

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES
CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS**

GABRIEL AUGUSTO DE OLIVEIRA LOPES

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UMA REAÇÃO EM
CADEIA DA POLIMERASE QUANTITATIVA (qPCR) PARA
DIAGNÓSTICO DA ZONOSE PSEUDOVARÍOLA BOVINA**

**Belo Horizonte
2019**

GABRIEL AUGUSTO DE OLIVEIRA LOPES

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UMA REAÇÃO EM
CADEIA DA POLIMERASE QUANTITATIVA (qPCR) PARA
DIAGNÓSTICO DA ZONOSE PSEUDOVARIOLA BOVINA**

Dissertação, como requisito parcial, para obter o grau de mestre em Análises Clínicas e Toxicológicas, submetida ao Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais.

Orientador: Prof. Jenner Karlisson Pimenta dos Reis

Coorientador: Dr Antônio Augusto Fonseca Júnior

**Belo Horizonte
2019**

RESUMO

A pseudovariola bovina é uma zoonose causada pelo *vírus da pseudovariola bovina* (PCPV), pertencente ao gênero *Parapoxvirinae*, família *Poxviridae*. A pseudovariola bovina acomete principalmente vacas, na região dos tetos e úberes, podendo também atingir bezerros lactantes. Em humanos é uma doença de caráter ocupacional, sendo também conhecida como “doença do ordenhador”, com a ocorrência de lesões principalmente em dedos e mãos de trabalhadores que lidam diretamente com a ordenha de animais infectados. As lesões iniciam-se com o aparecimento de manchas avermelhadas, formação de pápulas, com possibilidade de ulceração e formação de crostas em epitélio infectado. Geralmente os sintomas desaparecem em algumas semanas, porém podem tornar-se persistentes em indivíduos imunocomprometidos. O PCPV têm sido detectado em diversos surtos espalhados por todas as regiões do país. Além do dano à saúde humana, um surto da doença em rebanhos, pode levar a grandes perdas econômicas, com o possível descarte do leite e carne de animais infectados. O diagnóstico pode ser realizado por microscopia eletrônica, métodos sorológicos ou moleculares. Devido a sua relevância sanitária e econômica, o diagnóstico oficial da pseudovariola bovina no Brasil é realizado pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). Este diagnóstico também faz parte da triagem de amostras suspeitas para febre aftosa, que constitui barreira sanitária de elevada importância econômica para o país. Atualmente, essa detecção do PCPV é realizada por métodos moleculares baseados em PCRs convencionais. O presente estudo objetiva desenvolver e validar uma técnica para diagnóstico da pseudovariola bovina utilizando-se uma PCR quantitativa (qPCR), que forneça respostas rápidas quanto a detecção do agente em amostras suspeitas, com alta sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade, dentre outros requisitos de validação. A metodologia desenvolvida foi testada frente a amostras sabidamente negativas e amostras positivas para avaliação da especificidade e da sensibilidade, respectivamente. O limite de detecção do teste foi avaliado a partir de diluições sucessivas do vírus de referência isolado e de um plasmídeo padrão contendo a sequência alvo de interesse. Também foi verificada a repetibilidade do teste para uma mesmo analista sob as mesmas condições, assim como a reprodutibilidade do teste frente à variação de analistas ou componentes da reação. O método foi capaz de detectar até 1000 cópias/ μ L do PCPV em amostras e apresentou uma especificidade de 100%, e sensibilidade de cerca de 80 %. A repetibilidade e reprodutibilidade do teste foram adequadas de acordo os parâmetros estatísticos pré-estabelecidos em manuais de validação oficiais. Portanto, a qPCR desenvolvida, mostrou-se adequada ao uso na rotina diagnóstica de acordo com as normativas nacionais e internacionais relacionadas à garantia da qualidade e validação de um método de ensaio.

Palavras chave: pseudovariola bovina; *parapoxvírus*, PCPV; qPCR

ABSTRACT

The pseudocowpox is a zoonosis caused by the pseudocowpox virus (PCPV), classified within the genus *Poxvirinae*, *Poxviridae* family. The pseudocowpox affects mainly cows, also reaching suckling calves. In humans, it is a predominantly occupational disease, also known as "milkers`s nodule", with occurrence of lesions mainly in fingers and hands of workers who deal directly with milking of infected animals. The lesions begin with appearance of redness spots, formation of papules, with possibility of ulceration and formation of crusts in infected epithelium. They are usually self-limited resolving within a few weeks but may become persistent in immunocompromised individuals. PCPV has been detected in several outbreaks throughout the country. In addition to public health damage, an outbreak of the disease in herds can lead to large economic losses, with possible disposal of milk and meat of infected animals. The diagnosis can be performed by electron microscopy, serological methods and by molecular biology techniques. Due to its sanitary and economic relevance, the official diagnosis of pseudocowpox in Brazil is carried out by the Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply (MAPA). This diagnosis is also part of the screening of suspicious samples for foot-and-mouth disease, which constitutes a sanitary barrier of great economic importance for Brazil. Currently, detection of PCPV is performed by conventional PCR methods. This study aims to develop and validate a technique for the diagnosis of pseudocowpox using quantitative PCR (qPCR), which provides rapid responses regarding detection of the agent in suspect samples, with high sensitivity, specificity and reproducibility, among other validation requirements. The method developed was tested with known negative samples for the specificity assessment and runned against a panel of positive samples for sensitivity assessment. The limit of detection was evaluated from successive dilutions of the isolated reference virus and the standard plasmid containing the target DNA sequence. The repeatability of the test was also evaluated for the same analyst under the same conditions, as well as the reproducibility comparing the variance between different analysts or components of the qPCR. The method was able to detect up to 1000 copies / μL of PCPV in samples and had a specificity of 100% as well as a sensitivity of about 80%. The repeatability and reproducibility of the test were adequate according to the statistical parameters pre-established in official validation manuals. Therefore, the development of qPCR was satisfactory, showing itself adequate to the use in the diagnostic routine according to the national and international regulations related to the quality assurance and validation of a test method.

Palavras chave: pseudocowpox; *parapoxvirus*, PCPV ; qPCR

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura comparativa entre os Orthopoxvirus e Parapoxvirus	13
Figura 2 - Análise filogenética realizada a partir de estirpes de referência das espécies membro do gênero <i>Parapoxvirus</i>	15
Figura 3 - Representação esquemática do genoma do vírus da pseudovariola bovina.....	16
Figura 4 - Ciclo de replicação dos <i>Poxvirus</i>	19
Figura 5 - Lesões causadas pelo vírus da pseudovariola bovina	22
Figura 6 - Compilado de casos reportados envolvendo infecções por PCPV no Brasil	25
Figura 7 - Esquema de amostragem para verificação de desempenho entre dois analistas para a técnica de qPCR para detecção do vírus da pseudovariola bovina	43
Figura 8 - Limite de detecção em amostra de vírus isolado da pseudovariola bovina.....	46
Figura 9 - Limite de detecção para o plasmídeo padrão contendo a sequência alvo.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação taxonômica da Família <i>Poxviridae</i>	11
Tabela 2 - Relação de iniciadores e sonda utilizada para padronização da qPCR.....	36
Tabela 3 - Esquema padrão de resultados das amostras controle e resultados do teste a ser validado	39
Tabela 4 - Qualificação das forças de coincidências pelo Índice de Kappa de Cohen (Brennan Prediger 1981)	40
Tabela 5 - Especificações sobre o teste quanto a sensibilidade e especificidade.....	40
Tabela 6 - Resumo das conclusões de verificação de desempenho para repetibilidade e reprodutibilidade.....	45
Tabela 7 - Valores de Cq encontrados para cada título de vírus no teste de limite de detecção	47
Tabela 8 - Valores de Cq encontrados para cada concentração do plasmídeo no teste de limite de detecção.....	49
Tabela 9 - Amostras utilizadas nos testes de especificidade analítica e diagnóstica	50
Tabela 10 – Relação e descrição de amostras anteriormente positivas utilizadas para avaliação de sensibilidade	51
Tabela 11 - Resultados pareados das amostras controle e qPCR	52
Tabela 12 - Síntese dos resultados de sensibilidade e especificidade da qPCR para PCPV	52
Tabela 13 – Verificação de desempenho do teste entre analistas.....	53
Tabela 14 - Verificação de desempenho do teste entre o mix <i>QuantiTect Probe PCR Kit®</i> (Qiagen®) e o mix <i>Applied Biosystems™ TaqMan™ Fast Advanced Master Mix</i>	54
Tabela 15 - Verificação de desempenho do teste entre o mix <i>QuantiTect Probe PCR Kit®</i> (Qiagen®) e o mix <i>TaqMan® Fast Virus 1-Step Master Mix</i> ..	55

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

BSPV – vírus da estomatite papular bovina
BTV – vírus da língua azul
CPB - proteína ligadora de quimiocinas
Cq – ciclo de quantificação
CEV – vírus extracelular associado à célula
DNA - *ácido desoxirribonucléico*
dnTP's – nucleotídeos trifosfatados
dsDNA – DNA de fita dupla
EEV – partículas envelopadas extracelulares
ELISA – ensaio de imunoabsorção enzimática
FMDV – vírus da febre aftosa
G + C – guanina + citosina
GAGs – glicosaminoglicanos
GM-CSF – fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos
ICTV – *International Committee on Taxonomy of Viruses*
IEV – vírus envelopado intracelular
IL-10- interleucina 10
INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
IMV- partículas virais maduras intracelulares
ITR- regiões terminais invertidas
IV – vírions imaturos
LD – limite de detecção
LFDA – Laboratório Federal de Defesa Agropecuária
MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MET- microscopia eletrônica de transmissão
MgCl₂ – cloreto de magnésio
mM – milimol
mL- microlitros
MOCV – vírus do molusco contagioso
MS – Ministério da Saúde
ng - nanogramas

OIE - Organização Mundial da Saúde Animal
OMS – Organização Mundial da Saúde
OPV – *Orthopoxvirus*
ORF - regiões abertas de leitura
ORFV – orf vírus
pb – pares de bases
PCPV – vírus da pseudovariola bovina
PCR – reação em cadeia da polimerase
pmol - picomol
PPV- *Parapoxvirus*
qPCR – reação em cadeia da polimerase quantitativa
RNA – ácido ribonucléico
s - segundos
TCID₅₀ - doses infecciosas em 50 % de cultura de tecidos
T_m – Temperatura de *melting*
U – incerteza padrão expandida
u - incerteza padrão combinada
VACV – vírus vaccínia
VEGF – fator de crescimento endotelial vascular
μL- microlitros
VSV – vírus da estomatite vesicular

SUMÁRIO

1.0	Introdução	10
1.1	Pseudovaríola bovina.....	10
1.1.1	Classificação.....	10
1.1.2	Estrutura e genoma	11
1.1.3	Replicação viral	16
1.1.4	Transmissão, sinais clínicos e patogenia.....	20
1.1.5	Epidemiologia	23
1.6	Impacto econômico.....	26
1.1.7	Diagnóstico	26
1.2	PCR- Reação em cadeia da polimerase	27
1.2.2	qPCR- Reação em cadeia da polimerase quantitativa.....	28
1.3	Validação de métodos para diagnóstico laboratorial	31
1.3.1	Requisitos de validação	32
2.0	Objetivos	33
2.1	Objetivo geral.....	33
2.2	Objetivos específicos	33
3.0	Material e métodos.....	34
3.1	Local	34
3.2	Amostras.....	34
3.3	Equipamentos	34
3.4	Extração de DNA das amostras biológicas	35
3.5	Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores	35
3.6	Padronização dos reagentes e curva de temperatura.....	36
3.7	Crterios de validação.....	37
3.7.1	Controles	37
3.7.2	Especificidade diagnóstica.....	37
3.7.3	Especificidade analítica	38
3.7.4	Sensibilidade diagnóstica	38
3.7.5	Limite de detecção e eficiência da reação	40

3.7.6 Repetibilidade e reprodutibilidade.....	41
4.0 Resultados	46
4.1 Limite de detecção	46
4.2 Sensibilidade e especificidade	49
4.3 Repetibilidade e reprodutibilidade	52
5. 0 Discussão	56
6.0 Conclusão	64
7.0 Referências	65

1.0 Introdução

1.1 Pseudovariola bovina

1.1.1 Classificação

1 A zoonose pseudovariola bovina é causada por um vírus classificado
2 taxonomicamente dentro do gênero *Parapoxvirus* (PPV). O gênero
3 *Parapoxvirus* pertence à família *Poxviridae*, subfamília *Chordopoxvirinae*
4 (ICTV, 2019). A família *Poxviridae* compreende um grupo de vírus de
5 estrutura complexa, alto peso molecular e genoma composto de DNA de fita
6 dupla, sendo classificados dentro da mesma família por suas similaridades
7 genômicas, estruturais e antigênicas. Frequentemente, os Poxvirus são
8 espécie - específicos e os humanos são hospedeiros acidentais. Algumas
9 espécies podem infectar tanto humanos quanto animais, levando a zoonoses
10 de alto impacto clínico e econômico, como por exemplo, a pseudovariola
11 bovina, também conhecida em humanos como “doença do ordenhador”.

12 A subfamília *Chordopoxvirinae* compreende os vírus capazes de
13 infectar vertebrados, sendo quatro as famílias capazes de infectarem
14 humanos: *Orthopoxvirus*, *Moluscipoxvirus*, *Yatapoxvirus* e *Parapoxvirus*. A
15 classificação taxonômica da família encontra-se na Tabela 1. Dentro do
16 gênero *Parapoxvirus*, estão classificadas quatro espécies, sendo três de
17 maior potencial zoonótico. São elas: o vírus da estomatite papular bovina
18 (BSPV); o orf vírus (ORFV), causador da doença conhecida como ectima
19 contagioso; e o vírus da pseudovariola bovina (PCPV). Outras espécies,
20 ainda não classificadas oficialmente no gênero, incluem um *parapoxvírus* de
21 foca e um *parapoxvírus* de camelos (ectima contagioso de camelos ou
22 doença de Ausdyk). (Thomas et al. 2003).

Tabela 1 – Classificação taxonômica da Família *Poxviridae*

1. FAMÍLIA: <i>Poxviridae</i>	2 SUBFAMÍLIAS
1.1 subfamília: <i>Chordopoxvirinae</i>	11 gêneros e 2 espécies
Gênero <i>Avipoxvirus</i>	10 espécies
Gênero <i>Capripoxvirus</i>	3 espécies
Gênero <i>Centapoxvirus</i>	1 espécie
Gênero <i>Cervidpoxvirus</i>	1 espécie
Gênero <i>Crocodylidpoxvirus</i>	1 espécie
Gênero <i>Leporipoxvirus</i>	4 espécies
Gênero <i>Molluscipoxvirus</i>	1 espécie
Gênero <i>Orthopoxvirus</i>	10 espécies
Gênero <i>Suipoxvirus</i>	1 espécie
Gênero <i>Yatapoxvirus</i>	2 espécies
Gênero <i>Parapoxvirus</i>	4 espécies
Espécie: Vírus da estomatite papular bovina	
Espécie: <i>Orfvirus</i>	
Espécie: <i>Parapoxvirus</i> do cervo vermelho da Nova Zelândia	
Espécie: Vírus da pseudovaríola bovina	

Adaptado de *International Committee on Taxonomy of Viruses*, 2019

1.1.2 Estrutura e genoma

1 Os *Parapoxvírus* possuem uma morfologia única dentre os *Poxvirus*,
 2 como demonstrado por imagens de microscopia eletrônica de transmissão
 3 (MET) (Figura 1). Enquanto as partículas virais dos demais vírus da Família
 4 possuem forma de tijolo ou pleiomórficas, as partículas dos *Parapoxvírus* são
 5 arredondadas, em formato ovóide.

6 O envelope externo do vírus consiste em duas camadas. A externa é
 7 mais espessa e contém túbulos superficiais e/ou filamentos curtos de
 8 subunidades de proteína enroladas em forma helicoidal ou globular,

1 tipicamente com um canal oco que atravessa o centro de cada túbulo. A
2 camada interna mais fina é uma bicamada lipídica.

3 Os virions dos membros do gênero *Parapoxvirus* são cobertos com
4 longos túbulos superficiais rosqueados, que, devido à sobreposição nas
5 superfícies apical e basal, aparecem dispostos em forma cruzada, semelhante
6 a um novelo de lã. O cerne, em característico formato de “M”, dos
7 *Parapoxvírus*, contém o material genético, enzimas e fatores de transcrição
8 de genes precoces. A partícula contém ainda dois corpúsculos laterais de
9 função desconhecida (Figura 1) (Helena et al. 2017) (Cyrklaff et al. 2005).

10 O nucleocapsídeo consiste no DNA de fita dupla (dsDNA) revestido
11 por pelo menos 4 diferentes tipos de proteínas, mantendo o DNA em um
12 estado super-helicoidal. Uma RNA polimerase dependente de DNA está
13 também presente no núcleo.

14 O genoma do PCPV contém aproximadamente 145 mil pares de
15 bases (kpb). Não contém íntrons e apresenta 134 regiões abertas de leitura
16 (ORFs), o que representa um considerável número de genes para um vírus de
17 tal tamanho. As extremidades do genoma são repetições palindrômicas em
18 *tandem*. (Carter et al, 2005) (Hautaniemi et al. 2010).

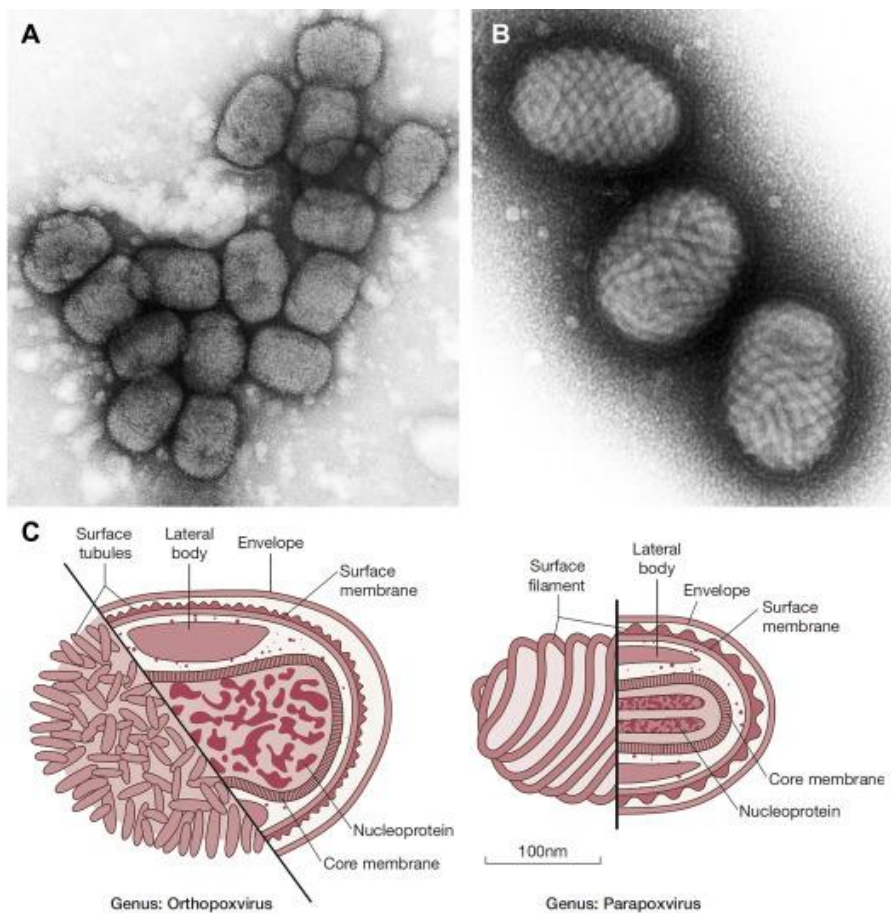


Figura 1 - Estrutura comparativa entre os Orthopoxvirus e Parapoxvirus

- 1 (A) Vírions do vírus vaccinia em microscopia eletrônica, mostrando túbulos
- 2 superficiais característicos de vírus membros de todos os gêneros, exceto o
- 3 gênero Parapoxvirus. (B) Vírions do PCPV, mostrando túbulos superficiais
- 4 característicos dos vírus membros do gênero Parapoxvirus. (C, à esquerda).
- 5 Diagrama esquemático da estrutura do gênero Orthopoxvirus (e todos os
- 6 outros gêneros de poxvirus vertebrados, exceto o gênero Parapoxvirus),
- 7 mostrando corpos centrais e laterais bicôncavos. (C, direita). Diagrama
- 8 esquemático, gênero Parapoxvirus. Parte dos dois diagramas mostra a
- 9 estrutura da superfície de um virion sem envelope, a outra parte mostra uma
- 10 seção transversal através do centro de um virion envelopado.
- 11 Adaptado de (Burrell et al. 2016)

12 Ao mesmo tempo em que o genoma dos PPV é o menor dentre os

13 *Poxvirus*, estes possuem a maior porcentagem de guanina + citosina (G+C)

14 dentre os vírus da família. O PCPV apresenta uma porcentagem de 65% de

1 G+C. Entretanto, pontos de acentuado desvio dessa média são observados
2 em regiões terminais do genoma, em um padrão tão distinto e uniforme que
3 forma uma assinatura deste vírus. Em contraste, representantes de outros
4 gêneros de poxvírus com alto conteúdo G+C, incluindo o vírus do molusco
5 contagioso (MOCV), exibem conteúdos G + C mais uniformes através de seus
6 genomas. (Hautaniemi et al. 2011) (Buttner; Rziha 2002) (Günther et al. 2017)
7 . Apesar de possuir um dos menores genomas dentre os poxvirus, os
8 PPV compartilham cerca de 70% dos genes relacionados à virulência em
9 comparação aos mais patogênicos vírus da família. Surpreendentemente,
10 análises filogenéticas demonstram uma maior similaridade do genoma do
11 PCPV com o ORFV (que infecta predominantemente caprinos) em
12 comparação com o BSPV, outro *Parapoxvírus* que infecta bovinos, como
13 mostrado na Figura 2. Até cerca de 10 anos, apenas os genomas do ORFV e
14 do BSPV haviam sido sequenciados de forma completa (Delhon et al. (2004).
15 Hautaniemi et al. (2010) sequenciou pela primeira vez uma estirpe de
16 referência do PCPV (VR634), obtida a partir de uma lesão em mão humana.

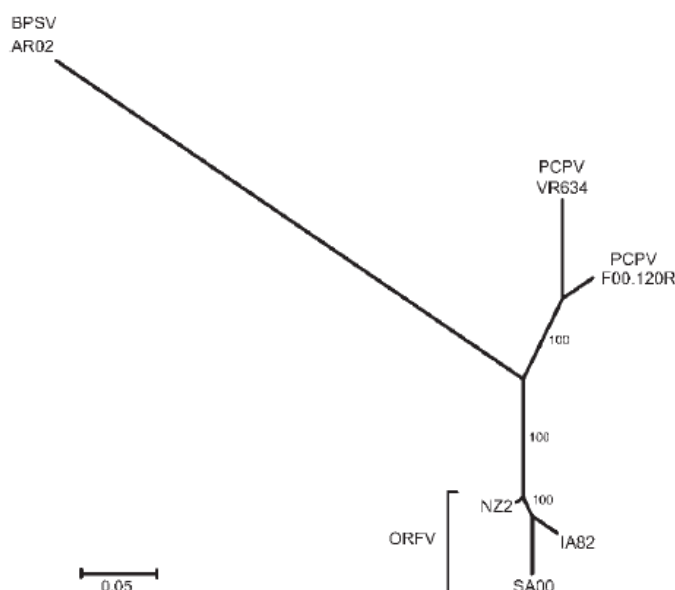


Figura 2 - Análise filogenética realizada a partir de estirpes de referência das espécies membro do gênero *Parapoxvirus*

Retirado de Hautaniemi et al. (2010)

1 O genoma do PCPV possui estrutura linear, sendo que, em sua
 2 região central, altamente conservada (aproximadamente 88 genes), são
 3 codificadas proteínas estruturais e fatores essenciais para a transcrição e
 4 replicação viral. A maioria destes genes são homólogos a outros membros da
 5 subfamília Chordopoxvirinae, como o *Vaccinia vírus* (VACV). Por outro lado,
 6 as regiões terminais invertidas (ITR) do genoma codificam proteínas
 7 relacionadas à virulência e evasão do sistema imune pelo vírus (Figura 3).
 8 Sendo que algumas destas proteínas são únicas para os *Parapoxvírus*,
 9 conferindo-os uma alta capacidade de interferir na inflamação, imunidade
 10 inata e imunidade adaptativa do hospedeiro. As regiões terminais também
 11 codificam proteínas não essenciais não compartilhadas com outros *Poxvirus*,
 12 mas que parecem estar envolvidas com inibição da apoptose e otimização da
 13 replicação viral (Mercer et al .2007) (Friederichs et al. 2014).

14 Os genes da região terminal são descritos como especialmente
 15 susceptíveis à mutações frente a diversas passagem do vírus em cultura de
 16 células, em comparação com outros vírus. Esta região também tem sido
 17 descrita como de fácil inserção de sequências de DNA no genoma, e isto,
 18 somado ao fato de que o vírus causa apenas lesões locais, e à capacidade

1 imunogênica do vírus, têm tornado os PPV em geral bons candidatos a uso
2 como vetores recombinantes para vacinação contra outras doenças virais e
3 terapia contra o câncer (Rittner et al.2018) (Fischer et al. 2003).

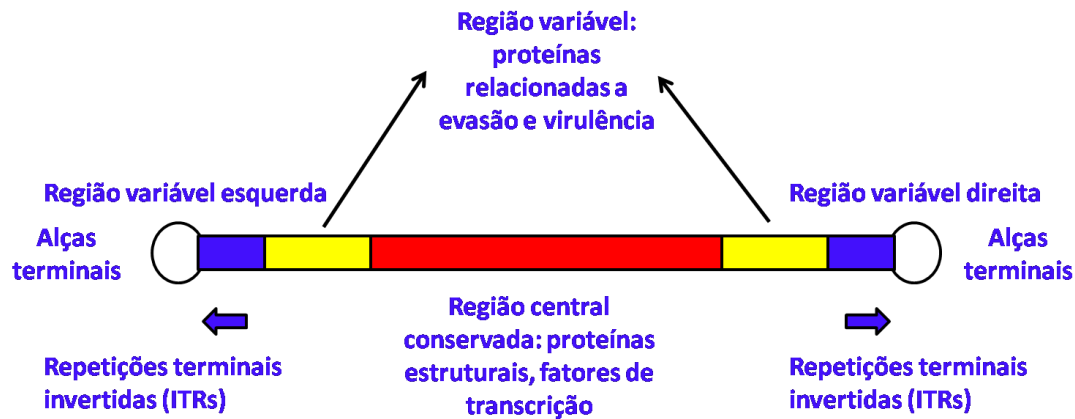


Figura 3- Representação esquemática do genoma do vírus da pseudovariola bovina

Adaptado a partir de (Babkin; Babkina 2015) e (Günther et al. 2017)

1.1.3 Replicação viral

4 Diferentemente da maioria dos vírus dsDNA, os *Poxvirus* replicam-se
5 inteiramente no citoplasma das células hospedeiras. Para tal peculiaridade,
6 possuem uma enzima denominada RNA polimerase DNA dependente. Esses
7 vírus possuem duas formas infectantes. Estas duas formas correspondem às
8 partículas virais maduras intracelulares (IMV) e às partículas envelopadas
9 extracelulares (EEV). As EEV possuem um envelope lipídico adicional,
10 adquirido da célula hospedeira e que dão a esta forma certas características
11 únicas em relação ao IMV, tais como maior resistência à neutralização por
12 anticorpos e à ação do sistema complemento (Bennet et al 2015).

13 Assim como acontece para outros vírus, a infecção dos *Poxvirus*
14 inicia-se com a adsorção da partícula viral à superfície celular. Porém, os
15 *Poxvirus* diferem da maioria dos vírus por não possuírem um ligante único
16 específico de interação com receptores celulares. Desta forma, a
17 possibilidade de utilização de diferentes receptores, bem como a existência
18 de duas formas infectivas com morfologias distintas tornam difícil o
19 entendimento do processo de ligação dos poxvirus às células hospedeiras.

1 Sendo assim, hoje se sabe que as formas IMV e EEV ligam-se a diferentes
2 receptores, isto devido à presença de diferentes proteínas em suas
3 superfícies. (Moss 2012).

4 A partícula de IMV possui apenas uma membrana lipídica, sendo
5 assim, um comum processo de fusão de membranas é capaz de explicar sua
6 formação e penetração. Já o EEV possui uma segunda membrana, acredita-
7 se que seu envelope mais externo seja rompido em uma reação não-
8 fusogênica dependente da ligação com poliânions presentes na superfície
9 celular. Tal dissolução permitiria a liberação de uma forma IMV na superfície
10 celular, que penetraria por fusão no citoplasma (Moss 2006).

11 Independentemente do modo exato de entrada do vírus na célula, o
12 resultado final do processo é a liberação do cerne viral, contendo o genoma
13 do vírus e enzimas associadas no citoplasma. Após este processo, o cerne é
14 degradado, o que é denominado de desnudamento secundário. Após o
15 desnudamento do cerne, o DNA se associa com a membrana do retículo
16 endoplasmático rugoso, formando um sitio de replicação para onde proteínas
17 precoces envolvidas na síntese de DNA são recrutadas (Mcfadden 2005).

18 A replicação do DNA viral dos *Poxvirus* (Figura 4) ocorre entre 2 e 3
19 horas após infecção, dependendo da espécie do vírus, multiplicidade de
20 infecção e do tipo de célula hospedeira. Ela ocorre exclusivamente no
21 citoplasma em regiões granulares, eletrodensas denominadas virossomas.
22 Acredita-se que os virossomas sejam derivados de membranas e organelas
23 celulares. Sendo assim, este processo parece ser independente do núcleo
24 celular e a maioria das proteínas necessárias à replicação do DNA viral é
25 codificada pelo vírus. A replicação do DNA viral inicia-se com um corte em um
26 sítio específico no DNA em uma ou ambas as regiões das ITR do genoma.
27 Este processo resulta na geração de aproximadamente 10.000 cópias do
28 genoma viral por célula, porém, destas apenas a metade será empacotada
29 nas partículas virais durante a morfogênese (Moss, 2013).

30 A morfogênese ou montagem inicia-se a partir de 5 a 6 horas após a
31 infecção. Durante a morfogênese pode-se observar a formação de diversas
32 estruturas: vírus crescentes, vírus imaturos (IVs), vírus maduro intracelular
33 (IMV), vírus envelopado intracelular (IEV), vírus extracelular associado à
34 célula (CEV) e finalmente o vírus envelopado extracelular (EEV). Neste

1 processo a primeira estrutura visível são estruturas constituídas de proteínas
2 virais e lipídeos do hospedeiro. Essas estruturas contêm espículas ligadas em
3 sua superfície convexa e se estendem para formar vírions imaturos esféricos
4 (IV). Embora as partículas dos IV conttenham o genoma viral, elas não são
5 infecciosas. Os IVs maturam-se em IMVs através de várias clivagens das
6 proteínas do capsídeo viral, o que promove condensação do cerne viral e
7 garante a forma característica ovóide dos PPV, da forma IMV (Bennet et al
8 2015) (Moss 2012).

9 A partícula IMV representa a maioria da progênie infecciosa de cada
10 célula, porém só são liberadas da célula em caso de lise. Devido a sua alta
11 resistência no ambiente, estas partículas virais desempenham um papel
12 importante na transmissão entre hospedeiros suscetíveis. Ao alcançar a
13 membrana celular, a membrana mais externa dos IEVs se funde com esta,
14 expondo no meio extracelular os vírus envelopados. As partículas que
15 permanecem na superfície celular são chamadas CEVs e, quando liberados
16 no meio extracelular, são denominados EEVs. A membrana lipídica adicional
17 dos EEVs torna as partículas virais envelopadas menos sensíveis a ação do
18 complemento e de anticorpos. Devido à maior resistência à eliminação pelo
19 sistema imune, os EEV's são importantes para a disseminação do vírus
20 dentro do hospedeiro ao permitirem disseminação do vírus para células
21 distantes. (Liu et al. 2018) (Moss 2013).

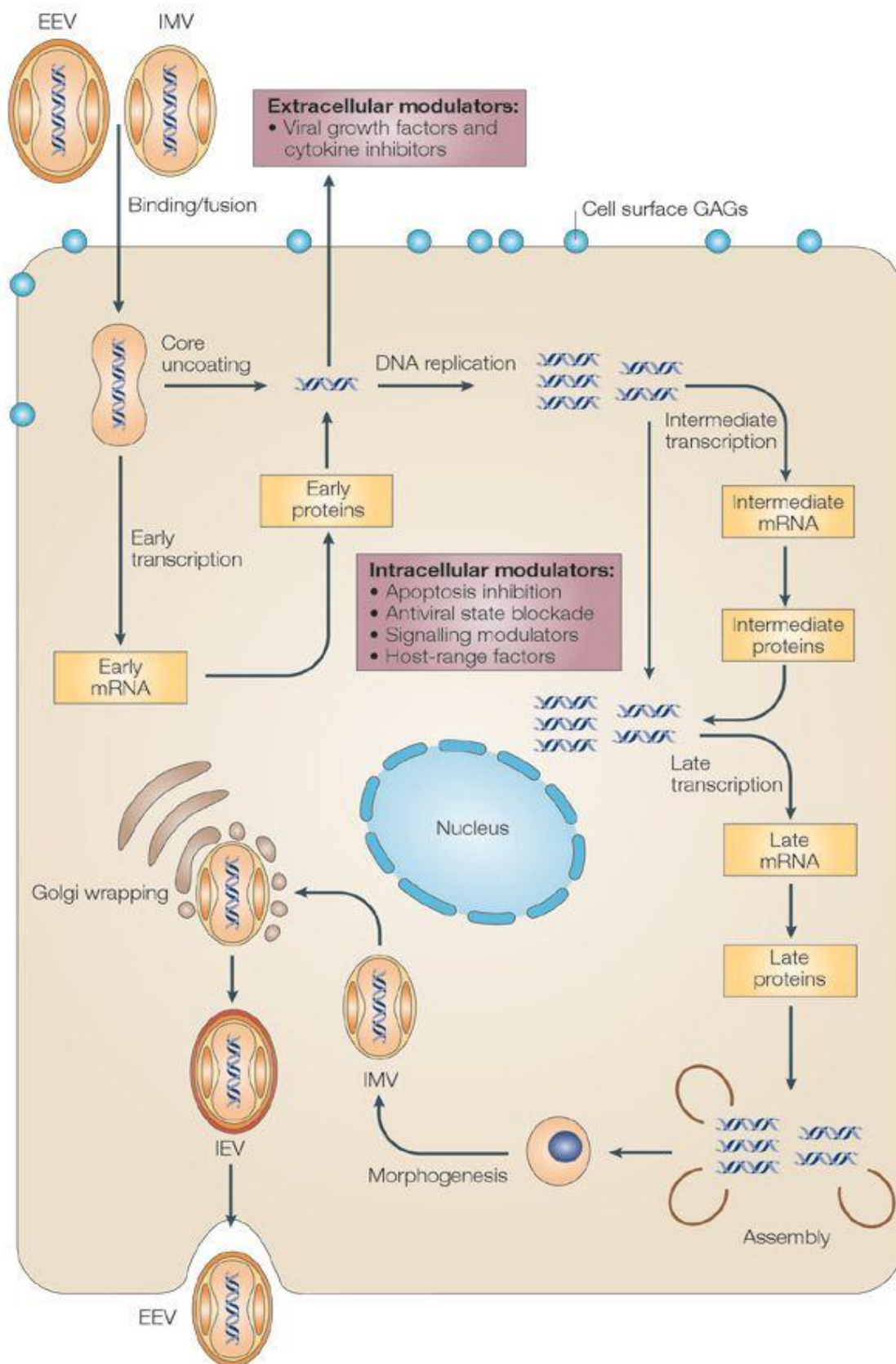


Figura 4 - Ciclo de replicação dos Poxvírus

Retirado de (Mcfadden 2005)

1.1.4 Transmissão, sinais clínicos e patogenia

1 Os *Parapoxvirus* infectam majoritariamente ovinos, caprinos e bovinos,
2 adicionados ao seu potencial zoonótico. Porém já foram relatadas infecções em
3 camelos (Abubakr et al. 2007), cervos (Hautaniemi et al. 2011) e focas
4 (Günther et al. 2017, Mercer et al 2007). No caso da pseudovariola bovina,
5 doença em questão no presente trabalho, o vírus infecta predominantemente
6 vacas, causando lesões principalmente na região do teto e úbere. As lesões
7 também podem ocorrer lesões na região bucal, principalmente de bezerros que
8 realizam a lactação em vacas infectadas, assim como estes bezerros podem
9 auxiliar no espalhamento da infecção para outras vacas, dentro de um mesmo
10 rebanho. A disseminação dentro do rebanho costuma ser lenta e a
11 porcentagem de animais infectados simultaneamente dentro de um mesmo
12 rebanho varia consideravelmente. Os *Poxvirus* são resistentes em condições
13 ambientais, o que favorece a disseminação por animais que utilizam a mesma
14 pastagem. A livre circulação entre bovinos de algumas propriedades, o manejo
15 conjunto de animais diferentes e a manipulação concomitante de animais
16 doentes e sadios são fatores de risco que podem facilitar a disseminação do
17 agente (Roess et al. 2013, Cargnelutti et al. 2014).

18 Há possíveis relatos de transmissões indiretas por outras formas, como
19 a partir dos equipamentos utilizados para retirada do leite, moscas e fômites
20 (Black et al. 2014) Em relação a possíveis outras formas de transmissão,
21 Rehfeld et al.(2018) detectaram a presença de Orthopoxvirus (OPV) e PPV no
22 leite de vacas doentes.

23 Tratando-se de outras espécies que não os bovinos tradicionalmente
24 infectados pelo PCPV, Black et al. (2014) detectaram a presença de PCPV no
25 pênis de touros Angus. Laguardia-Nascimento et al. (2017) identificaram a
26 presença do PCPV em búfalos (*Bubalus bubalis*) no Brasil, inclusive com
27 possibilidade de transmissão inter-espécie entre bovinos e este animal. Ainda,
28 Fairley et al. (2013) comprovaram uma infecção persistente por PCPV no
29 epitélio e patas de gatos.

30 Lesões nos tetos e úberes das vacas geralmente se iniciam como
31 pequenas e avermelhadas manchas que rapidamente evoluem para lesões
32 com aspecto de sarna ou formação de pequenas vesículas. A lesão é

1 geralmente autolimitada e se resolve em cerca de duas semanas. Porém
2 pode persistir por meses e deixar o teto com aparência de crosta e/ou com
3 presença de múltiplas lesões. (Friederichs et al. 2014) (Yaegashi et al. 2013).

4 A doença do ordenhador, assim denominada ao acometer humanos,
5 é predominantemente ocupacional, atingindo indivíduos que trabalham com
6 ordenha de rebanhos infectados, principalmente na região das mãos e dedos.
7 A ordenha manual e inadequados métodos de desinfecção ao se realizar tal
8 procedimento contribuem para a disseminação do vírus (Abrahão et al.,
9 2010). Os trabalhadores rurais que contraem estas lesões também podem
10 ajudar na infecção de mais animais no rebanho (Abrahão et al. 2009).
11 Indivíduos que não trabalham diretamente com estes animais, mas que
12 eventualmente podem visitar um criadouro, por exemplo, também podem se
13 infectar ao manusear pele ou carne infectada (Friederichs et al. 2014).
14 Trabalhadores que manipulam constantemente a carne infectada também
15 podem desenvolver a doença. A transmissão entre humanos ainda não foi
16 identificada (Barravieira 2014).

17 A infecção em humanos geralmente ocorre através de cortes ou
18 arranhões e geralmente se mantém no local de entrada do vírus, seja no
19 epitélio ou na mucosa oral, geralmente com proliferação do vírus em
20 queratinócitos. Existem relatos de lesões no epitélio de outras regiões, como
21 pernas e genitais, provavelmente de forma secundária devido inicialmente à
22 presença de infecção nas mãos. Ocorre hipertrofia e proliferação de células
23 epidermais, frequentemente associadas a um alto influxo de leucócitos
24 (predominância de mononucleares) e aumento nos níveis do fator de
25 crescimento vascular endotelial (VEGF). A histopatologia mostra
26 hiperqueratose, paraqueratose e acantose da epiderme, que geralmente
27 apresenta vesículas multiloculares, reticulares, degeneração de células em
28 forma de balão. Os corpos de inclusão eosinofílicos no citoplasma das células
29 epidérmicas vacuoladas são característicos, mas não observados em todos
30 os estágios da doença. A figura 5 exemplifica as lesões características em
31 bovinos e humanos, além dos achados histopatológicos característicos em
32 tecido humano. Sintomas sistêmicos como cansaço, mal-estar e
33 linfadenopatia são raros, e quando ocorrem, estão relacionados a indivíduos
34 imunocomprometidos. Lesões secundárias ou reincidências ocorrem em 8% a

1 12% dos casos (Black; Walburger 2014) (Abrahão et al. 2010) (Bennet et al
2 2015) (Buttner; Rziha 2002) (Barravieira 2014).

3 Em humanos, após um período de incubação que varia de 3 a 5 dias,
4 as lesões iniciam-se com o aparecimento de manchas eritematosas que
5 evoluem para a formação de pápulas, geralmente em “formato de alvo” (dias
6 7 a 14). Lesões nodulares geralmente aparecem de 14 a 21 dias.
7 Diferentemente das lesões causadas por outros *Parapoxvirus*, como ORFV ou
8 BSPV, ulcerações purulentas são raras. A regeneração completa do tecido
9 ocorre de quatro a seis semanas e é caracterizada inicialmente por um
10 papiloma regenerativo até a presença de tecido epitelial normal. Lesões
11 maiores e granulomatosas podem aparecer em indivíduos
12 imunocomprometidos, podendo ser necessária a remoção cirúrgica do tecido
13 lesado. A manutenção da lesão, inclusive com aparecimento de material
14 purulento, pode ocorrer em caso de coinfeção com bactérias, como
15 *Staphylococcus aureus*. O tratamento com antivirais tópicos como cidofovir
16 não parece acelerar o tempo de regeneração da lesão (Schatzmayr et al.
17 2000) (Abrahão et al. 2010) (Rucker et al. 1968). (Groves et al. 1991).



Figura 5 - Lesões causadas pelo vírus da pseudovaríola bovina

18 (A) Lesão causada pelo PCPV em tetos de vacas. (B) Detalhe da lesão em
19 dedo humano, evidenciando o centroeritematoso. (C) Achado histopatológico
20 característico, com infiltrado leucocitário e as partículas virais localizadas na
21 camada córnea.

22 Adaptado de (Barravieira 2014) e (Cláudia et al. 2017)

23 Em termos de patogenia, mais especificamente em relação às
24 condições que propiciam o aparecimento e persistência das lesões causadas

1 pelo vírus da pseudovariola bovina, os genes das regiões terminais dos PPV
2 contribuem significativamente para uma relação microrganismo hospedeiro
3 favorável ao vírus. O genoma do PCPV codifica diversas proteínas com
4 potencial patogênico na doença, como uma proteína ligadora de quimiocinas
5 (CPB), uma proteína homóloga ao fator estimulador de colônias de
6 granulócitos e macrófagos (GM-CSF) uma proteína homóloga à interleucina
7 10 (IL-10) e uma proteína homóloga ao fator de crescimento vascular
8 endotelial (VEGF). (Hautaniemi et al. 2011) (Ueda et al. 2003) (Ouyang et al.
9 2014) (Hautaniemi et al. 2010) (Nagarajan et al. 2015) .

10 A capacidade desse grupo de reinfetar seus hospedeiros, mesmo
11 que uma resposta de memória mediada por células seja induzida durante a
12 infecção primária, pode estar relacionado ao seu nicho epiteliotrópico e aos
13 imunomoduladores que produzem. Neste ambiente altamente localizado, os
14 imunomoduladores secretados apenas interferem com a resposta imune local
15 e, portanto, em regra, não comprometem o sistema imune do hospedeiro
16 sistemicamente. A descoberta de um gene similar ao fator de crescimento
17 endotelial vascular pode explicar a natureza altamente vascular de lesões
18 causadas pelo PCPV. Assim como uma proteína homóloga a uma citocina
19 antiinflamatória (IL-10) e um inibidor da ação de quimiocinas (CPB) pode
20 explicar a persistência das lesões. Existem muitos genes de *Parapoxvírus* que
21 não codificam polipeptídios com correspondências significativas em bancos
22 de dados, separando este gênero da maioria dos outros *Poxvírus* de
23 mamíferos. Estes genes parecem estar envolvidos na inibição da apoptose,
24 manipulando a progressão do ciclo celular e degradação de proteínas
25 celulares que podem estar envolvidas na resposta ao estresse oxidativo,
26 permitindo assim que o vírus subverta mecanismos antivirais intracelulares e
27 melhore a disponibilidade de moléculas necessárias para replicação viral
28 (Ouyang et al. 2014) (Mercer, et al 2007).

1.1.5 Epidemiologia

29 Os dados epidemiológicos quanto à distribuição do PCPV no Brasil
30 são esparsos, não existindo ainda um trabalho que sistematize e caracterize

1 de forma completa a distribuição do vírus pelo país. Os dados existentes são
2 provenientes de relatos de lesões por veterinários locais, publicações na
3 literatura de casos isolados em diferentes regiões do país e também
4 proveniente de dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
5 (MAPA), a partir do diagnóstico molecular oficial da pseudovariola bovina,
6 realizado em laboratório oficial da rede do MAPA.

7 O mais abrangente levantamento epidemiológico dos casos de PCPV
8 no Brasil foi realizado por (Laguardia Nascimento et al. 2017), juntamente
9 com a distribuição de casos positivos de outros *Poxvirus* como BSPV e VACV
10 (isolados ou em coinfeção). Foi feito um levantamento de resultados
11 positivos diagnosticados a partir de testes oficiais realizados pelo MAPA nos
12 anos de 2015 e 2016, demonstrando que o vírus está disseminado por todas
13 as regiões do país.

14 Alves et al. (2016) descrevem uma coinfeção entre PCPV e o vírus
15 da diarreia bovina (BVDV) na região da Amazônia. Cargnelutti et al. (2014)
16 reportaram a presença de animais positivos para PCPV e BSPV em rebanhos
17 em Rondônia, no norte do país. O mesmo grupo detectou a presença de
18 PCPV em bezerros de engorda no sul do país (Cargnelutti et al. 2015).
19 Laguardia-nascimento et al. (2016) detectaram animais positivos para PCPV
20 nos estados de Roraima, Amazonas e Mato Grosso. Neste mesmo estudo, a
21 análise filogenética demonstrou que estes vírus detectados em diferentes
22 estados estavam agrupados entre si, assim como com outros vírus
23 sequenciados a partir de amostras anteriores, como por exemplo, um vírus
24 obtido a partir de amostra coletada no estado de Minas Gerais.

25 Por todo o mundo também já foram detectados casos de
26 pseudovariola bovina, como por exemplo, em Bangladesh, Finlândia, Estados
27 Unidos, Índia e Turquia (Orguzoglu et al. 2014) (Lederman et al. 2014) (
28 Nagarajan et al. 2015). No Japão, até 2017, apenas o BSPV havia sido
29 isolado em amostras clínicas, até que Ohtani et al. (2017) detectaram o PCPV
30 em amostras vesiculares de úbere e língua de bovinos. Análises filogenéticas
31 dentre vírus isolados em todo o mundo demonstram uma relativa similaridade
32 entre as sequências obtidas, ao passo que evidencia uma diferenciação entre
33 amostras dos outros vírus do gênero *Parapoxvirus* – ORFV e BSPV
34 (Orguzoglu et al. 2014).

1 Abrahão et al. (2010) descreveram pela primeira vez no país a
2 detecção de um caso de coinfeção em humanos de PCPV e VACV, a partir
3 do swab da crosta de lesão presente na mão do paciente. Schatzmayr et al.
4 (2000) reportaram um caso de lesões características em seis pacientes
5 humanos após surto de PPV no estado do Rio de Janeiro. Os vírus foram
6 identificados por microscopia eletrônica após cultura em células. Outros casos
7 da pseudovariola bovina em humanos foram descritos por MacNeil et al.
8 (2010) ; Rogers et al. (1989) e Batalla et al. (2013), dentre outros.



Figura 6 - Compilado de casos reportados envolvendo infecções por PCPV no Brasil

9 Gotas azuis representam casos de PCPV isolados. Quadrados alaranjados
10 casos de coinfeção PCPV/BSPV. Xis roxos casos de coinfeção PCV/VACV.
11 Losangos amarelos representam tripla infecção PCPV/BSPV/ORFV. Estrelas
12 verdes representam casos comprovados de infecção por PCPV em humano
13 Adaptado de (Laguardia Nascimento et al. 2017).

1.6 Impacto econômico

1 A indústria de gado no Brasil é uma atividade econômica que ocupa
2 ampla faixa territorial e continua expandindo-se. O Brasil possui a segunda
3 maior quantidade de cabeças de gado no mundo, ultrapassado apenas pela
4 Índia (Lobato et al. 2014) (Laguardia Nascimento et al. 2017).

5 A detecção do vírus da pseudovariola bovina têm sido cada vez mais
6 frequente em diagnósticos oficiais do MAPA, indicando-se que esta doença é
7 uma potencial ameaça econômica e sanitária (Laguardia-Nascimento et al.
8 2017). A importância econômica do PCPV tem sido cada vez mais
9 reconhecida devido às perdas potenciais que podem ser causadas aos donos
10 de propriedades devido a surtos e também devido ao seu potencial zoonótico
11 (Ohtani et al. 2017).

12 As lesões provenientes da infecção pelo PCPV são confundíveis com
13 outras doenças, como febre aftosa e estomatite vesicular. Propriedades com
14 animais suspeitos para essas doenças estão sujeitas a regras estritas
15 relativas ao trânsito de animais e produtos derivados de animais, o que pode
16 causar perdas econômicas consideráveis. Doenças vesiculares de bovinos
17 possuem grande importância no território brasileiro em decorrência do
18 Programa Nacional de Erradicação da Febre Aftosa, uma vez que a detecção
19 deste vírus ocasiona embargos econômicos impostos por países
20 importadores de produtos de origem agrícola (Cargnelutti et al. 2014)
21 (Laguardia-Nascimento et al. (2017). Por isso, o conhecimento e rápido
22 diagnóstico dessas enfermidades é fundamental, com o objetivo de se evitar
23 interdições e/ou embargos comerciais desnecessários e dispendiosos e,
24 também, com a finalidade de se estabelecer programas adequados de
25 controle e prevenção para essas doenças

1.1.7 Diagnóstico

26 Devido ao seu tamanho e sua peculiar morfologia ovóide, a
27 microscopia eletrônica ainda se configura como um fácil método diferencial de
28 identificação dos PPV, porém além de ser laboriosa e nem todos os
29 laboratórios terem os recursos para tal, ela é incapaz de diferenciar as

1 espécies dentro do gênero *Parapoxvirus*. Ademais, se fazem necessárias alta
2 carga viral e morfologia do vírus intacta (Nitsche et al. 2006).

3 Além da microscopia eletrônica, o vírus também pode ser identificado
4 por ELISA, western blot e imunofluorescência (Schatzmayr et al. (2000).
5 Embora os métodos sorológicos possam ser de grande valia no diagnóstico,
6 não necessariamente irão diferenciar uma infecção aguda de um indivíduo já
7 recuperado. Assim como é demonstrado que os títulos de anticorpos contra
8 os PPV podem cair já alguns meses após a infecção (Abrahão et al. 2009).

9 Em fase aguda da lesão, Iketani et al. (2002) foram capazes de
10 detectar o DNA de PPV no soro do paciente, porém, como dito, os títulos não
11 são persistentes, podendo cair rapidamente, sendo ideal que o diagnóstico
12 seja realizado diretamente a partir do material das lesões.

13 Em relação a métodos moleculares, Inoshima et al. (2000) foram os
14 primeiros a desenvolver uma reação em cadeia de polimerase (PCR)
15 convencional para detectar de forma inespecífica os membros do gênero
16 *Parapoxvirus*. Também já são descritos na literatura nested-PCRs capazes de
17 detectar PPV em geral, juntamente com outros gêneros de Poxvirus, como os
18 Orthopoxvirus (OPV) (Abrahão et al. 2009).

19 Existem algumas PCRs multiplex convencionais que detectam
20 especificamente PCPV ou BSPV, juntamente com outras doenças vesiculares
21 (Cargnelutti et al. 2017). Nitsche et al. (2006) e Das et al. (2017)
22 desenvolveram PCRs quantitativas (qPCR) para detecção dos vírus
23 pertencentes ao gênero *Parapoxvirus* de forma inespecífica. Atualmente, o
24 diagnóstico oficial de pseudovariola bovina do MAPA, realizado no
25 Laboratório Federal de Defesa Agropecuária (LFDA/MG), é feito através de
26 PCR convencional ou nested-PCR. Também é utilizado uma qPCR para
27 diagnóstico de *Papapoxvirus* (Hui et al 2013)

1.2 PCR- Reação em cadeia da polimerase

28 A PCR foi desenvolvida por Kary Mullis em 1983. Mullis desenvolveu um
29 processo através do qual o DNA poderia ser multiplicado artificialmente através
30 de ciclos repetidos de duplicação cuja reação seria catalisada pela DNA
31 polimerase. Trata-se de um método rápido e eficiente para amplificação de

1 sequências específicas de DNA, sendo altamente reconhecida como um
2 método estável, rápido e sensível para detecção de ácidos nucléicos, embora
3 não possa confirmar a presença da partícula viral completa (Nascimento et al.
4 2014, Saiki et al. 1985).

5 A reação da PCR envolve três fases: a fase de desnaturação pelo calor,
6 a fase de anelamento e a fase de extensão. Na primeira fase ocorre a
7 separação da dupla hélice de DNA por aquecimento a uma temperatura
8 elevada (94°C-96°C), originando duas cadeias separadas. Durante a fase de
9 anelamento (50°C-60°C) ocorre a ligação do par de iniciadores com as duas
10 fitas de DNA separadas, com elevada especificidade. O par de iniciadores liga-
11 se exatamente à sequência complementar de DNA, indicando os pontos iniciais
12 e finais da nova cópia de DNA que será sintetizada na fase seguinte. Durante a
13 fase de extensão do DNA a temperatura é elevada até ao intervalo 72°C a
14 76°C, que coincide com a temperatura a que a DNA polimerase tem o seu
15 máximo de atividade. A enzima reconhece os sítios onde os iniciadores se
16 recombinaram com o DNA alvo e liga-se a eles. A enzima sintetiza a cadeia
17 complementar utilizando os nucleotídeos trifosfatados (dNTP"s) que estão
18 livres e em excesso na solução da reação. No fim de um ciclo de PCR obtêm-
19 se duas novas cadeias de DNA para cada alvo da dupla cadeia. Assim, duas
20 novas cadeias são sintetizadas a partir da cadeia molde em cada ciclo
21 completo da técnica de PCR, fazendo com que se dê um crescimento
22 exponencial, havendo ao fim de "n" ciclos, 2n vezes mais cópias do que havia
23 no início. O produto final é denominado amplicon (Van Pelt-Verkuil et al 2008) .

24 O produto da PCR é normalmente visualizado a partir da eletroforese em
25 gel., através de radiação ultravioleta e só é possível devido à adição de um
26 composto fluorescente apropriado que, ao interagir com o DNA, se torna
27 fluorescente (Van Pelt-Verkuil et al 2008).

1.2.2.qPCR- Reação em cadeia da polimerase quantitativa

28 A eficiência de amplificação de DNA pela técnica da PCR convencional
29 é dependente de diversos fatores, como a presença de inibidores, a
30 quantidade de DNA, o estado de degradação do DNA, entre outros. Assim, a

1 necessidade de verificar simultaneamente a quantidade e qualidade do DNA
2 amplificado levou ao desenvolvimento de uma variante da técnica da PCR
3 convencional: a PCR em tempo real, possibilitando a quantificação em tempo
4 real do DNA amplificado, em cada ciclo de amplificação. Neste método, as
5 fases de amplificação, detecção e quantificação são totalmente
6 automatizadas, ocorrendo em simultâneo e em tempo real. Desta forma, cada
7 ciclo de amplificação possui uma etapa a menos, já que os processos de
8 anelamento e extensão ocorrem simultaneamente (Nascimento et al. 2014).

9 O procedimento da qPCR segue o princípio geral da PCR
10 convencional. Assim, apresenta as três fases características da PCR: a fase
11 de crescimento exponencial, fase de crescimento linear e fase estacionária. A
12 primeira fase é bastante específica e precisa. Na fase de crescimento linear
13 os produtos da reação são consumidos e iniciam o processo de degradação.
14 A fase estacionária corresponde ao final da análise devido ao elevado nível
15 de degradação dos produtos da PCR. Os compostos fluorescentes
16 adicionados ao DNA geram um sinal de fluorescência que é diretamente
17 proporcional à quantidade de produto amplificado. A eficiência (E) da
18 amplificação é fundamental para o sucesso da técnica. Esta deve variar
19 idealmente entre os 90% e 100% (Kubista et al. 2006).

20 A interpretação dos resultados obtidos pelos equipamentos envolve o
21 conhecimento de três conceitos: *baseline*, ponto Cq e *threshold*. A *baseline*
22 corresponde ao limiar mínimo de detecção de fluorescência do instrumento
23 sendo considerado o “ruído de fundo” do equipamento. O ponto Cq,
24 denominado na literatura como *cycle of quantification/qualification*,
25 corresponde ao número de ciclos necessários para que a fluorescência da
26 reação seja detectável a partir de um determinado ponto. Trata-se de um
27 ponto a partir do qual a fluorescência detectada ultrapassa o limiar da fase
28 exponencial, conhecido também na literatura como *threshold*, definido, na
29 maioria das vezes, automática e arbitrariamente pelo software do
30 equipamento em função da *baseline*. O valor mínimo de Cq é dependente da
31 quantidade de moléculas presente no início do processo de amplificação, o
32 que significa que um menor número de moléculas inicialmente representa um
33 maior número de ciclos requeridos para gerar um aumento exponencial do

1 sinal da fluorescência que seja significativamente superior à *baseline* (Kubista
2 et al. 2006).

3 A tecnologia *SYBR® Green* baseia-se em um conjunto de moléculas
4 com a capacidade de se ligar de forma covalente à dupla cadeia de DNA e
5 que quando excitadas emitem uma fluorescência verde que é medida e
6 convertida numa quantidade de DNA. No início do processo a fluorescência é
7 reduzida, visto que as moléculas *SYBR® Green* livres não estão ligadas ao
8 DNA de dupla cadeia e como tal, o sinal produzido é mínimo. Ao longo do
9 processo, após a detecção dos iniciadores, quantidades crescentes dos
10 fluorocromos ligam-se à dupla cadeia de DNA pré-sintetizada pela enzima
11 Taq DNA polimerase. No fim da fase de extensão de cada ciclo, a
12 fluorescência é monitorizada e quantificada e, conseqüentemente, o DNA
13 amplificado é determinado (Kubista et al. 2006) (Nascimento et al. 2014).

14 A tecnologia TaqMan® utiliza-se de sondas fluorogênicas específicas
15 para determinado DNA alvo. A detecção e monitorização da atividade
16 exonucleotídica 5"-3" daTaq DNA polimerase é fundamental nesta tecnologia,
17 sendo utilizados para tal, dois iniciadores específicos de uma determinada
18 sequência de DNA e uma sonda Taqman® homóloga à região do fragmento
19 de DNA entre os primers. A sonda apresenta na extremidade 3" uma molécula
20 que aceita a energia da molécula *reporter* e a dissipa na forma de luz ou
21 calor, designada na literatura como *quencher* e na extremidade 5" um
22 fluorocromo *reporter*. A proximidade física da molécula *reporter* e do *quencher*
23 no princípio da análise suprime a detecção da fluorescência. Ao longo da
24 reação, as sondas ligam-se à sequência alvo com a qual apresentam uma
25 total complementaridade. Posteriormente, as sondas TaqMan® hibridizam e
26 são detectadas pela enzima Taq DNA polimerase que a hidrolisa pela sua
27 atividade exonucleotídica 5"-3. Este processo conduz à separação do
28 *quencher* da molécula *reporter*, durante a extensão resultando em um
29 aumento exponencial da intensidade de fluorescência até um ponto onde
30 pode ser detectado. É possível então estabelecer uma relação inversa entre o
31 número de moléculas de DNA iniciais na reação e o valor de Cq, que é a base
32 para os cálculos na PCR quantitativa (Nascimento et al. 2014) (Van Pelt-
33 Verkuil et al 2008).

1.3 Validação de métodos para diagnóstico laboratorial

1 Os métodos de ensaio para fins diagnósticos necessitam de completa
2 validação laboratorial, a qual deve ser subsidiada a partir de processos de
3 verificação de desempenho do método. Os ensaios de validação do método
4 são considerados como importante etapa da consolidação e adequação da
5 técnica. Em termos de garantia da qualidade, a Agência Nacional de
6 Vigilância Sanitária (ANVISA) define validação como sendo “o ato
7 documentado que atesta que qualquer procedimento, processo, equipamento,
8 material, operação ou sistema realmente conduza aos resultados esperados”.

9 Um ensaio validado é avaliado continuamente para assegurar a
10 adequação através dos resultados dos controles internos na execução de
11 cada ensaio. Ensaios aplicados aos indivíduos ou populações possuem
12 muitas finalidades, tais como: documentar se um país ou região encontra-se
13 livre de uma doença, evitando a propagação da doença através do comércio;
14 erradicação de uma infecção em uma região ou país, confirmando os casos
15 clínicos e estimando a prevalência da infecção, facilitando a análise de riscos
16 e identificação de indivíduos infectados para implementação de medidas de
17 controle (OIE, 2012).

18 Para direcionar as etapas e processos de validação de um método
19 laboratorial, existem os denominados órgãos de acreditação, os quais
20 determinam os requisitos necessários à validação de um método. No Brasil,
21 existem dois órgãos credenciadores para verificar a competência de
22 laboratórios de ensaios: a ANVISA e o Instituto Nacional de Metrologia,
23 Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO).

24 A principal normativa que estabelece as diretrizes de atuação e
25 validação para laboratórios que executa métodos de ensaio é a “ABNT NBR
26 ISO/IEC 17025 – Requisitos Gerais para a competência de laboratórios de
27 ensaio e calibração”. Esta norma preconiza não apenas os processos
28 necessários à validação de um método, como requisitos gerais para o
29 laboratório como um todo, por exemplo, calibração de equipamentos utilizados
30 no método, registros de dados e qualificação e treinamento de pessoal para
31 execução do método.

1.3.1 Requisitos de validação

1 Uma das propriedades fundamentais dos testes diagnósticos é a
2 validade de seus resultados, que pode ser mensurada mediante a sua
3 sensibilidade e especificidade, categorizando corretamente os indivíduos
4 doentes como positivos e os sadios como negativos. A especificidade
5 analítica é a habilidade de um método analítico de determinar somente o
6 analito que ele se propõe examinar. Ainda, também a habilidade do método
7 analítico em obter resultados negativos em concordância com os resultados
8 negativos obtidos pelo método de referência. A partir da análise da
9 especificidade diagnóstica deve-se garantir que o método é capaz de
10 distinguir a espécie de outros componentes ou agentes que possam levar a
11 resultados falsos positivos. Já a sensibilidade de um teste é definida pela
12 capacidade de determinado método detectar indivíduos verdadeiramente
13 doentes, ou seja, a parte das amostras de animais infectados que no ensaio
14 deverão ser positivas. O limite de detecção pode ser definido como a menor
15 quantidade ou grau que se pode detectar do analito em uma determinada
16 reação. Para ensaios de detecção direta, o limite de detecção pode ser
17 expresso como o número de cópias do genoma, unidades formadoras de
18 colônias, dose infecciosa, unidade formadora por placa, etc (Lalkhen;
19 McCluskey 2008).

20 A repetitividade é a capacidade de um método fornecer indicações
21 rigorosamente semelhantes para aplicações repetidas do mesmo analito sob
22 as mesmas condições de medição. Tais condições envolvem: mesmo
23 analista, mesmo equipamento, mesmo laboratório, etc. A reprodutibilidade é a
24 mais próxima concordância entre os resultados do mesmo analito, onde as
25 medições são feitas, sob condições diferentes, como por exemplo: analista,
26 equipamento ou reagentes. A precisão intermediária, também denominada de
27 reprodutibilidade interna, refere-se à precisão avaliada sobre a mesma
28 amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no
29 mesmo laboratório, mas definindo exatamente quais as condições específicas
30 a se variar (Fonseca Jr et al ,2013).

2.0 Objetivos

2.1 Objetivo geral

1 Desenvolver e validar uma reação em cadeia da polimerase em tempo
2 real (qPCR) capaz de detectar a presença do vírus da pseudovariola bovina
3 em amostras clínicas animais e humanas e em amostras para diagnóstico
4 oficial da doença no país.

2.2 Objetivos específicos

- 5 • Desenvolver uma qPCR que seja altamente eficaz, rápida e prática na
6 detecção de material genético do vírus da pseudovariola bovina.
- 7 • Validar a qPCR a partir de critérios de validação analítica como
8 sensibilidade, especificidade, repetibilidade e reprodutibilidade, dentre
9 outros.
- 10 • Estabelecer um novo método para diagnóstico de pseudovariola bovina
11 no Brasil, a ser utilizado nos laboratórios da Rede Nacional de
12 Laboratórios Agropecuários, pertencentes ao MAPA.

3.0 Material e métodos

3.1 Local

1 O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular do
2 Laboratório Federal de Defesa Agropecuária de Minas Gerais (LFDA-MG),
3 pertencente à rede de laboratórios do Ministério da Agricultura, Pecuária e
4 Abastecimento (MAPA). Todos os equipamentos, reagentes e demais
5 insumos utilizados neste trabalho pertencem ao Laboratório, que contém
6 todos os requisitos necessários para realização do projeto.

3.2 Amostras

7 As amostras utilizadas foram provenientes do banco de amostras do
8 Laboratório de Biologia Molecular do LFDA/MG. Estas amostras foram
9 coletadas e utilizadas para diagnóstico oficial de doenças infecciosas animais
10 no Brasil e posteriormente utilizadas em pesquisa e validação de métodos
11 moleculares de diagnóstico. A estirpe de referência utilizada (ATCC VR634), a
12 de mesma sequência utilizada para desenho dos oligonucleotídeos, foi
13 gentilmente cedida pelo Instituto Biológico (Secretaria de Agricultura e
14 Abastecimento do Estado de São Paulo). A titulação viral foi realizada pelo
15 Laboratório de Diagnóstico de Doenças Virais, do LFDA-MG, sendo o título
16 inicial de 10^4 doses infecciosas em 50 % de cultura de tecidos por 50
17 microlitros (10^4 TCID₅₀/50uL). A amostra obtida a partir de lavado de swab de
18 lesão de crosta humana foi gentilmente cedida pelo Professora Giliane
19 Trindade, do Departamento de Microbiologia, do Instituto de Ciências
20 Biológicas da UFMG.

3.3 Equipamentos

21 As micropipetas, termocicladores, cabines de segurança biológica e
22 demais equipamentos utilizados são devidamente calibrados e/ou verificados
23 conforme periodicidade preconizada pela ISO/IEC 17025/2017, normativa do
24 INMETRO que estabelece as Diretrizes Gerais para Competência de
25 Laboratórios de Ensaio e Calibração.

3.4 Extração de DNA das amostras biológicas

1 A extração de DNA das amostras foi realizada por método de coluna de
2 sílica utilizando-se o kit *DNeasy® Blood & Tissue Kit*, da *Qiagen®*, conforme
3 instruções do fabricante.

3.5 Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores

4 Regiões gênicas conservadas do vírus foram escolhidas como alvo para
5 amplificação na qPCR a partir de literatura constando o sequenciamento
6 completo do vírus (Hautaniemi et al. 2010). A estirpe de referência utilizada foi
7 a PCPV_VR634, depositada no GenBank (NCBI) com número de acesso
8 NC_013804. A sequência escolhida para a construção dos iniciadores foi uma
9 pertencente à ORF80 do PCPV, responsável por codificar uma proteína do
10 nucleocapsídeo viral (Hautaniemi et al. 2010). Após a construção dos
11 iniciadores e sonda de hibridização, todos os oligonucleotídeos foram
12 analisados no programa *OligoAnalyser3.1* (IDT, USA) para verificação das
13 estruturas secundárias e de possíveis dímeros formados. A especificidade *in*
14 *silico* dos iniciadores foi testada no programa *PrimerBlast* (NCBI). O amplicon
15 obtido na reação possui 150 pares de bases.

Tabela 2 - - Relação de iniciadores e sonda utilizada para padronização da qPCR

Iniciadores	Sequência	Posição no genoma	Temperatura de melting (T _m)
PCPV.ORF80.150.F	GATGGTATCCTTGCTGCTAGATC	91859-91881	54,7 °C
PCPV.ORF80.150.R	AGACCCAGTTTGTACCACAATC	92008-91987	54,9 °C
PCPV.ORF80.150.S	CGCACGCGCTTGCTGGT Fluoróforo : HEX <i>Quencher : IowaBlack</i>	91958-91937	61,7 °C

R : reverse ; F: forward ; S:sonda

3.6 Padronização dos reagentes e curva de temperatura

1 Para a determinação da concentração ideal dos oligonucleotídeos
2 iniciadores, cloreto de magnésio (MgCl₂) e demais componentes do Master
3 mix , foram realizados ajustes nas quantidades de reagentes, a fim de se
4 verificar a proporção de cada um com o melhor desempenho.

5 O volume final da reação foi padronizado em 25 µL, sendo 22 µL de
6 mix mais 3 µL da amostra. Para todas as etapas de validação descrita em
7 diante, foi utilizada a seguinte composição para o mix: 1 µL de cada iniciador
8 na concentração de 10 pmol/µL ; 0.5 µL da sonda a 10 pmol/µL ; 12,5 µL do
9 mastermix *QuantiTect Probe PCR Kit® (Qiagen®)* ; 2 µL de MgCl₂ a 25mM e
10 5 µL de água DECP estéril para completar o volume para 25 µL.

11 Para todas as reações foi utilizado o termociclador *Biorad CFX96™*
12 *Real-Time System*. Foi utilizado o seguinte ciclo de temperatura:
13 desnaturação inicial de 95 °C por 15 min, mais 45 ciclos de 95 °C por 15s
14 para desnaturação e 60 °C por 60s para anelamento e extensão.

3.7 Critérios de validação

1 Os parâmetros para a validação utilizados neste trabalho, assim como
2 as condições de instalação e equipamentos descritas acima, seguem as
3 diretrizes e etapas constantes no *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for*
4 *Terrestrial Animals 2010* (OIE, 2018) e no Manual de Verificação de
5 Desempenho de Métodos para Diagnóstico Molecular de Doenças Infecciosas
6 na Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários (Brasil, 2013).

3.7.1 Controles

7 Todos os controles cabíveis a cada experimento foram utilizados s nas
8 reações, de acordo com a definição dada pelo Manual de Verificação de
9 Desempenho de Métodos para Diagnóstico Molecular de Doenças Infecciosas
10 na Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários (Brasil, 2013):

11 Controle positivo: Amostra que sabidamente contém o agente etiológico a ser
12 identificado pela qPCR. O objetivo de se utilizar esta amostra é garantir que
13 todos os procedimentos culminem na amplificação do agente infeccioso alvo no
14 grupo de ensaio

15 Controle negativo: Matriz adicionada de todos os componentes que a
16 acompanham, exceto o agente infeccioso a ser diagnosticado. O propósito é
17 verificar se ocorreram reações inespecíficas com a matriz.

18 Controle de extração: Durante o processo de extração de amostras clínicas, foi
19 utilizado um tubo com água ou tampão para controle. O propósito é verificar se
20 ocorreram contaminações na etapa de extração.

21 Controle branco da reação: Tubo de reação para PCR apenas com os
22 reagentes utilizados, sem amostra. O propósito é verificar se ocorreram
23 contaminações nos reagentes.

3.7.2 Especificidade diagnóstica

24 Realizaram-se as reações de qPCR com amostras de teto e língua
25 bovinas (n total = 92) sabidamente negativas para o agente PCPV, para
26 verificar-se a capacidade do teste a ser validado em indicar o resultado

1 negativo em amostras realmente negativas e também verificar indiretamente a
2 influência do DNA do hospedeiro nas amostras a partir de eventuais reações
3 cruzadas com o genoma de uma espécie hospedeira.

3.7.3 Especificidade analítica

4 Foram utilizadas amostras, provenientes do banco de dados do
5 Laboratório de Biologia Molecular do LFDA-MG, comprovadamente positivas
6 para outros agentes com similaridade genômica com o PCPV, porém negativas
7 para este agente, a fim de atestar a capacidade do teste de indicar resultados
8 realmente negativos. Para tal finalidade, foram utilizadas amostras unicamente
9 positivas para outros vírus da Família *Poxvirus* - ORFV, BSPV e *Vaccinia vírus*
10 (VACV). Nesta etapa também foi utilizada uma amostra positiva para VACV
11 proveniente de lavado de *swab* de crosta de lesão em mão humana.

12 Também foram testadas amostras positivas para vírus cujas lesões
13 causadas apresentam similaridade clínica com as lesões causadas pelo PCPV
14 em animais ou humanos – vírus da língua azul (BTV), diferentes subtipos do
15 vírus da estomatite vesicular (VSV): *Nova Jersey*, *Indiana* e *Cocal*. Além de
16 amostra usada como controle positivo para o vírus da febre aftosa (FMDV) e
17 amostra positiva para *Staphylococcus aureus*.

3.7.4 Sensibilidade diagnóstica

18 A qPCR em validação foi testada frente a um painel de amostras
19 positivas para a espécie PCPV ou para o gênero PPV (posteriormente
20 sequenciadas para confirmação da espécie) de acordo com métodos
21 moleculares tradicionais ou qPCR inespecífica para PPV, anteriormente citada,
22 selecionadas de acordo com o histórico e banco de dados proveniente de
23 análises de diagnóstico oficiais realizadas no Laboratório de Biologia Molecular
24 do LFDA-MG. Tal etapa foi realizada a fim de se verificar a capacidade do teste
25 em atestar reais resultados positivo.

26 Os cálculos e análises estatísticas para avaliação do método, em
27 relação aos itens 3.7.2; 3.7.3 e 3.7.4 incluem cálculo do índice de

- 1 especificidade, de sensibilidade e do índice Kappa de Cohen (Brennan;
- 2 Prediger 1981), com intervalo de confiança de 95%. O índice foi calculado de
- 3 acordo com as tabelas e fórmulas expostas abaixo:

Tabela 3 - esquema padrão de resultados das amostras controle e resultados do teste a ser validado

		Amostras Controle (positivas ou negativas em outros ensaios)		TOTAL
		CP	CN	
qPCR	+	TP	FP	TP+FP
	-	FN	TN	FN+TN
TOTAL		TP+FN	FP+TN	n= TP+TN+FN+FP

CP= controle positivo; CN= controle negativo; TP= número de resultados positivos pelo qPCR e CP; TN= número de resultados negativos pelo qPCR e CN; FN= número de resultados positivos pelo CP e negativos pelo qPCR; FP= número de resultados negativos pelo CN e positivos pelo qPCR

$$\text{Coincidência observada} = \frac{TP + TN}{n}$$

$$\text{Coincidência esperada} = \frac{(TP + FN) \times (TP + FP) + (FP + TN) \times (FN + TN)}{n \times n}$$

O índice Kappa de Cohen é obtido por

$$K = \frac{\text{Coincidência observada} - \text{Coincidência esperada}}{1 - \text{Coincidência esperada}}$$

Tabela 4 - Qualificação das forças de coincidências pelo Índice de Kappa de Cohen (Brennan Prediger 1981)

Índice de Kappa de Cohen	Força de coincidência
0	Pobre
0,01-0,020	Leve
0,21-0,40	Aceitável
0,41-0,60	Moderada
0,61-0,80	Considerável
0,81-1,00	Quase perfeita

Tabela 5 - Especificações sobre o teste quanto a sensibilidade e especificidade

	Índice	Bom teste	Teste deve ser reavaliado
	Especificidade	> 0,95	Quando pelo menos um dos índices de bom teste não é cumprido
	Sensibilidade	>0,80	
Erro tipo I	$p_{FP} = 1 - \text{especificidade}$	$\leq 0,05$	
Erro tipo II	$p_{FN} = 1 - \text{sensibilidade}$	$< 0,20$	
	$p_{FP} + p_{FN} \leq 0,25$	$< 0,25$	

3.7.5 Limite de detecção e eficiência da reação

1 A determinação do limite de detecção (LD) de DNA específico pela
 2 qPCR foi realizada tanto utilizando-se plasmídeo padrão (CPS 19) que possui
 3 a região de interesse quanto o vírus de referência.

4 A concentração inicial do plasmídeo foi de 50 ng/uL. Foram realizadas
 5 sete diluições em série (escala de base 10) do plasmídeo concentrado, sendo
 6 a concentração inicial para a construção da curva a diluição em 10^{-3} vezes em
 7 relação à inicial, a qual corresponde à diluição de uso na prática do laboratório.
 8 Sendo assim, foi verificado o limite de detecção a partir das seguintes

1 concentrações, em triplicata: de 5×10^{-2} ng/uL a 5×10^{-8} ng/uL, ou 5×10^{-5}
2 pg/uL. O LD foi determinado pela última diluição na qual as amostras
3 apresentaram resultado positivo em todas as replicatas. O LD foi expresso em
4 número de cópias/ uL, considerando-se a concentração em nanogramas da
5 diluição limite e o fato de que o plasmídeo possui aproximadamente 4500 pares
6 de bases. Para confirmação do resultado, a diluição na qual foi obtido o LD foi
7 repetida em sete replicatas. Além disso, também foram repetidas uma diluição
8 abaixo e uma diluição acima do LD obtido, em sete replicatas para confirmação
9 dos resultados. Para verificar a possível influência da matriz de amostras
10 bovinas, para as últimas três diluições em que houve resposta positiva, o
11 plasmídeo padrão foi contaminado com 50 ng de DNA bovino (epitélio), e foram
12 analisados em replicata a fim de constatar se o DNA do hospedeiro teria
13 influência no LD.

14 Para o vírus de referência, também foi obtida uma curva a partir de nove
15 diluições em escala de dez a partir do vírus concentrado, que possuía título
16 inicial de 10^4 TCID₅₀/50uL, desta forma, o menor título testada foi 10^5
17 TCID₅₀/50uL. O LD foi determinado a partir da menor diluição em que ainda
18 houve detecção nas três replicatas.

3.7.6 Repetibilidade e reprodutibilidade

19 A verificação de desempenho do teste foi também avaliada a partir dos
20 parâmetros de repetibilidade e reprodutibilidade. A repetibilidade foi avaliada a
21 partir do grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de
22 um mesmo mensurando, efetuadas sob as mesmas condições de medição. Ela
23 é expressa quantitativamente, em função das características da dispersão dos
24 resultados. As condições de repetibilidade incluem:

- 25 - mesmo procedimento de medição;
- 26 - mesmo material;
- 27 - mesmo laboratório;
- 28 - mesmo analista;
- 29 - mesmo instrumento de medição (equipamento), utilizado nas mesmas
30 condições;
- 31 - as medições devem ser realizadas em intervalos de tempos pequenos.

1 Foram selecionadas sete amostras de uma mesma matriz (teto bovino),
2 que dentre elas foram contaminadas com diferentes concentrações do
3 plasmídeo padrão (0,5 ng/uL; 0,05 ng/uL; 0,005 ng/uL). Estas amostras foram
4 fracionadas em três séries de sete amostras cada. Os DNAs das amostras
5 foram extraídos de acordo com os procedimentos acima descritos e foram
6 realizadas três séries de reações com o teste a ser validado. Estas três séries
7 foram realizadas pelo mesmo analista, no mesmo equipamento (*Biorad CFX*
8 *96™ Real Time System*), e em um intervalo de tempo máximo de três dias.

9 A reprodutibilidade intralaboratorial é o grau de concordância entre os
10 resultados das medições de um mesmo mensurando, em condições variadas
11 para o mesmo método de ensaio. Neste caso foi realizada verificação de
12 reprodutibilidade entre analistas. As três séries de amostras foram testadas por
13 dois diferentes analistas seguindo-se os mesmos critérios de igualdade de
14 condições acima descritos. A figura 7 mostra o esquema de execução do teste
15 de reprodutibilidade entre analistas.

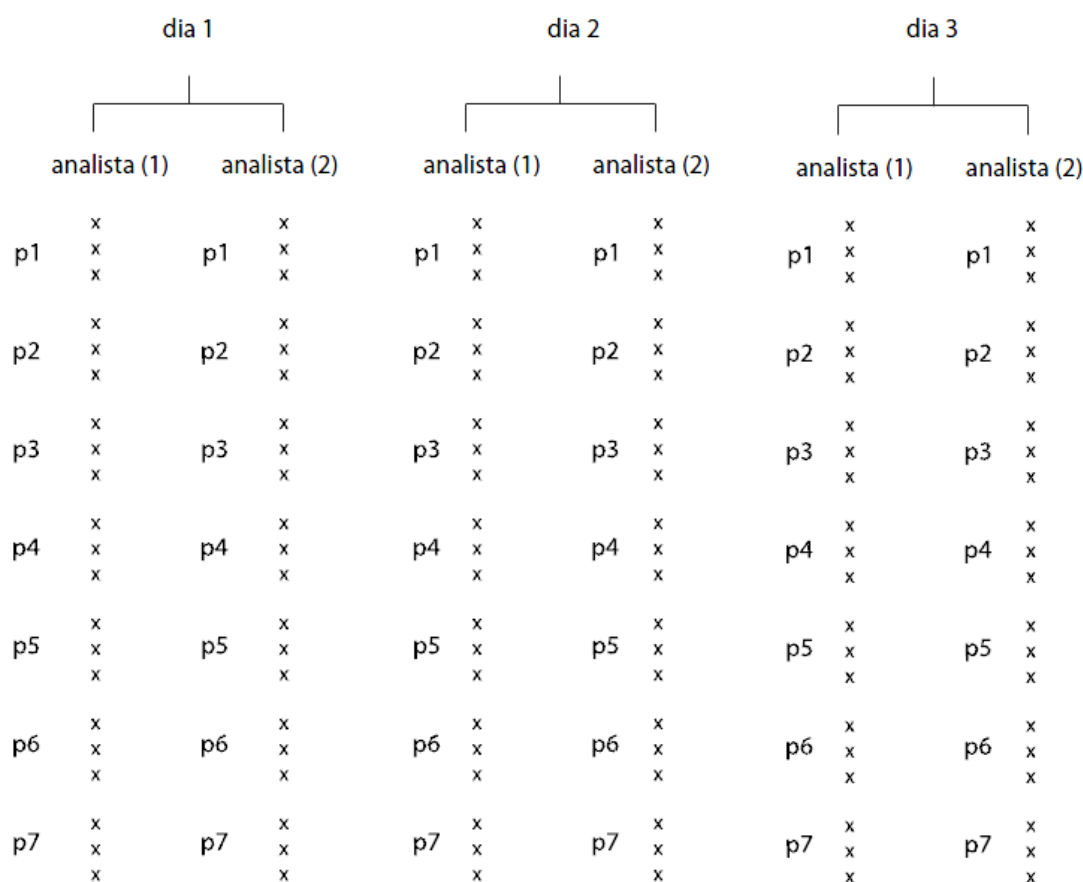


Figura 7 - Esquema de amostragem para verificação de desempenho entre dois analistas para a técnica de qPCR para detecção do vírus da pseudovariola bovina.

O conjunto de 3 “x” representa uma parcela experimental em triplicata.

1 Também foram realizados testes de reprodutibilidade variando-se as
 2 condições de reagentes do mix, utilizando-se diferentes kits comerciais,
 3 diferentes do *QuantiTect Probe PCR Kit® (Qiagen®)*, empregado nas demais
 4 etapas da validação, exatamente com as mesmas amostras e condições
 5 descritas para avaliação de reprodutibilidade entre analistas. Como cada kit
 6 comercial contém uma diferente composição e proporção de reagentes,
 7 também foi necessário empregar cada ciclo de temperatura de acordo com o
 8 indicado pelo fabricante. Para o kit *Applied Biosystems™ TaqMan™ Fast*
 9 *Advanced Master Mix* foi utilizado o seguinte ciclo: 50 ° C por 2 minutos, 95 ° C
 10 por 20 segundos e mais 45 ciclos de 95 ° C para 5 segundos e 60 ° C por 30

1 segundos. Para o kit *TaqMan® Fast Virus 1-Step Master Mix*, da *Applied*
2 *Biosystems*®, foi aplicado o seguinte ciclo: 50° C por 5 minutos, 95°C por 20
3 segundos e mais 45 ciclos de 95°C para 5 segundos e 60° C por 30 segundos.

4 Os valores de Cq obtidos foram lançados na planilha “Verificação de
5 Métodos Moleculares”, documento utilizado para a verificação dos cálculos de
6 repetibilidade e reprodutibilidade dos métodos moleculares desenvolvidos no
7 LFDA-MG, de acordo com o preconizado pelo Manual de Verificação de
8 Desempenho de Métodos para Diagnóstico Molecular de Doenças Infecciosas
9 na Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários (Brasil, 2013) De acordo
10 com os valores informados, é emitido o resultado de declaração de
11 conformidade do método, quanto a repetibilidade e reprodutibilidade, ou a
12 indicação de necessidade de adequação e repetição das medidas.

13 A análise estatística da variância dos dados foi realizada pelo
14 teste One-way ANOVA e com intervalo de confiança de 95 %, para verificar-se
15 a incerteza expandida e combinada das medidas. Foram verificadas a
16 adequação do sistema de medidas e aceitabilidade do erro de medidas para
17 repetibilidade e reprodutibilidade. A partir do teste F com 5 % de probabilidade,
18 são avaliadas as fontes de contribuição para a variância das medidas que
19 afetam a reprodutibilidade do teste, como variação entre kits e analistas ou
20 entre parcelas experimentais. “Os dados são inseridos na planilha validada
21 “Verificação de Desempenho de Métodos Moleculares”, conforme indicado
22 pelo” Manual de Verificação de Desempenho de Métodos para Diagnóstico
23 Molecular de Doenças Infecciosas na Rede Nacional de Laboratórios
24 Agropecuários (Brasil, 2013)”. O resumo com as conclusões e critérios
25 avaliados encontra-se na Tabela 6.

Tabela 6 - Resumo das conclusões de verificação de desempenho para repetibilidade e reprodutibilidade

TABELA DE CRITÉRIOS DE VERIFICAÇÃO DE DESEMPENHO			
Aceitabilidade e adequação do sistema de medidas	repê ≤ 5%	O sistema de medidas está adequado	
	reprê ≥ 5%	O sistema de medidas não está adequado para este experimento	
	erro da medida ≤ 30%	O sistema de medidas é aceitável	
	erro da medida > 30%	O experimento deve ser reconduzido para se reduzir a medida de variabilidade, os motivos dessa variabilidade devem ser pré-avaliadas	
IC (95%) Combinada-u	Incerteza	Padrão	Cumprir critérios de aceitabilidade e adequação do sistema de medidas
IC (95%) Expandida- U	Incerteza	Padrão	Cumprir critérios de aceitabilidade e adequação do sistema de medidas
Zona de confiança para um valor específico de mensurando			Valores dentro dos limites de critério do teste
Decisão sobre a hipótese de igualdade entre	Fontes de variação	Teste F ao nível de 5% de probabilidade	
		Resultado	Conclusão
	Dia ou equipamento ou amostras de mesma origem	Significante	Verificar os motivos da significância para se concluir inadequação do método
		Não significativa	Aceitar o método
	Analista ou equipamento	Significante	Verificar os motivos da significância para se concluir a inadequação do método
		Não significativa	Aceitar o método
	Parcelas experimentais	Significante	Aceita o método- a significância é devida à alta variabilidade entre as parcelas
		Não Significante	Aceita o método

4.0 Resultados

4.1 Limite de detecção

- 1 O limite de detecção foi realizado com uma amostra do vírus isolado, em
- 2 nove diluições a partir da inicial, concentração de 10^4 TCID₅₀/50uL.
- 3 Ocorreu a detecção nas três replicatas até a quinta diluição do vírus, ou
- 4 seja, até a concentração de 10^{-1} TCID₅₀/50uL. A curva apresentou R² igual a
- 5 0,99 e eficiência de 106 %.

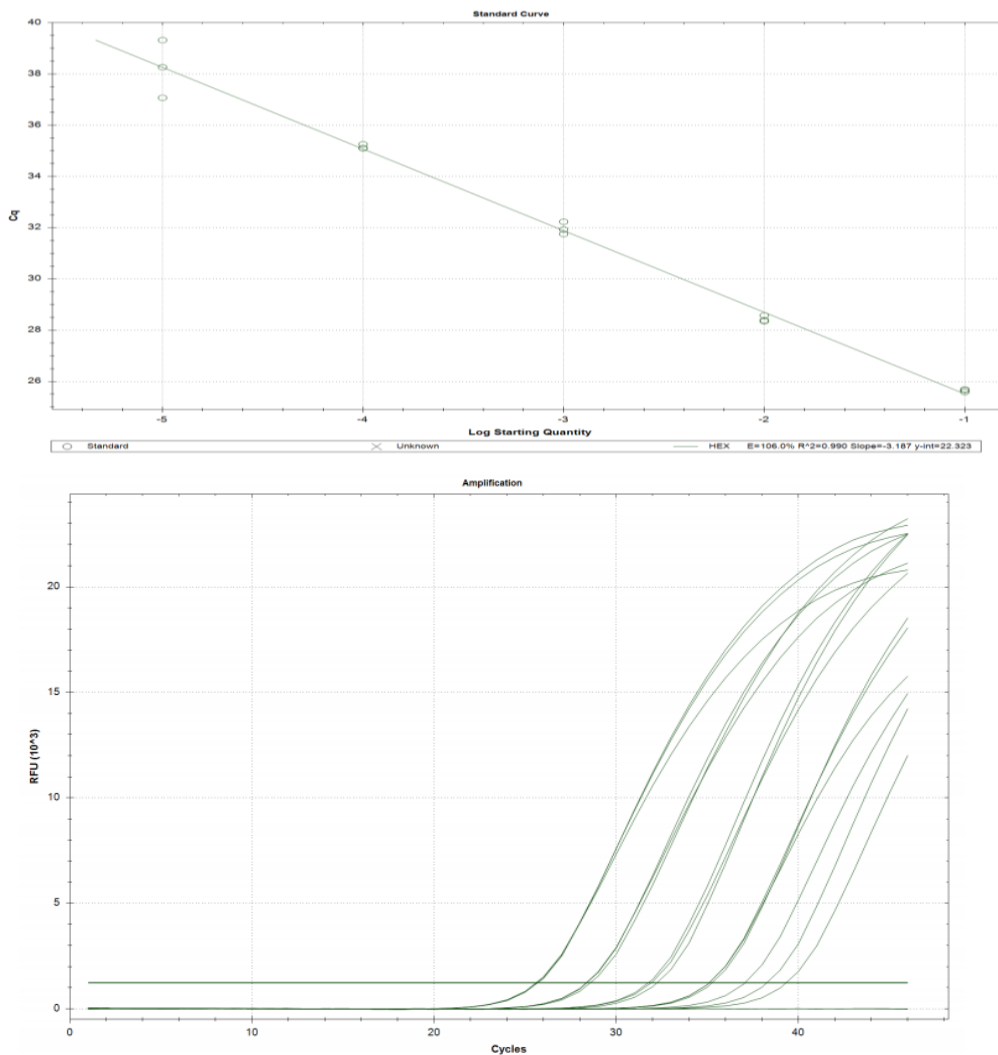


Figura 8 - Limite de detecção em amostra de vírus isolado da pseudovaríola bovina

Tabela 7 - Valores de Cq encontrados para cada título de vírus no teste de limite de detecção

Título do vírus	Valor médio de Cq
10 ³ TCID ₅₀ /50uL	25,64
10 ² TCID ₅₀ /50uL	28,44
10 ¹ TCID ₅₀ /50uL	31,97
10 ⁰ TCID ₅₀ /50uL	35,15
10 ⁻¹ TCID ₅₀ /50uL	38,22
10 ⁻² TCID ₅₀ /50uL	41,45 (2 replicatas)
10 ⁻³ TCID ₅₀ /50uL	Não detectado

1 Houve detecção, para o plasmídeo padrão, nas três replicatas, até a
2 concentração de 5×10^{-6} ng/uL, equivalente ao plasmídeo diluído 10^{-7}
3 vezes. Convertendo-se para número de cópias, o limite de detecção do
4 teste é de 1000 cópias por microlitro (10^3 cópias /uL). A curva apresentou
5 uma eficiência de 107 %, $R^2 = 0,99$ e slope = -3.151.

6 Para as três últimas diluições em que houve detecção nas três
7 replicatas, foi realizada uma curva de detecção com o plasmídeo
8 contaminado com DNA do hospedeiro (bovino), verificou-se que não
9 ocorreu uma redução no limite de detecção do teste nestas condições.
10 Sendo, porém, neste caso, o Cq médio para cada diluição cerca de uma
11 unidade maior, em comparação ao plasmídeo puro. Os valores de Cq
12 médios para cada ponto das curvas estão representados na Tabela 8.

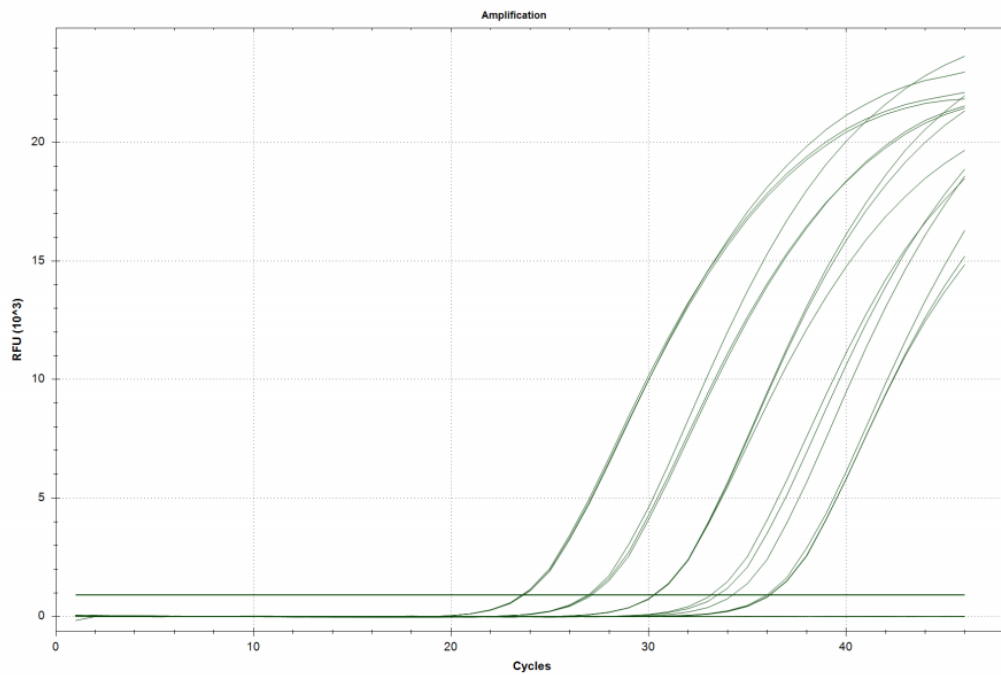
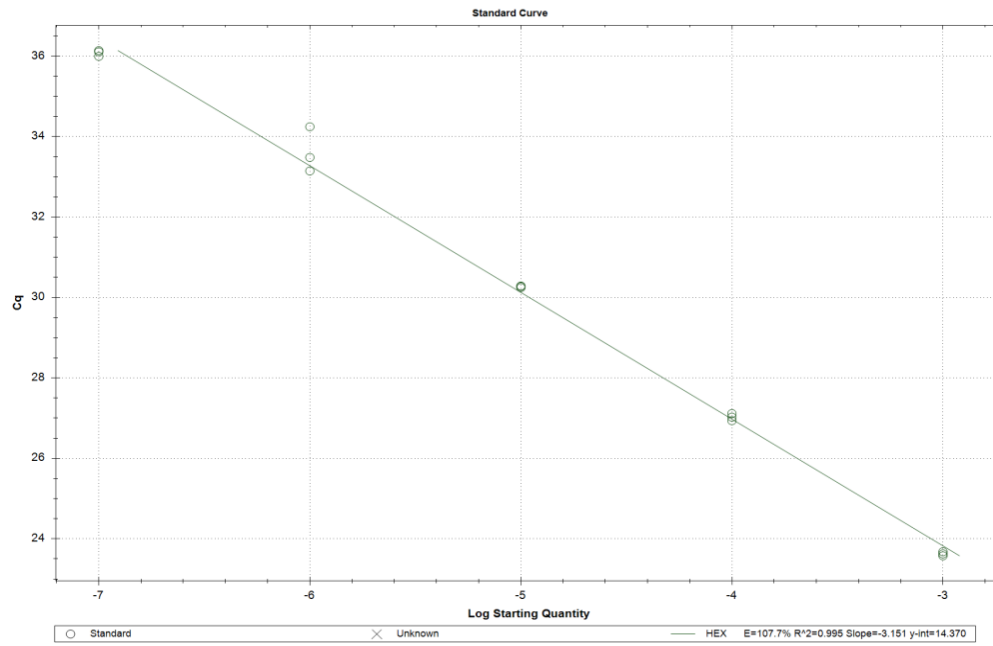


Figura 9 - Limite de detecção para o plasmídeo padrão contendo a sequência alvo

Tabela 8 - Valores de Cq encontrados para cada concentração do plasmídeo no teste de limite de detecção

Concentração do plasmídeo	Valor médio de Cq	Valor médio de Cq (com DNA do hospedeiro)
5 x 10 ⁻² ng/uL	23,63	----
5 x 10 ⁻³ ng/uL	27,02	----
5 x 10 ⁻⁴ ng/uL	30,27	31,49
5 x 10 ⁻⁵ ng/uL	33,63	34,97
5 x 10 ⁻⁶ ng/uL	36,08	38,21
5 x 10 ⁻⁷ ng/uL	39,78 – 2 replicatas	Não detectado
5 x 10 ⁻⁸ ng/uL	Não detectado	Não detectado

4.2 Sensibilidade e especificidade

- 1 Em relação à especificidade do teste, não houveram reações positivas
- 2 contra o DNA de tecidos bovinos não infectados (língua e teto), assim como
- 3 reações positivas contra outros agentes infecciosos presentes em
- 4 amostras, totalizando uma especificidade de 100 % para a qPCR.

Tabela 9 - Amostras utilizadas nos testes de especificidade analítica e diagnóstica

Agente infeccioso apresenta na amostra	Nº de amostras	Resultado na qPCR para PCPV
ORFV- Vírus ORF (ectima contagioso)	2	Negativo
BSPV – Vírus da estomatite bovina papular	2	Negativo
VACV- Vaccinia vírus	2	Negativo
BTV- Vírus da língua azul	1	Negativo
VSV- Vírus da estomatite vesicular	4	Negativo
FmDV- Vírus da Febre Aftosa	1	Negativo
Staphylococcus Aureus	1	Negativo
Amostras bovinas não contaminadas (teto e língua)	96	Negativo
Especificidade Total		100 %

1 Para avaliação da sensibilidade do teste, a qPCR em validação foi
2 testada frente a amostras atestadas como positivas como citado na
3 metodologia. Levando-se em conta também os valores de Cq da rotina
4 considerados suspeitos ou fraco positivos, o teste obteve sensibilidade de
5 aproximadamente 81,8 %. Considerando-se apenas amostras com Cq
6 abaixo de 38,0, a sensibilidade alcançada foi de 63,6 %.

Tabela 10 – Relação e descrição de amostras anteriormente positivas utilizadas para avaliação de sensibilidade

Ano de análise oficial LFDA/MG	Localidade no	Espécie hospedeira	Valor de Cq na qPCR em validação
2018	Castro-PR	Bovino	25,23
2016	Uberlândia-MG	Bovino	34,42
2016	Araguari-MG	Bovino	36,91
2016	Barra do Turvo-SP	Búfalo (Bubalus bubalis)	36,55
2017	Pedro Teixeira-MG	Bovino	Não detectado
2017	Santa Rita do Jacutinga	Bovino	Não detectado
2016	Iracema-RO	Bovino	39,10
2016	Brasil Novo-PA	Bovino	39,57
2016	Juiz de Fora-MG	Bovino	34,66
2017	Jacutinga-MG	Bovino	37,57
Abrahão et al. (2010)	Resplendor-MG	Humano	36,96

1 A partir da análise dos índices de sensibilidade e especificidade, o teste
2 cumpru todos os requisitos constantes no Manual de Verificação de
3 Desempenho de Métodos para Diagnóstico Molecular de Doenças Infecciosas
4 na Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários (Brasil, 2013), como exposto
5 abaixo. Calculando-se o índice de Kappa conforme as fórmulas e tabela de
6 referência descrita na metodologia, encontra-se uma força de coincidência do
7 nível quase perfeita (0,89), considerando a sensibilidade 82 % e especificidade
8 de 100 %.

Tabela 11 - Resultados pareados das amostras controle e qPCR

		Amostras Controle (positivas ou negativas em outros ensaios)		TOTAL
		CP	CN	
qPCR	+	9	0	9
	-	2	96	98
TOTAL		11	96	107

Tabela 12 - Síntese dos resultados de sensibilidade e especificidade da qPCR para PCPV

	Índice	Resultado	Conclusão
	Especificidade	1,0	Cumprir todos os requisitos (Tabela 5)
	Sensibilidade	0,82	
Erro tipo I	pFP=1-especificidade	0,0	
Erro tipo II	pFN = 1-sensibilidade	0,18	
	$pFP + pFN \leq 0,25$	0,18	

4.3 Repetibilidade e reprodutibilidade

1 Para a verificação de desempenho através dos testes de repetibilidade e
2 reprodutibilidade, a porcentagem de repetibilidade e a porcentagem do erro de
3 medida encontraram-se dentro dos parâmetros aceitáveis. Não foi encontrada
4 interferência significativa em relação ao teste realizado por dois diferentes
5 analistas, assim como não houve diferença significativa no desempenho do
6 teste utilizando-se diferentes kits comerciais para a composição dos mixes. O
7 compilado dos resultados encontra-se nas tabelas abaixo, as quais
8 representam a reprodução das conclusões apresentadas na supracitada
9 “Verificação de Desempenho de Métodos Moleculares”.

Tabela 13 – Verificação de desempenho do teste entre analistas

TABELA DE CRITÉRIOS DE VERIFICAÇÃO DE DESEMPENHO				
Aceitabilidade e adequação do sistema de medidas	repê = 1,60	O sistema de medidas está adequado		
	erro da medida = 6,79	O sistema de medidas é aceitável		
IC (95%) Combinada-u	Incerteza	Padrão	$0,31 \leq u \leq 0,42$	
IC (95%) Expandida- U	Incerteza	Padrão	$0,61 \leq U \leq 0,83$	
Zona de confiança para um valor específico de mensurando			$29,39 \leq 30 \leq 30,83$	
Decisão sobre a hipótese de igualdade entre	Fontes de variação		Teste F ao nível de 5% de probabilidade	
			Resultado	Conclusão
	Isolados virais		Não significativa	Aceita o método
	Analistas		Não significativa	Aceita o método
Parcelas experimentais		Significante	Aceita o método- a significância é devida à alta variabilidade entre as parcelas	

Conclusão: a avaliação de desempenho apresentou um sistema de medidas adequado e aceitável com relação à repetibilidade e reprodutibilidade. Os valores obtidos para o Cq e zona do limite de confiança estão dentro dos limites do critério do teste demonstrando que o método apresentou um bom desempenho.

Tabela 14 - Verificação de desempenho do teste entre o mix *QuantiTect Probe PCR Kit®* (Qiagen®) e o mix *Applied Biosystems™ TaqMan™ Fast Advanced Master Mix*

TABELA DE CRITÉRIOS DE VERIFICAÇÃO DE DESEMPENHO			
Aceitabilidade e adequação do sistema de medidas	repê = 1,14	O sistema de medidas está adequado	
	erro da medida = 15,18	O sistema de medidas é aceitável	
IC (95%) Combinada-u	Incerteza	Padrão	$0,54 \leq u \leq 0,81$
IC (95%) Expandida- U	Incerteza	Padrão	$1,09 \leq U \leq 1,63$
Zona de confiança para um valor específico de mensurando			$29,91 \leq 30 \leq 31,63$
Decisão sobre a hipótese de igualdade entre	Fontes de variação		Teste F ao nível de 5% de probabilidade
	Isolados virais		Resultado
			Conclusão
	Mixs		Não significativa
Parcelas experimentais		Não significativa	Aceitar o método
		Significante	Aceita o método- a significância é devida à alta variabilidade entre as parcelas

Conclusão: a avaliação de desempenho apresentou um sistema de medidas adequado e aceitável com relação à repetibilidade e reprodutibilidade. Os valores obtidos para o Cq e zona do limite de confiança estão dentro dos limites do critério do teste demonstrando que o método apresentou um bom desempenho.

Tabela 15 - Verificação de desempenho do teste entre o mix *Quantitect Probe PCR Kit*® (Qiagen®) e o mix *TaqMan*® *Fast Virus 1-Step Master Mix*

TABELA DE CRITÉRIOS DE VERIFICAÇÃO DE DESEMPENHO				
Aceitabilidade e adequação do sistema de medidas	repê = 1,46	O sistema de medidas está adequado		
	erro da medida = 15,49	O sistema de medidas é aceitável		
IC (95%) Combinada-u	Incerteza	Padrão	$0,30 \leq u \leq 0,40$	
IC (95%) Expandida- U	Incerteza	Padrão	$0,59 \leq U \leq 0,80$	
Zona de confiança para um valor específico de mensurando			$29,41 \leq 30 \leq 31,80$	
Decisão sobre a hipótese de igualdade entre	Fontes de variação		Teste F ao nível de 5% de probabilidade	
			Resultado	Conclusão
	Isolados virais		Não significativa	Aceita o método
	Mixs		Não significativa	Aceitar o método
Parcelas experimentais		Significante	Aceita o método- a significância é devida à alta variabilidade entre as parcelas	

Conclusão: a avaliação de desempenho apresentou um sistema de medidas adequado e aceitável com relação à repetibilidade e reprodutibilidade. Os valores obtidos para o Cq e zona do limite de confiança estão dentro dos limites do critério do teste demonstrando que o método apresentou um bom desempenho.

5. 0 Discussão

1 A validação de metodologias de diagnóstico laboratorial é um requisito
2 dos órgãos de acreditação, como o INMETRO, e dos órgãos oficiais nacionais
3 e internacionais, como o MAPA, o MS, a OMS, e a OIE. Ela deve ser feita
4 seguindo todas as diretrizes existentes e subsidiada por processos de
5 verificação de desempenho, para que se possa estatisticamente comprovar
6 que o resultado diagnóstico apresentado é confiável e reprodutível. Todo o
7 desenvolvimento e validação da metodologia deste trabalho seguiram as
8 etapas obrigatórias, constantes no Manual de Verificação de Desempenho de
9 Métodos para Diagnóstico Molecular de Doenças Infecciosas na Rede
10 Nacional de Laboratórios Agropecuários (Brasil, 2013), para a utilização deste
11 método como molecular diagnóstico oficial em amostras recebidas pelo
12 MAPA. Porém, antes de se discutir os resultados encontrados dentro dos
13 critérios de validação, deve-se ponderar questões quanto ao desenho dos
14 oligonucleotídeos e quanto a etapa de desenvolvimento do teste, em relação
15 à composição do mix de reação.

16 A escolha da região do genoma do vírus a qual será o alvo dos
17 iniciadores utilizados no método molecular é a primeira e fundamental etapa
18 no desenvolvimento de uma técnica de qPCR. A maioria dos trabalhos que
19 reportam desenvolvimento de técnicas de PCR para detecção do gênero
20 *Parapoxvirus*, ou trabalhos que reportam a detecção das espécies deste
21 gênero no campo, utilizam como alvo o gene responsável por codificar a
22 proteína B2L (ortólogo do gene F13L do vírus vaccinia, que codifica a proteína
23 de envelope p37K), componente do envelope viral de todas as espécies do
24 gênero PPV (Inoshima et al. 2000) (Abrahão et al. 2009) (Laguardia-
25 Nascimento et al. 2017). Hui et al. (2013) desenvolveram reações de qPCR
26 específicas para PCPV, BSPV e ORFV. Tais iniciadores já foram testados no
27 nosso laboratório, com ocorrência de significantes reações falso-positivas
28 inter-espécies dentre os vírus. Portanto fez-se necessário a escolha de uma
29 nova região do genoma como alvo.

30 Hautaniemi et al. (2010) foram os primeiros a realizar o
31 sequenciamento completo da estirpe de referência (VR634) utilizada neste
32 estudo. Ainda, compararam o genoma completo sequenciado com o genoma

1 de um vírus da pseudovariola bovina isolado a partir de um animal doente e
2 compararam o grau de similaridade de cada ORF do vírus sequenciado com
3 a ORF correlata do genoma das outras espécies do gênero (BSPV e ORFV),
4 a partir de sequencias completas disponíveis na literatura e em bancos de
5 genomas. Desta forma foi possível selecionar uma região do genoma que
6 possuísse uma similaridade relativa dentre as duas estirpes seqüenciadas do
7 PCPV, indicando uma região altamente conservada; ao mesmo tempo que
8 fosse uma região com boa relativa porcentagem de diferenciação de sua
9 sequência em comparação às outras espécies do gênero, evitando-se
10 reações cruzadas. A região selecionada foi a open reading frame 80 (ORF80),
11 que codifica uma proteína do nucleocapsídeo viral de função não
12 completamente conhecida. De acordo com Delhon e colaboradores (2004),
13 essa região pode estar envolvida na montagem da partícula viral. Além de
14 estar envolvida em função essencial para a replicação viral, esta proteína está
15 na região central do genoma do vírus, a qual é menos susceptível a
16 mutações, fator esse positivo em relação a conservação do genoma dentre
17 diferentes amostras.

18 Quanto aos testes para composição do mix de reação ideal para
19 prosseguimento da validação da metodologia, algumas variações na
20 proporção dos componentes da reação foram realizadas por tentativa e erro
21 utilizando-se o controle positivo a fim de obter-se o mix com melhor eficiência
22 da reação. A quantidade de iniciadores (10 pmol/uL) e sonda (5 pmol/uL) é
23 semelhante a diversas outras reações de qPCR utilizadas no nosso
24 laboratório para diagnóstico viral. A diferença que se destaca é uma relativa
25 alta quantidade de cloreto de magnésio utilizada por reação em comparação a
26 outras qPCR, sendo 2 uL de MgCl₂ à concentração de 25 uM. Todavia, a alta
27 quantidade de MgCl₂ necessária no mix é completamente esperada e
28 compreensível. Já que os *Poxvirus* possuem uma elevada quantidade dos
29 nucleotídeos guanina e citosina (G+C), sendo ainda que, o PCPV possui a
30 maior porcentagem de G+C dentro do gênero PPV (Hautaniemi et al. 2011)
31 (Buttner; Rziha 2002). Sabe-se que o íon magnésio auxilia a atividade da
32 enzima DNA polimerase e é especialmente importante para aumentar a
33 eficiência de PCRs com amplicons ricos em G+C (Obradovic et al. 2013).

1 Para a avaliação e discussão de todos os processos de validação
2 realizados neste trabalho é fundamental destacar que o Manual de
3 Verificação de Desempenho de Métodos para Diagnóstico Molecular de
4 Doenças Infecciosas na Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários
5 (MAPA, 2013) envolve parâmetros e cálculos estatísticos para metodologias
6 com objetivo final qualitativo. Ou seja, mesmo que a qPCR seja um método
7 capaz de quantificar o DNA presente na amostra, o resultado de interesse em
8 questão para o diagnóstico da pseudovariola bovina é apenas a ocorrência de
9 resultados positivos ou negativos, Mesmo assim, a metodologia foi capaz de
10 detectar a presença do DNA alvo após sucessivas diluições em escala de
11 base 10 do plasmídeo padrão ou do vírus. Ocorreu detecção nas três
12 replicatas em até 10^3 cópias / μ L ou em uma concentração viral de 10^{-1}
13 TCID₅₀/50 μ L, em ambos os casos em um Cq de aproximadamente 38. Estes
14 foram definidos como o limite de detecção porque o manual preconiza tal
15 limite como a diluição em que ainda há reação nas três replicatas. Porém isso
16 não significa categoricamente que a reação de qPCR é capaz de detectar a
17 presença do vírus ou partículas virais até estritamente estas concentrações
18 ou estes valores de Cq, já que nas diluições seguintes ainda houve reação
19 positiva em duas replicatas.

20 Em termos apenas de número de diluições, foi possível detecção em
21 mais diluições do plasmídeo do que do vírus isolado, porém este dado por si
22 só não representa algum problema ou relevância pois o plasmídeo padrão e o
23 vírus não são controles positivos completamente comparáveis. O plasmídeo
24 foi produzido especificamente para expressar a exata sequência de
25 nucleotídeos capazes de se ligar aos iniciadores e sonda, sem a presença de
26 quaisquer interferentes ou possíveis deleções. O isolado viral, apesar de ser
27 uma estirpe padrão, pode sofrer alterações em sua sequência genômica
28 devido a passagens sucessivas em cultura de células (como ocorrido
29 previamente à obtenção da amostra pelo LFDA-MG) ou mesmo apresentar
30 variabilidade em relação a outras estirpes circulantes. Hautaniemi et al. (2011)
31 afirmaram que o PCPV pode sofrer deleções e outras alterações em seu
32 genoma após apenas sete passagens em culturas de células.

33 Quando acrescido de uma quantidade pré-determinada de DNA do
34 hospedeiro bovino, não ocorreu redução do limite de detecção, porém, houve

1 aumento nos Cqs para cada diluição, ocorrência que já era esperada. A
2 interferência devido a presença de elementos na matriz é amplamente
3 descrita na literatura, com possibilidade do aumento no valor de Cq para se
4 detectar a mesma quantidade de cópias em uma amostra ou mesmo a
5 geração de resultados falso negativos (Bansal et al. 2016) (Schulten *et al.*,
6 1997).

7 A eficiência da amplificação da PCR também é um parâmetro para
8 avaliar a qualidade do ensaio corresponde à taxa na qual um amplicon é
9 gerado. Se um amplicon de qPCR dobrar em quantidade durante a fase
10 exponencial da amplificação, sua eficiência será 100%. Para métodos
11 moleculares em quem o objetivo final é atestar positivo ou negativo, a
12 eficiência ideal gira em torno de 90 % a 110 % (Nascimento et al. 2014),
13 portanto a metodologia apresentou uma capacidade dentro dos parâmetros
14 estabelecidos.

15 Além disso, as curvas apresentaram boa precisão entre as replicatas e
16 uma regressão linear dentre as diferentes concentrações dentro do esperado,
17 com um diferença de aproximadamente três unidades de Ct entre cada diluição
18 na escala de 10, tanto para o vírus padrão quanto para o plasmídeo. As
19 replicatas ajudam na identificação dos problemas de precisão. As replicatas
20 apresentaram um baixo desvio padrão. O ideal é um desvio padrão $Cq > 0,5$.
21 Alguns experimentos podem tolerar pequenas variações das réplicas sem
22 interferir no resultado. Para avaliar a curva padrão o valor do R^2 deve ser
23 próximo de um. Valores de $R^2 < 0,99$ podem indicar problemas de precisão e
24 interferir na eficiência do ensaio (Kubista et al. 2006).

25 Um dos parâmetros fundamentais na avaliação de testes diagnósticos é
26 a mensuração de sua especificidade e sensibilidade. Resumidamente, a
27 sensibilidade é a capacidade do teste em detectar o agente em amostras no
28 qual ele de fato está presente, enquanto a especificidade é a capacidade do
29 método de não detectar o agente quando o mesmo não está presente. Sendo
30 assim, o método diagnóstico é avaliado por sua qualidade em categorizar
31 corretamente os indivíduos doentes como positivos e indivíduos sadios como
32 negativos (Lalkhen; McCluskey 2008).

33 A avaliação da especificidade do teste a ser validado incluiu amostras
34 negativas do hospedeiro bovino para se certificar que o teste não será capaz

1 de gerar reações positivas inespecíficas em indivíduos saudáveis. Também foi
2 fundamental avaliarem-se amostras positivas para outros agentes virais e
3 bacterianos, seja pela similaridade genômica com o PCPV ou similaridade das
4 lesões causadas em indivíduos doentes. Não houve reação positiva em
5 nenhuma das amostras testadas. Existe uma alta similaridade do genoma do
6 PCPV para com o genoma das outras espécies do mesmo gênero: BSPV e
7 ORFV. Sendo que, a similaridade entre PCPV e ORFV é ainda maior, mesmo
8 sendo a principal espécie hospedeira diferente entre esses vírus. Portanto, as
9 reações falso positivo inter-espécies nesta reação representaria
10 particularmente um alto risco, como ocorrido com os iniciadores utilizados por
11 Hui et al. (2013).

12 Além de ambos estarem classificados dentro da mesma família, as
13 lesões causadas pelo VACV e pelo PCPV são visualmente indistinguíveis,
14 justificando-se, portanto, a utilização de amostras positivas para VACV no teste
15 de especificidade. Outras doenças vesiculares como as causadas pelo vírus da
16 estomatite vesicular e pelo vírus da febre aftosa também podem ser
17 confundidas com lesões causadas pelo PCPV em bovinos. A não ocorrência de
18 reações cruzadas com o vírus da febre aftosa é particularmente importante
19 porque o teste a ser validado neste estudo fará parte da triagem de amostras
20 suspeitas para febre aftosa. Devido à similaridade de lesões epiteliais em
21 bovinos e humanos, amostras positivas para bactérias como *Staphylococcus*
22 *aureus* foram utilizadas, também por se saber que lesões causadas por vírus
23 no epitélio tornam o tecido mais susceptível a lesões secundárias bacterianas,
24 devido às atividades imunomoduladoras do vírus no microambiente tecidual
25 infectado (Abrahão et al. 2010) (Cargnelutti et al. 2015) Barravieira (2014).

26 Para determinação da sensibilidade do teste foram utilizadas amostras
27 anteriormente dadas como positivas em análises oficiais a partir de
28 metodologias convencionais. A reação validade foi capaz de detectar a
29 presença do agente em amostras de bovinos e também em uma amostra
30 proveniente de lavado de crosta de lesão humana. Foram consideradas como
31 positivas, para o cálculo da sensibilidade, também amostras classificadas como
32 fracas positivas ou suspeitas. Para tal foram considerados alguns aspectos
33 relacionados à prática do teste, como o fato de que a finalidade do mesmo é
34 qualitativa, sendo do interesse para sua realização do diagnóstico oficial

1 apenas a resposta de positivo ou negativo e considerando que todos as
2 avaliações de diagnóstico serão realizadas com a presença de controles
3 positivos e negativos. De acordo com Bustin; Nolan (2004), os valores de Cq
4 não podem ser avaliados de forma absoluta e fixa dentre todas as qPCR para
5 diferentes agentes e/ou controles. De acordo com os autores, para casos em
6 que ocorre amplificação do controle negativo com alto valores de Cq, as
7 amostras com Cq acima de cerca de 35 devem ser desconsideradas. Porém
8 em reações de 45 ciclos, como neste caso, com controles negativos não
9 apresentando nenhuma reação, amostras com Cq entre 37-39 podem ser
10 consideradas. Destacando-se que estes controles negativos referem-se tanto a
11 amostras negativas como em poços que contém apenas o mix sem nenhuma
12 amostra, para se poder certificar que qualquer reação ocorrida não seja devido
13 à formação de dímeros de iniciadores. Além disso, no teste de limite de
14 detecção, em que foram utilizadas amostras sabidamente contendo o agente
15 alvo e ausentes de contaminação, foi possível detectar o DNA em amostras
16 com Cq entre 38 e 39.

17 Bem como, para a discussão acerca da sensibilidade e valores de Ct,
18 devem ser ponderadas outras questões referentes à prática de diagnóstico
19 oficial no contexto do Laboratório de Biologia Molecular do LFDA-MG. O
20 diagnóstico de pseudovariola bovina a ser realizado por este método, apesar
21 da relevância em si desta zoonose, terá importância prioritariamente devido a
22 sua presença na triagem de amostras suspeitas para o vírus da febre aftosa,
23 altamente relevante economicamente e para a saúde animal. Portanto, mesmo
24 quando da verificação em amostra suspeita de reação positiva para PCPV,
25 serão realizados qPCRs para todas as outras doenças vesiculares
26 semelhantes, diminuindo ainda mais o risco de reais falso positivos em
27 amostras coletadas de animais sabidamente doentes.

28 Os únicos seqüenciamentos completos do genoma do PCPV
29 correspondem à estirpe de referência (VR634), obtida a partir de um isolado de
30 lesão em mão humana (Alemanha), e também uma estirpe isolada a partir de
31 lesão em cervo vermelho na Finlândia (Hautaniemi et al. 2010) (Friedman-Kien
32 et al. 1963). Portanto, não existem estirpes em circulação no Brasil totalmente
33 sequenciadas. Desta forma, por mais que os iniciadores tenham como alvo
34 regiões relativamente conservadas, podem ocorrer deleções e demais

1 diferenças entre os genomas das estirpes circulantes brasileiras com as
2 estirpes referência obtidas em pacientes europeus. O que poderia justificar
3 inclusive a não detecção em algumas amostras.

4 Segundo Buzard et al. (2012), existem limitações em estudos
5 comparativos de técnicas que avaliam apenas alternância de equipamentos e
6 reagentes, uma vez que nem sempre é possível seguir todas as
7 recomendações de ambos os fabricantes. Por este motivo, qPCRs, para fins
8 diagnósticos, precisam ser avaliadas sob métodos estatísticos em que se
9 observem tanto a repetitividade quanto a reprodutibilidade, isto é, a
10 correspondência dos resultados de uma mesma amostra em diferentes
11 rodadas e com três replicatas a cada amostra Segundo (Bustin; Nolan 2004),
12 realizar a corrida em triplicata e repetir o experimento três vezes favorece a
13 análise estatística significativa dos resultados.

14 A avaliação da repetibilidade do teste por um mesmo analista, em
15 diferentes rodadas experimentais com as mesmas amostras, demonstrou que
16 o método é capaz de fornecer respostas precisas quanto aos valores de C_q e
17 que as medidas possuem um grau de concordância dentro das mesmas
18 condições. A verificação de desempenho entre analistas mostrou que o
19 método é reprodutível e que não existem erros sistemáticos em relação à
20 execução do ensaio por um analista específico, o que poderia comprometer
21 toda a validação da metodologia. Estas análises de desempenho, a partir dos
22 valores de C_q encontrados, também forneceram como descrito na tabela 12,
23 a incerteza do método, o que mostra a faixa confiável da medida dentro de
24 um valor de C_q encontrado.

25 A sensibilidade e eficiência de qPCR pode ser alterada quando da
26 utilização de diferentes mix de reagentes ou equipamentos, razão pela qual é
27 necessário otimizar a técnica em função destas variações e adotar
28 procedimentos avaliativos seguros para a validação dos ensaios. A
29 composição dos mix de reagentes pode sofrer alterações na composição de
30 tampões ou concentração de cátions, sobretudo Mg²⁺. Também a presença
31 de inibidores presentes nas amostras tem influência de maneira diferente
32 sobre cada mix(Stephens et al. 2010) (Ribeiro et al. 2016). Por conseguinte,
33 a avaliação de reprodutibilidade do teste entre diferentes mix auxilia na
34 comprovação e validação de que o método de diagnóstico é funcional sob

1 diferentes condições e pode ser reproduzido por outros laboratórios ou em
2 outras condições em que o mix inicialmente utilizado na validação não esteja
3 disponível. A percentagem do erro de medida e a repetibilidade dentro os mix
4 foram significativamente mais baixos que o máximo permitido, assim como
5 não houve contribuição significativa da variação dos mix para a variância total
6 das medidas realizadas na diferentes rodadas.

7 A robustez de um método determina a força que este apresenta em face
8 de variações na metodologia. Quanto maior for a robustez de um método,
9 maior será a confiança desse quanto à sua precisão. Apesar de não se ter
10 avaliado diretamente a robustez do ensaio pós determinação inicial da
11 composição do mix da reação, por exemplo, com pequenas variações no
12 volume de amostra ou de mix, pode-se afirmar que essa mais ampla
13 verificação de desempenho do método com diferentes mixes aferiu
14 indiretamente a robustez para este aspecto. Ao passo que cada mix comercial
15 possui uma diferente proporção de reagentes, demonstrando-se que o ensaio é
16 capaz de responder a variação de concentrações de alguns componentes da
17 reação sem que ocorra diferença significativa nos resultados. Além disso, como
18 explicitado acima, até se chegar a composição ideal da reação foram testadas
19 variações na quantidade de iniciadores e cloreto de magnésio, por exemplo.

6.0 Conclusão

- 1 1 – A qPCR foi capaz de detectar 10^3 cópias /uL da região alvo do PCPV ,
2 com a curva de detecção apresentando valores de linearidade e eficiência
3 dentro dos parâmetros aceitáveis, sendo capaz de detectar o agente viral
4 mesmo em baixas quantidades em amostras clínicas.

- 5 2- O método apresentou sensibilidade de 81,8 % e especificidade 100 %,
6 demonstrando ser capaz de fornecer respostas exatas e confiáveis quanto à
7 presença ou ausência do PCPV em indivíduos.

- 8 3- O método também apresentou ótimo desempenho quanto a sua
9 repetibilidade e reprodutibilidade, mostrando-se adequado ao uso na rotina
10 diagnóstica a partir de sua validação de acordo com as normativas nacionais
11 e internacionais relacionadas à garantia da qualidade de um método de ensaio.

7.0 Referências

ABRAHÃO, J. S.; LIMA, L. S.; ASSIS, F. L.; et al. Nested-multiplex PCR detection of Orthopoxvirus and Parapoxvirus directly from exanthematic clinical samples. **Virology Journal**, v. 6, p. 1–5, 2009.

ABRAHÃO, J. S.; SILVA-FERNANDES, A. T.; ASSIS, F. L.; et al. Human Vaccinia virus and Pseudocowpox virus co-infection: Clinical description and phylogenetic characterization. **Journal of Clinical Virology**, v. 48, n. 1, p. 69–72, 2010.

ABUBAKR, M. I.; ABU-ELZEIN, E. M. E.; HOUSAWI, F. M. T.; et al. Pseudocowpox Virus: The Etiological Agent of Contagious Ecthyma (Auzdyk) in Camels (*Camelus dromedarius*) in the Arabian Peninsula. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 7, n. 2, p. 257–260, 2007. .

ALVES, P. A.; FIGUEIREDO, P. O.; DE OLIVEIRA, C. H. S.; et al. Occurrence of Pseudocowpox virus associated to Bovine viral diarrhea virus-1, Brazilian Amazon. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 49, p. 70–75, 2016. Elsevier Ltd.

BABKIN, I. V.; BABKINA, I. N. The origin of the variola virus. **Viruses**, v. 7, n. 3, p. 1100–1112, 2015.

BANSAL, R.; MITTAPELLY, P.; CHEN, Y.; et al. Quantitative RT-PCR Gene Evaluation and RNA Interference in the Brown Marmorated Stink Bug. **PLoS one**, v. 11, n. 5, p., 2016.

BARRAVIEIRA, S. R. C. S. Diseases Caused by poxvirus - orf and milker ' s nodules - a review. **J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.**, v. 11, n. 2, p. 102–108, 2014.

BATALLA, A.; ALVARES-ARGUELLES, M. E.; GONZALES-MARTINEZ, M. G.; CURTO, J. R. ~ Milker ' s nodule complicated with erythema multiforme. **Medicina Clinica**, v. 141, n. 3, p. 7753, 2013.

BENNET , J E . DOLIN , R . BLASER, M. J. **Principles and Practices of Infectious Diseases**. 2015.

BLACK, W.; WALBURGER, M. T. Identification of Pseudocowpox Virus in Angus Bull with Failure to Breed. **Austin Virology and Retrovirology**, v. 1, n. August, p. 1–5, 2014.

BRENNAN, R. L.; PREDIGER, D. J. Coefficient kappa: Some uses, misuses, and alternatives. **Educational and Psychological Measurement**, v. 41, n. 3, p. 687–699, 1981.

BURRELL, C.; HOWARD, C.; MURPHY, F. **Medical Virology**. 2016.

BUSTIN, S. A.; NOLAN, T. Pitfalls of quantitative real- time reverse- transcription polymerase chain reaction. **Journal of Biomolecular Techniques**, v. 15, n. 3, p. 155–166, 2004.

BUTTNER, M.; RZIHA, H. J. Parapoxviruses : From the Lesion to the Viral Genome. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 16, n. 49, p. 7–16, 2002.

BUZARD, G. S.; BAKER, D.; WOLCOTT, M. J.; NORWOOD, D. A.; DAUPHIN, L. A. Multi-platform comparison of ten commercial master mixes for probe-based real-time polymerase chain reaction detection of bioterrorism threat agents for surge preparedness. **Forensic Science International**, v. 223, n. 1–3, p. 292–297, 2012.

CARGNELUTTI, J. F.; FLORES, M. M.; TEIXEIRA, F. R. M.; WEIBLEN, R.; FLORES, E. F. An outbreak of pseudocowpox in fattening calves in southern Brazil. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 24, n. 2, p. 437–441, 2015.

CARGNELUTTI, J. F.; SANTOS, B. S.; LEBRE, S. DAS N.; et al. Pseudovaríola e estomatite papular em bovinos no Estado de Rondônia, Brasil. **Ciência Rural**, v. 44, n. 3, p. 479–485, 2014.

CARGNELUTTI, J. F.; WEIBLEN, R.; FLORES, E. F. A multiplex PCR for viruses associated with exanthematic and vesicular disease in cattle. **Journal of Virological Methods**, v. 239, p. 38–41, 2017. Elsevier B.V.

CARTER, G. C.; LAW, M.; HOLLINSHEAD, M.; SMITH, G. L. Entry of the vaccinia virus intracellular mature virion and its interactions with glycosaminoglycans. **Journal of General Virology**, v. 86, n. 5, p. 1279–1290, 2005.

CLÁUDIA, A.; ESPÓSITO, C.; ESTHER, M.; MARQUES, A. Milker ' s nodules : classic histological findings. **An Bras Dermatol.**, v. 2, n. 6, p. 838–840, 2017.

CYRKLAFF, M.; RISCO, C.; FERNÁNDEZ, J. J.; et al. Cryo-electron tomography of vaccinia virus. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 8, p. 2772–7, 2005.

DAS, A.; WARD, G.; LOWE, A.; et al. Development and validation of a highly sensitive real-time PCR assay for rapid detection of parapoxviruses. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 29, n. 4, p. 499–507, 2017.

DELHON, G.; TULMAN, E. R.; AFONSO, C. L.; et al. Genomes of the Parapoxviruses Orf Virus and Bovine Papular Stomatitis Virus. **Journal of Virology**, v. 78, n. 1, p. 168–177, 2004.

FAIRLEY, R. A.; MERCER, A. A.; COPLAND, C. I.; CRAIG, S. M.; HESLIP, P. A. Persistent pseudocowpox virus infection of the skin of a foot in a cat. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 61, n. 4, p. 242–243, 2013.

FISCHER, T.; PLANZ, O.; STITZ, L.; RZIHA, H. J. Novel recombinant parapoxvirus vectors induce protective humoral and cellular immunity against lethal herpesvirus challenge infection in mice. **Journal of Virology Virol**, v. 77, n. 17, p. 9312–9323, 2003.

FONSECA Jr A.A., GOUVEA M.V., ZARONI M.M.H., CARVALHO L.B. & XAVIER S.M. 2013. Manual de Verificação de Desempenho de Métodos para Diagnóstico Molecular de Doenças Infecciosas na Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários. **MAPA/ACS**, Brasília. 57p.

FRIEDERICHS, S.; KREBS, S.; BLUM, H.; et al. Comparative and retrospective molecular analysis of Parapoxvirus (PPV) isolates. **Virus Research**, v. 181, p. 11–21, 2014. Elsevier B.V.

FRIEDMAN-KLEIN, A. E; ROWE, W. P ; BANFIELD, W. G. Milker's Nodules: Isolation of a Poxvirus from a Human Case. **Science** , v. 140, n, 3573, p.1335-1336, 1963

FONSECA Jr A.A., GOUVEA M.V., ZARONI M.M.H., CARVALHO L.B. & XAVIER S.M. . Manual de Verificação de Desempenho de Métodos para Diagnóstico Molecular de Doenças Infecciosas na Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários. **MAPA**, Brasília 2013.

GROVES, R. W.; WILSON-JONES, E.; MACDONALD, D. M. Human orf and milkers' nodule: A clinicopathologic study. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 25, n. 4, p. 706–711, 1991.

GÜNTHER, T.; HAAS, L.; ALAWI, M.; et al. Recovery of the first full-length genome sequence of a parapoxvirus directly from a clinical sample. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–8, 2017.

HAUTANIEMI, M.; UEDA, N.; TUIMALA, J.; et al. The genome of pseudocowpoxvirus: Comparison of a reindeer isolate and a reference strain.

Journal of General Virology, v. 91, n. 6, p. 1560–1576, 2010.

HAUTANIEMI, M.; VACCARI, F.; SCAGLIARINI, A.; et al. Analysis of deletion within the reindeer pseudocowpoxvirus genome. **Virus Research**, v. 160, n. 1–2, p. 326–332, 2011. Elsevier B.V.

HELENA, M.; CATROXO, B.; MARTINS, A. M. C. R. P. F.; SOUZA, F. Detection of Parapoxvirus in goats during contagious ecthyma outbreak in Ceará State , Brazil by transmission electron microscopy techniques. **International Journal of Environmental & Agriculture Research**, v. 3, n. 10, p. 1–9, 2017.

HUI, Z.; WILKINS, K.; DAMON, I. K.; LI, Y. Specific qPCR assays for the detection of orf virus, pseudocowpoxvirus and bovine papular stomatitis virus. **Journal of Virological Methods**, p. 6–11, 2013.

IKETANI, Y.; INOSHIMA, Y.; ASANO, A.; et al. Persistent parapoxvirus infection in cattle. **Microbiology and Immunology**, v. 46, n. 4, p. 285–291, 2002.

INOSHIMA, Y.; MOROOKA, A.; SENTSU, H. Detection and diagnosis of parapoxvirus by the polymerase chain reaction. **Journal of Virological Methods**, v. 84, n. 2, p. 201–208, 2000.

RITTNER, K; RICORDEL, M; TOSCH C; et al. Pseudocowpox: A next generation viral vector for cancer immunotherapy. **Cancer Research**, v. 78, n. 13, 2018.

KUBISTA, M.; ANDRADE, J. M.; BENGTSSON, M.; et al. The real-time polymerase chain reaction. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, n. 2–3, p. 95–125, 2006.

LAGUARDIA-NASCIMENTO, M.; DE OLIVEIRA, A. P. F.; FERNANDES, F. R. P.; et al. Detection of pseudocowpox virus in water buffalo (*Bubalus bubalis*)

with vesicular disease in the state of São Paulo, Brazil, in 2016. **Veterinary Quarterly**, v. 37, n. 1, p. 16–22, 2017.

LAGUARDIA-NASCIMENTO, M.; SALES, É. B.; GASPARINI, M. R.; et al. Detection of multiple viral infections in cattle and buffalo with suspected vesicular disease in Brazil. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 28, n. 4, p. 377–381, 2016.

LAGUARDIA NASCIMENTO, M.; FERREIRA, A. P.; AZEVEDO, I. C.; et al. Spread of poxviruses in livestock in Brazil associated with cases of double and triple infection. **Arch Virol**, 2017.

LALKHEN, A. G.; MCCLUSKEY, A. Clinical tests: Sensitivity and specificity. **Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care and Pain**, v. 8, n. 6, p. 221–223, 2008.

LEDERMAN, E.; KHAN, S. U.; LUBY, S.; et al. Zoonotic parapoxviruses detected in symptomatic cattle in Bangladesh. **BMC Research Notes**, v. 816, n. 7, p. 1–7, 2014.

LIU, B.; PANDA, D.; MENDEZ-RIOS, J. D.; et al. Identification of Poxvirus Genome Uncoating and DNA Replication Factors with Mutually Redundant Roles. (R. M. Sandri-Goldin, Org.) **Journal of Virology**, v. 92, n. 7, p. e02152-17, 2018.

LOBATO, J. F. P.; FREITAS, A. K.; DEVINCENZI, T.; et al. Brazilian beef produced on pastures: Sustainable and healthy. **Meat Science**, v. 98, n. 3, p. 336–345, 2014.

MACNEIL, A.; LEDERMAN, E.; REYNOLDS, M. G.; et al. Diagnosis of bovine-associated parapoxvirus infections in humans: Molecular and epidemiological evidence. **Zoonoses and Public Health**, v. 57, n. 7–8, p. 161–164, 2010.

MCFADDEN, G. Poxvirus tropism. **Nature Reviews Microbiology**, v. 20, n. 1,

p. 48–55, 2005.

MERCER, ANDREW A. SCHMIDT, A. WEBER, O. **Poxviruses**. 2007.

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

MOSS, B. Poxvirus cell entry: How many proteins does it take? **Viruses**, v. 4, n. 5, p. 688–707, 2012.

MOSS, B. Poxvirus DNA replication. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 5, n. 9, p. 1–12, 2013.

NAGARAJAN, G.; SWAMI, S. K.; DAHIYA, S. S.; et al. Characterization of GM-CSF-inhibitory factor and Uracil DNA glycosylase encoding genes from camel pseudocowpoxvirus. **Research in Veterinary Science**, v. 100, p. 291–296, 2015.

NASCIMENTO, S.; SUAREZ, E. R.; PINHAL, M. A. S. Tecnologia de PCR e RT-PCR em tempo real e suas aplicações na área médica. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 67, n. 3, p. 1–5, 2014.

NITSCHKE, A.; MATHIS, B.; WILHELM, S.; GEORG, P.; HERMANN, M. Real time PCR detection of Parapoxvirus. **Clinical Chemistry**, v. 52, n. 2, p. 316–319, 2006.

OBRADOVIC, J.; JURISIC, V.; TOSIC, N.; et al. Optimization of PCR conditions for amplification of GC-rich EGFR promoter sequence. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 27, n. 6, p. 487–493, 2013.

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE) . **World Organization of Animal Health**. Manual of diagnostic test and vaccines for terrestrial, Paris , France, 2018.

OHTANI, A.; YOKOYAMA, A.; NARUSHIGE, H.; INOSHIMA, Y. First isolation and genetic characterization of pseudocowpox virus from cattle in Japan. **Virology Journal**, v. 14, n. 172, p. 1–5, 2017. Virology Journal.

ORGUZOGLU, T. C.; KOC, B. T.; KIRDECI, A.; TAN, M. T. Evidence of zoonotic pseudocowpox virus infection from a cattle in Turkey. **Virus Diseases**, v. 25, n. September, p. 381–384, 2014.

OUYANG, P.; RAKUS, K.; VAN BEURDEN, S. J.; et al. IL-10 encoded by viruses: A remarkable example of independent acquisition of a cellular gene by viruses and its subsequent evolution in the viral genome. **Journal of General Virology**, v. 95, n. PART 2, p. 245–262, 2014.

VAN PELT-VERKUIL, E., BELKUM, ALEX VAN, HAYS, J. P. **Principles and Technical Aspects of PCR Amplification**. 2008.

REHFELD, I. S.; FRAIHA, A. L. S.; MATOS, A. C. D.; et al. Short communication: Parapoxvirus and Orthopoxvirus coinfection in milk of naturally infected cows. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 3, p. 7801–7803, 2018.

RIBEIRO, E. L.; OLIVEIRA, A. G. G.; LAGUARDIA-NASCIMENTO, M.; et al. Estudo comparativo e validação de três técnicas de PCR em tempo real (qPCR) para diagnóstico de Peste Suína Africana 1. **Pesq.Vet.Bras**, v. 36, n. 5, p. 473–478, 2016.

ROESS, A. A.; MCCOLLUM, A. M.; GRUSZYNSKI, K.; et al. Surveillance of Parapoxvirus Among Ruminants in Virginia and Connecticut. **Zoonoses and Public Health**, v. 60, n. 8, p. 543–548, 2013.

ROGERS, M.; BALE, P.; DE SILVA, L. M.; GLASSON, M. J.; COLLINS, E.

Giant Parapox Infection in a Two Year Old Child. **Australasian Journal of Dermatology**, v. 30, n. 2, p. 87–91, 1989.

RUCKER, R. C.; DALTON, A. J.; MUELLING, R. Orf Report of 19 Human Cases With Clinical and Pathological Observations. **Journal of the American Medical Association**, v. 204, p. 657–664, 1968.

SAIKI, R. K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. 1985 [classical article]. **Science**, v. 24, p. 476–480, 1985.

SCHATZMAYR, H. G.; SAMPAIO DE 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. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 5, p. 625–627, 2000.

STEPHENS, K. W.; HUTCHINS, R. J.; DAUPHIN, L. A. Cross-platform evaluation of commercial real-time reverse transcription PCR master mix kits using a quantitative 5' nuclease assay for Ebola virus. **Molecular and Cellular Probes**, v. 24, n. 6, p. 370–375, 2010. Elsevier Ltd.

THOMAS, K.; TOMPKINS, D. M.; SAINSBURY, A. W.; et al. A novel poxvirus lethal to red squirrels (*Sciurus vulgaris*). **Journal of General Virology**, v. 84, n. 12, p. 3337–3341, 2003.

UEDA, N.; WISE, L. M.; STACKER, S. A.; FLEMING, S. B.; MERCER, A. A. Pseudocowpox virus encodes a homolog of vascular endothelial growth factor. **Virology**, v. 305, n. 2, p. 298–309, 2003.

YAEGASHI, G.; SASAKI, I.; CHIBA, S.; MURAKAMI, K. Molecular Analysis of Parapoxvirus Detected in Eight Calves in Japan. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 75, n. 10, p. 1399–1403, 2013.