos os soros dos animais amostrados foram coletados a cada 2 a 3 meses, por 12 a 14 meses, para o monitoramento da curva de anticorpos neutralizantes para *Orthopoxvirus*.

Assim sendo, das 25 propriedades casos selecionadas, 14 foram monitoradas pelo período de 12 a 14 meses, conforme Tabela 3 abaixo.

Tabela 3. Número de propriedades casos e número de animais monitorados por categoria, por município trabalhado.

Município	Número de propriedades casos monitoradas	Número de animais monitorados		
		Vacas	Bezerros	Total
Mariana	10	70	80	150
Paulistas	03	14	24	38
São João Evangelista	01	7	7	14
Total	14	91	111	202

As informações relativas às amostras foram registradas em formulário específico para uso durante a colheita das mesmas,

contemplando a categoria do animal amostrado (vaca/bezerro), o tipo de material coletado, a fase da doença em que se

encontrava o animal ou ausência da mesma (Anexo 2).

4.3.1 – Sangue e soro sanguíneo

Os soros foram obtidos a partir da coleta do sangue, no momento da visita à propriedade, após a aplicação do questionário. As amostras de sangue/soro dos animais selecionados foram coletadas com o uso de tubo vacutainer e agulha individuais e descartáveis, nas veias jugular ou mamária, ou em algumas situações na veia caudal, após antisepsia do local com álcool 70%. Após a coleta, os tubos foram acondicionados sem refrigeração até completar a coagulação. Posteriormente, foram mantidos sob refrigeração, por cerca de 16 horas, e centrifugados a uma velocidade de 3.000 r.p.m., por 10 minutos, e o soro obtido foi transferido para tubos plásticos com tampa, que foram acondicionados e transportados sob refrigeração.

No Laboratório de Pesquisa em Virologia Animal da Escola de Veterinária-UFMG, os soros foram aliquotados e acondicionados em tubos ependorf de 1,5 mL, em 3 alíquotas, e mantidos a temperatura de -20°C, em caixas próprias identificadas com a palavra “caso” ou “controle”, nome da propriedade, nome do produtor, município, número do questionário, data da coleta e sigla criada para a propriedade. Mais tarde, uma alíquota de cada soro sanguíneo foi inativada a temperatura de 56°C, por 30 minutos para a prova de SN, e novamente aliquotada em volumes de 40 microlitos, em ependorf de 200 microlitos.

4.3.2 – Epitélio afetado (crostas)

Amostras dos epitélios afetados (crostas) das vacas e dos bezerros com doença foram coletadas nas propriedades onde a doença se encontrava na fase aguda durante a visita, com o objetivo de confirmação do diagnóstico. Para a coleta utilizou-se de pinça e as crostas foram acondicionadas em placa de petri, sob refrigeração, congeladas posteriormente e mantidas a uma temperatura de -20°C, para

pesquisa do vírus e/ou do DNA viral, no Laboratório de Virologia do ICB-UFMG.

4.4 – Teste de soroneutralização- SN

As amostras de soros coletadas das vacas e de seus bezerros, de todas as propriedades controles e daquelas propriedades casos monitoradas (1/3 dos casos), foram submetidas ao teste de soroneutralização por inibição do número de placas, em várias diluições na base 2 (20, 40, 80, 160, 320, 640 e 1280) para investigar a presença de anticorpos neutralizantes para *Orthopoxvirus*

Produção do vírus para utilização no teste de SN

4.4.1 – Cultivo de células VERO

Foram utilizado células VERO, uma linhagem de fibroblastos derivados do epitélio de rim de macaco verde *Cercopithecus aethiops*. As células foram cultivadas em garrafas de vidro, com Meio Mínimo de Eagle (MEM), com 5% de Soro Fetal Bovino (SFB), com gentamicina (1%), fungizona (0,5%) e penicilina e streptomomicina (1%), incubadas a 37°C.

4.4.2 – Multiplicação do *Vaccinia virus*

O VACV utilizado foi a amostra Western Reserve (VACV-WR), repassado pelo Laboratório de Vírus do ICB-UFMG.

Monocamadas com 100% de confluência foram infectadas com a multiplicidade de infecção (MOI) de 0,01. As garrafas inoculadas foram incubadas a 37°C, por 1 hora, para adsorção do vírus. Posteriormente foram adicionados MEM com 1% de SBF e as garrafas foram mantidas sob a mesma temperatura até o aparecimento do efeito citopático (ECP), até a destruição de 90% da monocamada. Após essa fase, o meio foi desprezado, as células foram raspadas e coletadas em tampão Tris-HCL 10 mM, pH 8,0. A suspensão de células foi então centrifugada, por 15 minutos a 1500 rpm (rotor H1000B-Sorvall RT6000 B), a 4°C, e o sedimento obtido foi

mantido a uma temperatura de -70°C, para purificação.

4.4.3 – Purificação do *Vaccinia vírus*

O produto obtido na multiplicação do vírus foi purificado segundo Joklik (1962). O sedimento foi ressuspensionado, centrifugado e os sobrenadantes reservados, enquanto os sedimentos celulares foram lisados e homogeneizados mecanicamente com “douncer”. As suspensões virais foram centrifugadas em colchão de sacarose para a separação dos restos celulares. Os sobrenadantes e a interface foram coletados, com pipeta pasteur, e o restante desprezado. Os sedimentos foram homogeneizados e sonificados, por 2 ciclos (Sonic Desmembrator-50, Fisher Scientific-USA).

Mais tarde os sedimentos foram centrifugados em gradiente de sacarose a 12.000 rpm (rotor AH 629-centrifuga Sorvall), a 4°C, por 45 minutos. As bandas relativas aos vírus foram coletadas com pipeta Pasteur e colocadas em Tris 10mM, pH 8,0, a 20.000 rpm (rotor AH 629 – ultracentrifuga Sorvall), a 4°C por 45 minutos. Finalmente, os sobrenadantes foram desprezados e os sedimentos ressuspensionados e homogeneizados e aliquotados em ependorfes, mantidos a -70°C.

4.4.4 – Titulação viral

Após a purificação, uma alíquota do vírus que se encontrava a -70°C foi utilizada para titulação, em placas de 06 wells, de acordo com metodologia descrita por Campos e Kroon (1993). Diluições decimais seriadas do vírus (10^{-1} a 10^{-12}) foram inoculadas sob monocamadas de células VERO e após 48 horas de incubação as monocamadas foram fixadas com cristal violeta a 1%, por 20 minutos e título viral estabelecido. Controles de viabilidade das células e de efeitos citotóxicos da monocamada foram realizados. O título viral foi calculado pelo número de placas obtidas na câmara da diluição que apresentou entre 30 a 300 placas de lise, multiplicado pelo inverso da

diluição e multiplicado pelo devido fator de correção para fazer a titulação para o volume de 1 mL. Mais tarde, uma outra titulação do vírus foi feita em placas de 24 wells.

4.4.5 – Teste de Soroneutralização

Parte dos soros coletados neste estudo foi testada pela técnica de SN em 24 wells, com a utilização dos soros padrões positivos e negativos previamente identificados entre aqueles coletados neste estudo. A SN foi realizada segundo Leparco-Goffart et al. (2005).

Na técnica de SN realizada em placas de 24 wells, o VACV amostra Western Reserve (WR) foi diluído, para produzir cerca de 15 a 50 placas de lise por câmara contendo a monocamada de células VERO, que foram incubadas até o aparecimento de CPE, por 48 a 72 horas. Posteriormente, as células foram fixadas em solução 10% de formol em PBS e a monocamada foi corada com solução de cristal violeta.

Os ensaios foram feitos sempre em duplicata para todos os soros testados. No caso dos soros das propriedades controles a prova de SN foi realizada em duplicata com uma repetição, em tempos diferentes, visando-se confirmar, com maior certeza, a presença de anticorpos neutralizantes nos animais provenientes das propriedades controles. Foram feitos controles de células, de vírus e dos soros padrões positivos e negativos. O título do soro foi calculado pelo inverso da maior diluição capaz de neutralizar 50% do número de placas que foram detectadas no soro controle negativo. Títulos maiores ou iguais a 20 foram considerados positivos. Os animais foram classificados como positivos ou negativos. No caso das propriedades controles trabalhou-se somente com a diluição de 20 vezes. Já para propriedades casos monitoradas trabalhou-se com a diluição ≤ 1.280 vezes.

Para traçar a curva de anticorpos neutralizantes para cada grupo, após agrupamento, os dados brutos dos títulos de

cada um deles foram transformados em log (base 2) e a média geométrica foi calculada para representação da curva do grupo. Os títulos de 20, 40, 80, 160, 320, 640 e 1280 correspondem aos seguintes valores, respectivamente, 4,3 / 5,3 / 6,3 / 7,3 / 8,3 / 9,3 e 10,3. Valores negativos (inferiores a 20) correspondem a 1.

4.5 – Isolamento viral e diagnóstico molecular

O isolamento viral e o teste de PCR para confirmação do diagnóstico de alguns casos trabalhados foram realizados no Laboratório de Vírus do ICB-UFMG. As técnicas foram realizadas segundo Meyer et al., 1997; Fonseca et al., 1998; Diniz et al., 2000; De Souza Trindade et al., 2003.

O material obtido das lesões foi utilizado para a inoculação em membrana corioalantóide (MCA) e em monocamadas de células VERO para detecção de efeito citopático. Ovos embrionados de galinha foram inoculados segundo a técnica convencional (Diniz et al., 2001). Os controles positivos foram realizados com os VACV amostra Western Reserve (WR).

O teste de PCR para diagnóstico de agentes virais em materiais clínicos foi realizado utilizando quatro genes característicos dos *Ortopoxvirus* que codificam a enzima timidina quinase (TK), o fator de crescimento do VACV (VGF), a proteína do corpúsculo de inclusão do tipo A (ATI) e a hemaglutinina viral (HA). As reações foram realizadas a partir dos DNAs extraídos de crostas ou de membranas e células inoculadas e seguiram protocolos descritos por Fonseca et al., 1998 e Trindade et al., 2003. Após a amplificação por PCR, algumas amostras foram sequenciadas e outras submetidas aos ensaios de RFLP (Polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição) utilizado o protocolo de digestão enzimática descrito por Meyer et al., 1997.

4.6 – Armazenamento e análise dos dados

Foi criado um banco de dados para registros das informações levantadas neste estudo, utilizando-se de softwares como EXCEL versão 2.0 e EPIDATA versão 3.3, que permitiram elaborar tabelas e gráficos para a reunião e análise dos dados obtidos.

Inicialmente o banco de dados foi criado no EPIDATA. Posteriormente, após digitação, os dados foram exportados para o EXCEL para conferência e correções. A análise propriamente dita foi feita no programa STATA versão 9.0. O processo de análise dos dados se deu em etapas, da seguinte forma: primeiramente, foi feita uma análise descritiva e uma análise univariada de todas as variáveis, com descrição da epidemiologia da doença, e, posteriormente, foi feita uma análise multivariada.

Nas análises descritiva e univariada todas as variáveis consideradas neste estudo foram analisadas através da comparação das frequências e médias, através dos testes do Qui-quadrado (X^2) e teste t de Student e com base nos cálculos da razão de chances ou *odds ratio* (OR) (Sampaio, 2002; Medronho, 2006). Cada variável foi analisada de forma comparada com os casos e controles, testando-se sua associação ou não com a doença. O teste X^2 foi utilizado para as variáveis qualitativas dicotômicas e o teste t de Student foi usado para as variáveis quantitativas, com comparação das médias, considerando-se o nível de significância 0,05. Para cada variável quantitativa foi feito o teste de variância e em seguida o teste t com variâncias iguais ou diferentes.

Posteriormente, pesquisou-se a existência de associação entre a doença e cada uma das variáveis, considerando-se o nível de significância 0,20 e mediu-se a intensidade desta associação através de OR. Nesta etapa, as variáveis dependentes que não apresentaram associação com a doença foram descartadas e aquelas que apresentaram associação foram trabalhadas na análise multivariada.

Na análise multivariada foi construído um modelo, buscando-se explicar a ocorrência

da doença e identificar prováveis fatores de risco para a mesma, utilizando-se da regressão logística múltipla e teste de verossimilhança (Dohoo, 2003; Medronho, 2006). O processo de construção do modelo levou em consideração todas as variáveis que tiveram p-valor $\leq 0,20$ na análise univariada, testando-se várias combinações delas, permanecendo incluídas no modelo final as variáveis importantes na epidemiologia da doença que mantiveram o p-valor $< 0,05$. Para cada uma das covariáveis foram calculadas as OR e o intervalo de confiança de 95%. Durante o processo de construção do modelo, testou-se a colineariedade das variáveis e aquelas co-relacionadas foram eliminadas. Possíveis interações entre as variáveis também foram testadas. Métodos de estudos de resíduos para identificação de casos atípicos ou de grande influência foram realizados (Hosmer

e Lemeshow, 2000). A Curva de Roc foi traçada e utilizada para avaliar a adequação do modelo.

5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 - Características dos municípios trabalhados

Em todos os municípios trabalhados a atividade pecuária se mostrou voltada principalmente para a produção de leite, com pequena quantidade de animais abatidos, conforme os dados e indicadores mostrados na Tabela 4 abaixo. Analisando a relação venda/compra (total de cabeças vendidas sobre o total de cabeças compradas) percebeu-se que a maior parte dos municípios é exportadora de animais, ou seja, venderam muito mais animais do que compraram.

Tabela 4. Dados e indicadores relacionados à atividade pecuária dos municípios trabalhados.

Município	NEA	AEA	EA	TCA	TCC	TCV	QPL	EB/AP (km ²)
Bambuí	1.293	130.414,15	81.453	1.091	8.851	14.369	33.135.501	63-92
Itamarandiba	1.695	157.580,96	28.111	222	1.498	3.082	6.493.008	93-121
Mariana	394	36.322,62	7.711	115	233	653	2.461.080	63-92
Mercês	559	24.454,09	16.307	273	1.258	2.035	6.834.689	93-121
Paulistas	301	22.261,91	9.637	25	383	620	3.389.194	63-92
Rio Pomba	398	18.096,02	11.559	103	676	1.778	8.587.564	93-121
Sabinópolis	887	78.540,70	24.243	156	1.266	2.623	10.962.349	63-92
São João Evangelista	685	41.748,77	24.795	29	1.538	1.592	7.992.447	93-121
Serro	836	52.834,87	29.155	313	2.192	2.470	12.231.526	63-92
MG	349.085	40.811.659,79	20.991.678	129.074	1.880.537	3.474.833	5.499.861.605	-

NEA = Número de estabelecimentos agropecuários
AEA = Área dos estabelecimentos agropecuários
EA = Efetivo de animais (bovinos)
QPL = Quantidade de leite produzida

TCA = Total de cabeças abatidas (bovinos)
TCC = Total de cabeças compradas (bovinos)
TCV = Total de cabeças vendidas (bovinos)
EB/AP (km²) = Efetivo bovinos / Área de pastagens

Considerando-se a importância da produção de leite neles, é provável que este trânsito tenha sido relacionado com o descarte de

vacas e a venda de bezerros para recria e engorda em outras áreas. O município de Bambuí se destacou com o maior rebanho

bovino e maior quantidade de leite produzida, seguido do Serro e Sabinópolis.

Já o município de Mariana apresentou o menor rebanho bovino e consequentemente a menor produção de leite. Apesar dos dados apresentados para a pecuária neste município, é sabido que a atividade de

mineração é predominante e muito mais importante do que a pecuária (IBGE, 2008).

5.2 - Distribuição dos casos selecionados por meses do ano

Os casos selecionados neste estudo ocorreram nos meses de junho a outubro. A Figura 6 abaixo, mostra esta distribuição.

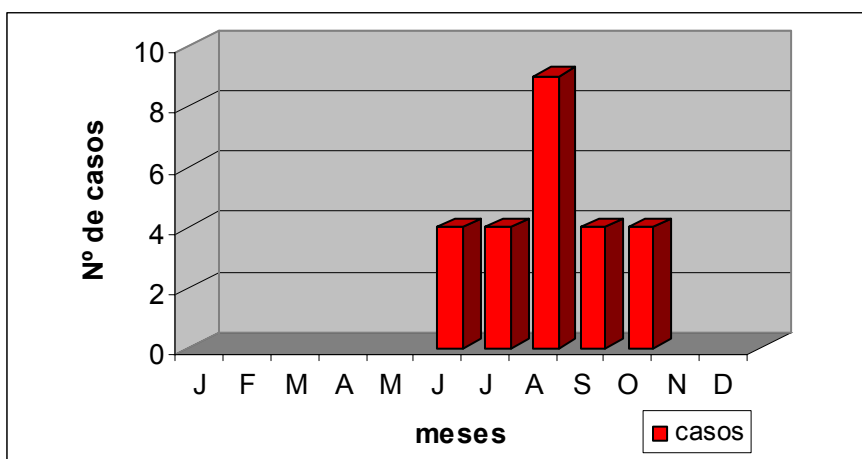


Figura 6. Distribuição dos casos selecionados por mês de ocorrência, no período 2005-2007.

Embora nem todos os casos de varíola bovina ocorridos no Estado de Minas Gerais no período compreendido pelo estudo tenham sido trabalhados, foi possível observar que os selecionados se concentraram nos meses de junho a outubro. Isto indica uma alta ocorrência da doença nestes meses, já que a seleção das fazendas foi feita com base nas fontes já citadas, sinalizando para uma sazonalidade e a existência de uma provável condição mais favorável para a doença nesta época do ano.

Estes resultados estão de acordo com Lobato et al. (2005) que observaram uma tendência a sazonalidade em um surto de varíola bovina ocorrido na Zona da Mata Mineira, no ano de 2001. Os autores relataram que 72% dos casos identificados ocorreram nos meses de julho a setembro, coincidindo com a época da seca. Os autores destacaram que a maior quantidade de suplementação alimentar dos animais,

como feno, silo e ração, na época da seca poderia favorecer a presença dos roedores nos arredores do curral.

A existência de traumatismos nas tetas das vacas nesta época do ano como um dos prováveis fatores predisponentes para a doença foi outro citado pelos autores.

De fato, durante este estudo, muitas vacas examinadas nos casos e controles apresentaram os tetos ressecados, com uma suave descamação da pele, e com presença de traumatismos, como por exemplo, cortes. Nesta época sabe-se que o capim fica bastante seco, o que poderia causar arranhões e cortes na pele da teta, favorecendo a entrada dos vírus.

5.3 – Animais existentes e animais amostrados nas propriedades casos e controles selecionadas

Ao todo foram envolvidos no estudo 5.925 animais. A Tabela 5 mostra o rebanho existente nas 72 propriedades, com total de animais e médias de animais por propriedade, por categoria animal.

Tabela 5 – Número médio e total de animais existentes por propriedade, nas 72 propriedades estudadas, por categoria animal.

Tipo		Categoria animal						Total
		Vacas	Vacas em lactação	Bezerros	Novilhas	Novilhos	Touros	
Média animais propriedade	de por	43	29	26	9	3	2	82
Número animais	de	3.077	2.058	1.853	672	214	109	5.925

Nas propriedades selecionadas, ao todo foram amostrados 896 animais. Vacas e bezerros foram amostrados em todas as propriedades. Entretanto, em algumas

situações as vacas não tinham seus bezerros ao pé, não sendo possível a coleta do sangue/soro dos mesmos. A Tabela 6 mostra estes dados por categoria animal.

Tabela 6. Total de animais amostrados neste estudo, por categoria animal.

Categoria	Animais amostrados		
Animal	Vacas	Bezerros	Total
Monitorados	91	110	201
Não monitorados	355	340	695
Total	446	450	896

5.4 – Amostras coletadas

– Soros coletados

Os animais não monitorados tiveram seus soros coletados por uma única vez. Já para aqueles animais monitorados foram realizadas de três a sete coletas de soros perfazendo um total de 1.470 soros coletados, sendo 766 dos animais monitorados.

– Crostas coletadas e diagnóstico laboratorial

Foram coletadas crostas de 24 animais pertencentes a 13 propriedades casos para exames laboratoriais e confirmação do diagnóstico.

Todas as amostras de crostas coletadas dos animais afetados das propriedades casos revelaram tratar-se de VACV. O diagnóstico foi realizado através das técnicas de PCR e/ou isolamento viral em ovos embrionados, citadas na metodologia, e os resultados encontram-se na Tabela 7.

Tabela 7 Resultados dos testes laboratoriais para crostas coletadas nos casos, por município.

Município	Nº de casos com coleta de crostas	Nº de vacas com coleta de crostas	Data da coleta	Diagnóstico Laboratorial	
				Isolamento em MCA ^b	PCR ^c (gene vgf)
BambuÍ	01	3	30.06.05	Positivo	Positivo
BambuÍ	01	3	09.08.05	Positivo	Positivo
Mercês	01	2	23.08.05	Positivo	Positivo
Serro	01	1	04.10.05	Positivo	Positivo
Serro	01	2	06.10.05	NR ^d	Positivo
Mariana	01	3	30.08.06	NR	Positivo
Mariana	02	2	01.09.06	NR	Positivo
Mariana	01	1	14.09.06	NR	Positivo
Mariana	01	4	19.09.06	NR	Positivo
Paulistas	2	3	19.10.06	NR	Positivo
São João Evangelista	01	Pool ^a	02.08.06	NR	Positivo
TOTAL	13	24	-	04	11

Fonte: Laboratório de Vírus, ICB, UFMG.

^aPool=crostas de várias vacas, não individualizadas.

^bMCA=membrana corioalantóide

^cPCR para *Orthopoxvirus*

^dNR=não realizado

Os resultados acima indicam que houve o envolvimento do VACV em todas as fazendas pesquisadas. Também foi possível comprovar que havia vírus infeccioso e viável em algumas crostas já que conseguiu-se isolar o vírus de todas as crostas inoculadas em MCA.

5. 5 – Perfil dos entrevistados

Os entrevistados foram proprietários, filhos de proprietários ou retireiros (Tabela 8). Para os casos e controles, a maior parte deles era o proprietário.

Tabela 8. Função dos entrevistados nas 25 propriedades casos e nas 47 controles.

Caracterização	Casos		Controles		Total	
	n	%	n	%	n	%
Proprietário	20	80,0	35	74,5	55	76,4
Filho do proprietário	2	8,0	3	6,4	5	6,9
Retireiro	3	12,0	9	19,1	12	16,7

A maioria dos proprietários era também ordenhador dos rebanhos, demonstrando o predomínio do uso de mão-de-obra familiar nas propriedades selecionadas, sugerindo tratar-se de pequenos negócios, com pouco

investimento em pessoal. A realização da entrevista com o proprietário, ordenhador de seu próprio rebanho, gerou uma expectativa de respostas mais corretas e mais

condizentes com a realidade, sugerindo maior confiabilidade.

5.6 - Estudo de caso-controle e modelo para a doença

5.6.1 - Análises descritiva e univariada

5.6.1.1 – Características estruturais das propriedades

- Área dos estabelecimentos amostrados

A comparação do tamanho médio das propriedades mostrou valor de p não significativo (0,06), demonstrando uma grande variação dos valores individuais, porém sem diferença significativa entre o tamanho da propriedade dos casos (163,3) e dos controles (90,72) e, portanto, sem associação entre esta variável e a ocorrência da doença.

Os resultados encontrados sugerem que as propriedades amostradas são pequenas (IMA, 2008).

_ Finalidade da produção

Nenhuma propriedade amostrada apresentou a finalidade corte. Em todas elas os bovinos eram criados com a finalidade de produção de leite ou de leite e corte (mista), com predomínio da produção de leite nos casos (80,0%) e nos controles (87,3%). O teste X^2 revelou que não houve diferença significativa entre os casos e controles ($p=0,41$). Nenhuma associação entre a ocorrência da doença e a variável finalidade da produção foi observada.

É sabido que a pecuária mineira apresenta tendências homogêneas quanto às formas de organização da produção pecuária. Por isto deve ser considerado que, embora as

propriedades casos e controles tenham sido amostradas de forma aleatória, atendendo aos critérios pré-estabelecidos para seleção dos mesmos, é possível que as características da organização da pecuária da área estudada, com predomínio da finalidade para leite, tenham influenciado na probabilidade de não se amostrar rebanhos de corte, considerando-se a homogeneidade das sub-regiões. Como citado anteriormente, o Estado apresenta sub-regiões homogêneas quanto à organização da pecuária e o universo amostrado também segue essa tendência, com predomínio de propriedades com finalidade de produção de leite, com uma menor probabilidade de se amostrar propriedades do tipo corte.

Por outro lado, todos os casos da doença descritos na literatura ou acompanhados no campo ou ainda informados por comunicação pessoal, ocorridos em Minas Gerais e no Brasil, nos últimos tempos, ocorreram em rebanhos com finalidade de produção de leite ou mistos. Isto é explicado pela epidemiologia da doença e pelo manejo diferenciado dos rebanhos. Varíola bovina é transmitida, principalmente, de animal para animal através das mãos do homem (ordenhador), durante o processo de ordenha dos animais, manejo típico de pequenas propriedades com finalidade de produção de leite.

Isto significa que fazendas de corte onde eventualmente exista ordenha, a doença poderá ocorrer.

_ Tamanho dos rebanhos

O tamanho médio do rebanho bovino foi maior nas propriedades casos do que nas controles (Tabela 9). Para todas as categorias, com exceção de touros, as médias dos casos foram superiores.

Tabela 9. Tamanho médio dos rebanhos nos 25 casos e nos 47 controles e número médio de animais por categoria, com respectivos valores de p no teste t, em nível de significância 0,05.

Categoria	Casos			Controles			p
	Média	95% IC		Média	95% IC*		
Vacas em lactação	40.36	22.54	58.17	22.31	16.60	28.03	0,05
Bezerros	36.96	20.02	53.89	19.76	14.28	25.24	0,05
Vacas	60.36	32.15	88.56	33.36	23.63	43.08	0,07
Novilhas	9.44	2.12	16.75	9.27	5.67	12.88	0,96
Novilhas	9.44	2.12	16.75	9.27	5.67	12.88	0,96
Touros	1.48	1.00	1.95	1.53	.95	2.11	0,88

*IC=Intervalo de confiança

O número médio do total de animais (cabeças de bovinos) nas propriedades casos foi de 111,8 e nas controles 66,5 animais, sem diferença significativa.

As categorias vacas, vacas em lactação e bezerros apresentaram as maiores diferenças entre casos e controles. Para estas duas últimas categorias os valores de p (0,05) foram significativos, revelando uma associação com a doença, com maior importância do que as demais categorias.

Considerando a epidemiologia da doença, embora a espécie bovina seja susceptível à doença, as categorias vacas em lactação e bezerros foram as sempre afetadas (Schatzmayer et al., 2000; Trindade et al., 2003; Nagasse-Shugara et al., 2004; Lobato et al., 2005; Leite et al., 2005; Megid et al., 2008) e o acometimento de outras categorias nunca foi descrito. No caso das vacas em lactação, isto é explicado pelo tipo de manejo das mesmas que exige contato direto com a teta, seja com as mãos do ordenhador ou com as teteiras da ordenhadeira mecânica, para retirada do leite, o que não acontece com as demais categorias, convencionalmente.

As categorias novilhas, novilhos e touros apresentaram valores médios muito próximos para casos e controles, sem diferença estatística entre elas. Destas, é maior o número de novilhas, o que pode ser explicado pela necessidade de reposição das vacas no rebanho e retenção das mesmas na propriedade. Como ficou demonstrado, a finalidade da produção

predominante não é do tipo corte e poucas têm a finalidade mista, o que explica o pequeno número de cabeças de novilhos existentes na propriedade. Através das entrevistas pôde-se constatar que, na maioria dos casos, os novilhos eram apenas recriados e vendidos, nunca terminados para o abate. Já a presença dos touros se deveu ao processo de monta natural adotado, também visualizado no momento da visita à propriedade.

- Cobertura e tipo de piso de curral

Essa condição de estrutura é importante para a higienização do estabelecimento, facilitando ou não a limpeza e a aplicação de desinfetantes, bem como de sua ação na destruição de agentes causadores de doenças. Os poxvírus são altamente resistentes (Fenner, 2000) e as condições ambientais e a presença de matéria orgânica dificulta a higienização facilitando a persistência dos vírus, possibilitando a reinfecção. Também a presença do sol é importante para determinar a umidade dos currais favorecendo a sobrevivência de agentes patogênicos. Além disso, os raios ultra-violeta ajudam na destruição de muitos agentes infecciosos presentes no ambiente.

Nos casos e controles esta condição dos currais quanto ao tipo de piso foi bastante semelhante, com percentuais muito próximos, sem diferença significativa, sem associação com a doença, ao nível de significância 0,05% (p=0,995). Conforme a Figura 7, os tipos do piso observados foram: terra, concreto, calçado, parte-calçado e cascalho.

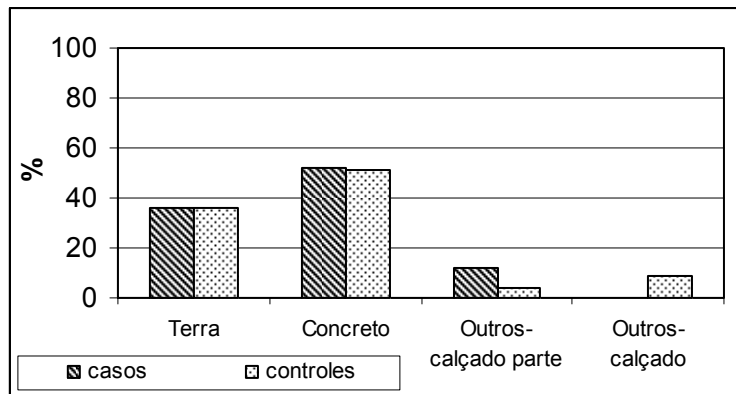


Figura 7. Distribuição do tipo de piso de curral nos 25 casos e nos 47 controles.

O tipo concreto foi o mais observado, tanto para os casos quanto para os controles, seguido de curral com piso de terra que foi observado em praticamente 1/3 das propriedades casos e controles. O piso de terra oferece uma condição totalmente desfavorável para higienização, principalmente pela dificuldade de eliminar matéria orgânica.

Outros tipos de pisos encontrados foram o calçado, calçado-parte e cascalho. De forma semelhante ao piso de terra, eles dificultam também a higienização do estabelecimento.

A quase totalidade dos currais de ordenha era coberta (Figura 8). Não houve diferença das proporções e, portanto, nenhuma associação estatística com a doença ($p=0,46$).

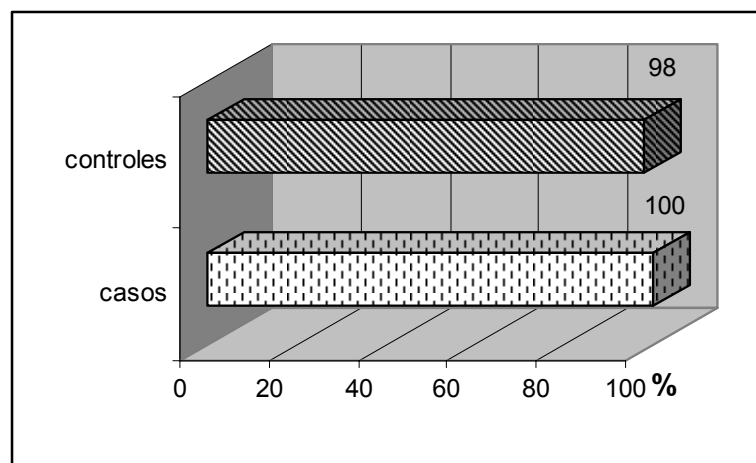


Figura 8. Percentual de curral de ordenha coberto nos 25 casos e nos 47 controles.

5.6.1.2 – Características do manejo sanitário

Para as propriedades casos, o uso de produtos para desinfecção dos estabelecimentos, mãos e tetas foi analisado em dois tempos, antes (A) e após (B) a ocorrência da doença na propriedade, para melhor retratação da realidade.

A) Uso da desinfecção antes da ocorrência da doença na propriedade

- Já utilizava estes produtos antes do aparecimento da doença

Esta investigação foi feita nos casos, no momento da visita, para esclarecer a partir

de que momento o produtor passou a utilizar os produtos para a desinfecção, na tentativa de eliminar erros quando da análise destes dados e responder perguntas do tipo: a desinfecção era utilizada antes do foco como medida preventiva, ou a desinfecção passou a ser utilizada a partir do momento do aparecimento do foco, como medida de tratamento? Este item se refere aos procedimentos de desinfecção, como um todo, realizados pelo produtor, ou seja, se refere a desinfecção do estabelecimento, das mãos e da tetas.

Observou-se que 84,0% dos casos não utilizavam das medidas de desinfecção antes do aparecimento da doença. Em contrapartida, somente 24% dos controles não utilizavam (Figura 9).

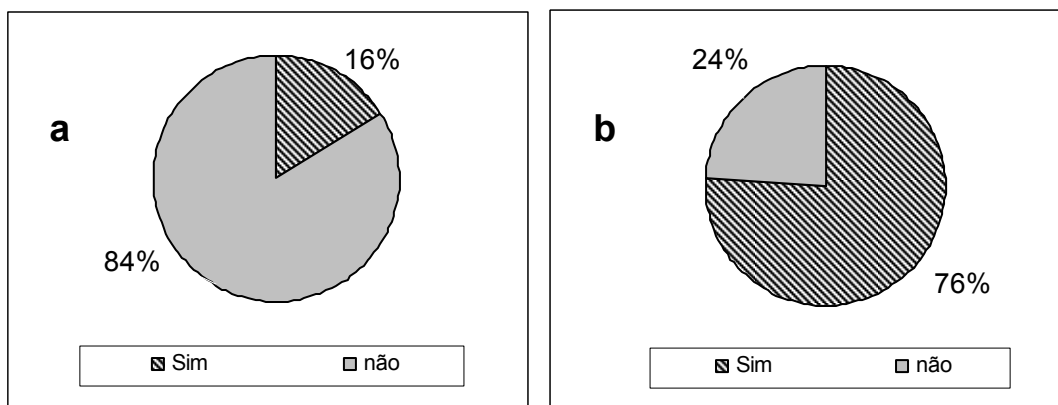


Figura 9. Percentual de produtores que utilizavam os produtos para desinfecção do estabelecimento, das mãos e das tetas antes (a) e depois (b) do aparecimento da doença nos 25 casos.

Como é sabido, o uso de desinfetante minimiza a carga viral no ambiente e também nas mãos dos ordenhadores, reduzindo riscos de transmissão da doença para humanos e animais, diminuindo consequentemente o número de infectados.

Então, com base na Figura 9, foi possível constatar que nos casos a desinfecção era realizada somente em 16,0% das propriedades, de forma preventiva, enquanto que nos controles era realizada em 25,5% a 51,1% das propriedades

(considerando estabelecimento, mãos e tetas), com uma diferença significativa entre casos e controles, como mostrado na análise univariada, com associação com a presença da doença. Essa diferença foi maior para a desinfecção das mãos (16,0% nos casos e 51,1% nos controles) e das tetas (16,0% nos casos e 44,7% nos controles).

Estes dados estão de acordo com o que realmente acontecia nos casos. Do momento do surgimento dos casos até

nosso conhecimento (através das fontes já citadas) e viabilização e efetivação da visita ao mesmo, muitos dias se passavam e o produtor já tomava algumas medidas para conter o problema. Estas medidas eram repassadas pelos veterinários que atendiam o foco ou, muitas vezes, por outros produtores que tiveram o problema ou que tinham ouvido falar do problema na região. Em alguns casos o produtor tinha lido sobre a doença (revistas para produtor rural) ou tinha visto na televisão (programas do tipo Globo Rural). Por outro lado percebeu-se que, no momento da visita à propriedade, nos casos eram utilizados os produtos mais adequados, em maior número de propriedades, em momentos mais adequados como, por exemplo, a desinfecção das mãos entre uma vaca e outra (29,4% nos casos e 12,5% nos controles), sinalizando para adoção das medidas recomendadas (Tabelas 19 e 20).

B) Uso da desinfecção após a ocorrência da doença na propriedade

- uso de desinfecção do estabelecimento no momento da visita (após a doença na propriedade)

Na data da visita a grande maioria das propriedades casos, que não utilizavam produtos para desinfecção do estabelecimento, mãos e tetas, antes da doença aparecer na propriedade, passaram a utilizar. Por isto quando analisamos a utilização de produtos para desinfecção do estabelecimento, na data da visita à propriedade, não houve diferença significativa para casos e controles. A maioria delas não utilizava desinfetante para higienização do estabelecimento, apenas 28,0% dos casos e 25,5% dos controles (Figura 10).

Os produtos mais utilizados para a higienização dos estabelecimentos foram cal virgem, cloro e creolina, tanto nos casos como nos controles (Tabela 10).

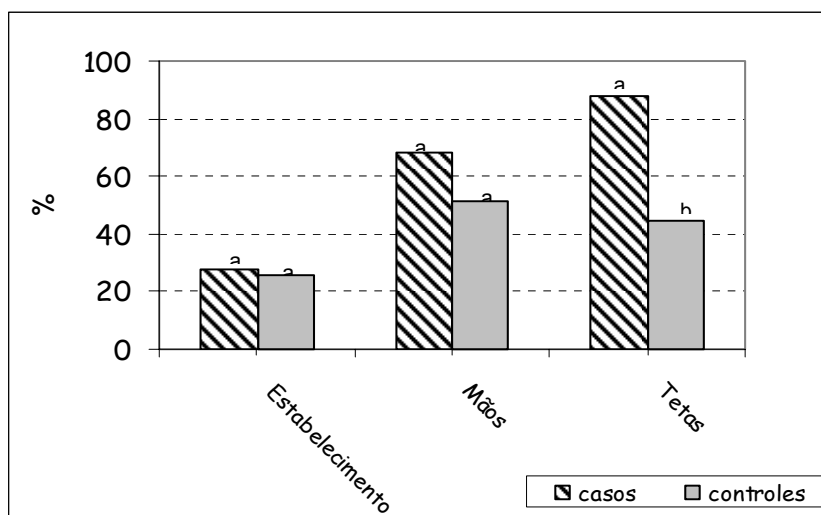


Figura 10. Distribuição da variável desinfecção do estabelecimento, das mãos e das tetas e respectivos valores de p no teste de proporção, em nível de significância 0,05, no momento da visita à propriedade.

Tabela 10. Tipos de produtos utilizados para a desinfecção do estabelecimento nos 25 casos e nos 47 controles, no momento da visita.

Variável	Casos		Controles	
	Nº	%	Nº	%
Cal virgem	4	50,0	3	25,0
Cloro	2	25,0	2	16,7
Carrapaticida	1	12,5	1	8,3
Creolina (cresóis e fenóis)	1	12,5	1	8,3
Cloro-creolina	0	0,0	2	16,7
Detergente	0	0,0	1	8,3
Iodo	0	0,0	1	8,3
Master clean	0	0,0	1	8,3

As frequências mais observadas para desinfecção dos estabelecimentos foram diariamente e semanalmente (Tabela 11). Somente nos casos foi observada a prática da desinfecção diariamente. Casos e controles faziam a desinfecção semanalmente também. Outras frequências citadas pelos produtores e mais utilizadas, de forma semelhante nos casos e controles, foram mensalmente (4), esporadicamente

(3) e de 3 em 3 meses (3), demonstrando que a desinfecção dos estabelecimentos era bastante deficiente em todas as propriedades. Como demonstrado acima, aproximadamente 1/4 das propriedades casos e controles faziam a desinfecção do estabelecimento. Além disso, a desinfecção era feita em intervalos grandes, condição favorável para aparecimentos de doenças.

Tabela 11. Distribuição da variável frequência para desinfecção do estabelecimento, no momento da visita.

Variável	Caso (n=25)		Controle (n=47)	
	Nº	%	Nº	%
Diariamente	0	0,0	3	25,0
3 x semana	0	0,0	0	0,0
Semanalmente	1	12,5	1	8,3
15 em 15 dias	0	0,0	0	0,0
outros	7	8,75	8	66,7

- Desinfecção das mãos no momento da visita (após a doença na propriedade)

A maior parte dos casos (68,0%) e controles (51,1%) utilizava produtos para desinfecção das mãos no momento da visita, entretanto não houve diferença significativa nos casos e controles. Os produtos mais utilizados

foram o cloro, cloro e iodo, iodo, detergente, sabão e álcool (Tabela 12). Cloro foi o mais utilizado tanto nos casos (70,6%) como nos controles (54,2%), seguido do cloro-iodo e iodo. Dos produtos relatados, cloro e iodo são realmente os produtos mais comumente utilizados e indicados para desinfecção das mãos em propriedades.

Tabela 12. Tipos de produtos utilizados para a desinfecção das mãos nos casos e nos controles, no momento da visita à propriedade.

Variável	Casos		Controles	
	n	%	n	%
Álcool	0	0,0	2	8,3
Cloro	12	70,6	13	54,2
Cloro-iodo	4	23,5	1	4,2
Cloro-farmaron (betametasona)	0	0,0	1	4,2
Detergente	0	0,0	2	8,3
Iodo	1	5,9	3	12,5
Sabão	0	0,0	2	8,3

- Desinfecção das tetas no momento da visita (após a doença na propriedade)

A desinfecção das tetas das vacas era realizada em 88% dos casos e em 44,7% dos controles. O teste de proporções demonstrou diferença significativa entre casos e controles, no momento da visita à propriedade. Os casos faziam a desinfecção no dobro de estabelecimentos, comparado com os controles.

Os desinfetantes utilizados foram o cloro, iodo e a combinação dos dois (cloro-iodo) (Figura 11). Tanto para casos como para

controles o cloro foi mais frequente (54,6% e 47,6%), seguido do iodo. Esses dados demonstram que para a desinfecção das tetas eram utilizados os produtos recomendados.

Deve-se considerar que fica difícil avaliar a eficiência desta medida já que não foi acompanhada a aplicação dos mesmos e não foram avaliadas as diluições usadas, o modo de aplicação, o modo de conservação dos produtos, entre outros.

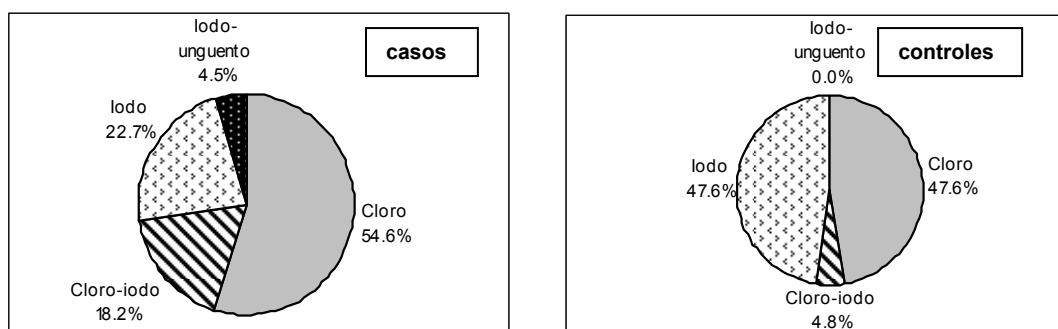


Figura 11. Tipos de produtos utilizados para a desinfecção das tetas nos casos e nos controles, no momento da visita à propriedade.

De modo geral, a desinfecção das tetas das vacas era feita com maior frequência antes da ordenha e no início e final da ordenha (Tabela 13). Nos casos predominou a frequência no início e no final da ordenha (41,2%), mas a desinfecção acontecia

também antes da ordenha e entre uma vaca, com percentuais bem próximos (23,5% e 29,4%). Em contrapartida, nos controles predominou a desinfecção antes da ordenha em 66,7% dos estabelecimentos.

Tabela 13 – Frequências utilizadas para desinfecção das mãos e tetas nos casos e nos controles, no momento da visita à propriedade.

Variável	Casos				Controles			
	Mão		Tetas		Mãos		tetas	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Antes da ordenha	4	23,5	6	27,3	16	66,7	9	42,9
Entre uma vaca e outra	5	29,4	1	4,5	3	12,5	0	0,0
No início e no final da ordenha	7	41,2	8	36,4	1	4,2	5	23,8
outros	1	5,9	7	31,8	4	16,7	7	33,3

5.6.1.3 – Características da ordenha

_ Litros de leite/dia

A produção média de leite/dia, antes da doença ocorrer, foi de 240,3 L nas

propriedades casos, e de 140,7 L nas controles. Embora a produção de leite nos casos tenha sido de quase o dobro (1,7 vezes) não houve diferença significativa entre as médias ($p=0,08$), nem associação desta variável com a doença (Figura 12).

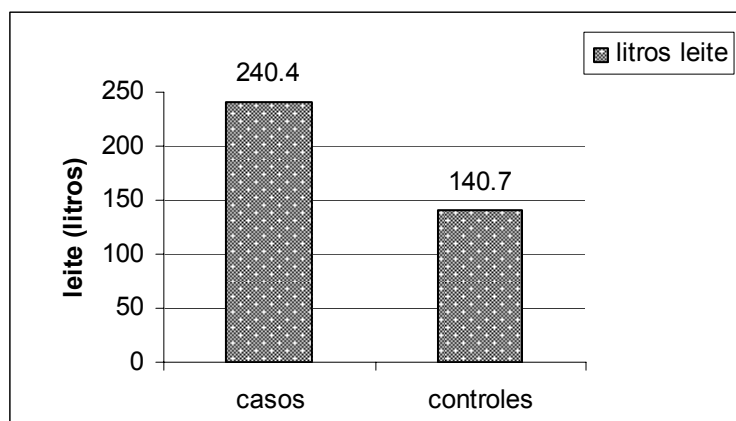


Figura 12. Produção média de leite/dia antes da doença ocorrer nos 25 casos e nos 47 controles.

O maior volume de leite produzido nas propriedades casos parece estar diretamente relacionado com o tamanho dos rebanhos, ou seja, com maior número de cabeças e com maior número de vacas em lactação. Considerando que são pequenas propriedades e que não é uma realidade a existência de vacas altamente produtoras, é esperado que maiores rebanhos, com finalidade de produção de leite produzam mais litros do produto.

- Tipo de ordenha

Como pode ser visto na Figura 13, o tipo de ordenha predominante nas propriedades foi a manual, com índices de 100% nos casos e 87,2% nos controles. O valor de p encontrado não foi significativo ($p=0,06$) em nível de significância 0,05%, demonstrando não ocorrer associação entre tipo de ordenha e varíola bovina. Entretanto, pode ser visto que o valor de p encontra-se muito próximo do limite de aceitação estatística e talvez tenha sido influenciado

negativamente pelo tamanho da amostra trabalhada em relação à ordenha mecânica, já que amostras maiores tendem a apresentar menor erro padrão. O mais freqüentemente observado e relatado é a ocorrência de varíola bovina em rebanhos com ordenha manual, embora casos esporádicos da doença têm sido relatados em propriedades com ordenha mecânica. Além disso, Lobato et al. (2005) observaram taxas de ataque inferiores em propriedades com ordenha mecânica quando comparadas com propriedades com ordenha manual. Como relatado por estes autores isto provavelmente se deve ao manejo diferenciado nas propriedades onde a utilização de desinfetantes para higienização das teteiras diminui a sobrevivência de vários patógenos, reduzindo a carga microbiana e diminuindo a probabilidade de transferência da doença de um animal para outro e para o homem, contribuindo para uma menor disseminação da doença entre propriedades e dentro das propriedades.

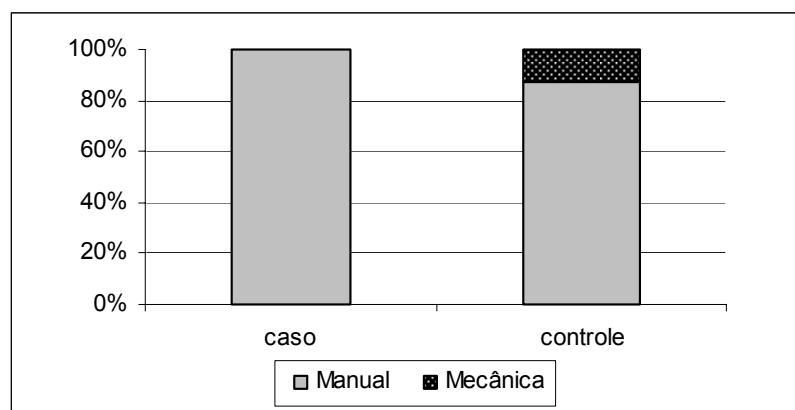


Figura 13. Distribuição do tipo de ordenha, nos 25 casos e nos 47 controles.

- Número de ordenhas

As ordenhas foram realizadas sempre uma ou duas vezes ao dia, sem nenhuma associação entre esta variável e a doença

(Tabela 14). Nenhuma propriedade apresentou 3 ordenhas diárias.

Tabela 14. Distribuição da variável número de ordenhas, nos casos e controles e respectivo valor de p, no teste χ^2 , em nível de significância 0,05.

Variável	Caso (n=25)		Controle (n=47)		p
	n	%	n	%	
Uma	15	60,0	29	61,7	0,888
Duas	10	40,0	18	38,3	
Três	0	0,0	0	0,0	

5.6.1.4 – A Doença

- Tempo decorrido entre a visita e o início da doença

Quanto ao tempo decorrido entre o início da doença e a visita à propriedade, em média, se passaram 29 dias, sendo que a maioria das propriedades foi visitada no 32º dia da doença (Tabela 15).

Tabela 15. Tempo (dias) decorrido entre o início da doença e a visita nos casos.

Variável	Caso (n=25)	
	n	%
11 a 19	6	24,0
20 a 29	8	32,0
30 a 39	6	24,0
40 ou mais	5	20,0

O conhecimento do momento exato do surgimento dos casos e consequentemente do tempo decorrido entre o início dos casos e a visita à propriedade é muito importante para a análise das variáveis, como por exemplo, tipo de lesão e sua evolução, curva de anticorpos e duração da doença no animal e no rebanho. Em consequência da

visita tardia, na maioria dos casos estudados não se observou lesões típicas da fase inicial da doença clínica.

Vários foram os fatores que contribuíram para que a visita fosse realizada tardiamente nos casos. Um deles foi a subnotificação. Muitos casos não foram notificados pelos produtores e só foram identificados mais tarde, por terceiros, seja por veterinários ou pessoas da comunidade. Outro fato foi a demora na notificação dos casos. Normalmente os produtores demoraram a comunicar o surgimento dos casos, só os fazendo tardiamente. Também o processo de viabilização das visitas aos casos contribuiu para isto. Além da burocracia existente para a obtenção da autorização para visita à propriedade, os procedimentos relativos à liberação de recursos e veículos, por exemplo, foram muito lentos.

- Conhecimento dos ordenhadores/ produtores sobre a doença

Pudemos observar que 56% dos produtores relataram que tinham conhecimento da doença. A maioria deles se informou através de outros proprietários. Técnicos ou veterinários foram fontes de informação

para aproximadamente $\frac{1}{4}$ deles. Rádio teve importância limitada e televisão e jornal ou revista não foram citados. Outras fontes

como o leiteiro, o filho e a casa revendedora de produtos foram citados (Figura 14).

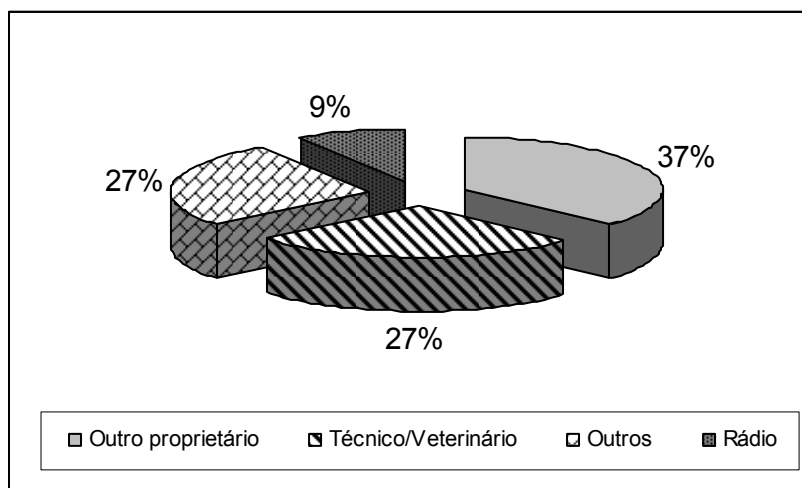


Figura 14. Distribuição das fontes de informação sobre a doença para os 56% dos produtores dos casos que tinham conhecimento prévio da doença.

Observou-se neste trabalho e no decorrer dos anos de estudo que o conhecimento da doença antes dela aparecer na propriedade é muito importante do ponto de vista da prevenção e controle e tem se mostrado uma ferramenta de baixo custo.

A experiência com o acompanhamento de vários focos no Estado tem mostrado que não adquirir animais doentes é uma das formas de prevenção mais importantes, e para isto, conhecer a procedência dos animais a serem adquiridos e examiná-los no momento da compra se faz relevante. Também a adoção de medidas como uso de desinfetantes do tipo cloro e iodo ou a combinação deles nas mãos e tetas das vacas ajudam a reduzir as taxas de ataque nos animais, se a doença for introduzida na propriedade, além de contribuírem para a não infecção nos ordenhadores.

Normalmente estas medidas preventivas não implicam em muitos custos e os produtos citados acima para desinfecção encontram-se disponíveis nas áreas rurais. Ao contrário, os custos com tratamento de animais e seres humanos afetados tem

mostrado a necessidade de disponibilização de recursos financeiros significativos, além das perdas econômicas conseqüentes da doença.

Estes achados sugerem que os produtores não tinham hábitos de ler revistas técnicas nem de assistir programas voltados para o produtor rural e que a assistência veterinária não era realizada da forma sistemática. Por outro lado demonstra que eles se informavam uns com os outros. O desconhecimento sobre a doença também está de acordo com o observado em relação às medidas de desinfecção do estabelecimento, das mãos e tetas e, talvez, possa explicar o fato da maioria deles só ter adotado estes procedimentos após a introdução da doença na propriedade.

Um fato importante é que o veterinário do IMA, sediado na região, em muitas situações, repassou medidas de controle para os proprietários na ocasião em que foi programar a visita ao foco para fins desta pesquisa, explicando também o fato dos produtores dos casos estarem utilizando medidas mais adequadas no momento da

nossa visita, embora não tivessem conhecimento da doença antes dela aparecer.

Baseado nestes dados é possível constatar a necessidade de divulgação de informações sobre a doença bem como das suas medidas de controle e prevenção. Para isto, com base na Figura 14, as formas mais adequadas seriam a realização de palestras para os produtores rurais e para veterinários com atuação nas áreas rurais.

Dos 25 apenas 3 não souberam informar e 22 deram respostas variadas que ajudaram no esclarecimento das formas de transmissão entre propriedades e na identificação da origem da doença, permitindo estabelecer alguns vínculos epidemiológicos entre alguns casos.

Os produtores foram perguntados sobre uma possível explicação para o aparecimento da doença e deram as seguintes respostas:

- Adquiriu vaca parida
- Adquiriu animais
- Caminhão de ração – Caminhão tanque de leite

- Gado comprado de fora
- Gavião
- Latão de leite
- Latão de leite (alça) (o ordenhador que trabalhava no tanque de expansão comunitário)
- O vizinho teve – latão de leite
- Ordenhador de outra propriedade com a doença
- Trânsito de ordenhadores
- Vaca na estrada
- Vaqueiro e vaca de fora
- Veio de outros lugares
- Vento

- A doença nos animais

Quanto aos animais domésticos, a doença ficou restrita aos bovinos, mostrando ser esta espécie altamente susceptível. Os animais afetados foram sempre vacas em lactação e bezerros em fase de amamentação, que mamavam nas vacas doentes. Nenhuma outra categoria de bovinos foi afetada (Tabela 16).

Tabela 16. Número de animais doentes (N) e taxa de ataque, por categoria animal, nos 25 casos.

Categoria animal	Casos	
	N	TA (x 100)
Vacas em lactação	501	49,7
Vacas secas	0	0
Bezerros	42	4,5
Novilhas	0	0
Novilhos	0	0
Touros	0	0
Total	543	8,6

TA= taxa de ataque

Estes resultados estão de acordo com o observado em outros focos de varíola bovina acompanhados no Estado, no período de 2000 a 2008, e com a literatura consultada (Damaso et al., 2000; De Souza Trindade et al., 2003; Leite, 2003; Leite et al., 2003; Nagasse-Sughara, 2004), quando somente vacas e bezerros foram afetados.

A taxa de ataque descrita para as vacas foi superior à documentada para bezerros. Em 40,0% dos casos mais da metade das vacas foram afetados, sendo que os índices variaram de 7,1% a 95,0%.

As taxas de ataque nas vacas em lactação encontradas aqui foram inferiores do que

aquelas descritas por Lobato et al. (2005), no surto da Zona da Mata, quando foram registrados índices entre 80 e 100% nas fazendas de ordenha manual e índices de 25 a 30% nas fazendas de ordenha mecânica. Talvez isto possa ser explicado pelo menor conhecimento da doença que o produtor e dos próprios veterinários que assistiam os focos tinham naquela época, levando a não adoção de medidas de controle adequadas.

Quanto à localização das lesões nas vacas, as tetas e úberes foram os mais acometidos (Figura 15).

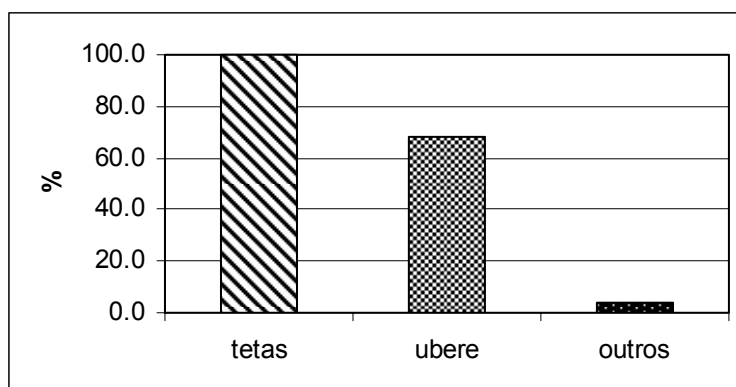


Figura 15. Localização das lesões nas vacas nas 25 propriedades casos.

Nos bezerros, em 11 propriedades não houve registro de lesões. Estes valores encontrados estão de acordo com o descrito por Lobato et al. (2005) que encontraram somente 21% das propriedades com lesões

nos bezerros. Quanto à localização, as lesões ocorreram principalmente nas gengivas e focinho, embora língua e narinas tenham sido afetadas (Figura 16) (Figuras 17 a 20).

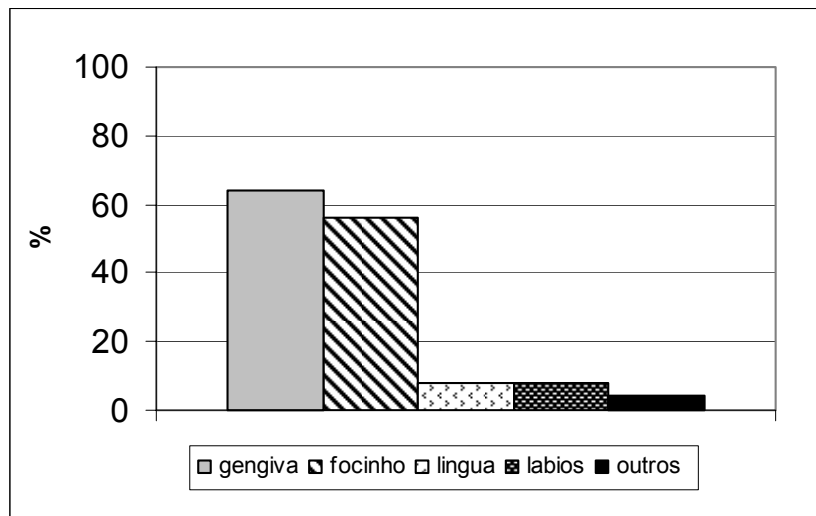


Figura 16. Localização das lesões nos bezerros nas 25 propriedades casos.



Figura 17. Lesões típicas de varíola bovina identificadas na cavidade oral de bezerro infectado, município de Serro-MG, ano de 2005.

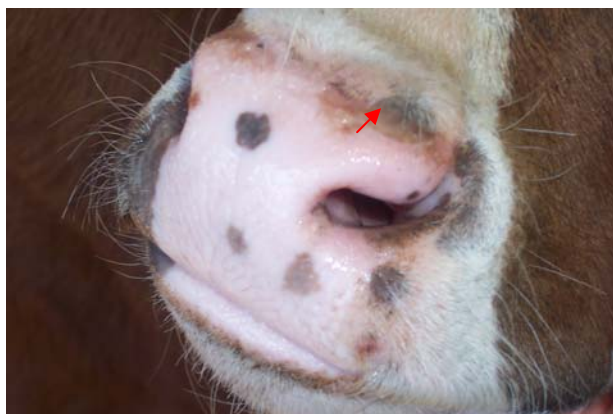


Figura 18. Lesões típicas de varíola bovina no focinho de bezerro infectado, município de Mariana, ano de 2006.



Figura 19. Lesões típicas de varíola bovina identificadas na gengiva de bezerro infectado, município de Mariana, ano de 2006.



Figura 20. Lesões típicas de varíola bovina identificadas na língua de bezerro infectado, município de Sabinópolis, ano de 2007.

Observou-se que as lesões nas vacas eram sempre mais graves e mais facilmente notadas pelos ordenhadores, quando comparado com as lesões dos bezerros. Além disso, percebeu-se que os ordenhadores tinham o hábito de examinar as tetas da vaca diariamente, o que não era realidade para os bezerros. Em muitas situações os ordenhadores relatavam a não existência de sinais clínicos nos bezerros e ao nosso exame clínico ficava comprovada a presença das lesões, o que o deixava surpreso, demonstrando que eles realmente não tinham conhecimento da existência delas. Esses achados também foram descritos no Rio de Janeiro, São Paulo, Minas Gerais e outros estados (Damaso et al., 2000; Schatzmayr et al., 2000; Trindade et al., 2003; Leite et al., 2003; Nagasse-Sughara, 2004).

A maior frequência das lesões nas tetas pode ser explicada pelo contato direto do ordenhador com as mesmas, diferentemente dos úberes, com o qual têm menos contato. Ainda em relação ao úbere, o bezerro pareceu ter importância no espalhamento das lesões, fazendo movimentos característicos com a cabeça e focinho (normalmente com lesões) junto a ele durante a mamada. Também as tetas tocam o úbere quando a vaca deita, podendo facilitar o espalhamento dos vírus nesta região.

Nas vacas as lesões mais frequentes foram do tipo úlceras e crostas. Pápulas foram pouco observadas. Mamite foi frequentemente constatada e outras infecções secundárias foram pouco notadas (Tabela 17).

Tabela 17. Distribuição dos sinais observados nas vacas e bezerros nas 25 propriedades casos.

Local	Vacas em lactação		Bezerros	
	n	%	n	%
Pápula	14	56,0	2	8,0
Vesícula	21	84,0	2	8,0
Úlcera	23	92,0	17	68,0
Crosta	22	88,0	0	0
Mamite	17	68,0	-	-
Infecção secundária da ferida	2	8,0	--	--

Estes achados estão de acordo com a evolução da doença e são condizentes com o momento da visita à propriedade, já que em média a doença estava ocorrendo há 29 dias. Normalmente o processo inicia-se com o desenvolvimento de um eritema cutâneo característico pelo aparecimento de pequenas manchas que evoluem para vesículas, que são as primeiras lesões a surgirem e logo evoluem para úlceras que evoluem para crostas, acometendo grandes áreas das tetas, permanecendo por mais tempo, cicatrizando dentro de 15 a 20 dias, como também descrito por Breman e Henderson (2002) (Figuras 21 a 24).

Observou-se que a evolução da doença dentro do rebanho não se deu da mesma forma para todos os animais e, frequentemente, foi possível identificar simultaneamente animais em diferentes fases da doença. No mesmo momento de observação, algumas vacas apresentaram-se com lesões do tipo vesículas, outras úlceras, muitas com crostas e em processo de cicatrização. Em uma mesma vaca foi possível identificar diferentes tipos de lesões, em diferentes tetas, embora um deles predominasse e caracterizasse a fase da doença.

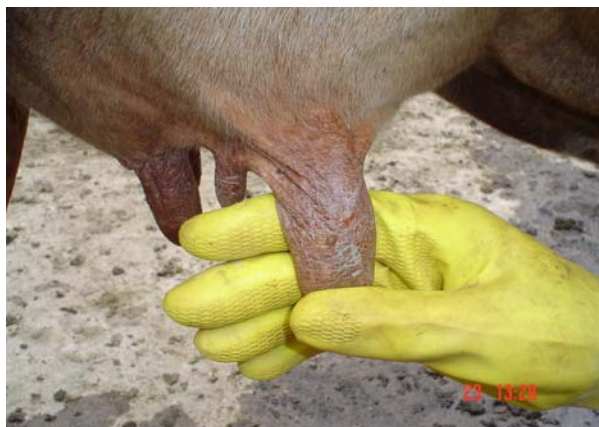


Figura 21. Lesões típicas de varíola bovina (vesículas) identificadas na teta de vaca infectada, município de Mariana-MG, ano de 2006.



Figura 22. Lesões típicas de varíola bovina (úlceras) identificadas na teta de vaca infectada, município de Rio Pomba-MG, ano de 2005.



Figura 23. Lesões típicas de varíola bovina (úlceras-crostas) identificadas na teta de vaca infectada, município de Bambuí-MG, ano de 2005.



Figura 24. Lesões típicas de varíola bovina (úlceras-crostras) identificadas na teta de vaca infectada, município de Mariana-MG, ano de 2006.

A ocorrência das mamites levou à diminuição da produção de leite e aumento dos custos para seu controle (Figuras 25 a 27). Muitos foram os casos constatados de lesão irreversível nas tetas e no úbere, com perda de tetas e até perda total da função de produção de leite. Um caso raro com

necrose do úbere por infecção secundária foi observado (Figura 28). Neste último citado, a vaca já apresentava sinais de infecção generalizada, com alteração dos movimentos respiratórios e sinais de debilidade e fraqueza.



Figura 25. Mamite observada em vaca infectada com varíola bovina, município de Paulistas-MG, ano de 2006.



Figura 26. Mamite observada em vaca infectada com varíola bovina, município de Sabinópolis-MG, ano de 2007.



Figura 27. Mamite observada em vaca infectada com varíola bovina, município de Sabinópolis-MG, ano de 2007.

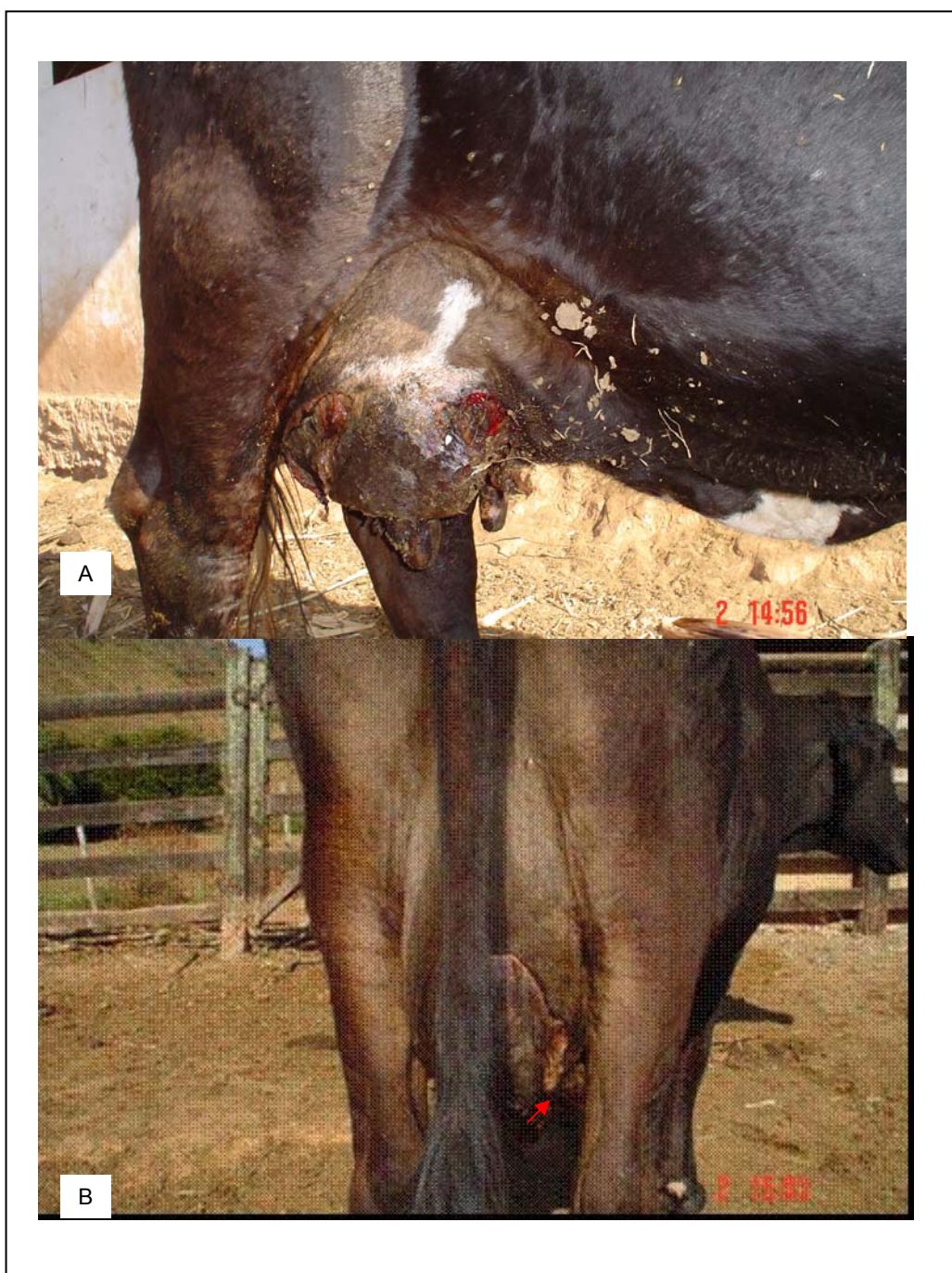


Figura 28. Mamite observada em vaca infectada com varíola bovina, com quadro de necrose do úbere e infecção sistêmica (A e B), no município de São João Evangelista-MG, ano de 2006.

- Tempo médio de duração da doença no rebanho e nas vacas

O tempo médio de duração da doença (primeiros sinais até a completa cicatrização), relatado pelos ordenhadores, foi de 29 dias (12 a 60 dias) no rebanho e de 25 dias (3 a 60 dias) nas vacas.

- Queda na produção de leite

Mesmo com a ocorrência da doença a quase totalidade dos produtores (96,0%)

continuaram ordenhando as vacas normalmente, mas em 72,0% das propriedades houve queda na produção de leite. A Figura 29 mostra o volume de leite produzido diariamente (em litros) antes e após o surgimento da doença, bem como a queda observada na produção. Os dados foram repassados pelos produtores, com base nos seus relatórios de entrega de leite fornecidos pelos laticínios ou em alguns casos com base em suas próprias experiências, sem o auxílio de instrumentos precisos para medição, em muitas propriedades.

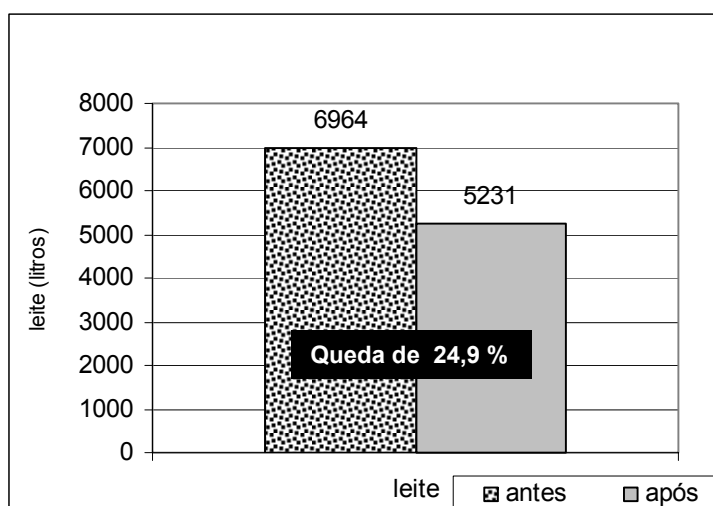


Figura 29. Total de litros de leite produzidos antes e após a doença e queda observada na produção nos casos.

A queda de leite pode ser explicada pela dificuldade de ordenhar em função da presença das lesões, processo extremamente doloroso, devido ao processo inflamatório nas tetas e úbere, e também em função da presença de mamite. Na fase inicial da doença principalmente, as vacas estavam com os úberes quentes e edemaciados e demonstraram dor durante a ordenha, apresentando-se inquietas e agitadas mesmo quando contidas com as cordas, e em consequência disso feridas se formaram nos membros posteriores correspondentes ao local da corda de contenção (Figuras 14 e 15).

- Tratamento dos animais

Todos os produtores trataram os animais. Foram utilizados produtos como o cloro e o iodo e outros combinados (Tabela 18).

Tabela 18 – Distribuição da variável tipo de tratamento adotado nos casos.

Variável	Casos	
	n	%
Cloro	7	28,0
Iodo	6	24,0
Cloro-iodo	8	32,0
Outros	4	16,0

Não foi possível avaliar a eficiência dos tratamentos utilizados nestas propriedades porque não houve acompanhamento delas após as visitas. Porém, a experiência com outros focos da doença mostrou que estas medidas são eficazes, contribuindo para a redução da taxa de ataque e também das infecções secundárias, acelerando a cicatrização das feridas, diminuindo o tempo de duração da doença nos animais e conseqüentemente no rebanho.

5.6.1.5 – Ordenhadores

- Idade dos ordenhadores

Nas propriedades amostradas trabalhavam um total de 131 ordenhadores. Em média os ordenhadores dos casos tinham 35 anos de idade e aqueles dos controles 38 anos, com variações de 14 a 76, e 15 a 74 respectivamente. Não houve diferença significativa entre as idades e nenhuma associação dessa variável com a doença (Tabelas 19 e 20).

Tabela 19. Distribuição dos ordenhadores existentes e doentes, nos casos (25) e nos controles (47), segundo a idade.

Ordenhadores	Casos (57 ordenhadores*)				Controles (71 ordenhadores*)	
	Existentes		Doentes		Existentes	
	N	%	N	%	N	%
Até 25 anos	15	26,8	11	73,3	13	18,3
Acima de 25 anos	41	73,2	28	68,3	58	81,7

*Um ordenhador dos casos e três ordenhadores dos controles não informaram a idade.

Tabela 20 – Variáveis relacionadas aos ordenhadores nos 25 casos e nos 47 controles e respectivos valores de p no teste t.

Variável	Casos				Controles				p
	n*	Média	95% IC		n	Média	95% IC*		
Idade (anos)	56	35	31.18	38.95	71	38	34.57	41.87	0,24
Tempo de trabalho (anos)	54	16	11.06	22.42	68	20	14.88	24.94	0,40
Trabalham em outra propriedade	57	0.12	0.05	0.23	74	0.09	0.03	0.18	0,60
Possuíam outros animais	57	0.31	0.19	0.45	74	0.36	0.25	0.48	0,55
Os animais adoeceram	57	0.07	0.00	0.13	74	0	0	0	0,02

*n=número de ordenhadores informantes

*IC = Intervalo de confiança

A idade dos ordenhadores pode significar uma maior ou menor probabilidade da existência de uma vacinação prévia contra varíola humana e conseqüentemente a presença de alguma imunidade contra VACV. Assim sendo, alguns trabalhos têm comparado a severidade das lesões nos ordenhadores vacinados e não vacinados contra varíola humana e têm descrito

diferenças significativas, com lesões mais brandas em ordenhadores vacinados. Entretanto, Megid et al. (2008) observaram que a severidade das lesões em ordenhadores vacinados e não vacinados foram semelhantes, em um surto na região sudeste do estado de São Paulo.

Tempo de trabalho na propriedade

O tempo médio de trabalho dos ordenhadores nas propriedades foi de 17 anos nos casos e 20 anos no controle (Tabela 20). Essa média alta foi devido ao fato de muitos ordenhadores serem os proprietários, que se encontravam trabalhando em seus próprios negócios por vários anos, alguns por toda a vida útil.

- Trabalham em outra propriedade

Alguns ordenhadores trabalhavam em outras propriedades, sendo 12,0% nos casos e 9,0% nos controles. Entretanto não houve diferença significativa entre as médias e nenhuma associação desta variável com a doença (Tabela 20). Sabe-se que o fato do ordenhador trabalhar em duas propriedades pode facilitar a transmissão da doença entre elas. Em muitas situações, inclusive neste estudo, foi comprovado que os ordenhadores foram fontes de infecção para a introdução da doença na propriedade, demonstrando ser uma das formas mais importantes para transmissão da doença, depois da introdução de animais doentes. Também Megid et al. (2008), acompanhando um surto de varíola bovina na região sudeste de São Paulo-SP, relataram que em duas das quatro fazendas acometidas, um mesmo ordenhador foi responsável pela ordenha dos animais.

- Possuíam bovinos

Não houve diferença entre casos e controles quanto ao fato dos ordenhadores possuírem animais em outras propriedades (Tabela 20). Como mencionado acima, muitos ordenhadores eram os próprios produtores e possuíam outros animais em outras propriedades.

Nos casos, um total 16 ordenhadores possuíam animais em outras propriedades. Destes, 12 possuíam animais da espécie bovina, ou seja, 21% dos ordenhadores dos casos possuíam animais em outras propriedades.

- Os bovinos que possuíam adoeceram

Nos casos, considerando apenas aqueles ordenhadores que possuíam bovinos (12/57), quatro tiveram seus animais doentes em outras propriedades, indicando uma possível transmissão da doença de um rebanho para outro através deles.

- Os sinais nos ordenhadores

- Os locais das lesões nos ordenhadores

Em 84% das propriedades casos a doença acometeu seres humanos, com o envolvimento de pelo menos um ordenhador. Do total de 57 ordenhadores existentes nas propriedades casos, 40 adoeceram (70% de doentes).

Daqueles quatro ordenhadores que tiveram seus animais doentes em outras propriedades, citados no item anterior, dois estavam doentes; contribuindo ainda mais para a possibilidade de uma provável transmissão da doença, através das mãos dos ordenhadores, para outras propriedades e outros rebanhos.

Nos ordenhadores, a infecção se caracterizou pela presença de lesões ulcerativas e pustulares, localizadas principalmente nas mãos, acometendo também antebraços e raramente face e outros membros. Linfadenopatia e úlceras foram os sinais clínicos mais relatados, seguidos de dor e febre. Pápulas e vesículas foram menos citados (Tabela 21) (Figuras 30 a 33).

Tabela 21. Frequência dos sinais observados nos ordenhadores doentes nos 25 casos.

Variável	Casos	
	n*	%
Pápula	9	22,5
Vesícula	22	55,0
Úlcera	38	95,0
Crosta	8	20,0
Dor	35	87,5
Febre	35	87,5
Linfadenopatia	38	95,0

*n=40 ordenhadores



Figura 30. Lesão causada por varíola bovina, no braço de ordenhador, no município de Paulistas-MG, ano 2006.



Figura 31. Lesão causada por varíola bovina, no joelho de ordenhador, no município de Mariana-MG, ano 2006.



Figura 32. Lesão causada por varíola bovina, na mão de ordenhador, no município de Serro-MG, ano 2006.



Figura 33. Lesão causada por varíola bovina, na mão de ordenhador, no município de Mariana-MG, ano 2006.

Estes achados estão de acordo com os outros pesquisadores (Damaso et al., 2000; Schatzmayr et al., 2000; Leite et al., 2003; Trindade et al., 2003; Nagasse-Sughara, 2004). De forma semelhante aos animais, pápulas e vesículas não são lesões muito características da doença no homem, provavelmente por surgirem no início da doença, com curto período de duração, dificultando a sua percepção. A formação de crostas foi pouco relatada ao contrário do observado em vacas, talvez devido aos cuidados dispensados às feridas, com uso de medicamentos tópicos e até mesmo devido à remoção delas.

As lesões relatadas pelos ordenhadores doentes, e em muitos casos observadas diretamente, estavam localizadas principalmente nas mãos (97,5%) e antebraços (35,0%), sendo que somente um ordenhador relatou não ter tido lesões nas mãos e sim no antebraço (Tabela 22). Rosto, braço e perna foram pouco

acometidos. Nenhum relato de exposição de todo o corpo e do tronco foi feito ou observado. Outras partes do corpo como calcanhar (04) e joelho (2) foram citadas (Fotos 21 e 22).

Tabela 22. Localização das lesões nos ordenhadores doentes nos 25 casos.

Local	Casos	
	n*	%
Mãos	39	97,5
Antebraço	14	35,0
Braço	2	5,0
Rosto	2	5,0
Tronco	0	0,0
Perna	2	5,0
Todo corpo	0	0,0
Outras**	6	15,0

*n=40 ordenhadores

**calcanhar (10,0%) e joelho (5,0%).

Tais achados estão de acordo com os relatos de outros autores (Damaso et al., 2000; Schatzmayr et al., 2000; Leite et al., 2003; Nagasse-Sughara, 2004, Lobato et al., 2005). Entretanto nunca foi relatada a observação das lesões nas pernas, no calcanhar e nos joelhos, o que é perfeitamente possível, considerando-se que as mãos podem apresentar grandes quantidades dos vírus nas feridas, caso não seja feita uma boa higienização e desinfecção das mesmas. Megid e colaboradores (2008) relataram lesão no rosto, na boca, no nariz e inclusive no olho de ordenhadores. Em princípio, a infecção de outras partes do corpo acontecerá toda vez que existir soluções de continuidade (condição essencial para penetração dos vírus) e o contato direto das mãos infectadas com estas soluções.

Quanto aos ordenhadores que não adoeceram (17), fatores, como exemplo, a existência de infecção prévia e a adoção de medidas adequadas de controle, envolvendo a desinfecção das mãos e tetas poderiam contribuir para explicar o fato. Além destes, a existência de um fator individual de resistência à doença não pode ser descartada, embora pouco provável e nunca descrita na literatura.

Destes 17 ordenhadores que não adoeceram, 10 encontravam-se em

propriedades com no mínimo um ordenhador doente. Porém chamou-nos a atenção o fato de que sete encontravam-se em quatro propriedades onde não houve doença clínica no homem.

Na tentativa de entender melhor o porquê da não transmissão da doença para estes ordenhadores nestas quatro propriedades, particularidades de cada uma delas foram revistas e apresentadas a seguir.

Em todas estas propriedades a ordenha dos animais era feita manualmente, sem a utilização de produtos para desinfecção para mãos e tetas antes da doença surgir, embora todos eles tenham relatado ter conhecimento prévio da doença. Os animais continuaram sendo ordenhados normalmente. Segundo os entrevistados, os animais foram tratados com iodo ou cloro.

Analisando tudo isto, observou-se que todas estas condições são favoráveis para a ocorrência e para a transmissão da doença para os ordenhadores, com exceção do tratamento dos animais, que não foi detalhado.

A Tabela 23 mostra mais algumas características importantes na epidemiologia da doença que foram observadas nestas propriedades.

Tabela 23. Características relacionadas com a ocorrência da doença observadas nas quatro propriedades onde a doença não acometeu os seres humanos.

Características	Fazendas			
	07	10	44	58
Tempo decorrido entre o surgimento da doença nos bovinos e a realização da visita (dias)	45	30	25	12
Nº de ordenhadores existentes	3	1	1	2
Idade dos ordenhadores	55			
	45			35
	45	41	38	14
Desinfecção das mãos ^a	NR ^c	NR	Cloro Início e final da ordenha ^b	NR
Desinfecção das tetas ^a	lodo Após a ordenha ^b	Cloro	Cloro Início e final da ordenha ^b	Cloro Antes da ordenha ^b
Taxa de ataque (%) observada nas vacas no momento da visita	95,0	41,2	62,5	26,9

^a = procedimentos adotados após o surgimento da doença

^b = frequência da desinfecção

^cNR= não realizado

Quanto ao tempo decorrido entre o surgimento da doença e a visita, em todas as propriedades ele foi superior ao considerado para o período de incubação. A idade dos ordenhadores, na sua grande maioria superior a 35 anos, sugere que talvez possa existir ainda uma certa proteção contra a doença devido à existência de uma provável vacinação contra varíola humana. Entretanto isto não seria verdade para o ordenhador de 14 anos de idade, considerando-se que a vacinação contra a varíola humana foi suspensa no mundo por volta de 1970.

Quanto às medidas de desinfecção, elas foram adotadas tardiamente, após o surgimento da doença clínica, havendo tempo suficiente para a penetração dos vírus nos organismos dos ordenhadores, assim como ocorrido nas vacas, levando-se em conta que o período de incubação é bastante semelhante para os dois. Também as taxas de ataque observadas nas vacas,

relativamente altas, sugerem que as medidas adotadas não foram eficazes.

Analisando desta forma, restam as características relacionados aos vírus, que poderiam estar ligadas a uma maior ou menor capacidade de infectar e causar lesões nos ordenhadores. Também existe a possibilidade de infecção subclínica nestes. Nenhum teste sorológico foi realizado para comprovar a presença de anticorpos anti orthopoxvirus.

- A doença no ordenhador

- Procurou médico

Em média a doença durou 17 dias nos ordenhadores (desvio padrão = 8,89 dias). A assistência médica foi procurada pela maioria deles, ou seja, dos 40 que ficaram doentes, 34 procuram médico. O setor público foi mais procurado do que o privado (Figura 34).

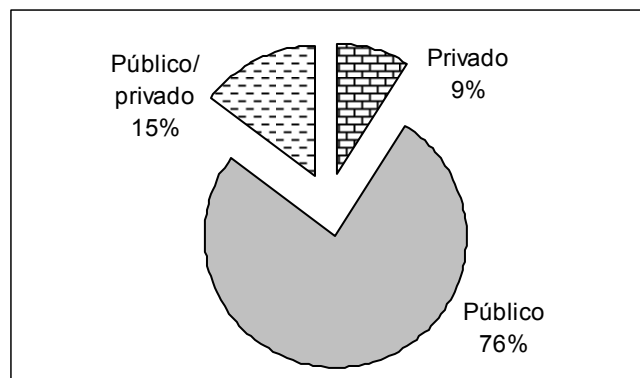


Figura 34. Distribuição dos tipos de assistência médica procurada pelos ordenhadores doentes nos 25 casos.

A procura da assistência médica por 85,0% dos ordenhadores doentes retrata a severidade da enfermidade e seu impacto na saúde pública. A maior utilização do posto de saúde local pode ser justificada pela sua maior disponibilidade no interior do estado, quando comparado com a existência de médicos particulares, além do caráter gratuito do atendimento nos postos.

Estes resultados encontrados chamam a atenção para a importância de treinamento dos médicos que trabalham nas áreas rurais, com repasse de informações técnicas sobre a doença e de dados de registros de ocorrência da mesma. Especialmente os médicos que prestam atendimento nos serviços públicos de saúde local devem ser treinados, pois os dados mostraram que este tipo de serviço foi o mais procurado. Durante o acompanhamento de alguns focos no Estado, contatos com o serviço de saúde local foram feitos e percebeu-se a falta de conhecimento sobre esta enfermidade tanto por parte dos profissionais dos serviços de saúde local dado seu caráter reemergente.

- Qual o tratamento recomendado

- Foi hospitalizado / ficou afastado do trabalho

Todos os 34 ordenhadores que procuraram assistência médica foram tratados, mas só 30 deles souberam informar o tratamento recomendado ou apresentaram os

medicamentos usados ou os receituários prescritos. Entre os vários tratamentos médicos citados, destacaram-se o uso de:

- antibióticos (25/30);
- antitérmicos e analgésicos (10/30);
- antiinflamatórios (3/30) e
- vacina anti-tetânica (01/30).

A maioria dos ordenhadores relatou que não foi hospitalizada, com exceção de dois que assim o fizeram. Entretanto, 45,6% deles (26 ordenhadores) informaram que ficaram afastados do trabalho por 7 dias em média.

Estes resultados comprovaram os gastos com recursos para aquisição de medicamentos destinados ao controle da doença no homem. Especificamente o uso de antibióticos sinaliza para ocorrência de infecções secundárias nas feridas ou a tentativa de evitá-las. Da mesma forma, o afastamento dos ordenhadores doentes contribuiu para os prejuízos causados, criando a necessidade de contratação de novas pessoas para manejar o rebanho, implicando em mais gastos com recursos humanos e perdas econômicas. Em muitos casos os novos ordenhadores contratados adoeceram também. Em uma propriedade, antes da adoção de medidas para controle, o número de ordenhadores contratados chegou a 11.

Além disso, observamos que alguns ordenhadores foram internados em hospitais, o que pode significar um risco de

transmissão da doença do homem para homem, caso os devidos cuidados não sejam tomados. Considerando a existência de outras pessoas doentes e em tratamento, de crianças e de pessoas imunossuprimidas nos hospitais, este risco de transmissão pode ser ainda maior, podendo implicar em infecção generalizada.

- Conhece outros ordenhadores que tiveram a doença

- Quem, onde, quais pessoas

Os ordenhadores dos casos foram investigados quanto o conhecimento de outras pessoas infectadas e 61,4% deles relataram conhecer outros ordenhadores doentes em outras propriedades, no município ou na região estudada.

Nessas informações foram citados nove dos casos trabalhados neste estudo e 4 casos desconhecidos. Mais uma vez, estes resultados sugerem que os ordenhadores dos casos tiveram algum contato, direto ou indireto, com outros ordenhadores doentes, sinalizando para a existência de prováveis vínculos epidemiológicos entre as propriedades casos, importantes do ponto de vista do estabelecimento da dinâmica de como a doença ocorreu, da identificação dos casos índices/primários/secundários, das fontes de infecção e formas de transmissão.

É certo que o questionário de investigação aplicado, da forma como foi elaborado, não permitiu identificar e estabelecer tais vínculos, nem mesmo medi-los ou quantificá-los. Contudo, durante as visitas, considerando as situações vividas e presenciadas, outras informações foram percebidas como, por exemplo: existe parentesco entre alguns casos (mãe e filho, primos, irmãos); muitos proprietários e/ou ordenhadores são amigos que se visitavam e se ajudavam. Alguns foram solidários com os outros e emprestaram vacas em lactação para os vizinhos na época da doença. Outros fizeram a ordenha para os companheiros em caráter de substituição, por amizade. Embora estas informações,

não sistematizadas e não padronizadas, não tenham sido utilizadas neste estudo, na análise estatística, permitindo comparar casos e controles, elas serviram para mostrar que existem outras realidades cotidianas, que são pouco investigadas normalmente nas pesquisas veterinárias, e que poderiam ser melhor trabalhadas porque ajudariam a esclarecer o surgimento da doença em muitas situações, principalmente nas doenças raras (pouco conhecidas e entendidas) e nas zoonoses (com participação direta do homem).

Neste estudo, por exemplo, é verdade que em muitos casos não foi possível ter conhecimento suficiente para explicar o surgimento da doença na propriedade. Da mesma forma, é sabido que esta dificuldade de identificar as origens dos focos também existe para outras doenças, principalmente sob programas de erradicação, como, por exemplo, em alguns casos de ressurgimento da febre aftosa em áreas livres no Brasil e no mundo, onde não foram identificadas as origens.

- Outras pessoas adoeceram

Em 23 propriedades casos os ordenhadores informaram que nenhuma outra pessoa da família ou outro morador foi acometido. Porém, em dois casos outras duas pessoas da família foram acometidas pela doença.

Eles foram um irmão e um primo, moradores de outras propriedades localizadas na região. Nestes dois casos, a doença parece ter sido adquirida dos animais, através da ordenha manual. Os produtores relataram que os parentes ajudaram na ordenha dos animais na ocasião da visita.

Novamente a existência de parentesco entre ordenhadores doentes se destacou, como demonstrado nos dois casos acima, em que primos e irmãos estão ligados a um mesmo caso.

Embora não tenha sido relatada nenhuma transmissão entre humanos, a ocorrência da doença nos ordenhadores atualmente alerta

para a possibilidade disso acontecer. Conforme descrito na literatura, ocorre a transmissão do vírus vacinal de homem para homem (infecções secundárias a partir da vacinação). Isto poderia acontecer com o vaccínia bovina também. Talvez estes vírus isolados no Brasil ainda não estejam tão adaptados para o homem como demonstram estar para os animais. Entretanto, este potencial de risco não pode ser totalmente ignorado. Por outro lado, é sabido que a grande maioria da população humana encontra-se susceptível ao vírus vaccínia. Além disso, pessoas em tratamento com corticóides, com AIDS, com tuberculose ou outras doenças imunossupressoras, existentes na população humana hoje, são ainda mais susceptíveis.

5.6.1.6 – Formas de transmissão da doença

A transmissão entre animais ocorreu por meio das mãos dos ordenhadores e a penetração dos vírus se deu provavelmente por soluções de continuidade em lesões pré-existentes nas tetas e úbere das vacas, conforme já citado por Damaso et al. (2000); Schatzmayr et al. (2000) e Trindade et al. (2003).

A doença foi transmitida dos animais para os seres humanos que se infectaram através do contato com as lesões presentes nas tetas dos animais doentes. Na

totalidade dos focos os ordenhadores contraíram a doença através do contato direto com a teta da vaca durante os procedimentos da ordenha.

Entre fazendas, em alguns casos, a doença foi transmitida pela introdução de animais doentes no rebanho e por ordenhadores que ordenharam animais doentes em outras propriedades.

A importância de outros fatores como, por exemplo, manipulação de latões de leite contaminados, presença de roedores silvestres que podem funcionar como reservatórios do vírus e resistência dos animais à doença foram observados neste estudo e são discutidos a seguir.

- Introdução de animais

A introdução de animais nas propriedades nos últimos 30 dias, tendo como referência a data da entrevista, foi relatada por 40,0% dos casos e por 25,6% dos controles (Figura 35). Um total de quatro propriedades controles não informou sobre o fato. O teste de proporções revelou não existir diferença entre estes valores ($p=0,21$), ao nível de significância de 0,05. Apesar de estatisticamente não se comprovar diferenças entre casos e controles quanto à introdução de animais neste estudo, uma maior atenção deve ser dada a esta variável e algumas considerações devem ser feitas.

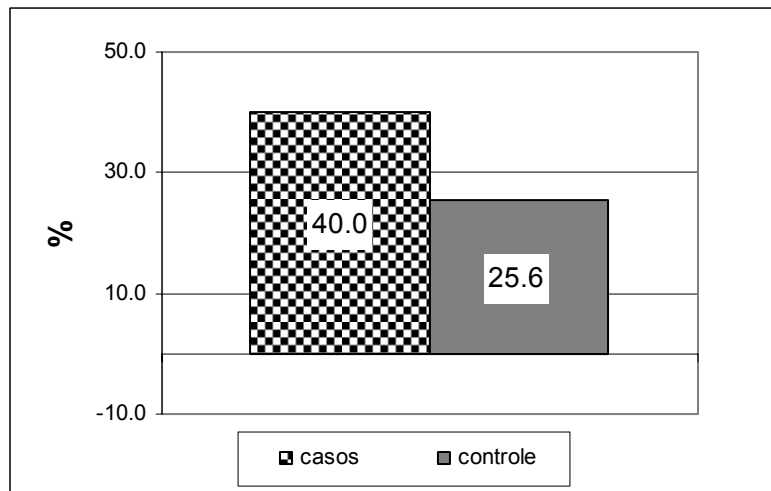


Figura 35. Percentual de propriedades casos e controles que adquiriram animais nos 30 dias anteriores a visita à propriedade.

Com base no conhecimento teórico e prático da epidemiologia da doença, especialmente nos modos de transmissão entre propriedades, é possível dizer que uma das formas importantes de transmitir a doença é introduzir animais doentes. Em muitos casos acompanhados e investigados, as fontes de infecção para a propriedade foram animais doentes introduzidos. Muitos relatos de casos citam como principais fontes de infecção para a propriedade a introdução de animais doentes e a introdução de ordenhadores doentes na propriedade. Segundo Moraes (1993), a análise do trânsito animal, como indicador direto, deve ser considerada na caracterização do risco diferenciado para doenças transmissíveis de curso agudo, especialmente a febre aftosa.

Por outro lado, essa informação é difícil de ser obtida dos criadores e existe uma tendência dela ser subestimada, devido à existência de uma legislação de defesa sanitária animal estadual e devido a comparação que muitos fazem com a varíola e a febre aftosa, quanto aos procedimentos tomados nos casos da doença.

Quanto à legislação estadual, existe uma obrigatoriedade de documentação sanitária para trânsito de animais, Guia de Trânsito

Animal-GTA, sob pena de multa (valores em reais por cabeça) para aqueles que não o fazem, ou seja, para aqueles que transitam com animais sem a GTA. Já no outro caso, muitos produtores temem em notificar casos da varíola bovina porque acreditam que serão tomadas medidas como aquelas adotadas no caso da febre aftosa, de erradicação da doença, com implicação de sacrifício de animais doentes e contatos diretos e indiretos, principalmente.

Somado a tudo isto, a pesquisa foi conduzida conjuntamente pela UFMG, órgão público de ensino e pesquisa, e pelo IMA, autarquia de cunho fiscal, o que por vezes, a princípio, não deixava o produtor à vontade para relatar os fatos que realmente aconteceram, apesar de toda uma argumentação que era feita junto a ele para esclarecer a finalidade da investigação, que foi de pesquisa e de conhecimento sobre a doença, e para convencê-lo de tal coisa.

Assim sendo, talvez estes fatores tenham prejudicado a retratação dos fatos que realmente aconteceram no campo e prejudicado uma maior aproximação da realidade.

- Animais introduzidos/categoria de bovinos introduzidos

Em todos os casos de introdução de animais na propriedade, somente a espécie bovina foi relatada. Em média foi introduzido

o dobro de animais nos casos (Tabela 24). Entretanto, não houve diferença em nível significativo para casos e controles.

Tabela 24. Número médio de animais introduzidos nos casos e controles e respectivo valor de p no teste t, em nível de significância 0,05.

Variável	Casos		Controles		P
	Média	95% IC	Média	95% IC*	
Número de animais	7.6	-1.34 16.54	3.36	1.45 5.27	0,31

*IC = Intervalo de confiança

Os animais adquiridos nos últimos 30 dias foram principalmente bezerros, vacas em lactação e vacas secas (Tabela 25). Nos casos houve introdução de bezerros e vacas em lactação em 60,0% das vezes e

de vacas secas em 40,0% das vezes. Já nos controles, houve mais introdução de vacas secas, seguido de vacas em lactação e bezerros.

Tabela 25. Categorias de animais introduzidos nos casos e nos controles e respectivo valor de p no teste de proporção, em nível de significância 0,05.

Categoria	Casos		Controles		p
	n	%	n	%	
Bezerro	6	60,0	2	18,2	0,095
Novilha	2	20,0	1	9,1	0,517
Novilho	0	0,0	0	0,0	
Vaca seca	4	40,0	7	63,6	0,333
Vaca em lactação	6	60,0	4	36,4	0,360
Touro	0	0,0	0	0,0	

Estes resultados estão de acordo com a finalidade da produção observada nas propriedades (leite ou mista). Neste tipo de rebanho normalmente acontece a introdução de fêmeas adultas para produção de leite. No caso daquelas em lactação o mais comum é ter os seus bezerros “ao pé”, o que explica a introdução de bezerros, já que não é objetivo da exploração a criação e terminação de

animais, como demonstrado também pela estrutura do rebanho existente.

Do ponto de vista da doença, vacas em lactação e seus bezerros são as categorias que são sempre afetadas, representando potencial de risco de transmissão da doença, ou seja, são as principais fontes de infecção para outras propriedades, caso movimentadas e introduzidas no manejo diário de outros rebanhos.

Embora vacas secas nunca tenham sido relatadas ou observadas como animais doentes há que considerar o tempo de cura da doença no animal e o manejo adotado para com os animais durante a ocorrência da doença. Nesta condição é comum ver o produtor secar as vacas que estão em fase final de lactação, em função das dificuldades de ordenhar na presença das feridas e em função da queda da produção de leite, fazendo então o descarte das mesmas (vender/trocar), podendo contribuir para a disseminação do vírus para outras propriedades e regiões.

Observou-se que devido ao aspecto de ferida seca que as crostas apresentam o produtor tem a falsa impressão de cura do animal. Em média o animal leva 30 dias para se curar, o que pode ser até prorrogado caso haja infecções secundárias. As crostas perduram por um longo período da doença e são ricas em vírus infeccioso.

A introdução da categoria novilha pode ser explicada pela necessidade de reposição das fêmeas adultas para produção de leite, como já descrito anteriormente. Quanto à doença, não há relato de acometimento de novilhas nos surtos.

- Origem dos animais introduzidos: Estado, município e propriedade

Todos os animais introduzidos nos casos e controles foram oriundos deste estado. Os municípios mais citados foram Mariana, seguido de Guanhães e Santos Dumont (Tabela 26).

Este fato é esperado e está de acordo com Moraes (1993) e IMA (2008) que analisaram o trânsito de bovinos e formas de organização da produção pecuária, no Estado de Mato Grosso e Minas Gerais, e que relataram ocorrer maior movimentação de animais localmente, ou seja, internamente na região, podendo existir circuitos bem definidos de comercialização. Por outro lado, aproximadamente 40,0% das propriedades incluídas neste estudo estão localizadas em Mariana (10 casos e 17 controles).

Do mesmo modo, todos os demais municípios citados como origem dos animais estão bem próximos daqueles trabalhados neste estudo (IBGE, 2008).

Além disso, é sabido que existe um trânsito local informal, que ocorre sem registros e sem a documentação sanitária exigida, dificultando ou impossibilitando, muitas vezes, a investigação da origem dos casos.

Tabela 26. Municípios de origem dos animais introduzidos nos casos e controles.

Município	Casos		Controles	
	n	%	n	%
Acaiaca	1	10,0	0	0,0
Guanhães	2	20,0	0	0,0
Mariana	4	40,0	6	54,5
Materlândia	1	10,0	0	0,0
Medeiros	1	10,0	1	9,1
Paiva	0	0,0	1	9,1
Paulistas	0	0,0	1	9,1
Santo Dumont	0	0,0	2	18,2
São Sebastião do Maranhão	1	10,0	0	0,0

Quanto às propriedades de origem dos animais, não foi possível fazer uma análise detalhada e o mapeamento deste trânsito, porque além do fato de muitas não serem informadas, outras foram citadas com nomes incompletos ou com uso de “apelidos”. Notou-se presteza dos entrevistados em informar os municípios de origem, mas não as propriedades e produtores, talvez pelo receio de causar danos a eles.

Entretanto, verificou-se que em algumas situações os animais eram oriundos de propriedades vizinhas da região e de outros pastos alugados para permanência de vacas secas e vacas prenhes.

- Localização das propriedades em relação a focos: vizinhas ou localizadas próximas

- Distância das propriedades em relação a outro foco

Uma parte das propriedades casos encontrava-se localizada vizinha a outro caso (28,0%). Esta situação foi constatada muitas vezes, em várias regiões do Estado, ao longo dos últimos oito anos, durante o acompanhamento da evolução da doença no Estado, embora a varíola bovina seja uma doença transmitida, essencialmente, pelo contato direto. Porém, a relação destes focos vizinhos nunca foi estudada de forma sistemática, com esclarecimentos dos vínculos epidemiológicos entre elas. A experiência e os dados dos focos notificados ao Serviço de Defesa Sanitária Animal deste estado tem mostrado que, inicialmente a doença tende a acontecer em forma de surtos, com envolvimento de muitas propriedades, num mesmo momento, em uma certa área geográfica delimitada. Posteriormente, no segundo ou terceiro ano de ocorrência na região, ela passa a ocorrer com um número menor de casos, de forma mais isolada.

Quanto aos controles, a forma de seleção direcionou para tal situação, em função do pareamento geográfico, determinando com que 44,4% deles fossem vizinhos de propriedades que tiveram a doença.

Quanto à distância existente entre os casos e controles em relação a outros focos mais próximos, as médias foram de 7,0 km e de 4,0 km para os casos e controles respectivamente.

- Contato direto dos animais dos casos e dos controles com os animais de propriedades vizinhas

Em 32,0% dos casos e em 13,3% dos controles os animais da propriedade tinham contato direto com animais vizinhos. Não houve diferença significativa dos casos e controles e, portanto, nenhuma associação com a doença. Epidemiologicamente, pelo que se conhece da doença, o contato direto de animal-animal não tem importância para a transmissão da doença investigada e o papel de possíveis moscas na transmissão de um animal para outro, em pequenas distâncias, não é conhecido, embora acredita-se ser possível (Blood e Radostitis, 1991). O objetivo desta investigação foi buscar identificar outras prováveis formas de transmissão da doença, diferentes daquelas conhecidas e comprovadas como contato direto dos animais.

- Entrega leite/tem tanque de expansão/transporte de leite em caminhão

A entrega de leite era uma atividade diária nos casos e controles e acontecia em mais ou menos 80% das propriedades, porém nenhuma associação significativa foi observada com a doença (Tabela 27). Como discutido anteriormente, no item finalidade da produção, o predomínio de propriedades com a finalidade da produção de leite na região influenciou na amostragem, diminuindo a probabilidade de amostrar propriedades do tipo corte. Entretanto a atividade de retirar o leite é mais importante do que a finalidade de produção na epidemiologia da doença. Em última instância o que vai determinar uma maior probabilidade de ocorrência da doença é a prática ou não da retirada do leite e não a finalidade da criação, se considerado uma realidade a retirada de leite em rebanhos de corte, para consumo próprio ou não, o que pode acontecer em algumas propriedades.

Tabela 27. Distribuição das variáveis entrega de leite, tem tanque de expansão, nos 25 casos e nos 47 controles e respectivos valores de p no teste de proporção, em nível de significância 0,05.

Variável	Casos				Controles				p
	Sim		Não		Sim		Não		
	n	%	n	%	n	%	n	%	
Entrega leite	22	88,0	3	12,0	37	80,0	9	20,0	0.42
Tem tanque de expansão	5	20,0	20	80,0	13	27,7	34	72,3	0,44
Transporta leite em caminhão	19	82.6	4	17.4	24	57,1	18	42.9	0.03

Neste estudo, em 82,6% dos casos e em 57,1% dos controles o leite era transportado em caminhão, em latões de aço, com exceção de uma propriedade caso que o fazia em caminhão tanque. O teste de proporção demonstrou existir diferença significativa entre casos e controles ($p=0,03$), revelando uma associação entre a variável transporte de leite em caminhão e a doença e mostrando ser este item um fator importante para a ocorrência da doença na propriedade.

Estes resultados podem ser explicados pelas formas de transmissão da doença. Uma vez introduzida a doença na propriedade e as vacas em lactação acometidas, entregar leite pode representar um risco de disseminação da doença, dependendo da forma como é feita. Lobato et al. (2005) sugeriram que a doença pode ser transmitida através das alças do latão de leite, nos casos de ordenha manual, se nenhuma desinfecção for feita nas mãos do ordenhador e nas alças dos latões. Isto porque a mão do ordenhador é contaminada pelos vírus durante a ordenha, através do contato direto com a teta da vaca lesada e uma vez contaminada transmite os agentes para outras pessoas ou objetos ao tocá-los ou manuseá-los, que finalmente contaminam outras pessoas que os tocam, como, por exemplo, a pessoa que fica nos caminhões recebendo e devolvendo os latões de leite (leiteiro) nas fazendas por onde coleta o leite.

Os autores relataram esta situação no caso dos surtos da Zona da Mata Mineira. Naquele surto várias propriedades rurais

foram acometidas e muitas delas estavam distribuídas ao longo de uma mesma linha de leite. Talvez o próprio deslocamento do caminhão entre as propriedades, entrando e saindo das mesmas, pode ser considerado como uma provável forma de distribuir o agente etiológico na matéria orgânica retida em seus pneus, considerando que o vírus é bastante resistente em condições adversas (Fenner, 2000).

Algumas propriedades casos e controle não transportavam os latões de leite no caminhão mas, utilizavam-se de outros meios como cavalos-burros (01 caso e 05 controles), charretes-carroças (02 casos e 07 controles) e até mesmo carrinho de mão (01 caso).

Naquelas propriedades casos e controles onde o leite não era retirado da fazenda, o mesmo era direcionado para a produção diária de queijos dos tipos frescal, curado, mussarela ou parmesão, que só mais tarde eram retirados da propriedade, dependendo do tempo de cura de cada tipo, com destino aos mercados. Tanto na literatura como nas observações de campo nunca se comprovou a transmissão da doença para o homem através do manuseio e consumo destes produtos, quer seja pela ausência do vírus nos produtos ou pela incapacidade destes vírus se manterem viáveis ou ainda pela incapacidade de infecção pela via digestiva.

Quanto à presença do agente no leite, testes laboratoriais realizados (PCR) com amostras de leite de vacas doentes (amostras de 06 propriedades casos) têm

apresentado resultados positivos (Trindade, 2009 - comunicação pessoal), comprovando a presença do agente, embora não se tenha a certeza de como o leite foi infectado. Através da observação direta da ordenha nos focos acompanhados foi possível constatar que gotas de sangue e fragmentos pequenos das crostas das tetas lesadas caíam dentro do balde, usado na ordenha, juntamente com o leite. A partir daí, sua viabilidade e capacidade de infectar nada se sabe. Alguns estudos estão em andamento.

Quanto ao consumo do leite na propriedade sabe-se que apesar da prática da fervura do leite ser freqüente no meio rural nem sempre acontece, por questões culturais regionais ou por desinformação, o que permitiria a ingestão do agente nos casos de contaminação.

Se realmente a ingestão do leite e derivados contaminados acontece, as observações realizadas até agora nos levam a pensar que a infecção não é comum ou não é viável pois, não há aumento no número de registros de pessoas com nenhum tipo de

enfermidade que pudéssemos relacionar com poxvirus (vaccinia) na região dos surtos.

Quanto ao trajeto dos caminhões não foi possível captar estas informações de modo suficiente e adequado para definir os seus trajetos, com origens e destinos bem como do destino final do leite recolhido nas propriedades.

- Presença de outros animais domésticos na propriedade

Em todas as propriedades foi relatada a presença de outros animais domésticos, sendo os cachorros, as aves e os eqüídeos os animais mais frequentemente presentes nos focos e controles, com índices de 89,1 a 100,0%. A maior diferença das proporções foi observada para a espécie suína, porém os valores de p revelaram não existir diferença significativa, em nível de 0,05%, quando comparados casos e controles (Tabela 28).

Tabela 28. Existência de outros animais domésticos nos 25 casos e nos 47 controles e respectivos valores de p no teste de proporção, em nível de significância 0,05.

Animais	Casos				Controles				p
	Sim		Não		Sim		Não		
	n	%	n	%	n	%	n	%	
Gato	19	76,0	6	24,0	29	63,0	17	37,0	0,27
Cachorro	25	100,0	0	0,0	41	89,1	5	10,9	0,08
Aves	25	100,0	0	0,0	44	95,7	2	4,3	0,29
Caprinos/ovinos	4	16,0	21	84,0	44	95,7	2	4,3	0,09
Eqüídeos	25	100,0	0	0,0	44	95,7	2	4,3	0,29
Suínos	20	80,0	5	20,0	27	58,7	19	41,3	0,06

Desses animais relatados, apenas cachorro e gato são citados na literatura como susceptíveis ao VACV e *Cowpoxvirus* (Bennett et al., 1986; Fenner, 2000). Em muitos países da Europa o gato tem um papel importante na epidemiologia da varíola por cowpox, sendo fonte de infecção para o homem (Bennett et al., 1986). Entretanto, neste estudo, como já mostrado, nenhum desses animais foi citado.

- Presença de animais silvestres na propriedade

Quanto à presença de animais silvestres mais comumente vistos na região, rato e gambá foram os mais citados, tanto nos casos como nos controles (Tabela 29). Gato do mato foi citado em 72,0% dos casos e em 45,7% dos controles, com valor de p significativo em nível de 0,05%, sinalizando para uma associação com a doença, o que não foi visto para as demais espécies.

Tabela 29. Animais do mato mais comuns na região relatados pelos casos e pelos controles e respectivos valores de p no teste de proporção, em nível de significância 0,05.

Variável	Casos				Controles				p
	Sim		Não		Sim		Não		
	n	%	n	%	n	%	n	%	
Rato	22	88,0	3	12,0	39	84,8	7	15,2	0,71
Gambá	21	84,0	4	16,0	34	73,9	12	26,1	0,33
Raposa	15	60,0	10	40,0	27	58,7	19	41,3	0,92
Capivara	14	56,0	11	44,0	17	37,0	29	63,0	0,12
Jaguaritica	7	28,0	18	72,0	9	19,6	37	80,4	0,42
Gato do mato	18	72,0	7	28,0	21	45,7	25	54,3	0,03
Coelho	19	76,0	6	24,0	31	67,4	15	32,6	0,45

Foi relatada, esporadicamente, a existência de outros animais como cachorro do mato, esquilo, lobo, lontra, macaco, paca, tamanduá, tatu e veado.

Muitos desses animais silvestres foram vistos próximos ao curral dos animais, igualmente nas propriedades casos (76,0%) e controles (65,0%), sem diferenças significativas ($p=0,34$).

Não foi feito teste de proporção para cada um desses animais vistos próximos ao curral, porém, houve diferenças nos percentuais encontrados. Os animais que mais se aproximaram dos currais foram o rato, gambá e coelho, em todas as propriedades. Dessas, o rato foi o mais relatado, sendo visto em 48,4% das propriedades casos e em 39,6% das propriedades controles. Isto pode ser explicado pelos seus hábitos alimentares de

consumo de grãos, principalmente de milho, farelos e rações, que são dados aos bovinos e que são normalmente estocados em locais próximos ao curral para facilitar o manejo, principalmente na época da seca, quando se tem pouca pastagem disponível, sendo necessário suplementar os animais. É interessante observar que esta época coincide com o pico da ocorrência da doença no estado (Lobato et al., 2005).

De acordo com a literatura consultada, vários roedores se infectam com o vírus vaccínia (Fenner, 2000). No Brasil o vírus já foi isolado de ratos silvestres e de camundongos utilizados em pesquisa laboratorial (Lanna, 1980; Fonseca et al., 1998; Diniz et al., 2000; Trindade, 1998; Marques et al., 2001; Da Fonseca et al., 2002; Trindade et al., 2004). Contudo, a comprovação destes roedores como fonte de infecção para bovinos e o homem e seu

papel de reservatório nunca foi efetivamente comprovado, sendo ainda desconhecido.

Mais recentemente, Ferreira et al. (2008) avaliaram a transmissão horizontal em camundongos sentinelas expostos às fezes contaminadas de camundongos infectados experimentalmente com VACV, mimetizando uma infecção natural. Os dados sugerem que excrementos de murinos podem desempenhar um papel relevante na propagação e transmissão de VACV e podem talvez ajudar a explicar como estes vírus circulam entre seus hospedeiros naturais.

Também a presença dos gambás pode ser explicada pela busca de alimentos, como aves domésticas e seus ovos, que estão sempre disponíveis ao redor do curral, em função do sistema de criação que deixa as aves soltas no peri-domicílio, facilitando o seu acesso. Como mostrado anteriormente, em 100% das propriedades existiam aves domésticas.

Os gatos do mato não foram vistos próximos aos currais, talvez em função seus hábitos noturnos, o que dificultaria a sua visualização durante o dia (Tabela 30).

Tabela 30. Distribuição dos animais do mato vistos próximos ao curral nos 25 casos e nos 47 controles.

Animais	Casos		Controles	
	n	%	n	%
Rato	15	48,4	19	39,6
Gambá	7	22,6	4	8,3
Raposa	3	9,7	8	16,7
Cachorro do mato	1	3,2	1	2,1
Capivara	1	3,2	4	8,3
Lobo	1	3,2	2	4,2
Lontra	1	3,2	0	0,0
Porco	1	3,2	0	0,0
Coelho	1	3,2	4	8,3
Esquilo	0	0,0	1	2,1
Veado	0	0,0	1	2,1
Siriema	0	0,0	1	2,1
Paca	0	0,0	1	2,1
Tamanduá	0	0,0	1	2,1
Perdiz	00	0,00,0	11	2,1

- Vê muito rato na propriedade

O relato da existência de muitos ratos nas propriedades foi maior nos casos do que nos controles, quando comparados os

percentuais observados, 52,0% e 30,4% respectivamente. Entretanto não houve diferença significativa em nível de 0,05% e o valor de p encontrado foi de 0,07, muito próximo do valor limite (Figura 36).

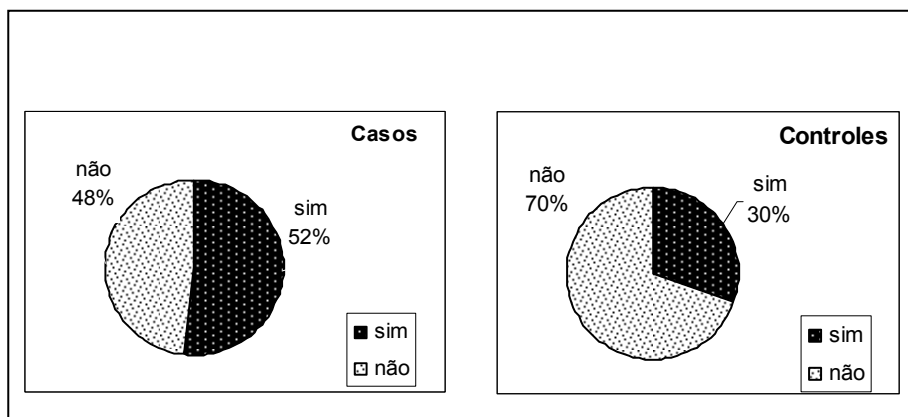


Figura 36. Distribuição da variável vê muito rato nas propriedades nos casos e controles.

Os principais locais onde os ratos foram vistos estão listados na Tabela 31 e corresponderam ao paiol e curral, tanto dos casos como dos controles. Quanto às propriedades, normalmente os ratos foram mais vistos nos casos do que nos controles, independentemente do local avistado, com exceção da sede. Embora nenhum valor de p encontrado tenha sido significativo em nível de 0,05, o local curral se destaca com valor de 0,06 muito próximo do significativo, sinalizando para uma maior importância na ocorrência da doença.

As análises estatísticas coincidem com a realidade do campo. No paiol normalmente estão estocados os grãos, em grandes quantidades, provavelmente na seca e o

acesso dos ratos vai depender dos procedimentos de segurança realizados para impedi-lo. Já no curral o acesso é mais fácil, mas a disponibilidade de alimentos não é grande nem está disponível o tempo todo, porque o mais comum é suplementar os animais uma vez ao dia. Considerando a possibilidade de contatos dos ratos com os bovinos, direta ou indiretamente, e a importância disso para a doença, já que os roedores podem apresentar o vírus, a presença dos ratos no curral se faz mais importante. Ferreira (2008) constatou que os camundongos experimentalmente infectados com o VACV isolados de bovinos eliminam vírus pelas fezes e infectam outros camundongos que entram em contato com suas fezes.

Tabela 31 – Principais locais onde os ratos foram vistos nos 25 casos e nos 47 controles e respectivos valores de p no teste de proporção, em nível de significância 0,05.

Variável	Casos				Controles				p
	n		%		n		%		
	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	
Cocho	6	19	24,0	76,0	8	38	17,4	82,6	0,50
Paio	19	6	76,0	24,0	27	19	58,7	41,3	0,15
Curral	12	13	48,0	52,0	12	34	26,1	73,9	0,06
Silo	3	22	12,0	88,0	1	45	2,2	97,8	0,09
Sede	3	22	12,0	88,0	9	37	19,6	80,4	0,42
Outros	3	22	12,0	88,0	8	38	17,4	82,6	0,55

Também os ratos foram vistos em outros locais, poucas vezes, como na caixa de arroz, no capim, galinheiro e quarto de ração, sem diferença entre casos e controles.

- Faz controle de ratos

O controle dos ratos era feito igualmente nos casos (92,0%) e nos controles (87,0%), sem diferenças significativas ($p=0,52$). Os

métodos de controles mais relatados foram o gato, o uso de veneno e a combinação dos dois (Tabela 32).

A realização do controle dos ratos com gatos aponta para a existência de contatos entre duas espécies importantes susceptíveis ao vírus vaccínia, que poderiam estar envolvidos na cadeia de transmissão da doença, carecendo de maior investigação para comprovação ou não.

Tabela 32. Distribuição dos métodos utilizados para controles dos ratos nos casos e nos controles.

Método de controle	Casos		Controles	
	n*	%	n*	%
Gato	10	41,7	14	30,4
Gato-veneno	6	25,0	7	15,2
Veneno	8	33,3	16	34,8
Gato-ratoeira	0	0,0	1	2,2
Veneno-ratoeira	0	0,0	2	4,3

*n: um caso e um controle não informaram.

- Presença de mosca ao longo do ano/presença de mosca na época da doença

A época do verão foi relatada como data de maior ocorrência de moscas, tanto nos casos como nos controles, sem diferenças significativas. Em 96,0% dos casos os produtores relataram que não existiam muitas moscas na época do surto,

diminuindo a possibilidade de uma provável associação entre presença de moscas e a doença e a hipótese de que elas poderiam estar envolvidas como vetores mecânicos de transmissão do agente, como sabido para outras doenças.

5.7 Análise de regressão logística univariada para seleção das variáveis a serem trabalhadas no modelo para a doença

Na análise de regressão logística univariada todas as variáveis foram testadas novamente, em nível de significância 0,20, visando selecionar as variáveis para a construção do modelo. O valor de p trabalhado ($p < 0,20$) se justifica para não eliminar variáveis fracamente associadas que poderiam se tornar fortemente associadas à doença numa análise multivariada futura. Assim, as variáveis consideradas para a análise multivariada foram total de animais, área do estabelecimento, litros leite/dia, introdução bezerros, transporta leite caminhão, gato-do-mato, ratos-curral, vê muito rato, ratos-paiol, capivara, adquiriu animais, nº de vacas lactação, nº de bezerros, nº de vacas, desinfeta mãos, desinfeta tetas, desinfeta estabelecimento.

As variáveis desinfecção do estabelecimento, desinfecção das mãos e desinfecção das tetas foram identificadas como fatores de proteção, com valores de OR de 0,167, 0,182 e 0,182 respectivamente. Como esperado o uso de desinfetantes reduz a carga de agentes biológicos e evita a ocorrência da doença. Essas variáveis apresentaram correlação positiva entre si e para o modelo de regressão múltipla foi usada apenas a variável desinfecção de tetas.

A variável introdução de animais nas propriedades, nos últimos 30 dias, apresentou valores de p muito próximos do ponto de corte definido ($p < 0,05$) para aceitação ou rejeição da variável, porém foi considerado e trabalhado no modelo devido à importância que tem na epidemiologia da doença.

Transportar leite em caminhão, em latões de aço, aumentou o risco de ocorrência de

variola bovina em 3,56 vezes na propriedade, quando comparado com propriedades que não transportam leite em caminhão.

A presença do gato do mato e da capivara aumenta o risco de ocorrência da doença em 3,06 e 2,17 vezes, respectivamente.

A existência de muitos ratos nas propriedades mostrou forte associação com a doença, aumentando em 2,47 vezes a chance de a doença ocorrer. A presença deles no curral e no paiol aumenta em 2,61 e 2,22 o risco da doença.

As variáveis área do estabelecimento, litros leite/dia, total de animais, número de vacas, número de vacas em lactação e número de bezerros também mostraram correlação entre si e somente número de vacas em lactação foi trabalhado no modelo multivariado.

Entretanto deve ser considerado que aqui as variáveis foram estudadas individualmente, sem a interferência de umas sobre as outras (Medronho, 2006), o que é mais improvável de acontecer na realidade.

5.8 – Análise multivariada

Através da análise de regressão logística multivariada realizada foi construído um modelo para tentar explicar a doença, compostos por três variáveis significativas, ao nível de significância de 0,05, com importância na epidemiologia da doença.

- Modelo

A Tabela 33 mostra o modelo construído com as variáveis uso desinfetante nas mãos-tetas, transporte do leite através de caminhão, em latões de aço, e número de vacas em lactação.

Tabela 33. Modelo proposto para a varíola bovina, construído através da análise de regressão logística múltipla.

Variável	Odds Ratio (OR)	P>(z)	95% Intervalo Confiança	
Uso de desinfetante nas mãos-tetas	0,16	0,01	0,04	0,69
Transporte de leite em caminhão	18,94	0,03	1,18	302,94
Número de vacas em lactação	1,13	0,03	1,01	1,26
Interação				
Transporte de leite em caminhão e Número de vacas em lactação	0,89	0,04	0,79	0,99

Neste modelo proposto, para a variável uso de desinfetante nas mãos-tetas foi encontrado uma OR de 0,16, significando 0,16 vezes mais chance de ter a doença, ou seja, 6,25 menos chance de ter a doença (1/0,16), sendo, portanto, fator de proteção.

Transportar leite em caminhão, em latões de aço, aumenta o risco de ocorrência da varíola bovina em 18,94 vezes. O número de vacas em lactação também aumenta 1,13 vezes o risco da doença ocorrer, sendo, também, fator de risco para a mesma.

O transporte do leite em caminhão e o número de vacas em lactação se mostraram muito importantes como fatores de risco,

porém, o efeito do número de vacas em lactação tende a ser anulado quando a variável transporte de leite em caminhão está presente, mostrando que existe interação entre essas duas variáveis (OR 0,89).

Os testes de goodness-of-fit para o χ^2 de Hosmer e Lemeshow e χ^2 de Pearson realizados, com base no valor de p ($p > 0,80$ e $p > 0,48$, respectivamente), demonstraram que o modelo construído é adequado para a doença. A curva de ROC foi traçada para o Modelo (Tabela 33) e um valor de 0,76 foi encontrado, demonstrando que 76% do modelo é explicado (Figura 37).

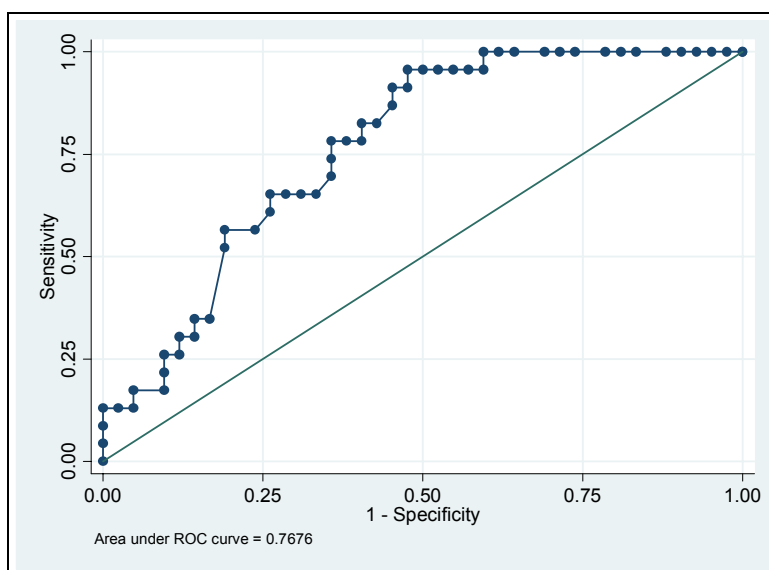


Figura 37. Curva de ROC para o Modelo construído.

5.9 – Monitoramento da curva de anticorpos neutralizantes nos rebanhos casos

Das oito fazendas monitoradas que foram amostradas, cinco já foram trabalhadas e três estão em andamento. Um total de 24 vacas, de cinco fazendas casos, teve seus soros testados pelo teste de SN, em placas de 24 wells, e a curva de anticorpos neutralizantes foi apresentada, com base

em três coletas realizadas nos tempos: 1º dia, 6,1-6,6 meses após e 12,5-13,1 meses após o 1º dia de visita.

Os resultados mostraram que a maior parte das vacas testadas foi positiva (22 em 24), apresentando anticorpos neutralizantes para *Orthopoxvirus*, demonstrando que tiveram contato com o agente, conforme Tabela 34.

Tabela 34. Vacas monitoradas e testadas na SN, por propriedade, em cinco dos 25 casos.

Identificação das fazendas	Vacas			Coleta de crostas*
	Testadas	Positivas		
	N	N	%	
49	4	4	100,0	Sim
45	5	3	60,0	Não
48	5	5	100,0	Não
47	5	5	100,0	Sim
46	5	5	100,0	Não
Total	24	22	91,7	-

*todas as crostas coletadas foram positivas para *Orthopoxvirus* no teste PCR (gene vgf).

Em relação à curva de anticorpos não pudemos observar um padrão no comportamento da primeira para a última coleta.

Observamos que em alguns animais o título de anticorpos subia e continuava alto até um ano após, enquanto outros apresentavam queda dos níveis de anticorpos já na segunda coleta. Outros mantiveram os títulos constante durante todo o período de monitoramento.

Os resultados obtidos com os 24 animais foram distribuídos em quatro diferentes grupos, segundo a tendência da curva de anticorpos neutralizantes apresentada, da seguinte forma: grupo A e B com tendência de queda, grupo C manutenção e grupo D com tendência de aumento dos títulos de anticorpos da primeira pra a terceira coleta (Figuras 38 a 40).

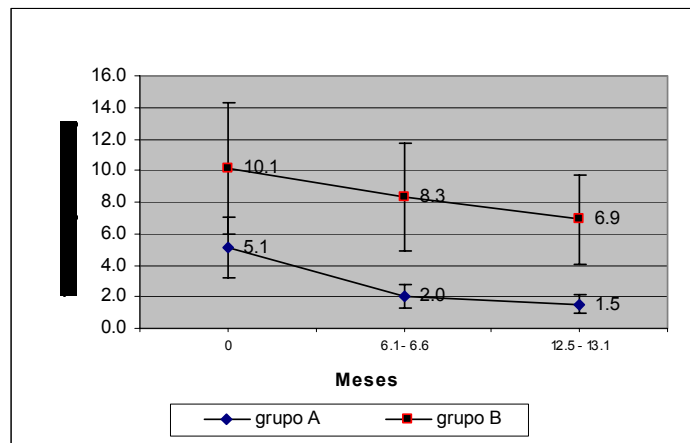


Figura 38. Curva de anticorpos contra VACV dos grupos A (sete animais) e B (seis animais), com tendência de queda dos títulos.

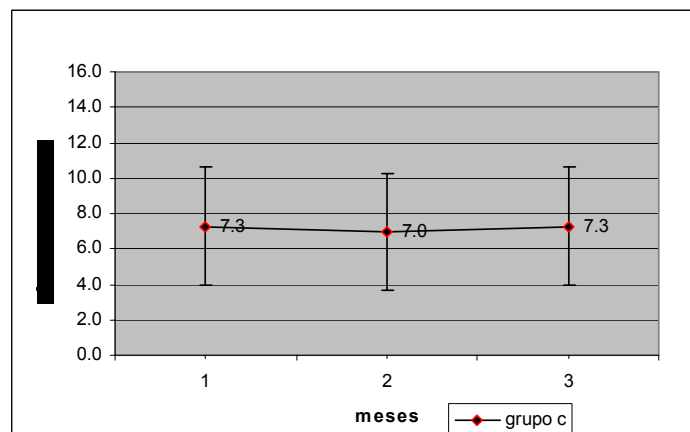


Figura 39. Curva de anticorpos contra VACV do grupo C (cinco animais), com tendência de manutenção dos títulos.

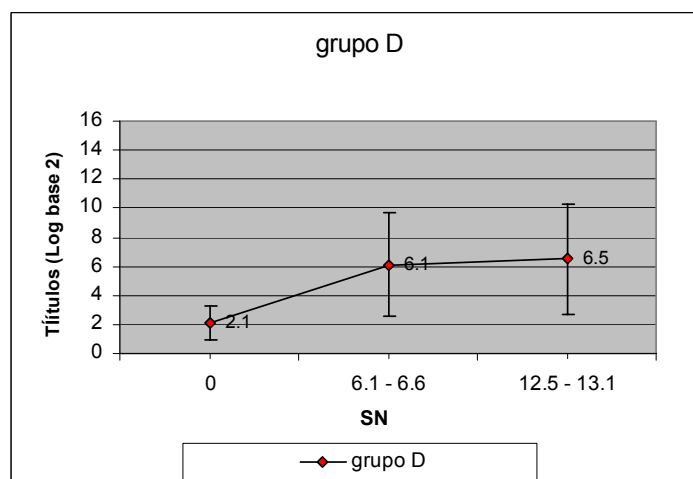


Figura 40. Curva de anticorpos contra VACV do grupos D (três animais), com tendência de aumento dos títulos.

Os resultados sorológicos foram comparados com a presença ou ausência de sinais clínicos e revelaram que das 19 vacas que apresentaram sinais clínicos, 18 foram sorologicamente positivas (94,7%).

Cinco vacas não apresentaram sinais clínicos, mas quatro delas foram positivas (80,0%). Quanto às vacas sem sinais clínicos, 80,0% delas apresentaram anticorpos neutralizantes para *Orthopoxvirus*. De forma semelhante, seus títulos caíram, tornando a maioria das vacas negativa ao final do período avaliado.

A presença de anticorpos nas vacas sem sinais clínicos pode ser devido a uma infecção subclínica, ou talvez devido a uma infecção prévia sofrida pelos animais em outras fazendas ou nesta mesma fazenda em surto anterior.

Quando os títulos de anticorpos das vacas com e sem sinais clínicos foram comparados observamos que os animais que apresentaram sinais clínicos tiveram títulos mais altos de anticorpos, variando de 20 até 1.280, sendo que 41,7% apresentaram títulos maiores ou iguais a 320 e 58,3% apresentaram títulos até 80. As vacas sem sinais clínicos apresentaram títulos variando de 20 a 40.

Verificamos que 95% das vacas com sinais clínicos apresentaram uma resposta imune com produção de anticorpos neutralizantes sendo os títulos de anticorpos destes animais maiores do que aqueles apresentados pelas vacas sem sinais clínicos.

Quanto à vaca com sinal clínico que não apresentou anticorpos, talvez as variações individuais relacionadas a imunossupressão possam estar relacionadas. Embora pouco provável, outros agentes poderiam estar envolvidos, mas isto só um diagnóstico laboratorial diferencial para outros patógenos poderia esclarecer, o que não foi realizado.

De modo geral, considerando os animais testados, os resultados sinalizaram para a existência de uma relação direta entre presença de sinais clínicos, títulos apresentados na SN e duração dos títulos apresentados, permitindo observar que a presença de sinais clínicos no animal induziu uma resposta imune do tipo humoral intensa e mais duradoura. Após 12 meses da infecção, 66,7% das vacas ainda eram soropositivas

De modo geral, os animais com os maiores títulos na primeira coleta encontravam-se principalmente nas fases de crosta e cicatrização, enquanto que os que estavam nas fases de vesículas e úlceras tenderam a apresentar títulos mais baixos nesta coleta.

Os resultados da pesquisa de anticorpos neutralizantes nas vacas doentes nas fazendas casos também foram agrupados de acordo com a procedência dos animais, fazendo-se uma análise por propriedade, com apresentação da curva por animal e da curva por fazenda, esta última obtida através da média geométrica dos valores individuais. Desta forma 05 grupos foram formados, correspondendo cada grupo a uma única propriedade. Os resultados estão apresentados na Figura 41.

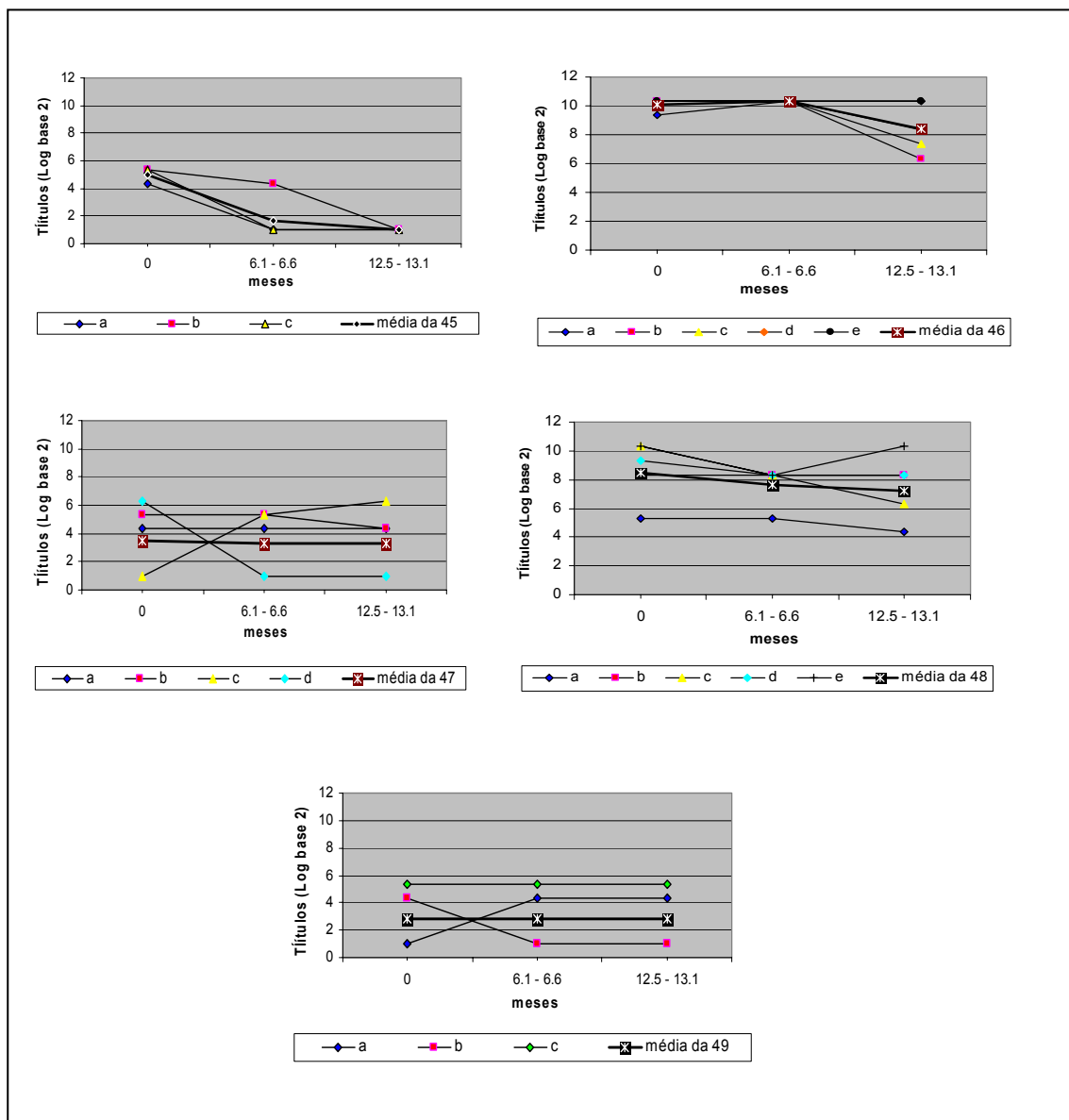


Figura 41- Curvas de anticorpos contra VACV apresentadas pelos animais das Fazendas 45, 46, 47, 48 e 49.

Comparados desta forma, os resultados mostraram que a curva de anticorpos por fazenda tendeu a apresentar títulos mais homogêneos.

Não temos como comparar os nossos resultados com outros autores, pois é a primeira vez que o acompanhamento desta curva de anticorpos é descrita. Porém estes achados sugerem que fatores relacionados às amostras virais circulantes podem estar

envolvidos. Não observamos diferença entre as raças destas fazendas sendo predominante as vacas mestiças girolandas, o que diminui a possibilidade do fato estar relacionado com fatores ligados ao animal. Condições de manejo e manejo sanitário inerentes a cada propriedade que limitem a carga viral infecciosa e a reinfecção dos animais também não podem ser descartados.

Do ponto de vista clínico estes achados são importantes, ou seja, é importante que as vacas infectadas apresentem uma resposta imune do tipo humoral duradoura. Isto porque, conforme a literatura consultada, os anticorpos são muito importantes para evitar reinfecções e também para a proteção de bezerros nascidos após a doença (imunidade passiva). Considerando-se a existência e a circulação de VACV e a possibilidade de re-introdução da doença nos rebanhos já afetados, a existência de vacas com anticorpos neutralizantes contra este agente no rebanho é bastante desejada.

5.10- Pesquisa de anticorpos neutralizantes nos rebanhos controles

Vacas e bezerros dos controles foram testados na SN para pesquisa de anticorpos neutralizantes para *Orthopoxvirus*. Todas as vacas foram testadas, porém somente os bezerros das vacas positivas na SN foram submetidos ao teste de SN. Ao todo foram testados 315 animais, sendo 279 vacas e 28 bezerros. Os resultados encontrados estão nas Tabelas 35 e 36.

Tabela 35. Resultados gerais da SN nos rebanhos controles.

Tipo	Existentes	Testados	Negativo	Positivas ^a	P(x100) ^b
Propriedades controles	47	47	34	13	27,7
Vacas	279	279	251	28	10,0
Bezerros	267	28	21	7	2,6
Total de animais	546	315	280	35	6,4

^aPositivas=pelo menos um animal positivo

^bP=prevalência aparente

Tabela 36. Resultados da SN por categoria de animais, por propriedade, nos controles.

Propriedade	Positivos		Prevalência Aparente (x100)			
	Vaca em lactação	Bezerro	Vacas	Vacas em lactação	Bezerros	Rebanho
002	1	0	0,5	1,0	0,0	0,3
014	1	0	4,0	5,3	0,0	2,2
025	1	0	3,8	5,0	0,0	1,6
031	4	1	17,4	22,2	7,1	10,6
032	1	0	6,3	9,1	0,0	2,8
033	6	2	13,0	18,8	6,7	9,4
061	4	3	10,0	25,0	18,8	9,7
063	3	0	6,0	12,0	0,0	3,4
065	1	1	9,1	11,1	16,7	5,6
066	3	0	12,0	17,6	0,0	7,1
067	1	0	5,6	7,1	0,0	2,6
069	1	0	3,7	4,8	0,0	2,2
073	1	0	12,5	16,7	0,0	7,1
Total	28	7				

Esses resultados comprovam que existiam animais soropositivos nas propriedades controles. Provavelmente estes ou tiveram contato com *Orthopoxvirus* ou tiveram contato com o vírus *Orthopoxvirus* e adoeceram, nesta ou em outra propriedade.

Entretanto a doença não estava acontecendo no momento da visita às propriedades e sinais que indicassem a presença de lesões recentes ou sinais de recuperação de lesões não foram observados, sugerindo que estes animais soropositivos foram adquiridos (por compra ou troca) ou trazidos de outra propriedade onde a doença ocorreu. Nenhum produtor relatou já ter tido a doença na propriedade anteriormente.

Isto pode ser explicado pelo fato de que muitos produtores descartaram animais que adoeceram, curados ou em fase de cura, como mencionado anteriormente. No próprio monitoramento das propriedades casos, realizado neste trabalho, foi possível comprovar esta conduta de descarte de animais, o que impossibilitou a coleta dos soros de todos os animais amostrados e brincados ao longo de todo o período programado. Talvez o mais provável seja considerar que estes animais tenham sido adquiridos porque a prevalência de soropositivos encontrada nos controles, quase sempre, é muito baixa dentro das propriedades, indicando que poucos animais tiveram contato com o vírus, o que não é esperado para um surto de varíola bovina.

Por outro lado os bezerros raramente foram soropositivos, sugerindo que não tiveram contato com o vírus e que provavelmente eram relativos à imunidade passiva. Isto não pôde ser confirmado porque a idade dos bezerros não foi registrada.

Analisando as informações destas 13 propriedades controles soropositivas constatou-se que quatro delas introduziram animais nos 30 dias anteriores à visita, sendo que três introduziram vacas secas (propriedades 014, 066 e 067) e uma

introduziu vacas em lactação e bezerros (propriedade 065). Além disso, foi possível comprovar que naquelas propriedades onde foram introduzidas vacas secas, a prevalência de bezerros positivos foi zero, enquanto que naquela onde foram introduzidos vacas e bezerros a prevalência de bezerros foi de 16,7%.

Também informações sobre parentesco entre os ordenhadores dessas propriedades e os das propriedades casos puderam ser obtidas, demonstrando que as propriedades controles 002, 033, 066 e 061 tinham parentesco (do tipo irmão e sobrinho) com as propriedades casos 001, 028, 047 e 058, sinalizando novamente para a importância de se pesquisar outros vínculos epidemiológicos que poderiam contribuir para o esclarecimento do surgimento da doença.

5.11 Descrição da doença nas propriedades estudadas

Percebeu-se que a evolução da varíola bovina não se deu da mesma forma nas propriedades estudadas. Apesar destas observações terem um caráter abstrato acreditamos que é importante descrevê-las pois padrões bem diferentes foram constatados em diferentes propriedades.

Diferenças em aspectos da epidemiologia como taxa de ataque e também na gravidade, quantidade e formato das lesões, tamanho da área lesada e severidade da mesma para o homem chamaram atenção. Ainda em relação às lesões percebemos que ora elas apresentavam formatos bem arredondados, ora bem alongados, como que desenhos irregulares variando quanto à gravidade. Diferenças no padrão da resposta humoral também foram observadas como já demonstrado na Figura 41.

Embora nenhum instrumento preciso tenha sido utilizado para medir e classificar estes parâmetros, a experiência e vivência adquirida com o acompanhamento da

doença ao longo dos últimos oito anos nos permitiu compará-las.

Com o objetivo de descrever diferentes formas com que a doença se apresentou no campo foram selecionadas quatro fazendas

e um resumo de alguns aspectos importantes, de forma comparada, como está apresentado na Tabela 37. Também fotos das lesões das referidas propriedades foram reunidas na Figuras 42 e 43.

Tabela 37. Comparação de alguns parâmetros para descrição da ocorrência da doença em quatro propriedades casos.

Critérios	Propriedades Rurais			
	40	47	46	07
Localização geográfica	Paulistas	Mariana	Mariana	Bambuí Sem sinais
Gravidade das lesões no homem	grave	grave	moderada	
Taxa de ataque nas vacas (0-100%)	40.4	21.4	83.3	95.0
Gravidade das lesões nas vacas	grave	branda	moderada	grave
Títulos na SN	NR ^a	3.4 - 3.3 - 3.2	10.1 - 10.3 - 8.3	NR
Utilizava desinfecção antes da doença	não	não	não	não
Desinfecção mãos pós doença	sim	sim	sim	não
Desinfecção tetas pós doença	sim	sim	sim	sim

^aNR=não realizado



Figura 42: Lesões típicas de varíola bovina identificadas no úbere de vacas infectadas na fazenda 07, município de Bambuí-MG (A), na fazenda 46, município de Mariana-MG (B), na fazenda 040, município de Paulista-MG (C) e na fazenda 47, município de Mariana-MG (D).



Figura 43: Lesões típicas de varíola bovina identificadas nas mãos de ordenhadores infectados no município de Mariana-MG (A), na fazenda 040; na fazenda 47, município de Mariana-MG (B); na fazenda 46, município de Paulistas-MG (C).

Os fatores que poderiam estar permeando estas diferenças não puderam ser determinados neste trabalho. Porém aspectos como contato prévio com o vírus no caso de animais e vacina no caso de humanos, adoção de medidas de manejo que vão intervir na evolução da doença como uso de desinfetantes e a presença de amostras virais variantes com diferente patogenicidade circulando entre as propriedades devem ser consideradas.

Também fatores geográficos, ou seja, de localização das propriedades, chamaram atenção. Ao contrário do esperado, percebemos que existem diferentes perfis da doença numa mesma região, num mesmo município e em propriedades muito próximas (quase vizinhas), corroborando ainda mais para se acreditar na existência de variantes de VACV envolvidas neste

estudo e em circulação no estado, determinando diferenças no fenótipo da doença.

Estas observações se tornaram importantes quando constatamos que publicações recentes sobre a ocorrência destes surtos no Brasil tem identificado e isolado diferentes VACV, caracterizando populações de variantes destes vírus, em diferentes regiões ou na mesma região (Nagasse-Shugahara et al., 2004; Trindade et al., 2006; Megid et al., 2008). Ferreira e colaboradores (2008) identificaram diferenças de virulência entre amostras isoladas de bovinos neste estado, utilizando o modelo camundongo. Os autores mostraram que duas amostras isoladas de vacas doentes no município de Guarani-MG apresentaram, uma (GP1) patogenicidade para camundongos inoculados pela via

intranasal e a outra (GP2), isolada da propriedade localizada a 10 km da primeira, baixa patogenicidade. De fato, Trindade et al. (2007) já havia descrito diferenças na sequência gênica destes vírus e demonstrado que há uma deleção de 18 nucleotídeos no GP2 em relação ao GP1.

Até agora, a existência de pelo menos dois grupos distintos de *Vaccinia virus* isolados no Brasil está claro e comprovado (Trindade et al., 2007; Ferreira et al., 2008), porém estes estudos foram baseados em análises de sequência gênica e modelo em camundongo. As observações realizadas neste trabalho vêm somar às evidências anteriores dados epidemiológicos das implicações desta diversidade, pois diferenças no padrão clínico, patogenicidade e padrão de resposta imunológica foram claramente observados nas propriedades estudadas.

Neste sentido, seria importante sequenciar e comparar genes envolvidos na interação agente-hospedeiro que vão determinar a patogenicidade e resposta imune contra este agente.

Este estudo sobre a varíola bovina no Estado de Minas Gerais permitiu comprovar que varíola bovina é uma doença reemergente, que vem afetando cada vez mais seres humanos e animais, em diferentes áreas deste Estado e do Brasil, causando prejuízos para o setor pecuário e para a saúde pública. Até então a doença tem se mostrado como uma zoonose de caráter ocupacional, afetando principalmente ordenhadores, porém a existência de um potencial de risco para outras pessoas, direta ou indiretamente, não pode ser ignorado.

Tudo isto enfatiza a necessidade urgente da redefinição das medidas de controles, que vem sendo adotadas pontualmente nas áreas afetadas, e da intensificação das mesmas. Também os serviços de vigilância devem ser revistos e adequados frente ao caráter reemergente da doença.

6 – CONCLUSÕES

Vaccínia bovina tem ocorrido no Estado de Minas Gerais, em pequenas propriedades com finalidade de produção de leite e com infra-estrutura e manejo sanitário deficiente, com manejo de ordenha manual;

As categorias de animais afetados são sempre vacas em lactação e seus bezerros. Os sinais observados foram a presença de úlceras e crostas nas tetas e nos úberes das vacas e úlceras nos focinho e na gengiva dos bezerros;

Em 84,0% das propriedades casos os ordenhadores foram afetados. Os principais sinais observados foram linfadenopatia, febre, dor e presença de úlceras nas mãos e antebraços;

A transmissão da doença para os humanos acontece através da ordenha de animais doentes. Nenhuma transmissão entre humanos foi observada;

Até então, a doença tem se mostrado tipicamente ocupacional, acometendo principalmente os ordenhadores;

A transmissão da doença entre propriedades se deu, principalmente, através da introdução de animais na propriedade e de ordenhadores doentes que ordenharam em outras propriedades com a doença;

Em alguns casos não foi possível determinar os fatores envolvidos na introdução da doença na propriedade. Assim concluiu-se que existem provavelmente outros fatores envolvidos na transmissão da doença além daqueles aqui identificados;

Muitos animais dos rebanhos casos apresentaram anticorpos neutralizantes para *Orthopoxvirus*, demonstrando uma imunidade duradoura por mais de 12 meses;

Rebanhos sem a doença podem ter animais soropositivos para *Orthopoxvirus*;

A pesquisa de anticorpos neutralizantes para *Orthopoxvirus* nos animais amostrados não revelou um padrão comum para a resposta imune;

As variáveis nº de vacas lactação, nº de bezerros, desinfeta estabelecimento, desinfeta mãos, desinfeta tetas, introdução bezerros, transporta leite caminhão, presença de capivara, presença de gato-domato, vê muito rato, presença de ratos no paiol, presença de ratos no curral e introdução de animais parecem ter associação com a ocorrência da doença;

No modelo construído para a doença, usar desinfetante é fator de proteção enquanto transportar leite em caminhão, em latões de aço, o número de vacas em lactação e introdução de animais favorecem o aparecimento da doença;

Diferentes padrões de apresentação da doença foram observados, com variações da severidade clínica;

O conhecimento prévio da doença é essencial para a profilaxia e controle da doença;

Identificou-se a necessidade urgente de treinamento de médicos dos serviços de saúde local para atuação nas áreas de ocorrência de surtos, dado o caráter reemergente da doença;

Constatou-se a necessidade de divulgação de informações sobre a doença, bem como das suas medidas de controle e prevenção, para os produtores rurais. Para isto, a forma mais adequada seria a realização de palestras envolvendo produtores rurais e veterinários com atuação nas áreas rurais;

Medidas de prevenção e controle para a varíola bovina devem ser intensificadas no Estado de Minas Gerais e no Brasil, bem como um sistema de vigilância epidemiológica para a doença deve ser redefinido e implementado.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BREMAN, J.G.; HENDERSON, D.A. Diagnosis and Management of Smallpox. **The New England Journal of Medicine**, v.346, n.17, p. 1300-1308, 2002.

BREMAN, J. G.; HENDERSON, D. A. Diagnosis and Management of Smallpox. **The New England Journal of Medicine**, v. 346, n.17, p. 1300-1308, 2002.

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

VACCINIA (Smallpox) vaccine:Recommendation of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). **MMWR - Morbidity and Mortality Weekly Report**. v.50, n.RR-10, 2001.

HOUSEHOLD Transmission of Vaccinia Virus from Contact with a Military Smallpox Vaccinee Illinois and Indiana. **MMWR – Morbidity and Mortality Weekly Report**. v.56, n.19, p. 478-481. 2007.

DOHOO, I.; MARTIN, W.; STRYHN, H. **Veterinary Epidemiologic Research**. Charlottetown, PE, Canada: VER Inc., 2003, p706.

Da FONSECA, F. G.; TRINDADE, G. S.; SILVA, R.L.A. et al. Characterization of a Vaccinia-like Virus Isolated in a Brazilian Forest Short Communication. **Journal of General Virology**, v.83, p.223-228, 2002.

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. **Virology**, v. 277, p. 439 – 449, 2000.

DINIZ, S.; TRINDADE, G.S.; FONSECA, F.G.; et al. Surto de Varíola Murina em Camundongos Suícos em Biotérios - Relato de Caso. **Arquivo de Medicina veterinária e Zootecnia**, v. 53, n.2, p.152-156, 2001.

FENNER, F.; HENDERSON, D.A.; ARITA, I. et al. **Smallpox an its Eradication**. Geneva: World Health Organization, 1988.

FENNER, F. Adventures with Poxvirus of Vertebrates. *FEMS Microbiology Reviews*, v.24, p. 123-133, 2000.

FENNER, F. In: **Poxviruses in Clinical Virology**. RICHAMAN, D.D.; WHITLEY, R.; HAYDEN, F.G. (eds). Local: American Society Microbiology Press. Washington, DC- USA, 2002. p.359-374.

FERREIRA, M.J.; ABRAHÃO, J.S.; DRUMOND, B.P. et al. Vaccinia vírus: shedding and horizontal transmission in a murine model. *Journal of General Virology*, v.89, p.2986-2991, 2008.

FONSECA, F.G.; LANNA, M.C.S.; CAMPOS, M.A.S. et al. Morfologia and Molecular Characterization of the Poxvirus BeAn 58058. *Archives of Virology*, v.143, p.1171-1186, 1998.

FROIS, M.C.M. **Caracterização das formas de organização da produção pecuária e das modalidades de ocorrência da febre aftosa nas mesorregiões homogêneas Central Mineira e Oeste de Minas, 1980 a 1994**. 1995. 94f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Escola de Veterinária UFMG.

HENDERSON, D. A.; MOSS, B. **Smallpox and Vaccinia in Vaccines**. 3.ed. Local: W.B. Saunders Copany, 1999. p.74-97.

HENDERSON, D.A. Smallpox: Clinical and Epidemiologic Features. *Medical Health RI*, v.85, n.3, p.107-108. 2002.

HOSMER, D.W. e LEMESHOW, S. Applied Logistic Regression. 2.ed. Local: **Wiley-Interscience**, 2000. 392p.

IMA-Instituto Mineiro de Agropecuária. Relatórios internos do trânsito de bovinos em Minas Gerais. 2008.

IMA-Instituto Mineiro de Agropecuária. Relatório de notificação de doenças em Minas Gerais. 2009.

LANNA, M.C. **Propriedades Biológicas dos Poxvírus Silvestres Cotia e BeAn58058 Isolados no Brasil**. 1980. 105f. Dissertação (Mestrado) Escola de Veterinária UFMG.

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

LEITE, J.A.; TRINDADE, G.S.; DRUMOND, B.P. et al. Passatempo vírus: a novel vaccinia vírus isolated during a zoonotic outbreak in Brazil. *Emerging Infectious Disease*, v.11, n.12, p.1935-1938, 2005.

LEPARC-GOFFART, I.; POIRIER, B.; GARIN, D. et al. Standardization of a neutralizing anti-vaccinia antibodies titration method: an essential step for titration of vaccinia immunoglobulins and smallpox vaccines evaluation. *Journal of Clinical Virology*, v.32, p.47-52, 2005.

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

LOBATO Z.I.P.; TRINDADE G.S.; FROIS M.C.M. et al. Surto de varíola bovina causada pelo vírus Vaccinia na região da Zona da Mata Mineira. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.57, n.4, p.423-429, 2005.

LOPES, O. S.; LACERDA, J.P.G.; FONSECA, I. et al. Cotia Virus: a New Agent Isolated From Sentinel Mice in São Paulo, Brazil. *American Journal Medicine and Hygiene*, v.14, p.156-157, 1965.

LOPES, O.S.; SACCHET, L.A.; COIMBRA, T.L.M. Report from the Arbovirus Laboratory. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz. Brasil. 1975.

MARQUES, J.T.; TRINDADE, G.S.; DA FONSECA, F.G. et al. Characterization of ATI, TK, nad IFN Genes in the BeAn 58058 Virus, a Naturally Attenuated Wild Orthopoxvirus. **Virus Genes**, v.23, p.291-301, 2001.

MAZUR, C.; FERREIRA, I.I.; RANGFEL FILHO, F.B. et al. Molecular Characterization of Brazilian Isolates of Orf Virus. **Veterinary Microbiology**, v.73, p.253-259, 2000.

MEDRONHO, R.A. ; BLOCH, K.V.; LUIZ, R.R. et al.. **Epidemiologia**. São Paulo: Atheneu, 2006. 493p.

MEGID, J.; APPOLINÁRIO, C.M.; LANGONI, H. et al. Short Report: Vaccinia Vírus in Humans and Cattle in Southwest Region of São Paulo State, Brazil. **American Journal Medicine and Hygiene**, v.79, n.5, p.647-651, 2008.

MEYER, H.; ROOP, S.L.; ESPOSITO, J.J. Gene for A-type inclusion body protein is useful for a polymerase chain reaction assay to differentiate orthopoxvirus. **Journal of Virological Methods**, v.64, p.217-221, 1997.

MORAES, G.M. **Definição e delimitação dos circuitos de comercialização bovina como condição prévia para reestruturação dos ecossistemas de febre aftosa no Estado de Mato Grosso do Sul**. 1993. 100f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Escola de Veterinária UFMG.

MOSS, B. *Poxviridae: The Viruses and Their Replication*. In **Fields' Virology**. FIELDS, B. N., KNIPE, D. M., HOWLEY, P. M.; GRIFFINI, D. E. eds. 3ª, vol. 2. Lippincott-Raven Publishers. Philadelphia, PA, p. 2849-2883, 1996.

MOURÃO, M.L.P. **Sistema de organização da produção pecuária e ecossistemas de febre aftosa no norte de Minas Gerais**. 1994. 47f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Escola de Veterinária UFMG.

NAGASSE-SHUGARA T.K.; KISIELIUS, J.J.; UEDA-ITO, M. et al. Human vaccinia – like vírus outbreaks in São Paulo and Goiás states, Brazil: virus detection, isolation and identification. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.46, p.315-322, 2004.

NATHANSON, N. *Viral Pathogenesis and Immunity*. 2ª ed. Local: Copyright Elsevier Ltd., 2007.

PANCHANATHAN, V.; CHAUDHRI, G.; KARUPIAH, G. Correlates of protective immunity in poxvirus infection: where does antibody stand? **Immunology and Cell Biology**, v.86, p.80-86, 2008.

REIS, R.; FIGUEIREDO, J.B.; PACHECO, M. Varíola bovina – aspectos clínicos, características do vírus e observações sobre vacinação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.22, p. 267, 1970.

ROUQUAYROL, M.Z. e ALMEIDA FILHO, N. **Epidemiologia & Saúde**. Local: Editora Medsi, Rio de Janeiro, 1999. 570p.

SAMPAIO, I.B.M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte. Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002. 221p.

SILVA, P.L.; VIANA, F.C.; RIBEIRO, S.C.A. et al. Surto de Varíola Bovina no Município de Prata-MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.38, n.3, p.323-330, 1986.

SCHATZMAYR H.G.; LEMOS, E.R.; MAZUR, C. et al. Detection of poxvirus in cattle associated with human cases in the State of Rio de Janeiro: preliminary report. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.95, n.5, p.625-627, 2000.

SMITH, S.A. e KOTWA, G.J. Immune Response to Poxvirus Infections in Various Animals. **Critical Reviews in Microbiology**, v.28, n.3, p.149-185, 2002.

SPEKOWITZ, K.A. How Contagious is Vaccinia? **New England Journal Medicine**, v.348, n. 5, p.439-446, 2003.

TRINDADE, G.S. **Caracterização Molecular de um Vírus Ectromelia Isolado de Camundongos do Biotério do ICB-UFMG Através do Estudo Comparativo com os Poxvírus Silvestres BeAn 58058 e Cotia Isolados no Brasil.** 1998. Dissertação (Mestrado). Instituto de Ciências Biológicas-ICB UFMG.

TRINDADE G.S.; DA FONSECA, F.G.; MARQUES, J.T. *et al.* Araçatuba virus: a vaccinia-like virus associated with infection in humans and cattle. **Emerging Infectious Disease**, v.9, n.2, p.155-160, 2003.

Da TRINDADE, F. G. Isolamento, identificação e caracterização molecular de poxvirus circulantes no Brasil. Dissertação de Doutorado. Belo Horizonte, UFMG, 2003.

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. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.75, n.3, p.486-490, 2006.

TRINDADE, G.S.; EMERSON, G. L.; CARROLL, D.S. *et al.* Brazilian Vaccinia Viruses and Their Origins. **Emerging Infectious Diseases**, v.13, n.7, p.965-972, 2007.

TRINDADE, G.S.; DRUMOND, B. P.; MALDONADO, M.I.C.G. Zoonotic vaccinia Virus Infection in Brazil: Clinical Description and Implications for Health Professionals. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, n.4, p.1370-1372, 2007.

TRIGUEIRO, R. C. **Imunoevasão em Orthopoxvirus isolados no Brasil: análise de genes B18R e E3L.** 2004. 156f. Dissertação (Mestrado). UFMG.

Anexo 1

QUESTIONÁRIO DE INVESTIGAÇÃO POXVIRUS

Número do questionário: _____

Latitude: _____ Longitude: _____

Propriedade foco Propriedade controle

Data: (dd/ mm/ aaaa) ____/____/____

Identificação da Propriedade

Nome: _____ Município: _____

Endereço: _____ Área: _____

Identificação do Produtor

Nome: _____ Cadastro: _____

Endereço: _____ Telefone: _____

Identificação do Entrevistado

Nome: _____ Função: _____

Endereço: _____ Telefone: _____

Caracterização da Forma de Produção

Finalidade da produção: Corte Leite Mista Litros/dia: _____

Tamanho do rebanho:

Nº de vacas: _____ Nº de vacas em lactação: _____

Nº de bezerros amamentando: _____ Nº de Novilhas: _____

Nº de Novilhos: _____ Nº de Touros: _____

Tipo de piso do curral: Terra Concreto Outro: _____

Curral de ordenha coberto: Sim Não

Utiliza de algum produto para a desinfecção do estabelecimento? Sim Não

Se sim, qual? _____

Frequência: Diariamente 3 X por semana Semanalmente 15 em 15 dias

Outros _____

Utiliza de produto para a desinfecção das mãos? Sim Não

Se sim, qual? _____

Quando: Antes da ordenha Entre uma vaca e outra No início e no final da ordenha

Outros _____

Utiliza de produto para a desinfecção das tetas? Sim Não

Se sim, qual? _____

Quando: Antes da ordenha Entre uma vaca e outra No início e no final da ordenha

Outros _____

Já utilizava estes produtos antes do aparecimento da doença? Sim Não

Passou a utilizar depois da doença? Sim Não

Tipo de ordenha: Mecânica Manual

Nº ordenhas/dia: 1 2 3

Ordenhadores

Nº de ordenhadores da propriedade: _____

Identificação do Ordenhador:	A	B	C	D	E
Idade:					
Tempo de trabalho dos ordenhadores na propriedade (anos):					
Trabalham em outras propriedades:					
Possuem animais:					
Qual espécie:					
Quantos:					
Os animais adoeceram:					

Doença

Quando apareceu a doença na sua propriedade? (em dias) _____

Quando iniciou a doença o Sr. Já sabia desta doença? Sim Não

Como ficou sabendo? Rádio TV Por outro proprietário Técnico

Jornal ou revista Outros _____

Como e por quê acha que ela apareceu? _____

Quantas vacas adoeceram? _____

Quantas vacas em lactação adoeceram? _____

Qual o local das lesões: Tetas Úbere Outros _____

Quais os sinais observados nas vacas? Pápula Vesícula Úlcera Crostas

Mamite Infecção secundária da ferida

Quantos bezerros adoeceram? _____

Quais locais foram observados lesões nos bezerros:

Focinho Gengiva Língua Lábios Outros _____

Quais os sinais observados nos bezerros? Pápula Vesícula Úlcera Crostas

Quanto tempo aproximadamente uma vaca que adoeceu demora para curar (dias): _____

Quanto tempo a doença ficou no rebanho? _____

Continuou ordenhar normalmente? Sim Não

Observou queda na produção de leite? Sim Não

Quanto produzia? _____

Quanto está produzindo? _____

Tratou os animais? Sim Não

Como tratou os animais?

Outros bovinos adoeceram? Sim Não

Quais? Vacas secas Novilhas Touros Novilhos

Algum ordenhador adoeceu? Sim Não

Quais adoeceram? **A** **B** **C** **D** **E** .

Quais os sinais no ordenhador? Pápula Vesícula Úlcera Crostas

Dor Febre Linfadenopatia (íngua)

Quais partes do corpo apresentaram lesões?

Mão Anti-braço Braços Rosto Tronco Pernas Todo o corpo

Outras: _____

Qual a duração da doença no ordenhador (dias)? _____

O ordenhador procurou o médico? Sim Não

Onde? Particular Posto de saúde

Qual tratamento recomendado? _____

Foi hospitalizado? Sim Não

Ficou afastado do trabalho? Sim Não

Quantos dias? _____

Conhece outros ordenhadores que tiveram a doença? Sim Não

Quem? _____

Onde trabalha? _____

Outras pessoas adoeceram? Sim Não

Da família? Sim Não

Quem? Filho Filha Esposa/Marido Outro morador da residência

Moradores da propriedade? Sim Não

Quantas: _____

Qual: _____

Outras pessoas Sim Não

Quantas: _____

Qual: _____

Forma de Transmissão da Doença

Adquiriu animais nos últimos 30 dias? Sim Não

Qual espécie? _____

Quantos? _____

Se bovinos, qual categoria: Bezerros Novilha Novilho Vaca seca

 Vaca em lactação Touro

Origem: Estado_____ Município_____ Propriedade_____

Esta propriedade faz divisa com outra que teve o problema? Sim Não

Nome do produtor: _____

Nome da propriedade: _____

Qual a distância daqui até esta outra propriedade que teve o problema (km)?

Os animais desta propriedade têm contato direto com animais da propriedade vizinha? Sim
Não

Entrega leite? Sim Não

Tem tanque de expansão? Sim Não

Como é transportado o leite? Caminhão Outros: _____

De onde vem o caminhão? (GPS) _____

Para onde vai o caminhão? (GPS) _____

Qual o destino do leite? _____

Existem outros animais na propriedade? Sim Não

Quais? Gato Cachorro Aves Caprinos/ovinos Eqüídeos Suínos

Outros: _____

Quais os animais do mato mais comuns nesta região? Rato Gambá Raposa

Capivara Jaguaritica Gato do mato Coelho Outros _____

Alguns destes animais já foram vistos próximos do curral? Sim Não

Quais? _____

Você vê muito rato aqui nesta propriedade? Sim Não

Quais os principais locais que eles ficam? Cocho Paiol Curral Silo Sede

Outros _____

Faz controle de ratos? Sim Não

Como?

Em qual época do ano existe mais mosca aqui (mês)? _____

Na época da doença havia muita mosca aqui? Sim Não

Coleta de Material

Coletou material? Sim Não

Coletou leite? Sim Não

De onde? Leite da teta Leite do latão Leite do tanque de expansão

Anexo 2

FORMULÁRIO PARA COLHEITA DAS AMOSTRAS - POXVÍRUS								
PROPRIEDADE:						QUESTIONÁRIO:		
Animal vaca () bezerro () outro:	material coletado			fase da doença				REGISTRO:
	leite	soro	crosta	vesícula	úlceras	crosta	cicatrização	sem sinal clínico
	obs:							
PROPRIEDADE:						QUESTIONÁRIO:		REGISTRO:
Animal vaca () bezerro () outro:	material coletado			fase da doença				REGISTRO:
	leite	soro	crosta	vesícula	úlceras	crosta	cicatrização	sem sinal clínico
	obs:							
PROPRIEDADE:						QUESTIONÁRIO:		REGISTRO:
Animal vaca () bezerro () outro:	material coletado			fase da doença				REGISTRO:
	leite	soro	crosta	vesícula	úlceras	crosta	cicatrização	sem sinal clínico
	obs:							
PROPRIEDADE:						QUESTIONÁRIO:		REGISTRO:
Animal vaca () bezerro () outro:	material coletado			fase da doença				REGISTRO:
	leite	soro	crosta	vesícula	úlceras	crosta	cicatrização	sem sinal clínico
	obs:							
PROPRIEDADE:						QUESTIONÁRIO:		REGISTRO:
Animal vaca () bezerro () outro:	material coletado			fase da doença				REGISTRO:
	leite	soro	crosta	vesícula	úlceras	crosta	cicatrização	sem sinal clínico
	obs:							