

FELIPE LOPES DE ASSIS

“CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E BIOLÓGICA DE
AMOSTRAS DE *Vaccinia virus* ISOLADAS DURANTE
SURTOS DE VACCINIA BOVINA NO BRASIL”.

BELO HORIZONTE

2012

FELIPE LOPES DE ASSIS

“CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E BIOLÓGICA DE AMOSTRAS DE *Vaccinia virus* ISOLADAS DURANTE SURTOS DE VACCINIA BOVINA NO BRASIL”.

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

Orientador: Jonatas Santos Abrahão

Co-Orientador: Erna Geessien Kroon

BELO HORIZONTE

2012

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	6
LISTA DE TABELAS	8
LISTA DE ABREVEATURAS	9
RESUMO.....	12
ABSTRACT.....	13
1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Família <i>Poxviridae</i>	14
1.1.1 Classificação	14
1.1.2 Morfologia da partícula.....	15
1.1.3 Organização genômica	16
1.1.4 Ciclo de multiplicação.....	18
1.2 Gênero <i>Orthopoxvirus</i> (OPV)	22
1.2.1 Espectro de hospedeiro	22
1.2.2 Distribuição das espécies do gênero OPV	24
1.2.3 Aspectos clínicos das infecções.....	25
1.3 <i>Vaccinia virus</i> (VACV).....	28
1.3.1 Amostras brasileiras de VACV	30
1.3.2 Diversidade Genotípica e Fenotípica das amostras Brasileiras de VACV	32
1.3.3 Aspectos epidemiológicos do VACV no Brasil	34
1.3.4 Transmissão e disseminação	35
1.3.5 Hospedeiros e Reservatórios naturais do VACV no Brasil.....	36
1.3.6 Modelos para estudo de virulência do VACV	37
2. JUSTIFICATIVA	40
3. OBJETIVO.....	42
3.1 Objetivo geral.....	42
3.2 Objetivos específicos.....	42
4. METODOLOGIA	43
4.1 ORIGEM DAS AMOSTRAS	43
4.2 Processamento das amostras	45
4.3 Sistemas celulares	46
4.3.1 Células fibroblásticas de embrião de galinha (CEF)	46
4.3.2 Células VERO e BSC	47

4.3.3 Controle de qualidade da multiplicação celular.....	47
4.4 Vírus.....	48
4.5 Isolamento Viral	48
4.6 SELEÇÃO de placas virais	49
4.7 MULTIPLICAÇÃO Viral.....	49
4.8 PURIFICAÇÃO	50
4.9 titulação	50
4.10 ENSAIO DE FENÓTIPO DE PLACA.....	51
4.11 Virulência de amostras de VACV em modelo murino.....	51
4.12 reação em cadeia da polimerase (PCR).....	52
4.12.1 PCR- <i>Nested</i> para o gene <i>vgf</i>	52
4.12.2 PCR para o gene <i>ha</i>	53
4.12.3 PCR para o gene <i>ati</i>	54
4.13 Gel de poliacrilamida (PAGE) 8%.....	56
4.14 Coloração com prata	56
4.15 Gel de Agarose 1%.....	57
4.16 sequenciamento e ANÁLISE FILOGENÉTICA	57
5. FLUXOGRAMA DE TRABALHO.....	58
6. RESULTADOS.....	59
6.1 TRIAGEM DAS AMOSTRAS.....	60
6.2 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR	61
6.2.1 Análise do gene <i>ha</i>	61
6.2.2 Análise do gene <i>ati</i>	63
6.3 ISOLAMENTO VIRAL	66
6.4 SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE FILOGENÉTICA	68
6.4.1 Análise do gene <i>ha</i>	69
6.4.2 Analise do gene <i>ati</i>	73
6.5 CARACTERIZAÇÕES BIOLÓGICAS	77
6.5.1 Ensaio de fenótipo de placa	77
6.5.2 Ensaio de virulência em camundongos Balb-C.....	77
7. DISCUSSÃO	81
8. CONCLUSÕES	88
9. BIBLIOGRAFIA	89
ANEXO 1 : PUBLICAÇÕES RELACIONADAS AO TRABALHO DE MESTRADO	

101

ANEXO 2: PUBLICAÇÕES NÃO RELACIONADAS AO TRABALHO DE MESTRADO.....	102
TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS CIENTÍFICOS.....	103

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Morfologia dos <i>Poxvirus</i>	16
Figura 2: Representação esquemática das características estruturais e funcionais do genoma do VACV.....	17
Figura 3: Ciclo de multiplicação do VACV.....	20
Figura 4: Lesão postulares típicas de varíola.....	25
Figura 5: Lesões pustulares corporais causadas por infecção de MPXV.....	26
Figura 6: Lesões faciais causadas por infecção de CPXV.....	27
Figura 7: Aspectos clínicos das infecções causadas pelo VACV.....	28
Figura 8: Sequência de aminoácidos do gene <i>ha</i> de amostras de VACV-BR e outras amostras de VACV e OPV.....	31
Figura 9: Consenso entre as seis parcimoniosas árvores concatenadas derivadas a partir da análise dos genes B19R, E3L e <i>ha</i> de varias espécies do gênero OPV.....	32
Figura 10: Ciclo hipotético de transmissão do VACV.....	35
Figura 11: Dose letal de 50% para modelo Balb/C infectados por via intranasal....	36
Figura 12: Distribuição geográfica das amostras clínicas coletadas durante surto de vaccinia bovina.....	43
Figura 13: Representação esquemática da localização dos iniciadores desenhados para a PCR semi- <i>Nested</i> para o gene <i>ati</i>	53
Figura 14: Detecção do gene <i>vgf</i> em amostras clínicas coletadas durante surtos de vaccinia bovina entre os anos de 2005 a 2009.....	58
Figura 15: Detecção do gene <i>ha</i> em amostras clínicas coletadas durante surtos de vaccinia bovina entre os anos de 2005 a 2009.....	60
Figura 16: Detecção do gene <i>ha</i> em amostras clínicas coletadas durante surto de vaccinia bovina na cidade do Serro em 2011.....	61

Figura 17: Percentual de similaridade entre VACV, baseado nas sequências nucleotídicas e aminoácidos do gene <i>ha</i>	68
Figura 18: Sequência de nucleotídeo do gene <i>ha</i> de amostras de VACV-BR e outras amostras de VACV e OPV.....	69
Figura 19: Árvore filogenética baseada na sequência nucleotídica do gene <i>ha</i>	70
Figura 20: Percentual de similaridade entre VACV, baseado nas sequências nucleotídicas e aminoácidos do gene <i>ati</i>	71
Figura 21: Sequência de nucleotídeo do gene <i>ati</i> de amostras de VACV-BR e outras amostras de VACV e OPV.....	72
Figura 22: Arvore filogenética baseada na sequência nucleotídica do gene <i>ati</i>	74
Figura 23: Ensaio de fenótipo de placa em células BSC-40.....	75
Figura 24: Variação absoluta média diária do peso e curva de sobrevivência de camundongos Balb/C infectados pela via intra-nasal.....	77
Figura 25: Sinais clínicos observados após infecção de camundongos Balb-C com amostras de VACV.....	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação da família <i>Poxviridae</i>	15
Tabela 2: Descrição das amostras analisadas.....	42
Tabela 3: Iniciadores desenhados para reação de PCR em tempo real.....	51
Tabela 4: Iniciadores desenhados para reação de PCR do tipo semi- <i>Nested</i> para o gene <i>ati</i>	52
Tabela 5: Triagem molecular das amostras coletadas durante o período de 2010-2011, pela PCR <i>Nested</i> para o gene <i>vgf</i>	59
Tabela 6: Análise da presença do gene <i>ati</i>	62
Tabela 7: Caracterização do perfil de <i>ha</i> e <i>ati</i> de amostras envolvidas em surtos de VB.....	62
Tabela 8: Amostras de VACV isoladas de amostras coletadas entre 2010 e 2011 envolvidas em surtos de VB	65
Tabela 9: Amostras selecionadas para sequenciamento parcial dos genes <i>ha</i> e <i>ati</i>	66

LISTA DE ABREVEATURAS

Aa: Aminoácido

AFM: Microscopia de força atômica (do inglês, “atomic force microscopy”)

ARAV: *Araçatuba virus*

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

BAV: *BeAn 58058 virus*

BGV1: *Baixo guandu virus 1*

BSA: Albumina sérica bovina (do inglês, “bovine serum albumin”)

CARV: *Carangola virus*

CDC: Centro de controle e prevenção de doenças dos Estados Unidos (do inglês, “US Center for diseases control and prevention”)

CEF: Célula fibroblástica de embrião de galinha (do inglês, “chicken embryo fibroblast”)

CEV: Partículas envelopadas infecciosas extracelulares associadas à célula (do inglês, “cell-associated extracellular virions”)

CMLV: *Camelpox virus*

CO₂: Dióxido de carbono

CPXV: *Cowpox virus*

CTGV: *Cantagalo virus*

D.P. I: dias pós-infecção.

DNA: Ácido desoxirribonucléico

ECTV: *Ectromelia virus*

EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético

EEV: Partículas envelopadas infecciosas extracelulares (do inglês, “enveloped extracellular virions”)

EMBRAPA: Empresa brasileira de pesquisa agropecuária

ESV1: *Espírito santo virus 1*

EUA: Estados Unidos da América

GOV1: *Goias virus 1*

GP1V: Guarani propriedade 1 virus

GP2V: *Guarani propriedade 2 virus*

HA: Hemaglutinina

HSPV: *Horsepox virus*
H₂O dd: Água destilada e deionizada
IBGE: Instituto brasileiro de geografia e estatística
ICTVdB: Banco de dados do comitê internacional de taxonomia de vírus (do inglês, “*International committee on taxonomy of virus data base*”)
IMV: partículas infecciosas intracelulares (do inglês, “*intracellular mature virions*”)
IOC: Instituto Oswaldo Cruz
ITR: repetições terminais invertidas (do inglês, “*inverted terminal repetitions*”)
IV: vírus imaturos.
Kb: Quilobases
KCl: Cloreto de potássio
KDa: Quilodalton
Kpb: Mil pares de base.
LD: Dose letal
M.O.I: Multiplicidade de infecção
MARV: *Maravilha virus*
MEM: Meio mínimo de Eagle (do inglês, *minimum Eagle Medium*)
µg: Micrograma
µL: Microlitros.
mL: Mililitro
MPXV: *Monkeypox virus*
MUNV: *Mundo novo virus*
nm: Nanômetros.
nt: Nucleotídeos
OPV: Gênero *Orthopoxvirus*.
ORF: Janela aberta de leitura (do inglês, “open reading frame”)
P/v: Peso por volume
PAGE: Gel de poliacrilamida para eletroforese
PARV1: *Para virus 1*
PARV2: *Para virus 2*
pb: Pares de base.
PBS: Tampão fosfato salina (do inglês, “*phosphate buffer solution*”)
PCR: Reação em cadeia da polimerase (do inglês. “polymerase chain reaction”)
PFU: Unidades formadoras de placa (do inglês, “*plate forming units*”)

PSTV: *Passatempo virus*
q.s.p: Quantidade suficiente para
RCNV: *Raccoonpox virus*
RNA: Ácido Ribonucleico
RNAm: Ácido Ribonucléico mensageiro
SAV: SPAn232 *virus*
SB2005V: *Serro bovino 2005 virus*
SFB: Soro fetal bovino
SH1V: *Serro humano 1 virus*
SH2V: *Serro humano 2 virus*
SB1V: *Serro bovino 1 virus*
SKPV: Skunkpox virus
TATV: *Taterapox virus*
TBE: tampão tris borato de EDTA
UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais
UGDV: *Uasin Gishu disease virus*
U/mL: Unidades internacionais por mililitro
V: Volts
v/v: Volume por volume
VACV: *Vaccinia virus*
VACV-BR: Amostras brasileiras de *Vaccinia virus*
VARV: *Variola virus*
VB: *Vaccinia bovina*
VBH: *Belo Horizonte virus*
VGF: Fator de crescimento viral (do inglês, “*virus growth factor*”)
VPXV: *Volepox virus*
WHO: Organização Mundial de Saúde (do inglês, “*World Health Organization*”)
WR: *Western reserve*

RESUMO

O gênero *Orthopoxvirus* (OPV), pertencente à família *Poxviridae*, compreende vírus com morfologia complexa, sítio de multiplicação no citoplasma e um grande extenso genoma de DNA de fita dupla. O *Vaccinia virus* (VACV), membro deste gênero, é um importante agente zoonótico, acometendo principalmente o gado de leite e ordenhadores, o que confere a esta doença um caráter ocupacional. Desde 1999, o VACV vem sendo relacionado a surtos de uma doença denominada vaccínia bovina (VB), caracterizada por lesões exantemáticas nos tetos e úbere de animais em lactação, e mãos e antebraço de ordenhadores, em várias regiões e biomas no Brasil, principalmente na região sudeste. Estudos moleculares e biológicos indicam a circulação no Brasil de dois grupos de VACV com características fenotípicas e genéticas distintas. Devido ao grande número de casos de VB reportados nos últimos anos ao grande impacto da doença para a economia do país, tradicional na produção de leite e seus derivados, este trabalho tem como objetivo avaliar a diversidade genética e fenotípica das amostras brasileiras de VACV detectadas em espécimes humanos e bovinos entre os anos de 2005 a 2011 em várias regiões do Brasil. Dentre as 402 amostras analisadas, 168 (41,8%) foram positivas após triagem por PCR para o gene viral *vgf*. Destas, 92 amostras foram selecionadas para caracterização molecular. Apenas 3 amostras, provenientes do mesmo surto que ocorrem na região do Serro em 2011, apresentaram a assinatura genética do grupo 1 de VACV-BR, que compreendem isolados como GP1V, SAV, BAV e P1V, enquanto que as demais amostras apresentaram perfil genético do grupo 2 de VACV-BR, que compreendem isolados como GP2V, PSTV, ARAV, CTGV e S2V. Os dados biológicos e moleculares apresentados neste trabalho comprovam que diferentes amostras de VACV co-circulam no Brasil, com uma maior prevalência de amostras do grupo 1, porém, os motivos para tal permanecem desconhecidos. Esta foi a primeira vez em que uma amostra de VACV-BR do grupo 2 foi isolada de humanos. O estudo do polimorfismo entre os diferentes VACV isolados abre as portas para estudos envolvendo a genética evolutiva destes isolados, a sua patogênese e até mesmo métodos de controle antivirais.

ABSTRACT

The genus orthopoxvirus (OPV), belonging to Poxviridae family, comprises viruses with complex morphology, multiplication site in the cytoplasm and a large extensive genome of double-stranded DNA. The Vaccinia virus (VACV), member of this genus, is an important zoonotic agent, affecting mainly the milk and cattle milkers, which gives the disease an occupational character. Since 1999, the VACV has been linked to outbreaks of a disease called bovine vaccinia (BV), characterized by rash injuries on the teats and udder of lactating animals, and milkers hands and forearm in various regions and biomes in Brazil, mainly in southeast. Molecular and biological studies indicate the circulation in Brazil of two groups of VACV with distinct phenotypic and genetic characteristics. Due to the large number of reported cases of VB in recent years, the major impact of the disease to the country's economy, traditional in the production of milk and milk products, this study aims to evaluate the genetic and phenotypic diversity of Brazilian VACV isolates detected in both human and cattle specimens during 2005 to 2011 years in various regions of Brazil. Among of the 402 samples tested, 168 (41.8%) were positive after screening by PCR for viral VGF gene. Of these, 92 samples were selected for molecular characterization. Only three samples from the same outbreak, occurring in Serro region in 2011, showed the genetic signature of the group 2 of VACV-BR comprising mice-virulent strains such as GP1V, SAV, BAV and P1V, whereas the other samples showed the genetic profile group 1 of VACV-BR, comprising isolated as GP2V, PSTV, ARAV, CTGV and S2V. Biological and molecular data presented in this work show that co-circulation of different VACV lineages in Brazil, with a higher prevalence of group 1 samples. However, the reasons for this remain unknown. This was the first time a sample VACV-BR group 2 have been isolated from humans. The study of polymorphism between different isolates VACV opens the door to future studies of the genetic evolution of these isolates, its pathogenesis and even antiviral control.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Família *Poxviridae*

1.1.1 Classificação

A família *Poxviridae* compreende vírus que apresentam propriedades características como morfologia complexa do vírus, sítio de multiplicação no citoplasma e um grande genoma que codifica para numerosos peptídeos com funções estruturais, enzimáticas, fatores transcricionais e ligantes virais (Moss, 2007).

A família *Poxviridae* é dividida em duas subfamílias (**Tabela 1**), relacionadas geneticamente, denominadas *Chordopoxvirinae* e *Entomopoxvirinae* de acordo com os hospedeiros naturais vertebrados ou invertebrados, respectivamente. As subfamílias são divididas em gêneros compostos por espécies relacionadas tanto geneticamente quanto ao espectro de hospedeiro. *Chordopoxvirinae* é dividida em nove gêneros: *Avipoxvirus*, *Capripoxvirus*, *Cervidpoxvirus*, *Leporipoxvirus*, *Molluscipoxvirus*, *Orthopoxvirus* (OPV), *Parapoxvirus* (PPV), *Suipoxvirus*, *Yatapoxvirus* e uma espécie ainda não classificada em nenhum gênero dentro da subfamília denominada *Squirrel poxvirus*. *Entomopoxvirinae* é dividida em três gêneros: *Alphaentomopoxvirus*, *Betaentomopoxvirus*, *Gammaentomopoxvirus* e duas espécies ainda não classificadas em nenhum gênero: *Diachasmimorpha entomopoxvirus* e *Melanoplus sanguinipes entomopoxvirus* 'O' (ICTVdB, 2012).

Os vírus da subfamília *Entomopoxvirus* infectam hospedeiros artrópodes das ordens dos Coleópteros (*Alphaentomopoxvirus*), Lepidóptera e Ortóptera (*Betaentomopoxvirus*) e Díptera (*Gammaentomopoxvirus*) (Basil, 1995). Os vírus da subfamília *Chordopoxvirinae* apresentam um espectro de hospedeiro bastante amplo, estando os vírus pertencentes aos gêneros OPV, PPV, *Molluscipoxvirus* e *Yatapoxvirus* associados a infecções humanas. Muitas amostras de cordopoxvírus isoladas de mamíferos como focas californianas (*California harbor seal poxvirus*), golfinhos nariz-de-garrafa (*Dolphin poxvirus*), cangurus cinza e vermelho (*Grey kangaroo poxvirus*, *Red kangaroo poxvirus*) e de répteis como o crocodilo do Nilo (*Nile crocodile poxvirus*) e jacarés americanos (*Spectacled caiman poxvirus*), ainda não foram classificados (ICTVdB, 2012).

Tabela 1: Classificação da família *Poxviridae*. A espécie protótipo de cada gênero foi citada. Fonte: (ICTVdB, 2012).

CLASSIFICAÇÃO DA FAMÍLIA <i>Poxviridae</i>		
Subfamília	Gênero	Espécie protótipo do gênero
<i>Chordopoxvirinae</i>	<i>Avipoxvirus</i>	<i>Fowlpox virus</i>
	<i>Capripoxvirus</i>	<i>Sheeppox virus</i>
	<i>Cervidpoxvirus</i>	<i>Deerpox virus W-848-83</i>
	<i>Leporipoxvirus</i>	<i>Myxoma virus</i>
	<i>Molluscipoxvirus</i>	<i>Molluscum contagiosum virus</i>
	<i>Orthopoxvirus</i>	<i>Vaccinia virus</i>
	<i>Parapoxvirus</i>	<i>Orf virus</i>
	<i>Suipoxvirus</i>	<i>Swinepox virus</i>
	<i>Yatapoxvirus</i>	<i>Yaba monkey tumor virus</i>
	-	<i>Squirrel poxvirus</i>
<i>Entomopoxvirinae</i>	<i>Alphaentomopoxvirus</i>	<i>Melolontha melolontha entomopoxvirus</i>
	<i>Betaentomopoxvirus</i>	<i>Amsacta moorei entomopoxvirus 'L</i>
	<i>Gammaentomopoxvirus</i>	<i>Chironomus luridus entomopoxvirus</i>
	-	<i>Diachasmimorpha entomopoxvirus</i>
Não classificados	-	<i>Cotia virus, Pox virus red squirrel, Dolphin poxvirus California harbor seal poxvirus, Caiman poxvirus, Nile crocodile poxvirus, Grey kangaroo poxvirus, Red kangaroo poxvirus.</i>

1.1.2 Morfologia da partícula

Os vírus pertencentes à família *Poxviridae* possuem morfologia complexa, com formas de tijolo, ovaladas ou pleomórficas, medindo entre 140-260 nm de diâmetro por 220-450 nm de comprimento. A partícula viral é dividida em capsídeo, corpúsculo lateral, envelope e membrana (**Figura 1A**). A parede do cerne possui espessura total de 18-19nm, com indícios da presença de nucleoproteínas como constituintes básicos, porém sem estrutura resolvida por tomografia crioeletrônica (MOSS, 2001; ICTVdB, 2012). O capsídeo é envolvido por uma membrana lipídica contendo glicoproteínas dispostas de forma irregular (vírus do gênero OPV) (**Figura 1B**) ou espiraladas (vírus do gênero PPV) (**Figura 1C**). O capsídeo pode apresentar-se em uma forma bicôncava, unilateralmente côncava ou em forma cilíndrica, dentro do qual se encontra o material genético. A partícula pode conter um ou dois corpúsculos laterais, dependendo do formato do capsídeo, sendo sua função e

composição ainda não bem definidas, podendo tratar-se apenas de artefatos de microscopia. O envelope viral é constituído de uma membrana bi-lipídica, proveniente da célula hospedeira (MOSS, 2001; ICTVdB, 2012).

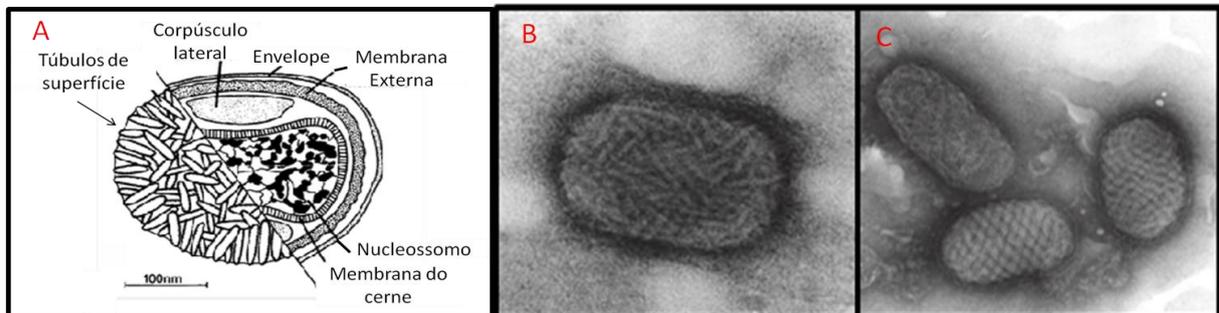


Figura 1: Morfologia dos Poxvirus. (A) estrutura esquemática de uma partícula de poxvirus. (B) micrografia eletrônica de um OPV, destacando membrana lipídica contendo túbulos de superfície dispostos de forma irregular. (C) micrografia eletrônica de um PPV apresentando tubulos de superfície dispostos em forma elicoidal. Fontes: ICTVdB, 2012; FENNER, 1989 – modificado.

A massa total da partícula do *Vaccinia virus* (VACV) (gênero OPV) é em média de 9,5 fg, sendo esta constituída por proteínas, DNA e lipídios (90%, 3,2% e 5% respectivamente). Em contraste, cerca de um terço do *Fowlpox virus* (gênero *Avipoxvirus*) é constituído por lipídeos. A partícula viral dos poxvirus possui mais de 100 proteínas distribuídas por toda sua estrutura, sendo muitas delas importantes fatores precoces do processo de transcrição do genoma viral. Carboidratos são encontrados também na partícula dos poxvirus, compondo as glicoproteínas de superfície, além de espermina e espermidina associadas a traços de RNA com significado indefinido (Moss, 2007).

1.1.3 Organização genômica

O genoma dos poxvirus é constituído de uma molécula de DNA de fita dupla, não segmentada, com tamanho variando entre 130kb (gênero PPV) a 375kb (gênero *Avipoxvirus*), e codificando aproximadamente 200 genes. Apresenta um conteúdo de G+C variando entre 35-64% nos cordopoxvirus e cerca de 20% em entomopoxvirus (Moss, 2007; ICTV,2012).

O genoma dos poxvirus, sobretudo dos virus pertencentes ao gênero OPV, apresentam uma região central conservada contendo genes estruturais e genes relacionados à replicação do genoma, e regiões terminais em ambas as

extremidades contendo sequências repetidas e invertidas (ITR), onde se encontram genes relacionados à virulência e imunomodulação. Os dois segmentos do genoma são interligados covalentemente nas extremidades (**Figura 2**). As ITR's apresentam alto conteúdo de T+A, grampos que conectam as duas fitas de DNA e são importantes no processo de formação de concatâmeros, que por sua vez serão importantes na replicação do DNA. As ITR's apresentam tamanhos variados devido a deleções, repetições e transposições (Moss, 2007; ICTV,2012).

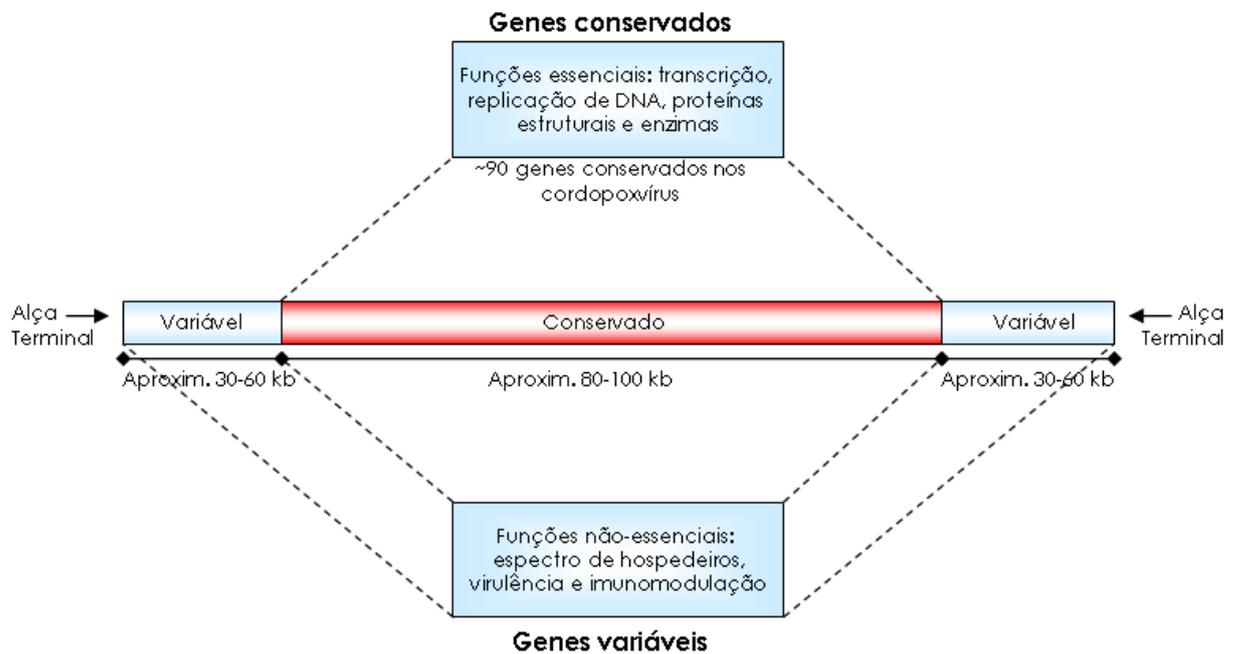


FIGURA 2: Representação esquemática das características estruturais e funcionais do genoma do VACV. A região central do genoma apresenta genes altamente conservados, que codificam proteínas envolvidas em funções essenciais. As regiões terminais invertidas (ITRs) codificam proteínas não-essenciais, e se apresentam duplicadas no genoma. Nas extremidades são observadas as alças terminais. **Fonte: Adaptado de Smith e McFadden, 2002.**

A região central do genoma dos vírus pertencentes à subfamília *Chordopoxvirinae* apresenta cerca de 90 genes altamente conservados, diferentemente das regiões terminais que apresentam genes altamente divergentes entre os gêneros dos vírus pertencentes à subfamília *Chordopoxvirinae* e até mesmo entre vírus da mesma espécie. Análises do tamanho do genoma, número de genes únicos, arranjo dos genes e análise filogenética de sequências de proteínas dos vírus dos gêneros pertencentes à subfamília *Chordopoxvirinae*, mostram que o gênero *Avipoxvirus* é o gênero mais divergente dentre os demais cordopoxvírus, seguido do gênero *Molluscipoxvirus*. Os gêneros *Suipoxvirus*, *Capripoxvirus*, *Leporipoxvirus* e

Yatapoxvirus se agrupam em conjunto, sendo que *Suipoxvirus* e *Capripoxvirus* compartilham um ancestral comum. O gênero OPV se agrupa distante dos demais gêneros (Gubser, 2004).

Os genes dentro do genoma normalmente não se sobrepõem. Seguindo uma convenção, os genes ou ORF's dos poxvírus (open reading frame – janela aberta de leitura) são nomeados de acordo com a letra do fragmento gerado pela digestão do genoma do VACV, usando a enzima de restrição Hind III, seguido do número da ORF no fragmento genômico (da esquerda para a direita) e L para R (left = esquerda ou right=direita), de acordo com o sentido da ORF. As proteínas sintetizadas recebem o nome referente ao gene sem a indicação do sentido de leitura do gene, exemplo: gene H3L codifica para a proteína H3, que atua como um ligante de heparina (Moss, 2007).

Algumas proteínas produzidas pelos poxvírus, que possuem atividade imunomodulatória, podem ser divididas em três classes estratégicas: “*virostealth*” que se refere à proteínas que impedem o reconhecimento das células infectadas pelas células de defesa, desta forma mascarando a infecção; proteínas transdutoras, que impedem a ativação de vias antivirais inatas como apoptose, cascatas pró-inflamatórias e ativação do estado antiviral; e proteínas que realizam mimetismo molecular como, por exemplo, virocinas e viroreceptores sintetizados pelo vírus para mimetizar citocinas e seus respectivos receptores. Estas proteínas bloqueiam a comunicação extracelular, promovendo a manutenção do microambiente intracelular protegido para o vírus dentro do tecido infectado (*revisado por Johnston & McFadden, 2003*).

1.1.4 Ciclo de multiplicação

Os vírus da família *Poxviridae*, juntamente com os vírus das famílias *Asfarviridae* e *Mimiviridae*, são exceção entre os vírus de DNA por realizarem todo seu ciclo de multiplicação no citoplasma, enquanto que os demais vírus de DNA realizam pelo menos parte de seu ciclo de multiplicação no núcleo celular. Os poxvírus não possuem um DNA infeccioso por si só. Para que os poxvírus possam realizar a replicação no citoplasma é necessário que possuam uma enzima RNA polimerase-

DNA dependente (normalmente encontrada no núcleo celular) associada à partícula viral (McFadden, 2005; Moss, 2007; *revisado por* Raoult, 2007).

Para se estudar o ciclo de multiplicação dos vírus da família *Poxviridae* foi utilizado o modelo de multiplicação do VACV (**Figura 3**), espécie protótipo do gênero OPV. Durante a multiplicação do VACV, três tipos de partículas são produzidos: vírus maduro intracelular (IMV), vírus envelopado intracelular (IEV) e vírus envelopado extracelular (EEV) que pode ser chamado de CEV (vírus envelopado célula-associado) quando este permanece aderido à membrana celular para ser propelido para as células vizinhas através da polimerização de uma cauda de actina (*revisado por* McFadden, 2005).

O ciclo de infecção do VACV pode ser iniciado pelas partículas EEV ou IMV. Porém, as diferentes partículas virais apresentam mecanismos e utilizam receptores celulares distintos para reconhecer e penetrar na superfície celular. Tais diferenças se devem às diferentes proteínas de superfície presentes nos diferentes morfotipos. Contudo, estes mecanismos e receptores envolvidos na adsorção ainda não foram completamente elucidados (Moss, 2007).

Evidências apontam para a existência de proteínas virais nos IMV's que auxiliam a adesão de partículas virais à superfície celular por se ligarem a moléculas ubiquamente expressas como glicosaminoglicanos, sulfato de condroitina e sulfato de heparano. Os EEV's possuem uma membrana externa que precisa ser removida para que haja uma fusão de membranas. Estudos demonstram que determinadas amostras virais em contato com diferentes tipos celulares podem utilizar diferentes vias de penetração, como a fusão com a membrana citoplasmática ou vesícula endossomal e formas distintas de macropinocitose (Moss, 2007; Mercer et al, 2010).

desnudamento e replicação do DNA que forma moléculas concatêmeras (McFadden, 2005; Moss, 2007).

A expressão gênica dos poxvírus é interessantemente programada. A síntese precoce de enzimas, fatores transcricionais e DNA polimerase dá início a replicação do genoma viral. A RNA polimerase e fatores de transcrição presentes na partícula viral (transcriptossomo) iniciam a transcrição de genes virais precoces, sintetizando proteínas imunomodulatórias, fatores de crescimento, enzimas e fatores de transcrição para os genes intermediários. Alguns desses fatores de transcrição para os genes intermediários já foram caracterizados e consistem na RNA polimerase viral, enzima *capping* (atua através de um mecanismo que não envolve a formação de CAP), e proteínas VITF-1 e VITF-3. A proteína celular VITF-2 parece também estar envolvida no processo de transcrição dos genes intermediários, atuando como um sinalizador de proliferação celular (Vos et al, 1991; Harris et al, 1993; McFadden, 2005; Moss, 2007).

Já foram caracterizadas até o momento 53 proteínas virais intermediárias, sendo algumas delas também expressas em tempos tardios da infecção. Algumas proteínas intermediárias, como A1, A2 e G8, são responsáveis por regular a síntese de genes tardios (Keck et al, 1990; Yang et al, 2011). Os genes tardios são transcritos e os mRNA's codificam para a síntese das proteínas estruturais, enzimas e fatores transcricionais para os genes precoces. A transcrição dos genes precoces está sob completo controle de fatores transcricionais virais, diferentemente das etapas de transcrição de genes intermediários e tardios, que são co-regulados por genes virais e do hospedeiro (McFadden, 2005; Moss, 2007).

A montagem das partículas inicia-se em regiões citoplasmáticas denominadas fábricas virais, das quais organelas celulares são excluídas. A primeira estrutura visível, constituída de proteínas e lipídeo, é denominada vírus imaturo (IV) e apresenta-se em forma ovoide ou esférica. As moléculas concatêmeras de DNA são resolvidas em moléculas individualizadas e cada molécula é empacotada em um IV. Um processo de clivagem proteolítica transforma a partícula do IV em uma partícula em "forma de tijolo", característica das partículas dos poxvírus, formando os IMV's (revisado por Roberts & Smith, 2008). Muitos IMV's de alguns cordopoxvírus, como

por exemplo, *Cowpox virus* (CPXV), *Ectromelia virus*, *Raccoonpox virus* e *Fowlpox virus*, se tornam oclusos em uma densa matriz protéica denominada corpúsculo de inclusão do tipo A (ATI). A proteína que forma este corpúsculo possui uma massa de aproximadamente 160kDa, e é codificada tardiamente pelo gene *A26L (ati)* (Patel et al., 1986; Funahashi et al., 1988; Osterrieder et al., 1994). O VACV apresenta uma deleção de dois resíduos de adenosina, o que provoca uma mudança da fase de leitura do gene *ati* gerando um códon de terminação precoce levando à produção de uma proteína truncada com massa variando entre 92 à 96 kDa (Amegadzie et al., 1992; Meyer et al., 1993; Osterrieder et al., 1994; Ulaeto et al., 1996; Moss, 2007). A análise do gene *ati* é sugerida para o estudo filogenético de amostras de VACV (Meyer et al., 1994; Leite et al., 2007).

A maior parte da progênie viral permanece no citoplasma na forma IMV, e serão liberadas após a lise celular. Porém, algumas partículas migram através dos microtúbulos, em uma velocidade aproximada de 2.8 m/s, até o complexo de Golgi, onde adquirem uma dupla membrana, dando origem aos vírus envelopados intracelulares (IEV) (Moss, 2007; Roberts & Smith, 2008).

Os IEV's são transportados até a membrana celular, de onde são exocitados formando os vírus envelopados extracelulares (EEV). Alguns EEV's se associam à membrana citoplasmática formando os vírus envelopados associado à célula (CEV). Os CEV's induzem a polimerização de uma cauda de actina propelindo a partícula viral até a célula vizinha. As proteínas virais A33 e A36 estão envolvidas no processo de polimerização da cauda de actina. Os EEV's, apesar de representarem apenas um pequeno percentual das partículas virais totais, são essenciais para a disseminação do vírus dentro do hospedeiro durante uma infecção (MacFadden, 2005; Moss, 2007; Roberts & Smith, 2008; Doceul et al., 2010).

1.2 GÊNERO *Orthopoxvirus* (OPV)

1.2.1 Espectro de hospedeiro

Os vírus pertencentes ao gênero OPV, com exceção do *Variola virus* (VARV) o qual infecta apenas o ser humano, possuem um amplo espectro de hospedeiros, sendo

estes pertencentes ao domínio *Eukarya*, reino *Animalia*, filo *Chordata*, sub-filo *Vertebrata*, classes *Mammalia*, *Reptilia* e *Aves*. Dentre os hospedeiros pertencentes à classe *Mammalia*, os ortopoxvírus são capazes de infectar aqueles pertencentes às ordens *Primates*, *Artiodactyla*, *Perissodactyla*, *Pholidota* e *Lagomorpha* (ICTVdB, 2006).

Dentre as nove espécies pertencentes ao gênero OPV (**Tabela 1**), quatro são capazes de infectar o homem: VARV, *Monkeypox virus* (MPXV), CPXV e VACV. As espécies *Camelpox virus*, *Ectromelia virus*, *Raccoonpox virus*, *Taterapox virus*, *Volepox virus* são agentes zoonóticos. As espécies *Skunkpox virus* (SKPV) e *Uasin Gishu disease virus* (UGDV) ainda não foram definitivamente classificadas dentro do gênero *Orthopoxvirus*, e são agentes etiológicos de doença em *Conepatus semistriatus* (gambá) e equídeos (revisado por MacFadden, 2005; ICTVdB, 2006).

Os OPV's possuem um arsenal bioquímico que permite a eles infectar uma grande variedade de hospedeiros. O espectro de hospedeiro bem como os reservatórios naturais destes vírus continuam sob investigação, e recentemente algumas espécies de mamíferos naturalmente infectados tem sido identificados. Felinos possuem um papel importante como hospedeiros intermediários na transmissão do CPXV, possivelmente transmitindo-o do roedor ao homem, a animais domésticos como cão e cavalos e a animais de zoológico como elefantes, rinocerontes, antas, edentatas e alguns carnívoros (Marennikova et al, 1977; Baxby et al, 1979; Meyer et al, 1998; Pelkonen et al, 2003; Kurth et al., 2008). Estudos sorológicos e moleculares têm mostrado que CPXV provoca infecção persistente em *Clethrionomys glareolus* (ratazana do morro), *Microtus agrestis* (ratazana do campo) e camundongos domésticos e arborícolas, enquanto que o esquilo parece ser o principal reservatório natural do MPXV (Hutson et al, 2009). Apesar da importância histórica do VACV na campanha de erradicação do VARV, pouco se sabe sobre sua origem, reservatórios naturais e mecanismos pelos quais o vírus se mantém no ambiente natural. Apesar disso, amostras de brasileiras de VACV já foram detectadas em roedores silvestres e peridomiciliares e em primatas amazônicos (Lopes et al., 1965; Abrahão et al. 2009b; Abrahão 2010b).

1.2.2 Distribuição das espécies do gênero OPV

Os OPV's possuem atualmente uma distribuição global devido principalmente à grande expansão demográfica, que colocam humanos e animais domésticos em contato com o ambiente silvestre, bem como o tráfego de pessoas e transporte de animais, que tem contribuído para o aumento da distribuição destes vírus. Um exemplo disso foi o surto de MPXV ocorrido nos E.U.A em 2003, devido à importação de roedores endêmicos do continente africano, para serem vendidos como animais de estimação. Nesta ocasião, 81 casos de infecção em humanos foram notificados, acometendo principalmente veterinários e vendedores de animais (Guarner, 2004).

O CPXV é endêmico na Europa e Ásia, acometendo cerca de 1% do gado bovino. Acredita-se que roedores silvestres e peri-domiciliares sejam importantes reservatórios naturais do CPXV (Chantrey et al., 1999). A transmissão direta do CPXV de um roedor para um hospedeiro humano já foi observada, e recentemente dois novos casos foram notificados na França e Alemanha (Ninove *et al.*, 2009; Campe *et al.*, 2009). No Brasil, um caso de varíola bovina, doença causada pelo CPXV, foi relatado por SILVA e colaboradores, em 1986. No entanto, nenhuma caracterização molecular do agente viral foi realizada para a confirmação de que se tratava efetivamente de um CPXV, e não um VACV, que causa a vaccínia bovina (Trindade *et al.*, 2003).

Até o momento, a circulação do *Taterapox virus* e UGDV foi descrita apenas no continente africano, acometendo gerbis e cavalos, respectivamente. *Volepox virus* (VPXV), *Skunkpox virus* (SKPV) e *Raccoonpox virus* (RCNV) circulam na América do Norte acometendo roedores peridomiciliares, gambás e guaxinins, respectivamente. O ECTV circula na Europa e causa doença grave em camundongos. O *Horsepox virus* (HSPV) circulava na Europa comumente antes do século XX, porém hoje sua circulação é rara (Tulman et al., 2006; Damon, 2007; ICTVdB, 2012). A distribuição geográfica do VACV ainda é incerta e provavelmente sub-estimada. No Brasil, várias amostras já foram descritas, estando estas envolvidas em casos de infecção em humanos, bovinos e equídeos. Roedores peridomésticos parecem estar envolvidos na circulação do VACV em ambientes rurais provocando diversos surtos de vaccínia

bovina (VB), uma doença que acomete o gado leiteiro com grande impacto econômico (Abrahão et al., 2009b). Uma sub-espécie de VACV, denominada *Buffalopox virus*, circula na Índia, acometendo búfalos domésticos, gado e humanos (Yogesh et al, 2011).

1.2.3 Aspectos clínicos das infecções

Os vírus pertencentes ao gênero OPV são os mais bem conhecidos dentre os poxvírus devido ao seu impacto na saúde humana. O membro mais notório dentro do gênero certamente é o VARV, que causa uma doença exantemática febril (**Figura 4**) com taxas de mortalidade que variavam entre 30 e 40% em alguns surtos (Damon, 2007). Este impacto motivou uma campanha mundial de vacinação contra o VARV durante as décadas de 60 e 70. Em 1980, a Organização Mundial de Saúde (WHO) declarou o VARV erradicado no ambiente sendo permitida sua manutenção em dois laboratórios: Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), nos Estados Unidos, e o Centro de Pesquisa do Estado para Virologia e Biotecnologia, na Rússia (*revisado por* McFadden, 2005).



Figura 4: Lesões pustulares típicas de varíola em membro inferior (A) e face (B). **Fontes:** CDC/Cheryl Tyron; www.manbir-online.com/diseases/smallpox.htm.

As infecções por OPV podem ser classificadas como sistêmicas ou localizadas, apresentando geralmente exantemas característicos. A evolução do quadro clínico é variável dependendo da espécie e virulência do OPV, da via de inoculação do vírus, da espécie animal infectada e do estado imunológico do hospedeiro. As lesões exantemáticas geralmente evoluem de uma mácula para uma pápula, vesícula,

pústula, que eventualmente se rompe e dá origem a uma úlcera, que então forma uma crosta e cicatriza (Damon, 2007).

O MPXV é um importante agente zoonótico, que ocasionalmente provoca doença sistêmica grave em humanos (**Figura 5**), muito semelhante à provocada pelo VARV. O período de incubação do MPXV varia entre 7 a 17 dias, com subseqüentes sintomas graves semelhantes à gripe, com febre alta. Dois terços dos pacientes apresentam sintomas respiratórios, além de múltiplas vesículas umbilicadas com distribuição centrífuga (*revisado por Lewis-Jones, 2004*).



FIGURA 5: Lesões pustulares corporais causadas por infecção de MPXV - **Fonte:** ettertotheworld.wordpress.com/.../

As infecções por CPXV em humanos apresentam um curso rápido, com apenas sete dias de incubação em média, provocando um mal-estar e pirexia semelhante a uma gripe. Normalmente provoca poucas lesões, localizadas principalmente na face e nas mãos, além de edema, eritema e adenopatia localizada. As vesículas progridem para pústulas, pápulas e posteriormente crostas, que lentamente evoluem para a cicatrização. Um caso mais grave foi notificado na Holanda onde uma adolescente, em contato com um roedor da espécie *Rattus norvegicus*, apresentou lesões nodulares ulceradas na face (**Figura 6**). Em hospedeiros imunodeficientes, o CPXV pode causar quadro clínico grave e generalizado (Wolfs, 2002; Lewis-Jones, 2004).



FIGURA 6: Lesões faciais resultantes da infecção por CPXV após contato com roedor da espécie *Rattus norvegicus* -
Fonte: Wolfs, 2002

O VACV, agente utilizado como amostra vacinal no combate a varíola, pode ser transmitido de uma pessoa vacinada para outra não vacinada pelo contato direto (**Figura 7A**). No Brasil, O VACV é um agente zoonótico, acometendo principalmente o gado leiteiro e ocasionalmente fazendeiros e ordenhadores, levando a uma grande perda econômica. O VACV causa lesões nodulares e pustulares nos tetos das vacas, nariz e boca de bezerros, evoluindo para ulcerações dolorosas, e por fim com a formação de crosta. A mesma evolução das lesões é observada em humanos em contato com as lesões do gado (**Figuras 7B a 7D**). Ordenhadores apresentando lesões nas mãos contribuem para a disseminação da doença para o rebanho leiteiro e, potencialmente, para seus familiares e pessoas próximas. Um caso de transmissão pelo contato entre humanos ocorreu na última década, após um soldado norte-americano receber a vacina contra varíola, e transmitir o vírus VACV para sua filha de vinte oito meses de idade que sofria de dermatite atópica. Esta transmissão provocou um quadro grave denominado *eczema vaccinatum* (**Figuras 7E e 7F**) (Vora et al., 2008).



Figura 7: Aspectos clínicos das infecções causadas pelo VACV. A, lesão vulvar; B, lesões na mão; C, lesões na face; D, lesões graves nas tetas de bovino; E e F, eczema vaccinatum em criança com dermatite atópica. **Fontes:** Trindade et al., 2003 ; Vora et al., 2008; Schatzmayr et al., 2009.

1.3 *Vaccinia virus (VACV)*

O VACV é a espécie protótipo do gênero OPV (ICTVdB, 2012). Devido à relação antigênica entre os OPV, o VACV foi extensamente utilizado na campanha de vacinação contra a varíola organizada pela Organização Mundial de Saúde (OMS). No entanto, a definição da origem e natureza das várias amostras de VACV utilizadas na produção de vacinas é ainda um desafio a ser superado. Sabe-se que as quatro amostras de VACV, denominadas EM-63, Lister, New York City Board of Health e Temple of Heaven foram as principais amostras utilizadas durante a campanha contra varíola, sendo inoculadas em cerca de um terço da população mundial (FENNER, 1988).

No Brasil, os registros históricos relatam uma importação de amostras vacinais datando antes de 1804. Estas amostras, destinada a imunização da população contra a varíola, chegaram em navios negreiros vindos de Portugal, sendo transportada pelo sistema braço a braço, aportando no Estado da Bahia. A partir daí, tanto escravos quanto a vacina foram enviados para os Estados São Paulo, Minas Gerais e Rio Grande do Sul, e a partir de 1840, para o Rio de Janeiro Espírito Santo,

Santa Catarina, Rio Grande do Norte, Ceará e Maranhão. Entre 1804 e 1887 houve uma extensa vacinação tanto de escravos quanto de pessoas que viviam nessas regiões, apesar da alta rejeição deste tipo de imunização por parte da população (Revisado por RISI, 1968).

Em 1887, a primeira amostra vacinal produzida em bezerro foi importada do Instituto Chambon em Paris na França para o Instituto de Vacinas do Rio de Janeiro (atual Instituto Oswaldo Cruz). Esta amostra foi então distribuída para os estados de Minas Gerais, Espírito Santo, Mato Grosso, Rio Grande do Sul e Pernambuco (Revisado por FERNANDES, 1999). Em 1899, surgiu a prática da utilização de bovinos para a produção de vacina em larga escala. Em 1903, a prática da vacinação se tornou obrigatório no Brasil por força de lei, devido ao esforço do pesquisador Oswaldo Cruz, diretor da Repartição Sanitária do Congresso Nacional. A partir daí, as vacinas passaram a ser produzidas em diferentes sistemas biológicos, utilizando amostras vacinais de origens muitas vezes desconhecidas (Revisado por RISI, 1968)

Em 1950, foi iniciado o programa de erradicação da varíola nas Américas e em 1966 foi criada a campanha de erradicação subordinada ao Departamento Nacional de Saúde com apoio da Repartição Sanitária Panamericana de Saúde. A vacina sistematicamente utilizada neste programa foi produzida pelo Instituto Oswaldo Cruz, no Rio de Janeiro. Sabe-se que a amostra utilizada para a produção desta vacina (VACV-IOC) era proveniente da França, provavelmente originada da amostra Paris (Revisado por FENNER, 1988; DAMASO et al., 2000). Durante todo esse período, as vacinas produzidas no Brasil não chegaram a atingir um padrão de qualidade satisfatório, considerando sua estabilidade e potencialidade. Contudo, apenas em 1970 foi obtida uma amostra vacinal com padrões de qualidade satisfatórios. Tratava-se da vacina produzida pelo Instituto Butantan, em São Paulo, provavelmente utilizando um clone proveniente da amostra Lister, denominada assim de VACV-LBT (Revisado por FENNER, 1988).

Os lotes sementes da vacina Lister produzidos pelo Centro Internacional de Referência da OMS, não eram submetidos à clonagem antes de sua distribuição para diversos laboratórios em todo o mundo. A observação prévia da presença de vários polimorfismos entre diferentes alíquotas da vacina Lister distribuída pela

OMS, sugere que o estoque da amostra Lister na verdade era constituída de uma população genética e fenotipicamente heterogênia (MORIKAWA et al., 2005). Drumond, 2007 observou diferenças entre as sequências nucleotídicas e aminoácidos (aa), de diversos genes contidos nas regiões terminais invertidas (ITR) da amostra VACV-LBT, em relação às sequências de Lister e as variantes LC16m0 e LC16m8, produzidos no Japão a partir da amostra Lister. A principal diferença observada entre a amostra Lister (Número de acesso: AY678276) e a amostra VACV-LBT foi a presença de uma deleção de 6 aa no gene A56R da amostra VACV-LBT, ausente na amostra Lister. No entanto, Drumond, 2007 avaliou cerca de 10% dos genes codificados por essas amostras, o que nos estimulou a compará-las utilizando dados genômicos completos, a fim de elucidar semelhanças e divergências entre as amostras Lister e VACV-LBT, bem como descrever as características genéticas dessa amostra vacinal que foi amplamente utilizada no Brasil. Recentemente, foi realizado o sequenciamento de genoma completo da amostra VACV-LBT e as análises preliminares dos dados obtidos serão apresentados neste trabalho.

1.3.1 Amostras brasileiras de VACV

Desde 1960, amostras de VACV tem sido repetidamente isoladas no Brasil, mas a origem destas amostras ainda vem sendo alvo de intensa pesquisa (Lopes et al., 1965). Em 1963, a amostra *BeAn 58058 virus* (BAV) foi isolada do sangue de um roedor do gênero *Oryzomys sp* capturado na região norte do Brasil no estado do Pará. Esta amostra de VACV foi a primeira isolada naturalmente no Brasil (Lopes et al., 1965).

Durante as décadas de 60 e 70, o governo do estado de São Paulo, através do Instituto Adolfo Lutz, conduziu um trabalho de vigilância epidemiológica contra arboviroses emergentes no estado. Durante esta investigação, uma amostra de VACV foi repetidamente isolada de camundongos sentinelas e foi denominada *Cotia virus*. Uma amostra de *Cotia virus*, denominada *SPAn232* (SAV), foi enviada ao Laboratório de Vírus da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), onde foi caracterizada molecularmente como VACV (da Fonseca et al., 2002).

Em 1998, a amostra Belo Horizonte virus (VBH) foi isolada de amostras clínicas congeladas, coletadas durante surto de VACV no biotério do Instituto de Ciências Biológicas/UFMG ocorrido em 1993. Este surto acometeu camundongos recém adquiridos da Universidade de Campinas, no estado de São Paulo, indicando uma exposição prévia desses animais ao vírus. A partir de 1999, surtos de doença exantemática, associados ao VACV, acometendo gado e ordenhadores, foram reportados no Brasil. Duas novas amostras de VACV, Araçatuba virus (ARAV) e Cantagalo virus (CTGV) foram isoladas em distintos rebanhos leiteiros doentes, em diferentes localidades da região sudeste do Brasil. Desde então, vários surtos têm sido notificados em várias regiões do país, principalmente no sudeste. Em 2000, um surto acometendo humanos foi reportado em Minas Gerais, e a amostra de VACV denominada Muriaé virus (MURV) foi identificada e caracterizada (Trindade et al, 2007a). Em 2001, duas amostras de VACV foram isoladas em um mesmo surto, em fazendas adjacentes, no estado de Minas Gerais; Guarani P1 virus (GP1V) e Guarani P2 virus (GP2V), que apesar de terem sido isolados de propriedades adjacentes, apresentaram propriedades distintas (Trindade et al, 2006). Em 2003, a amostra Passatempo virus (PSTV) foi também isolada de gado leiteiro no estado de Minas Gerais (Leite et al, 2005). Em 2005, surtos de uma doença exantemática foram reportados na região do Serro/MG envolvendo humanos e gado leiteiro. Foi conduzida uma investigação para identificar o agente causador do surto e uma nova amostra de VACV, denominada Serro virus 2 (SV2) foi identificada e caracterizada (Trindade et al, 2009). Em 2009, Abrahão e colaboradores descreveram a circulação de uma amostra de VACV, Mariana virus (MARV) em uma fazenda na região de Mariana, no estado de Minas Gerais.

Até o presente momento foram notificados surtos causados pelo VACV em onze Estados brasileiros, compreendendo todas as regiões do Brasil. Nos últimos três anos, surtos exantemáticos causados por VACV, afetando bovinos e humanos, foram descritos nos estados do Espírito Santo (Donatele *et al.*, 2007), Pernambuco (Damaso et al., 2008), Rondônia (S. de Saúde de Rondônia, 2009), Maranhão (Assis *et al.*, 2009 – dados não publicados), Tocantins (Medaglia *et al.*, 2009), Minas Gerais (Abrahão et al., 2009), Rio de Janeiro (Silva-Fernandes *et al.*, 2009) e São Paulo (Megid *et al.*, 2008). Em janeiro de 2010, Brum e colaboradores descreveram um surto exantemático causado por um OPV acometendo cavalos crioulos em um haras

localizado em Pelotas, RS. Estudos moleculares adicionais, realizados em parceria com o Laboratório de Vírus/UFMG, demonstraram que este isolado também se tratava de uma co-infecção de duas amostras distintas de VACV, amostras *Pelotas 1 virus* (P1V) e *Pelotas 2 virus* (P2V). Estas amostras foram as primeiras isoladas de cavalos no Brasil (Brum et al, 2010; Campos et al, 2010).

1.3.2 Diversidade Genotípica e Fenotípica das amostras Brasileiras de VACV

Damaso e colaboradores (2000) sugeriram que a amostra de VACV *Cantagalo virus* (CTGV) tenha sido originada da amostra vacinal VACV-IOC, baseado na similaridade de sequências de nucleotídeos e aminoácidos do gene A56R (*ha*), que codifica para uma hemaglutinina. Estas análises se basearam, sobretudo, na presença de uma deleção de 18 nucleotídeos observada tanto na amostra CTGV como na amostra IOC (**Figura 8**).

VACV-WR_(AY243312)	TTDETPEPIIDK-EDHTVIDTWSYITVSTSSGIIVTTKSTTDDADLYDTYNDNDTVPPITVGGSTTISISNYK	
VACV-GP1V_(DQ206436)-	
VACV-VBH_(DQ206435)-	
VACV-SPAn232_(DQ222922)-	
VACV-BeAn58058_(DQ206442)-	
VACV-P1V-	
VACV-P2V	..K.....-.....L.....	
VACV-TO_CA_(GU322359)-	
VACV-TO_AC_(GU322360)	..K.....-.....L.....	
VACV-RIA_(DQ810280)-	
VACV-CTGV_(AF229247)	..K.....-.....L.....	
VACV-CTGV-MU07_(FJ545689)-	
VACV-LOR_(DQ810281)-	
VACV-ARAV_(AY523994)-	
VACV-MARV_(GQ226040)-	
VACV-SV2_(EF063677)-	
VACV-GP2V_(DQ206437)	..K.....-.....L.....	
VACV-IOC_(AF225248)-S.....
VACV-Bf13906_(AF375077)Y.....-D.....S.....
VACV-Bf181_(AF375078)Y.....-D.....S.....
VACV-Ankara_(U944848)E.....-S.....
VACV-LST_(AY678276)E.....-S.....
VACV-Acambis_3_(AY313848)-S.....S.....
VACV-MALERAN_(AY146624)A.....-S.....S.....
VACV-LBT_(EF175985)E.....-S.....S.....
VACV-DUKE_(DQ439815)-S.....S.....
HSPV_(DQ79250)-S.....S.....
Rabbitpox_(AF37511)-S.....S.....

Figura 8: Sequência de aminoácidos do gene *ha* de amostras de VACV-BR e outras amostras de VACV e OPV. O retângulo mostra a região de deleção de 6 aminoácidos (18nt) nas amostras de VACV-BR não virulentas (modelo murino), além de outras amostras, enquanto que as amostras de VACV-BR virulentas, além de outras, não possuem esse deleção. **Fonte: Campos et al., 2010.**

Entretanto, Trindade e colaboradores (2007) demonstraram, em um estudo mais

extenso com diversas amostras brasileiras de VACV (VACV-BR), utilizando os genes *ha*, B19R, E3L e a região variável rpo132-ATI-p4c-A27L no genoma dos poxvirus, que as amostras brasileiras de VACV não se agrupam diretamente com a amostra vacinal VACV-IOC. Este mesmo estudo demonstrou que as amostras VACV-BR podem ser agrupadas filogeneticamente em dois grupos monofiléticos distintos (**Figura 9**), sendo o grupo 1 composto pelas amostras *Araçatuba virus* (ARAV), *Cantagalo virus* (CTGV), *Guarani P2 virus* (GP2V), e *Passatempo virus* (PSTV); e o grupo 2 composto pelas amostras *Guarani P1 virus* (GP1V), *Belo Horizonte virus* (VBH), *BeAn 58058 virus* (BAV) e *SPAn232 virus* (SAV).

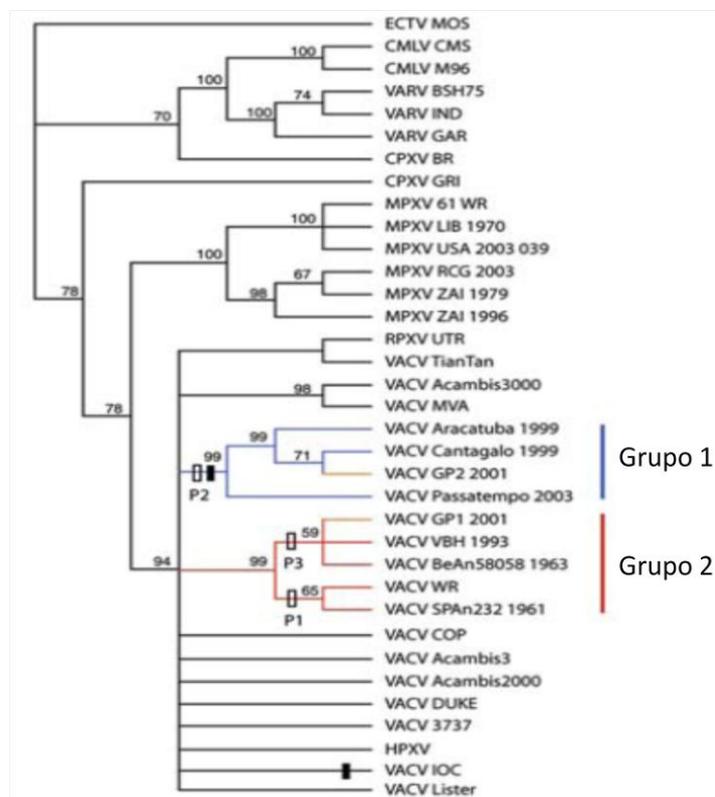


Figura 9: Consenso entre as seis mais parcimoniosas árvores concatenadas derivadas a partir da análise dos genes B19R, E3L e *ha* de várias espécies do gênero *Orthopoxvirus*. O retângulo negro indica uma deleção de 18 nucleotídeos (nt) no gene *ha*, compartilhado entre as amostras do grupo 1 e a amostra VACV-IOC. Retângulo aberto indica três perfis de digestão (P1,P2 e P3) na região variável rpo132-ATI-p4c-A27L. Linhas azuis, grupo 1; Linhas vermelhas, grupo 2; linhas amarelas, amostras GP1V e GP2V isoladas em fazendas adjacentes. **Fonte: Trindade et al., 2007.**

Corroborando com os resultados de Trindade e colaboradores (2007), um estudo sobre a virulência das amostras de VACV-BR em modelo murino (Balb/c), realizado por Ferreira e colaboradores (2008), demonstrou que as amostras brasileiras de

VACV também podem ser agrupadas em dois grupos: um extremamente virulento em modelo murino que agrupa as amostras BAV, SAV, VBH e GP1V; e outro não virulento, que agrupa ARAV, PSTV e GP2V. Novos estudos com base na comparação molecular dos genes C6L, C7L, K1L, K2L, K3L, E3L, *ha*, B5R, B8R e *ati*, identificaram novamente o mesmo padrão dicotômico dos VACV-BR descritos anteriormente (Drumond et al., 2008). Estudos filogenéticos posteriores incluíram as amostras de VACV MARV, SV2, P2V e MURV no grupo 1 e não virulento em modelo murino, enquanto que a amostra P1V foi incluída no grupo 2 e virulenta em modelo murino (Abrahão et al., 2009b; Campos et al., 2010).

1.3.3 Aspectos epidemiológicos do VACV no Brasil

Segundo a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), em 2010 o Brasil possuía um rebanho bovino de 209.541.000 cabeças de gado. Neste mesmo período, a região sudeste apresentou a maior produção de leite no país, com 2.972,129 milhões de litros, cerca de 39% da produção nacional. Estes dados demonstram a importância da produção leiteira para a economia nacional e principalmente para a região sudeste (www.agricultura.gov.br, acesso em 15/07/2010).

Apesar dos impactos econômicos causados durante os surtos de VB, devido à diminuição da produção de leite e afastamento do trabalhador infectado, não existe uma ação de vigilância epidemiológica efetiva a fim de diminuir a disseminação do VACV nas áreas rurais, e o número de casos de infecções certamente é subestimado (Abrahão et al., 2009b). O risco de infecção em humanos através do consumo do leite contaminado ainda é desconhecido. Porém existe pelo menos uma ocorrência do aparecimento de lesões exantemáticas na boca de um humano, associadas ao *Bufoalopox virus*, uma amostra indiana de VACV, após o consumo de leite contaminado (*revisado por* Berkelman, 2003). Em 2009, Abrahão e colaboradores detectaram partículas infecciosas de VACV em amostras de leite coletadas de rebanhos leiteiros durante surtos de VB no Estado de Minas Gerais, Brasil. Porém, não se sabe ao certo se a presença de partículas infecciosas de VACV no leite é decorrente de uma contaminação com fragmentos das crostas presentes no teto durante a ordenha, ou se é decorrente de uma infecção sistêmica

e uma conseqüente migração viral para as glândulas mamárias (Abrahão et al., 2009a).

Os surtos de VB apresentam um caráter ocupacional, acometendo principalmente trabalhadores rurais ligados direta ou indiretamente com a ordenha do gado. Um caráter sazonal à VB foi atribuído por Lobato e colaboradores (2005) e Donatele e colaboradores (2007). Nestes estudos supracitados, foi observada uma maior ocorrência de surtos de VB durante as estações mais secas do ano. Entretanto, Fernandes e colaboradores (2009) sugerem que a VB não seja mais sazonal, devido ao crescente número de relatos da doença na região sudeste do Brasil, durante todo o ano.

1.3.4 Transmissão e disseminação

Os mecanismos de transmissão e disseminação do VACV são bastante complexos e não completamente elucidados. Ratos, camundongos, gambás, raposas, cães selvagens e pequenos felídeos são frequentemente observados nas adjacências das fazendas onde surtos foram notificados. Acredita-se que alguns destes animais, principalmente roedores, possam estar envolvidos na transmissão do VACV do ambiente silvestre para o ambiente rural. Em 2009, Abrahão e colaboradores observaram durante um surto na região de Mariana que tanto o gado quanto ordenhadores de uma propriedade apresentavam lesões características de VB. Foi então feita a captura de roedores nas instalações da propriedade. Amostras clínicas humana, bovina e murina foram coletadas para a investigação da presença de VACV. Análises moleculares e fenotípicas indicaram que o vírus presente nos três hospedeiros analisados tratava-se da mesma amostra de VACV, denominada MARV.

Sabendo da presença do VACV no ambiente silvestre (Lopes et al, 1965; da Fonseca et al., 2002) , Abrahão e colaboradores (2009) propuseram um modelo de transmissão do VACV do ambiente silvestre para o ambiente rural e sua posterior disseminação (**Figura 10**). Neste modelo, a fauna silvestre adjacente às propriedades rurais seria a fonte do VACV. Um ambiente de transição entre a floresta e as áreas adjacentes da fazenda como plantações e as bordas das

florestas forneceriam condições para a transmissão do vírus a partir dos reservatórios silvestres para os roedores peridomésticos, através do contato direto entre estes animais ou excrementos. Esta hipótese de transmissão horizontal entre roedores é corroborada com dados de Ferreira e colaboradores (2008b) que detectaram a presença de VACV em fezes e urina de camundongos infectados experimentalmente e constataram a transmissão do VACV, através do contato das fezes contaminadas, para animais saudáveis.

Devido à grande quantidade de roedores próximos às instalações destinadas ao manejo do gado, como currais, e em locais de armazenamento de suprimentos como paióis, Abrahão e colaboradores (2009) propuseram ser esta a fonte de contaminação do gado, que por sua vez transmitiria o VACV através do contato direto ou de excrementos para outros bovinos, humanos ou roedores. Pesquisas realizadas em parceria entre o Laboratório de Virus da UFMG e a Escola de Veterinária da UFMG, indicam a presença do VACV nas fezes do gado contaminado (D’Anunciação et al, 2012). A eliminação do VACV nas fezes do gado contribuiria para a disseminação do vírus no rebanho e para humanos e populações de roedores (D’Anunciação et al, 2012).

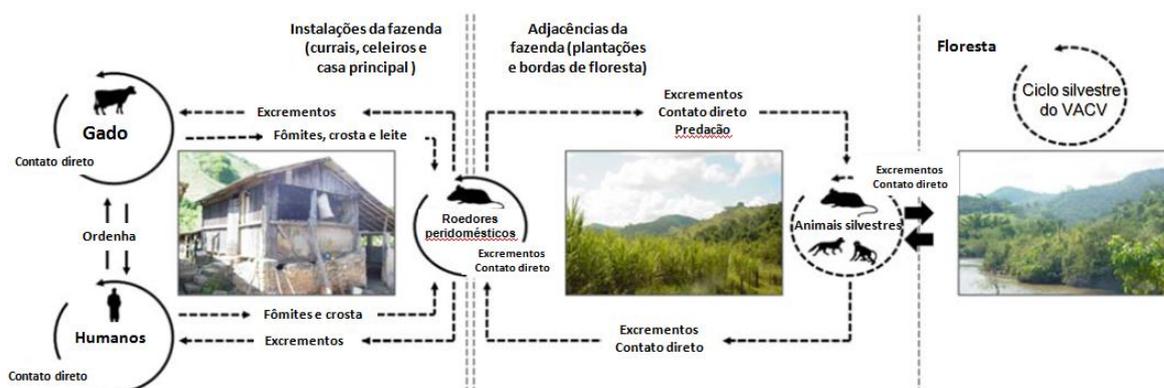


Figura 10: Ciclo hipotético de transmissão do VACV. Ambiente silvestre como fonte natural do VACV envolvidos em surtos de VB no ambiente rural. **Fonte: Adaptado de Abrahão et al., 2009b**

1.3.5 Hospedeiros e Reservatórios naturais do VACV no Brasil

Embora alguns pesquisadores acreditem que o VACV circulante hoje no Brasil e Índia seja proveniente de amostras vacinais, as quais foram transmitidas para animais domésticos e adaptaram em ambientes rurais (Damaso et al., 2000),

amostras isoladas de animais silvestres (BAV e SAV) no Brasil sugerem uma origem natural para amostras isoladas na América do Sul (Trindade et al., 2007).

Em um trabalho de resgate de fauna feito no Estado do Amazonas em 2001-2002 para a construção de uma hidroelétrica, foram capturados 344 animais silvestres de oito diferentes espécies, dos quais os soros foram coletados e enviados ao Laboratório de Vírus da UFMG. Anticorpos contra ortopoxvírus foram detectados em 4 espécies de mamíferos analisados: *Cebus apella* (Macaco-prego), *Alouatta caraya* (Macaco guariba), *Nasua nasua* (quati) e *Dasyprocta* sp (cutia). Através de PCR para os genes *ha* e *vgf*, foi detectado VACV geneticamente similar às amostras de VACV isoladas durante surtos de VB no Brasil. Embora estes achados sejam incertos no contexto da VB, novas perspectivas no estudo da biologia e epidemiologia do VACV foram abertas (Abrahão et al., 2010b). Uma extensa investigação a fim de identificar possíveis reservatórios naturais do VACV vem sendo conduzida pelo Laboratório de Vírus da UFMG (dados não publicados).

1.3.6 Modelos para estudo de virulência do VACV

O modelo animal mais adequado para o estudo de virulência das amostras de VACV ainda é incerto. Vários modelos animais vêm sendo utilizados, sendo o modelo murino considerado um bom modelo animal devido à disponibilidade de linhagens consanguíneas bem definidas (Jacobs et al., 2006). Várias vias de inoculação vêm sendo utilizadas neste modelo, tais como intradérmica, intravenosa, intraperitoneal, intracranial e intranasal. A via intranasal é a principal via de inoculação do VARV, e é considerada a principal via de transmissão dentre os demais ortopoxvírus. Conforme mencionado no item 1.3.2, Ferreira e colaboradores (2008) utilizaram o modelo murino Balb-C para a caracterização do perfil de virulência de amostras brasileiras de VACV.

Os camundongos Balb-c, infectados pela via intranasal com algumas amostras de VACV-BR, apresentaram sinais clínicos como: pilo ereção e arqueamento de dorso (VBH, BAV, SAV, GP1V), alopecia periocular (BAV e SAV), balanopostite (GP1V) e perda excessiva de peso ($\geq 25\%$) (VBH, BAV, SAV, GP1V). Os animais inoculados com PSTV, ARAV, VACV-Lister e GP2V não apresentaram sinais da doença. A dose

letal (LD₅₀) para cada amostra virulenta foi estabelecida para este modelo (**Figura 11**) (Ferreira et al., 2008).

Amostra de VACV	LD50 (PFU)
VBH	10 ³
WR	10 ⁴
GP1V	10 ⁶
SAV	10 ⁶
BAV	5×10 ⁷

Figura 11: Dose letal de 50% para modelo Balb-c infectado por via intranasal. Grupos de 7 animais foram infectados com doses virais variando de 10³ a 10⁸ PFU, e acompanhados por até 20 dias. **Fonte: Ferreira et al., 2008.**

Anticorpos neutralizantes podem ser observados nos camundongos infectados com ARAV, GP2V, PSTV e VACV-Lister 12 dias após infecção. Não foi possível detectar anticorpos neutralizantes nos animais inoculados com as amostras VACV-BR virulentas devido à letalidade precoce provocada pelas amostras virais. Foram detectados altos títulos virais (10⁸-10⁹ PFU/g) nos pulmões, traquéia, baço, fígado, rins, coração e cérebro dos animais infectados com as amostras BAV, SAV, VBH, GP1V e VACV-WR. Não foi detectada a presença de VACV nos órgãos dos camundongos infectados com as amostras ARAV, GP2V, PSTV e VACV-Lister. Análises histopatológicas nos pulmões dos animais infectados com as amostras BAV, SAV, VBH, GP1V e VACV-WR revelaram a presença de infiltrados inflamatórios e quadro grave de pneumonia enquanto que nos animais infectados com as amostras ARAV, GP2V, PSTV e VACV-Lister este quadro foi de brando a moderado. Todos os animais estudados apresentaram pneumonia intersticial e bronquiolite. Nos quadros mais graves as lesões no pulmão foram degenerativas, necrotizantes e hemorrágicas, contendo predominantemente infiltrados intersticiais

linfocíticos e histiocíticos. Hiperplasia das células do epitélio bronquial, fibroblastos e pneumócitos também foram observados (Ferreira et al., 2008).

Adams e colaboradores (2007) utilizaram coelhos infectados com *Rabbitpox virus* e *Vaccinia virus* como modelo de estudo da varíola em humanos. A Escola de Veterinária da UFMG junto com o Laboratório de Vírus da UFMG vêm desenvolvendo um estudo sobre a patogênese do VACV em modelo bovino (dados não publicados).

Uma correspondência entre o perfil genético e efeito citopático foi demonstrado por Abrahão et al, 2009 e Campos et al, 2010 para estudos de caracterização de amostras de VACV. Amostras do grupo 1 de VACV-BR apresentaram placas de lise em monocamada celular pelo menos 2 vezes menores que as placas provocadas por uma infecção com amostras de VACV-BR do grupo 2, corroborando com os ensaios de virulência em modelo murino e com os dados moleculares (Trindade et al., 2007; Drumond et al., 2008).

2. JUSTIFICATIVA

Desde tempos remotos, há cerca de 6.000 anos, a vida do ser humano vem sendo impactada pelos poxvírus. Acredita-se que a varíola tenha causado a morte de mais pessoas do que qualquer outra doença ou outras causas de mortalidade na história da humanidade. Só no século XX, estima-se que cerca de 500 milhões de mortes tenham sido causadas pelo VARV. Registros históricos indicam que a varíola pode ter sido, em parte, responsável pela decadência de civilizações organizadas como Atenas e até mesmo o Império Romano, assim como o fez também nas Américas. Mesmo após a erradicação do VARV, a possibilidade de sua utilização como arma biológica tem motivado pesquisas com diversos vírus do gênero OPV, causadores de infecções zoonóticas, a fim de entender os processos biológicos envolvidos na transmissão e patogênese das doenças, uma vez que estes agentes possuem semelhanças com o VARV.

Outras espécies de OPV tais como CPXV, MPXV e VACV, têm emergido como agentes zoonóticos, eventualmente causando infecções graves em humanos. No Brasil, desde a década de 60, amostras de poxvírus vêm sendo isoladas e caracterizadas como VACV através de métodos imunológicos, virológicos e moleculares. Devido ao fato de o VACV ter sido o agente utilizado como vacina contra o VARV, sua caracterização tem sido especialmente importante.

Desde 1999, o VACV vem sendo relacionado às infecções no gado leiteiro em diversas regiões do Brasil, afetando principalmente pequenas propriedades que realizam a ordenha de subsistência, causando um grande impacto econômico e social. Apesar de sua importância econômico-social no Brasil, a VB é ainda negligenciada tanto pelos próprios proprietários, como também por trabalhadores rurais, veterinários, políticos e profissionais da saúde.

Surtos de vaccínia bovina vêm sendo cada vez mais frequentemente notificados em diversas regiões do Brasil, principalmente no sudeste, centro-oeste, nordeste e norte. Amostras clínicas humanas e bovinas, coletadas durante estes surtos, vêm sendo encaminhadas ao Laboratório de Vírus da UFMG, e analisadas pelo grupo de

poxvirologia para fins de diagnóstico. Em muitas destas amostras foi detectada a presença do VACV. Contudo, algumas destas amostras ainda não foram caracterizadas para fins de estudos filogenéticos, biológicos e epidemiológicos. Devido à grande diversidade biológica entre as amostras de VACV, este trabalho teve como objetivo caracterizar amostras de VACV detectadas em espécimes humanos e bovinos entre os anos de 2005 a 2011, em várias regiões do Brasil, a fim de avaliar a diversidade genética e fenotípica das amostras brasileiras de VACV.

3. OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

Realizar a caracterização molecular e biológica de amostras de VACV isoladas de humanos e bovinos durante surtos de VB, ocorridos nas regiões sudeste, centro oeste e norte do Brasil no período de 2005 a 2011.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Fazer a triagem molecular por PCR (gene C11R – fator de crescimento viral) de espécimes clínicos humanos e bovinos, de uma coleção de amostras clínicas do Laboratório de Virus da UFMG, coletadas durante surtos de VB;
- Realizar a caracterização das amostras positivas na triagem em dois grupos distintos, utilizando uma PCR diferencial para o gene A56R (Hemaglutinina viral);
- Padronizar uma PCR-*Nested* para o gene *ati* a fim de aplicá-la na caracterização molecular das amostras identificadas no presente estudo;
- Sequenciar e analisar filogeneticamente regiões parciais dos genes *ha* e *ati* de algumas amostras de VACV selecionadas;
- Fazer o isolamento, clonagem, multiplicação e purificação viral de algumas amostras de VACV, para realização da sua caracterização biológica (ensaios de virulência em modelo murino Balb-C e fenótipo de placa).

4. METODOLOGIA

4.1 ORIGEM DAS AMOSTRAS

Foi utilizada neste estudo uma coleção de 142 amostras clínicas, pertencentes ao Laboratório de Vírus da UFMG; dentre elas crostas, suabes e soros humanos e bovinos, coletadas durante surtos de VB ocorridos durante o período de 2005 a 2009, nos estados de Minas Gerais e Espírito Santo. Estas amostras estavam armazenadas em freezer -20°C. Foi feito um levantamento dos registros destas amostras clínicas a fim de verificar sua procedência.

Alem disso, no decurso deste trabalho (2010 e 2011) vários surtos de VB foram notificados em vários estados brasileiros, e amostras foram enviadas ao Laboratório de Vírus para pesquisa do agente etiológico. Em alguns casos, uma equipe do Laboratório foi enviada até o local de ocorrência do surto para a coleta de materiais e levantamento epidemiológico. Durante este período foram coletadas e analisadas 260 amostras clínicas sendo, 151 provenientes do Estado da Bahia (34 propriedades), 51 de Goiás (05 propriedades), 33 do Espírito Santo (08 propriedades), 21 de Minas Gerais (03 propriedades) e 04 do Estado do Pará (01 propriedade). Conforme protocolo interno do Laboratório de Vírus da UFMG, estas amostras foram inseridas em um catálogo de registro e homologação de diagnóstico para OPV, e as fichas epidemiológicas arquivadas. Uma compilação de todas as amostras analisadas pode ser visto na **Tabela 2**.

As amostras provenientes dos estados da Bahia, Espírito Santo, Goiás e Mato Grosso foram enviadas pelos órgãos de vigilância veterinária de cada Estado ou pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). As amostras provenientes de Minas Gerais foram coletadas pelo grupo de poxvirologia da UFMG. As amostras do estado do Pará foram coletadas e encaminhadas ao Laboratório de Vírus pelo estudante de Doutorado da Escola de Veterinária da UFMG, Cairo H.S de Oliveira. Todas as amostras foram armazenadas em freezer -20°C até o momento da análise. No total foram analisadas 402 amostras clínicas provenientes de cinco Estados de quatro regiões do Brasil (**Figura 12**).

Tabela 2: Descrição das amostras analisadas, identificando a localidade de coleta, ano ou período em que as amostras foram coletadas; espécime (s) clínico (s) coletados e o total de amostras coletadas em cada localidade.

Localidade	Ano	Espécime	Nº amostras	Fonte
Minas Gerais*	2005-2009	crosta, soro, suabe	44	Humano/Bovino
Espírito Santo*	2005-2009	crosta, soro, suabe	40	Humano/Bovino
Serro/MG	2005	Crosta	16	Humano/Bovino
Resplendor/MG	2005-2009	Crosta, suabe	8	Bovino
Paulista/MG	2005-2009	crosta	3	Bovino
Maravilha/MG	2005-2009	Crosta	1	Bovino
Paraguaçu/MG	2009	Crosta	6	Bovino
Argirita/MG	2008	Suabe	5	Humano
Ecoporanga/ES	2005-2009	crosta	2	Bovino
Mucurici/ES	2008	Soro, crosta	11	Bovino
Lagoa da Prata/MG	2009	Crosta	2	Bovino
Acaiaca/MG	2005	Suabe	2	Humano
Bambuí/MG	2005/2009	Suabe	1	Bovino
Jequeri/MG	2005	Suabe	1	Humano
Carangola/MG	2011	Soro, crosta, suabe	18	Humano/Bovino
Serro/MG	2011	Crosta	3	Humano/Bovino
Pará*	2011	Crosta	4	Bovino
Ecoporanga/ES	2010	Soro, crosta	5	Bovino
Pinheiros/ES	2010	Soro	15	Bovino
Cachoeiro do Itamemirim/ES	2010	Soro	2	Bovino
Baixo Guandu/ES	2010	Soro, crosta	3	Bovino
São José do Calçado/ES	2011	Soro, crosta	3	Bovino
Anchieta/ES	2011	Soro	3	Bovino
São Roque do Canaã/ES	2011	Soro	2	Bovino
Vila Propício/GO	2011	Soro, crosta	22	Bovino
Burití Alegre/GO	2011	Soro, crosta	10	Bovino
São João da Paraúna/GO	2011	Soro, crosta	13	Bovino
Jataí/GO	2011	Soro, crosta	6	Bovino
Mundo Novo/BA	2011	Soro, crosta	69	Humano/Bovino
Piritiba/BA	2011	Soro, crosta	16	Bovino
Itapé/BA	2011	Soro	1	Bovino
Mairi/BA	2011	Soro, suabe	4	Humano
Miguel Calmo/BA	2011	Soro	3	Bovino
Jacobina/BA	2011	Soro, crosta	24	Bovino
Capela do Alto Alegre/BA	2011	Soro, crosta	19	Bovino
Pintada/BA	2011	Soro, crosta	2	Bovino
Macajuba/BA	2011	Soro, crosta	4	Bovino
Baixa Grande/BA	2011	Soro, crosta, suabe	9	Humano/Bovino
TOTAL	-	-	402	-

*As amostras descritas, coleta em Minas Gerais, Espírito Santo (2005-2009) e Pará (2011), não tiveram as localizações exatas das cidades de coleta identificadas.

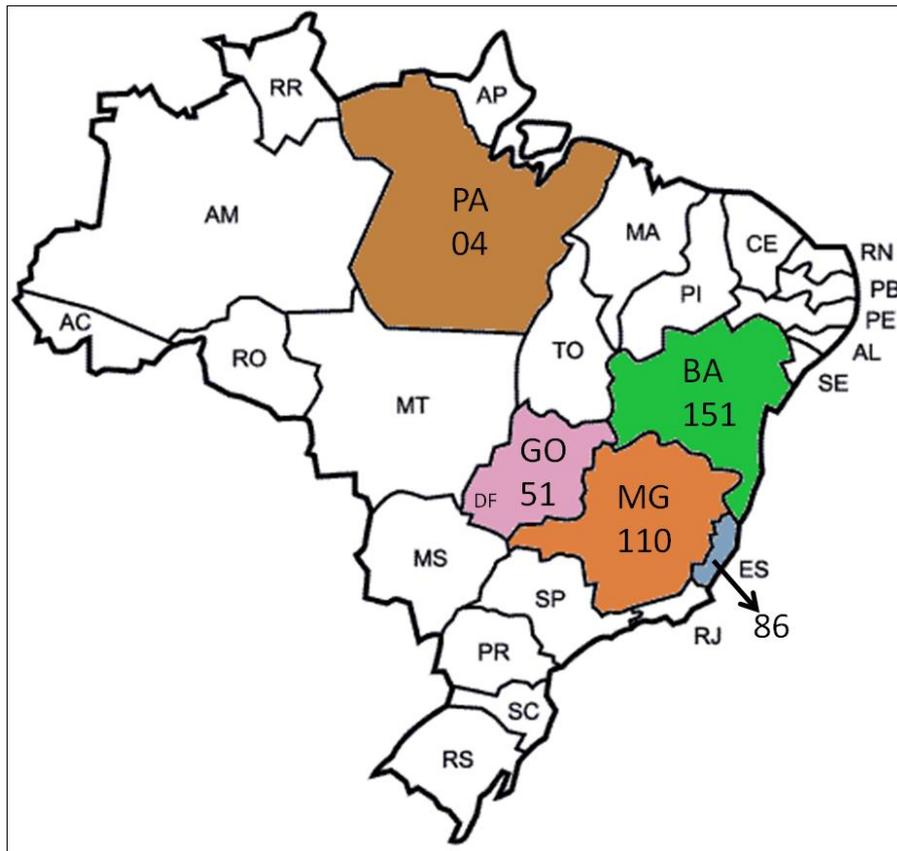


Figura 12: Distribuição geográfica das amostras clínicas coletadas durante surto de VB. Em destaque os Estados acometidos por surtos de VB. Os números contidos na figura correspondem ao numero de amostras coletadas em cada Estado: Pará, 04 amostras; Goiás, 51 amostras; Bahia, 151 amostras; Minas Gerais, 110 amostras; Espírito Santo, 86 amostras.

4.2 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

Todas as amostras clínicas foram processadas usando solução salina tamponada (PBS) acrescida de penicilina (200 U/mL), anfotericina B (4µg/mL) e gentamicina (100 µg/mL). As biópsias de lesão (crostas) foram maceradas manualmente com auxílio de um pistilo e diluídas a 1:100 p/v em PBS, homogeneizadas e clarificadas por centrifugação a 2000 x g por 3 minutos. Os soros foram diluídos à 1:100 v/v em PBS e homogeneizados. Aos suabes foram adicionados 200-300µL de PBS, homogeneizados e centrifugados a 2000 x g por 3 minutos. Todas as amostras foram submetidas à reação de PCR do tipo *Nested* para o gene *vgf* como método de triagem (Abrahão et al., 2009).

4.3 SISTEMAS CELULARES

4.3.1 Células fibroblásticas de embrião de galinha (CEF)

Para o isolamento viral foram utilizadas células fibroblásticas de embrião de galinha (CEF). A CEF é uma célula embrionária primária obtida através de maceração do tecido embrionário e posterior desagregação enzimática. Os ovos contendo embriões com 10 dias de vida foram higienizados com solução de iodo glicerinado 2% para evitar contaminações. Os ovos foram abertos em capela de fluxo laminar, com a câmara de ar voltada para cima. Com auxílio de uma pinça, a casca do ovo foi quebrada e removida até a linha da câmara de ar. A membrana da casca foi removida expondo o embrião, que foi removido pelo pescoço de forma a preservar o saco vitelino (gema). O embrião teve a cabeça e os membros removidos e foi colocado numa placa de Petri com meio mínimo essencial (MEM) estéril (sem adição de SFB, antibióticos e glutamina). Foram removidos os órgãos internos (coração, fígado e intestinos). Os embriões foram triturados em seringa, coletados em erlenmeyer contendo cerca de 5 mL de tripsina/EDTA (NaCl 136mM; KCl 5mM; glicose 55mM; NaHCO₃ 69mM; 0,5g p/v tripsina 1:250 [Difco]; EDTA 0,5mM; 1% vermelho de fenol) por carcaça, onde foram incubados por 15 minutos a 37°C sob agitação lenta. Para interromper a ação da tripsina, foi adicionado meio MEM 10% de SFB, em igual volume. A suspensão foi filtrada em béquer com gaze em 8 camadas. O filtrado foi transferido para tubo falcon (50mL) estéril e centrifugado por 10 minutos a 1750 x g. O meio foi descartado e o sedimento suspenso em 4mL de meio MEM 10 %. As células foram contadas em Câmara de Neubauer (**Item 4.3.3**) e foram adicionada 5 X 10⁶ células por garrafa (150 cm²). Foram adicionados 25mL de meio MEM acrescido de 10% de SFB, glutamina, bicarbonato de sódio e acrescido de antibióticos (penicilina - 100 U/mL; anfotericina B - 2µg/mL; Gentamicina - 50 µg/mL). As garrafas foram incubadas a 37°C até atingir confluência de 90-100%. As células CEF foram sub-cultivadas por no máximo 3 vezes sendo a monocamada celular lavada com solução tampão fosfato salina (PBS) (NaCl 137mM; KCl₂ 7mM; Na₂HPO₄ 1,4mM; pH 7,2) e tratada com solução de tripsina contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (NaCl 136mM; KCl 5mM; glicose 55mM; NaHCO₃ 69mM; 0,5g p/v tripsina 1:250 [Difco]; EDTA 0,5mM; 1% vermelho de fenol).

4.3.2 Células VERO e BSC

As células VERO e BSC-40, linhagens contínuas derivadas de células epiteliais de rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*) foram obtidas da “American Type Culture Collection” (ATCC), (Maryland, E.U.A.). O cultivo celular foi feito em garrafas redondas contendo 50 mL de meio mínimo essencial de Eagle (MEM) (Gibco™, USA) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Brasil), glutamina, gentamicina (50 µg/mL), penicilina potássica (200 U/mL) e anfotericina B (2,5 µg/mL), sob incubação a 37°C, em atmosfera com 5% de CO₂ em estufa de tambor rolante. Os subcultivos foram feitos três vezes por semana sendo a monocamada celular lavada com solução tampão fosfato salina (PBS) (NaCl 137mM; KCl 7mM; Na₂HPO₄ 1,4mM; pH 7,2) e tratada com solução de tripsina contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (NaCl 136mM; KCl 5mM; glicose 55mM; NaHCO₃ 69mM; 0,5g p/v tripsina 1:250 [Difco]; EDTA 0,5mM; 1% vermelho de fenol). As células VERO foram utilizadas para multiplicação e titulação viral, enquanto que as células BSC-40 foram utilizadas no ensaio de fenótipo de placas. Em ambos os casos, a infecção viral foi realizada quando as monocamadas atingiram uma confluência entre 80-90%.

4.3.3 Controle de qualidade da multiplicação celular

Para o controle da multiplicação das linhagens celulares e das CEFs, suspensões celulares foram diluídas, utilizando micropipeta, em tubos de eppendorf de 1,5mL em uma concentração de 1:10 (100µL da suspensão celular + 900µL de meio de cultura). Com auxílio de uma micropipeta, foram aplicados aproximadamente 0,1mL da diluição entre a lamínula e a câmara de Neubauer. A contagem das células foi feita utilizando um microscópio invertido. Foram quantificadas as células presentes nos quadrantes das extremidades do campo de contagem. Para obter a quantidade de células por mililitro de suspensão, o número de células contadas é dividido pelo número de quadrantes contados; o resultado é multiplicado pelo fator padrão de correção da câmara de 10⁴; e novamente multiplicado pelo fator de correção da diluição da suspensão utilizada, no caso 10. A suspensão foi então alíquotada em garrafas e placas estéreis com a quantidade apropriada. Novo meio de cultura

previamente suplementado foi adicionado, e as células foram homogeneizadas para garantir crescimento uniforme da monocamada em toda a superfície de contato.

O crescimento celular foi avaliado diariamente até este atingir a confluência desejada. Para o cultivo de CEF e VERO em garrafas de 150 cm² foram adicionados 5×10^6 células para que se atingisse a confluência de 90-100% em aproximadamente 72 horas. Para titulação e ensaio de fenótipo de placa em células VERO e BSC-40, respectivamente, placas de seis poços foram inoculadas com 10^6 células, por poço, para se obter a confluência de 90-100% em 24 horas.

4.4 VÍRUS

Como controle positivo da PCR para o gene *vgf*, foi utilizada a amostra laboratorial *Vaccinia virus* Western Reserve (VACV-WR), protótipo da espécie, e gentilmente cedida pelo Dr. C. Jungwirth (Universitat Wurzburg, Alemanha). Como controles positivos das PCRs para os genes *ha* e *ati*, foram utilizadas as amostras GP2V e GP1V, representantes dos grupos 1 e 2 de VACV-BR, respectivamente (Trindade et al, 2006). Para o ensaio de fenótipo de placa e virulência em modelo murino, também foram utilizadas as amostras WR (protótipo dos OPV), GP1V (amostra sabidamente virulenta em modelo murino) e GP2V (amostra sabidamente não virulenta em modelo murino).

4.5 ISOLAMENTO VIRAL

Para o isolamento viral, monocamadas de células CEF e/ou BSC-40, com confluência entre 80-90%, tiveram o meio de cultura desprezado; lavado duas vezes com PBS retirando o excesso ao final da lavagem com auxílio de uma pipeta estéril. As monocamadas foram então inoculadas com 300ul de cada amostra processada (1:100 p/v ou v/v) (**Item 4.2**) e incubadas a 37°C para adsorção durante uma hora, sendo o inóculo homogeneizado por inversões da garrafa a cada 10 minutos. Após a adsorção foi adicionado meio MEM, na quantidade adequada para o recipiente utilizado, suplementado com 1% de SFB. As monocamadas foram então incubadas a 37°C com atmosfera a 5% de CO₂, por 48 horas ou até que se observassem placas de lise na monocamada, provocadas pelo vírus. Como controle negativo, foi

utilizado meio MEM. Como controle positivo foi utilizado VACV- WR. Para os casos onde não foi possível observar efeito citopático (ECP) na primeira passagem, foram procedidas até três passagens adicionais em monocamada de CEF. As monocamadas de CEF que apresentaram efeito citopático foram coletadas com auxílio de raspador (Scraper TTP[®]) e armazenadas em freezer -70°C.

4.6 SELEÇÃO DE PLACAS VIRAIS

Para a seleção de placas virais, as suspensões de vírus foram seriadamente diluídas em meio DMEM sem adição de SFB, em um volume final de 200uL. Estas foram inoculadas em monocamada de células VERO, com confluência de 80-90%, contidas em placas de 6 poços, após prévio descarte do meio e lavagem da monocamada com PBS. As monocamadas contendo os inóculos foram incubadas por 1 hora (período de adsorção), sendo gentilmente homogeneizadas a cada 10 minutos. Após a adsorção, foi adicionado aos poços, meio de cultura semi-sólido, que consistiu de: Meio DMEM 2X suplementado com SFB 2% e acrescido de antibióticos 2X (penicilina - 200 U/mL; anfotericina B - 4µg/mL; Gentamicina - 100 µg/mL). Paralelamente, foi preparada solução de Agarose 2% diluída em H₂O dd e adicionada do meio DMEM supracitado na razão de 1:1 (v-v), dando origem a meio DMEM 1X acrescido de agarose 1%. Foram adicionados 2mL deste meio em cada poço contendo monocamada e inóculo. Para cada placa foi reservado um poço para controle de célula, que foi inoculado com meio DMEM 0%. As culturas foram incubadas por 24-48hs. Após visualização e seleção dos clones com auxílio de microscópio e pincel de ponta fina, estes foram coletados com auxílio de pipeta e ponteira de 100uL com filtro. O meio sólido foi aspirado logo acima da placa marcada com pincel. O aspirado foi dispensado em tubo de 1,5 mL pré-identificado contendo 100uL de PBS. A ponteira foi lavada com o PBS contido no tubo repetidas vezes para liberar possíveis partículas contidas nela. Os tubos foram armazenados em freezer -20°C. Os clones utilizados na caracterização biológica foram submetidos a duas seleções para garantir a pureza dos clones.

4.7 MULTIPLICAÇÃO VIRAL

Para a multiplicação viral, 20 garrafas de 150cm², contendo monocamadas de células VERO com confluência de 90-100%, foram infectadas com multiplicidade de infecção (MOI) de 0,01 em 3mL de MEM, acrescido de antibióticos (penicilina - 100 U/mL; anfotericina B - 2µg/mL; gentamicina - 50 µg/mL). Após 1 hora de adsorção, a 37°C, foram acrescentados 25mL de MEM suplementado com 1% SFB. As células foram novamente incubadas a 37°C sob atmosfera de 5% de CO₂ e monitoradas diariamente, ao microscópio óptico até a detecção de 90% de ECP, aproximadamente, 48 horas após a infecção (Trindade et al., 2003, 2006; Leite et al., 2005). Em seguida, o meio de cultivo foi desprezado, as células foram lavadas com PBS e desprezadas das garrafas com auxílio de um raspador (Scraper TTP[®]) utilizando Tris-HCl 10mM, pH 8,0. A suspensão obtida foi então centrifugada durante 10 minutos a 1500 x g, a 4°C, e o sedimento obtido foi mantido a – 70°C para posterior purificação das partículas virais.

4.8 PURIFICAÇÃO

O sedimento obtido durante a multiplicação viral (**item 4.7**) foi homogeneizado em 8mL de Tris-HCl 10mM, pH 8,0 e centrifugado a 2.500 x g (rotor H1000B - Sorvall RT6000 B) durante 15 minutos a 4°C. O sobrenadante obtido foi mantido em banho de gelo e o sedimento celular foi lisado duas vezes em 10 mL de solução de lise (MgCl₂ 1mM; Tris10mM, pH 7,0; KCl 10mM). Após a adição desta solução, a suspensão foi incubada em banho de gelo, durante 10 minutos e as células lisadas mecanicamente em homogeneizador do tipo “Douncer” (Wheaton, USA) por 80 vezes. A suspensão viral resultante foi então centrifugada a 14.000 x g, 4°C, por 2 horas sobre um colchão de sacarose a 36% em Tris-HCl 10mM, pH 8,0 para separação dos restos celulares. Utilizando-se uma pipeta Pasteur, o sobrenadante e a interface foram coletados e desprezados e o restante foi descartado por inversão do tubo. Os sedimentos obtidos foram homogeneizados em até 500µL de Tris 10mM (pH 8,0), distribuídos em alíquotas de 2 µL em microtubos e estocados a – 70°C (Adaptado de JOKLIK,1962).

4.9 TITULAÇÃO

A titulação foi feita em duplicata em placas de 6 poços contendo aproximadamente $1,5 \times 10^6$ células Vero/ câmara cultivada por 16 a 24 horas, a 37°C em MEM, contendo 5% SFB (Cultilab, Brasil). Em cinco câmaras da placa, o meio foi desprezado e 200 µL de uma série de diferentes diluições dos vírus, na razão de 10, em meio MEM, foram adicionados às células. Uma câmara foi reservada para o controle da viabilidade celular. Após 1 hora de adsorção a 37°C, 2,8 mL de MEM contendo 1% de SFB foram adicionados e as placas foram novamente incubadas a 37°C e monitoradas por 48 horas. Em seguida, as células foram fixadas com solução 10% de formol em PBS por 30 minutos, lavadas com água e, posteriormente, coradas com solução 1% (p/v) de cristal violeta por 15 minutos. O título viral foi calculado pelo número de placas obtidas na câmara da diluição que apresentou entre 30 a 300 placas de lise, multiplicado pelo inverso da diluição, em 200 µL, e posteriormente convertido para o volume final de 1 mL, dando o título final em unidades formadoras de placas por mililitro (PFU/mL) (Campos & Kroon, 1993).

4.10 ENSAIO DE FENÓTIPO DE PLACA

Algumas das amostras virais isoladas (**item 4.5**) foram selecionadas para os ensaios de fenótipo de placa. Desta forma, estas amostras foram multiplicadas em células Vero (**item 4.7**), purificadas (**item 4.8**) e então foram inoculadas em placas de 6 poços contendo monocamadas de célula BSC-40 com confluência de 90-95%, sob M.O.I.s variando entre 1 e 0,01, para a observação do fenótipo de placas virais. A inoculação das amostras foi feita segundo o item 4.8. Após 48 horas de incubação, as células infectadas foram fixadas com solução de 10% de paraformaldeído e coradas com cristal violeta. As placas de lise obtidas pela inoculação celular com amostras virais foram fotografadas para análise comparativa. A célula BSC-40 foi escolhida por ser capaz de diferenciar amostras do grupo 1 e 2 de VACV-BR de acordo com o tamanho da placa de lise gerada por eles. Em células VERO essa diferença não é observada.

4.11 VIRULÊNCIA DE AMOSTRAS DE VACV EM MODELO MURINO

Algumas das amostras de VACV obtidas no presente estudo foram selecionadas, multiplicadas (**item 4.7**) e purificadas (**item 4.8**) para análise de virulência em

camundongo Balb-c, segundo Ferreira e colaboradores, 2008. Camundongos BALB/c machos com 4 semanas de idade foram utilizados como modelo animal, sendo cedidos pelo Centro de Bioterismo da UFMG (CEBIO/UFMG). Quatro animais em cada grupo foram anestesiados através de injeção intraperitoneal de Ketamina e Xilasina (3.2 mg e 0.16 mg/animal, em tampão fosfato salina (PBS) 0,9%, respectivamente) e inoculados por via intranasal com um volume de 10 µL contendo 10⁶ PFU das amostras virais testadas. Como amostras controles, foram selecionados os vírus WR (protótipo dos OPV), GP1V (amostra sabidamente virulenta) e GP2V (amostra sabidamente não virulenta). Como controle negativo, animais foram inoculados com 10 µL de PBS. Os animais foram acompanhados por 12 dias após a infecção (D.P.I), sendo registrada diariamente a evolução dos sinais clínicos e peso. Todos os animais foram sacrificados após o período de observação através da injeção letal de 100ul da solução anestésica/analgésica seguida por deslocamento cervical (Ferreira et al., 2008). Os experimentos foram feitos de acordo com as normas do Comitê de Ética (CETEA) da UFMG (protocolo nº 207/2010).

4.12 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

4.12.1 PCR-Nested para o gene *vgf*

Para a PCR-Nested para o gene *vgf*, um gene conservado entre os virus do gênero *Orthopoxvirus* que codifica para um fator de crescimento viral, foram utilizados iniciadores externos *vgfF*: CGCTGCTATGATAATCAGATCATT e *vgfR*: GATATGGTTGTGCCATAATTTTTAT (Fonseca et al., 1998), e os iniciadores internos *vgfF2*: ACACGGTGAAGTGTATCCA e *vgfR2*: CTAATACAAGCATAATAC (Abrahão et al., 2009B). A primeira reação consistiu de: em um volume final de 20 µL em solução tampão (tris 0,1M pH8.3 + KCl 0,5M + 0,1% de Triton x100) foi acrescentado 0.4 mM de cada iniciador (VGF-F and VGF-R), 40 mM dNTP's, 2,0 mM MgCl₂, 500 ng albumina bovina sérica (BSA) e 2 U de Taq DNA polimerase. A reação foi realizada no termociclador DNA Mastercycler Epgradient (Eppendorf, Hamburg, Germany) usando o protocolo de pré-incubação à 95°C por 9 minutos; 30 ciclos de desnaturação (94°C, 1 minuto), pareamento (45°C, 1 minuto) e extensão (72°C, 1 minuto), e extensão final (72°C,10 minutos). A segunda reação foi feita utilizando

1µL da primeira reação como amostra. Foram utilizadas as mesmas condições químicas e térmicas da primeira reação, porém utilizando somente os iniciadores internos e excluindo a BSA. Como controle negativo foi utilizado H₂O dd utilizada na preparação da solução de PCR a fim de avaliar uma possível contaminação dos reagentes. Para esta reação é esperada a amplificação de um fragmento de 170pb (Abrahão et al., 2009B). As reações foram fracionadas em gel de poliacrilamida (**item 4.13**) e coradas pelo método da prata (**item 4.14**).

4.12.2 PCR para o gene *ha*

Para o gene *ha* foram utilizados os pares de iniciadores descritos na **Tabela 3** (Trindade et al., 2008). Os iniciadores para **PCR 1** foram desenhados para amplificar diferentes OPV incluindo CPXV, MPXV e ECTV; os iniciadores para **PCR 2** foram desenhados para amplificar todas as amostras de VACV-BR, não amplificando amostras derivadas da amostra vacinal DRYVAX e alguns clones da amostra VACV-Lister; os iniciadores para **PCR 3** foram desenhados para amplificar todas as amostras de VACV-BR que não apresentam uma deleção de 18 nt no gene *ha*, amplificando amostras derivadas de VACV-NYCBH DRYVAX and VACV-Lister. Com este conjunto de iniciadores é possível identificar as amostras como sendo OPV (par de iniciadores PCR 1), diferenciar amostras de VACV-BR das amostras VACV vacinais (par de iniciadores PCR 2) e por fim separar as amostras de VACV-BR em dois grupos de acordo com a presença ou não da deleção de 18 nt no gene *ha* (par de iniciadores PCR 3). Embora estes iniciadores tenham sido desenhados para aplicação em PCR em tempo-real, estes foram aqui utilizados em reações convencionais. Cada amostra foi submetida às três reações simultaneamente sob as seguintes condições: em um volume final de 20 µL em solução tampão (tris 0,1M pH8.3 + KCl 0,5M + 0,1% de Triton x100) foi acrescido 1 mM de cada par de iniciador, 7,5 mM dNTP's, 2.5 mM MgCl₂ e 1U de Taq DNA polimerase. As condições térmicas para a reação foram as seguintes: um ciclo inicial à 95 °C por 10 minutos, seguido de 30 ciclos de 95°C por 1 min, 55°C por 1 min e 72°C por 1 min e temperatura final de extensão 72°C por 10 min (adaptado de Trindade et al., 2008).

Tabela 3: Iniciadores desenhados para reação de PCR em tempo real. O tamanho dos fragmentos esperados para cada grupo de VACV-BR está demonstrado na tabela. **Fonte: Trindade et al., 2008.**

	Pares de iniciadores desenhados para reação de PCR em tempo real para o gene <i>ha</i>	Tamanho do fragmento amplificado	
		Grupo 1	Grupo 2
PCR 1	HA-genérico F - CATCATCTGGAA TTGTCACACTAAA HA-genérico R - ACGGCCGACAATATAATTAATGC	166 pb	184 pb
PCR 2	HA-BVV F - ACCGATGATGCGGATCTTTA HA-genérico R - ACGGCCGACAATATA ATTAATGC	134 pb	152 pb
PCR 3	HA BVV-nDEL F- GCGGATCTTTATGATACGTACAATG HA-genérico R- ACGGCCGACAATATAATTAATGC	0 pb	143 pb

A fim de confirmar os resultados obtidos, utilizando o conjunto de iniciadores para o gene *ha* descritos por Trindade et al.;, 2008, algumas amostras foram adicionalmente submetidas a uma PCR convencional para amplificação da ORF completa deste mesmo gene. A amplificação deste fragmento foi feita utilizando os iniciadores EACP1 (ATGACACGATTGCCAATAC) e EACP2 (CTAGACTTTGTTTTCTG) (Roop et al, 1995) sob as seguintes condições: em um volume final de 20 µL em solução tampão (tris 0,1M pH8.3 + KCl 0,5M + 0,1% de Triton x100) foi acrescentado 2,0 mM de MgCl₂, 10 mM de cada dNTP, 4 mM de cada iniciador, 2 U de Taq polimerase. As condições térmicas para a reação foram: um ciclo inicial a 95 °C por 10 minutos, seguido de 30 ciclos de 95 °C por 1 min, 55°C por 1 min e 72°C por 2 min e temperatura final de extensão 72°C por 10 min. Os fragmentos de DNA amplificados (927pb) foram fracionados em gel de agarose 1% (Roop et al, 1995), e encaminhados para sequenciamento (**item 4.15**)

4.12.3 PCR para o gene *ati*

Visando avançar na caracterização das amostras de VACV, uma PCR do tipo semi-*Nested* foi utilizada para a amplificação do gene A26L (*ati*). Este gene apresenta um grande polimorfismo entre as amostras brasileiras de VACV e por isto representa um alvo para diferenciação e agrupamento molecular das mesmas. Esta reação foi designada para a detecção de amostras que apresentam a região *downstream* deste gene íntegra, como as amostras GP2V, PSTV, ARAV, dentre outras. Os iniciadores desenhados para realização da triagem molecular das amostras de VACV estão contidos na **Tabela 4**. Representação da localização dos iniciadores desenhados para a PCR semi-*Nested* para o gene *ati* esta contida na **Figura 13**.

Tabela 4: Iniciadores desenhados para reação de PCR do tipo semi-Nested para o gene *ati*

	Pares de iniciadores desenhados para reação de PCR para o gene <i>ati</i>	Tamanho do fragmento amplificado	
		Grupo 1	Grupo 2
1ª Reação	ATI-IF/1 - 5'ACCACGTCTACACTCGGCGA3' ATI-IR/2 ' 5'TGCATCGAGAGCGGAGGAGGA'3;	787	753
2ª Reação	ATI-IF/1 - 5'ACCACGTCTACACTCGGCGA3' ATI-IR/3 - 5'CGATGCCAAGTACATCGACGA3'	166	145

Para estes iniciadores foram utilizadas as mesmas condições químicas da reação para o gene *vgf* (item 4.10.1), exceto pela ausência da BSA. As condições térmicas foram: um ciclo inicial a 95°C por 10 minutos, seguido de 30 ciclos de 95°C por 1 min, 60°C por 1 min e 72°C por 1 min e temperatura final de extensão 72°C por 10 min. Para esta reação o fragmento esperado é de 145 pb para amostras VACV-BR.

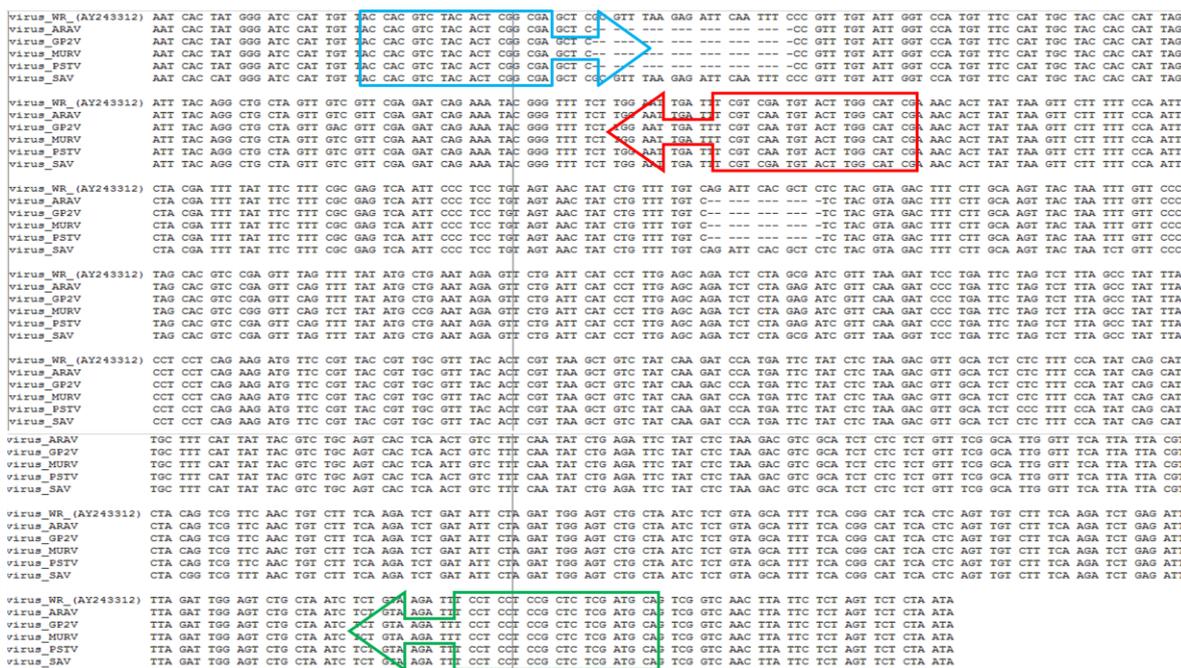


Figura 13: Representação esquemática da localização dos iniciadores desenhados para a PCR semi-Nested para o gene *ati*. (Azul) iniciador ATI-IF/1; (Vermelho) iniciador ATI-IR/2; (Verde) ATI-IR/3. Os iniciadores foram construídos baseados no alinhamento de sequências do gene *ati* de amostras de VACV-BR.

Algumas amostras positivas nesta triagem foram escolhidas para sequenciamento, onde foram utilizados os iniciadores descritos por Meyer e colaboradores (1997): ATIR-5'-CTTAACCTTTTCTTTCT-3' e ATIF-5'-AATACAAGGAGGATCT-3', e que amplificam fragmentos de tamanhos diferentes para diferentes espécies de OPV.

Com estes iniciadores é possível avaliar polimorfismos genéticos no gene *ati*. As condições para as reações foram: em um volume final de 20 µL em solução tampão (tris 0,1M pH8.3 + KCl 0,5M + 0,1% de Triton x100) foi acrescido 15mM de cada dNTP, 2.0 mM de MgCl₂, 4 mM de cada iniciador e 2.5 U de Taq polimerase. As condições térmicas para a reação foram: um ciclo inicial à 95°C por 10 minutos, seguido de 30 ciclos de 95°C por 1 min, 48°C por 1 min e 72°C por 2 min e temperatura final de extensão 72°C por 15 min. Os fragmentos de DNA amplificados foram fracionados em gel de agarose 1% (**item 4.14**) e encaminhados para sequenciamento (**item 4.15**)

4.13 GEL DE POLIACRILAMIDA (PAGE) 8%

Para o preparo do PAGE 8% foram utilizados 3,74 mL de H₂O dd, 1,4 mL de tampão tris borato de EDTA (TBE) 5X (54g de tris base; 27,5g ácido bórico; 20 mL de EDTA 0,5 M pH 8,0; 1000 mL H₂O q.s.p), 1,86 mL de solução de poliacrilamida (29,2 g de acrilamida; 0,8 g de bisacrilamida; 100 mL de H₂O q.s.p), 7µL de TEMED (catalizador) e 100µL de APS (polimerizador). O PAGE foi polimerizado em aparato Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio Rad – cod: 165-8000) com espessura de 0.75mm, e transferido para cuba de eletroforese contendo tampão TBE 5X. Foram aplicados 10µL da amostra acrescida de 3µL de tampão de corrida 6X [10 mM Tris-HCl (pH 7.6); 0.03% azul de bromofenol; 0.03% cianol xileno; 60% glicerol; 60 mM EDTA – Fermentas Life Sciences] e submetido à eletroforese a 100 Volts.

4.14 COLORAÇÃO COM PRATA

Após fracionamento por eletroforese, os géis de poliacrilamida foram corados com prata para visualização de bandas de DNA. Desta forma, os géis foram retirados dos aparatos de eletroforese e transferidos para um recipiente contendo solução fixadora 1 (metanol 40%; ac. acético 10%), onde foram mantidos por 30 minutos. Em seguida, a solução fixadora 1 foi descartada. Os géis foram então submersos em solução fixadora 2 (etanol 10%; ac. acético 5%), por 15 minutos. Foi então adicionada uma solução oxidante (dicromato de potássio 0,0034 M; ácido nítrico 0,0032 M; H₂O dd q.s.p) por 5 minutos. Os géis foram submetidos a três banhos de H₂O dd por 5 minutos e então submersos em uma solução de prata (0,2g de nitrato

de prata; 100 mL de H₂O dd) por 20 minutos; após este período, o excesso de prata foi retirado dos géis por um banho com H₂O dd por 1 minuto. Por fim, os géis foram submersos em uma solução reveladora (5,9g de carbonato de sódio; 0,1g de paraformaldeído; 200 mL de H₂O dd) até aparecimento das bandas. Para interromper a atividade da solução reveladora, cerca de 200 mL de solução de parada (mistura da fixadora 1 e 2) foram adicionados aos géis. Os géis foram fixados em lâmina de vidro com papel celofane para fins de análise e registro dos mesmos.

4.15 GEL DE AGAROSE 1%

Para seqüenciamento, foram gerados produtos de PCR contendo fragmentos dos genes *ha* (960pb) e *ati* (1606pb) (itens 4.11.2 e 4.11.3, respectivamente). Estes fragmentos foram fracionados em gel de agarose 1%. Para o preparo do gel foi adicionado 1,0 mg de agarose em 100ml de tampão tris acetato de EDTA (TAE 1X); dissolvido sob aquecimento em microondas e distribuído em aparato apropriado. Após solidificação do gel, as amostras foram aplicadas nas canaletas e submetidas à eletroforese a 100 Volts. As amostras foram acrescidas de 1,0 ul de Sybr Green (nas concentrações indicadas pelo fabricante) para visualização das bandas utilizando luz ultravioleta, e 3,0ul tampão de corrida 6X [10 mM Tris-HCl (pH 7.6); 0.03% azul de bromofenol; 0.03% cianol xileno; 60% glicerol; 60 mM EDTA (Fermentas Life Sciences)], para acompanhamento da corrida. As bandas de interesse foram excisadas com o auxílio de um bisturi e o fragmento foi recuperado do gel utilizando o Kit Gel Extraction (Qiagen, Alemanha) seguindo as recomendações do fabricante.

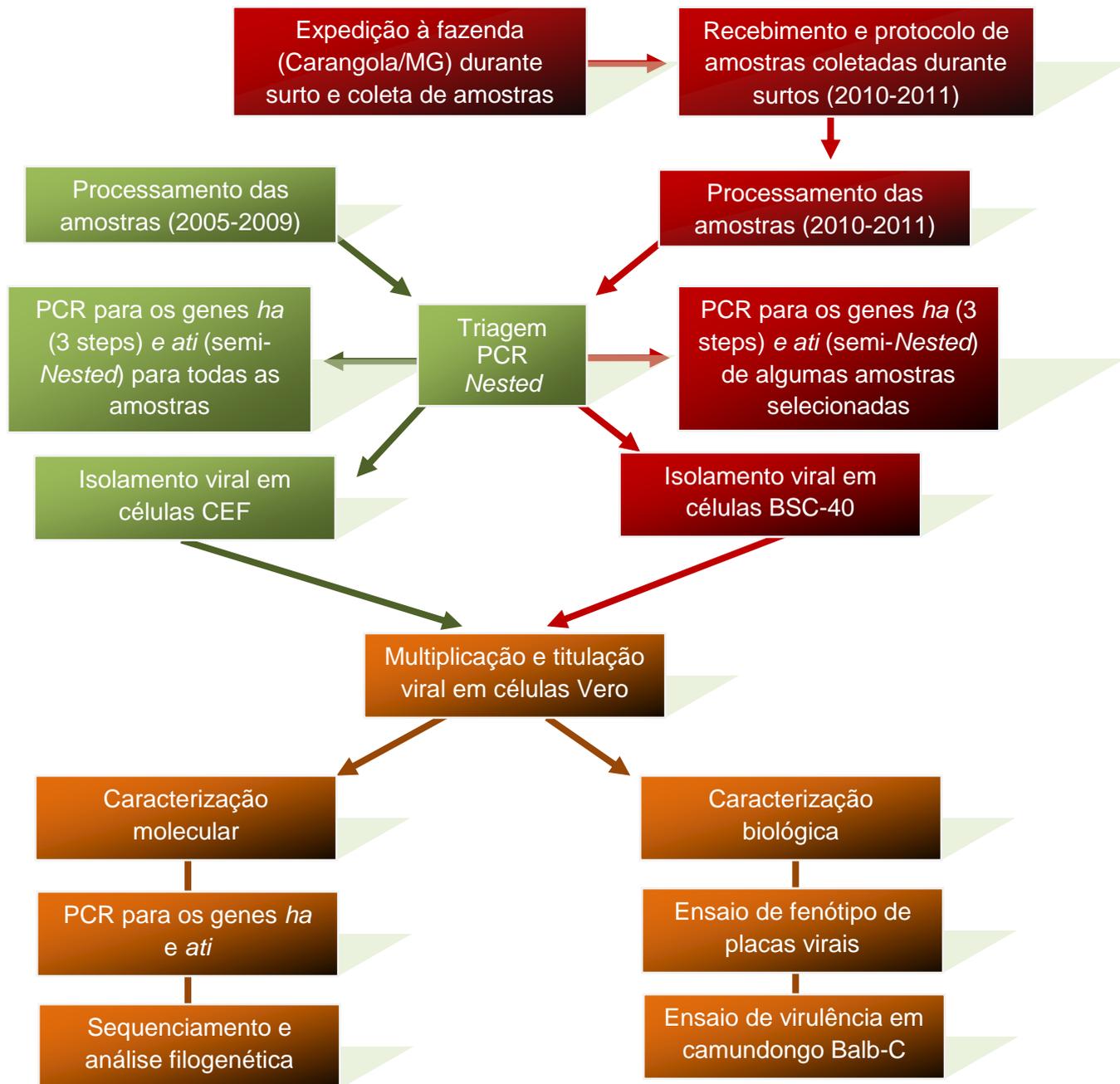
4.16 SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE FILOGENÉTICA

O sequenciamento foi feito pelo método de dideoxi descrito por SANGER e colaboradores (1977) em sequenciador automático capilar Mega Bace1000 (Amersham/Pharmacia, Suécia), utilizando o “Kit Dy Enamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for *Megabace*” e obedecendo as condições de reação e leitura indicadas pelo fabricante. Para cada fragmento foram feitas seis reações de sequenciamento, três com cada um dos iniciadores. As seqüências obtidas foram

sobrepostas e o consenso foi obtido utilizando a plataforma Asparagin-Cenargen (EMBRAPA, 2010).

As sequências obtidas foram comparadas com as depositadas no banco de dados do “National Center for Biotechnology Information” através do programa BLAST 2.0 (<http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST>.- Basic Local Aligment Tool). As sequências nucleotídicas foram analisadas pelo programa BLAST N e as de aminoácidos foram analisadas pelo programa BLAST X. As sequências de nucleotídeos e de aminoácidos foram analisadas e utilizadas para a construção de árvores filogenéticas utilizando o método de *Neighbor-joining* implementado no programa MEGA4. O modelo de substituição de nucleotídeos utilizado na construção das árvores foi Tamura Nei 3 parâmetros. Para a construção das árvores, múltiplos eventos INDEL foram considerados como um único evento. A análise de bootstrap foi feita com 1000 replicatas (Leite et al, 2007).

5. FLUXOGRAMA DE TRABALHO



6. RESULTADOS

6.1 TRIAGEM DAS AMOSTRAS

A triagem das amostras foi feita utilizando a PCR-*Nested* para o gene *vgf*, bastante conservado dentre os vírus do gênero *Orthopoxvirus*. Das 142 amostras clínicas datadas de 2005 à 2009, pertencentes ao banco de amostras do Laboratório de Vírus, 58 amostras (41%) foram positivas, sendo 13 (22,4%) provenientes de humanos, 25 (43,1%) provenientes de bovinos e 20 (34,4%) amostras não tiveram seu município ou espécie de origem precisamente determinado, pois seus registros não foram localizados. Todavia, estas amostras foram coletadas em surtos ocorridos nos Estados de Minas Gerais e Espírito Santo, no período mencionado. Estas amostras, de origem indeterminada, foram incluídas no trabalho a fim de se avaliar a diversidade genética entre diferentes amostras de VACV-BR. A **Figura 14** mostra um gel de poliacrilamida no qual foi feita a eletroforese da PCR *Nested* para o gene *vgf* de algumas amostras clínicas, destacando o tamanho do fragmento amplificado (170pb).

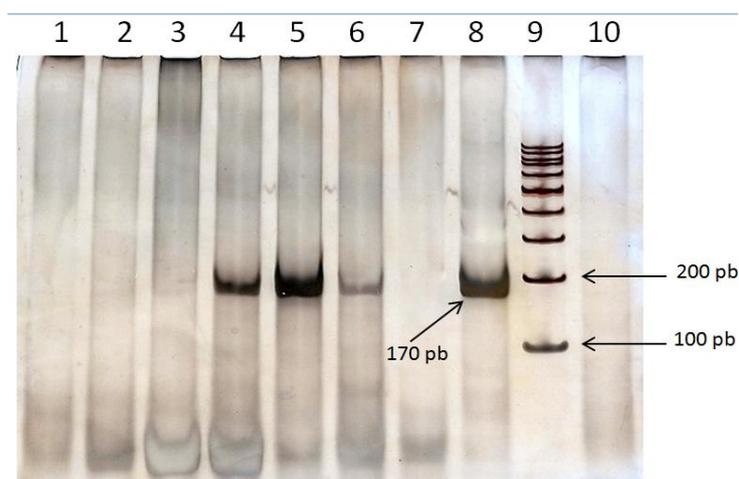


Figura 14: Detecção do gene *vgf* em amostras clínicas coletadas durante surtos de vaccínia bovina entre os anos de 2005 a 2009. Amostras de suabes e crostas foram coletadas, processadas em PBS e submetidas à PCR *Nested* para o gene *vgf* (Abrahão et al., 2009). As PCR foram fracionadas em PAGE 8% e corados pela prata. Canaleta (1): amostra bovina coletada em Minas Gerais em 2005; canaletas (2-3): amostras bovinas coletadas da cidade do Serro em 2005; canaleta (4): amostra de bovino coletada na cidade de Resplendor/MG em 2005; canaletas (5-6): amostras de bovinos coletadas na cidade do Serro em 2005; canaleta (7): amostra de bovino coletada em Minas Gerais em 2005; canaleta (8): controle positivo (VACV-WR); canaleta (9): padrão molecular; canaleta (10): controle negativo. Para essa reação são esperadas bandas de aproximadamente 170pb.

Das 260 amostras coletadas durante o período de 2010-2011, 110 amostras (42,3%) foram positivas na triagem (**tabela 5**). As amostras provenientes do estado da Bahia

representaram 58% das amostras analisadas e apresentaram uma positividade de 38,4%. Os Estados de Goiás e Minas Gerais apresentaram índices mais elevados de positividade com 58% e 41%, respectivamente. O Estado do Espírito Santo apresentou 24% de positividade, enquanto que 100% das amostras coletadas no Estado do Pará foram positivas.

Das amostras coletadas de bovinos, foi observada uma positividade de 31,6% para soros, 50% para suabes e 71,1 % para crostas. Foram coletadas amostras clínicas humanas (19 amostras) apenas nos Estados da Bahia e Minas Gerais, correspondendo a 7% das amostras coletadas. Foi possível detectar a presença de DNA viral em 100% das amostras dentre elas crostas e suabes. No entanto, não foi possível detectar DNA viral em amostras de soro humano.

Tabela 5: Triagem molecular das amostras coletadas durante o período de 2010-2011, pela PCR *Nested* para o gene *vgf*

Estado	Amostras positivo/total	Humano			Bovino		
		Soro	Suabe	Crosta	Soro	Suabe	Crosta
BA	58/151	0/4	2/2	5/5	37/114	2/3	12/23
GO	30/51	0/0	0/0	0/0	12/30	0/0	18/21
ES	8/33	0/0	0/0	0/0	6/30	0/0	2/3
MG	10/21	0/1	5/5	0/0	0/0	3/7	1/1
PA	4/4	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	4/4
Total	110/260	0/5	7/7	5/5	55/174	5/10	37/52

Amostras positivas/total das amostras, relativo à amostra clínica e sua fonte, e Estado de coleta da amostra.

Apenas amostras positivas na triagem pela PCR *Nested* para o gene *vgf* foram utilizadas em análises posteriores.

6.2 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

6.2.1 Análise do gene *ha*

Todas as amostras datadas de 2005-2009, positivas na triagem com o gene *vgf*, foram submetidas à PCR para o gene *ha*, descrito por Trindade e colaboradores (2008), a fim de identificar o grupo genético de VACV-BR mais prevalente nestas

amostras. Das 58 amostras positivas para *vgf*, 38 (65,5%) foram identificadas como pertencentes ao VACV-BR grupo 1, pois apresentaram amplificação nas reações 1 e 2 (**Figura 15**). Este resultado indica que estas amostras apresentam a deleção de 18 nucleotídeos no gene *ha*. As demais amostras coletadas entre 2005-2009 não apresentaram amplificação nas condições testadas, não sendo possível identificar o grupo genético dos vírus contidos nelas.

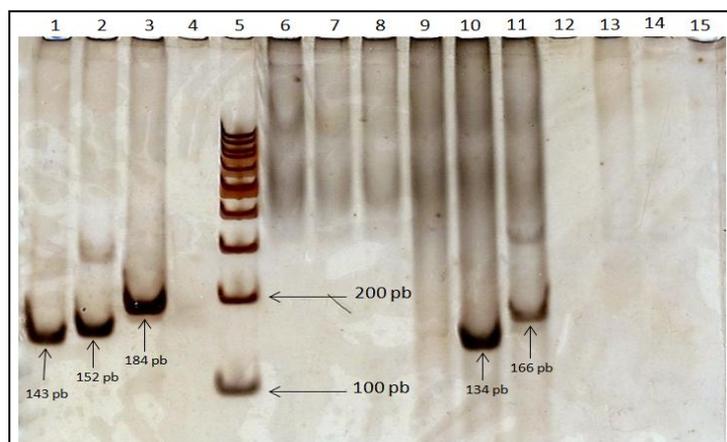


Figura 15: Detecção do gene *ha* em amostras clínicas coletadas durante surtos de vaccínia bovina entre os anos de 2005 a 2009, utilizando set de iniciadores para o gene *ha*. Amostras de crostas foram coletadas, processadas em PBS e submetidas à PCR utilizando conjunto de iniciadores descritos por Trindade e colaboradores (2008). As PCR foram fracionadas em PAGE 8%, que foi corado pela prata. Canaletas (1-3): Controle positivo (VACV-GP1V); canaleta (5): padrão molecular; canaletas (6-8): amostra bovina (Espírito Santo, 2005) negativa para o set de iniciadores para o gene *ha*; canaletas (9-11): amostra bovina coletada na cidade de Lagoa da Prata/MG em 2009; canaletas (13-15): controle negativo; Canaletas (4 e 12): vazias. Para cada amostra foi utilizado três pares de iniciadores (Tabela 3) e os tamanhos esperados dos fragmentos estão indicados na figura.

Dentre as amostras coletadas entre 2010-2011, foram testadas para esta mesma reação 07 amostras representativas de três propriedades do Estado de Minas Gerais, situadas nas cidades do Serro e Carangola; e 02 amostras de uma mesma propriedade do estado do Pará. Amostras de 02 propriedades de Minas Gerais, obtidas durante um surto no município do Serro em 2011, apresentaram o perfil genético de VACV-BR grupo 2 (**Figura 16**), enquanto que as amostras coletadas na cidade de Carangola/MG e no estado do Pará, apresentaram o perfil de VACV-BR grupo 1. Desta forma, de todas as amostras testadas, somente as amostras virais coletadas no Município do Serro em 2011 não apresentaram a deleção de 18 nucleotídeos no gene *ha*.

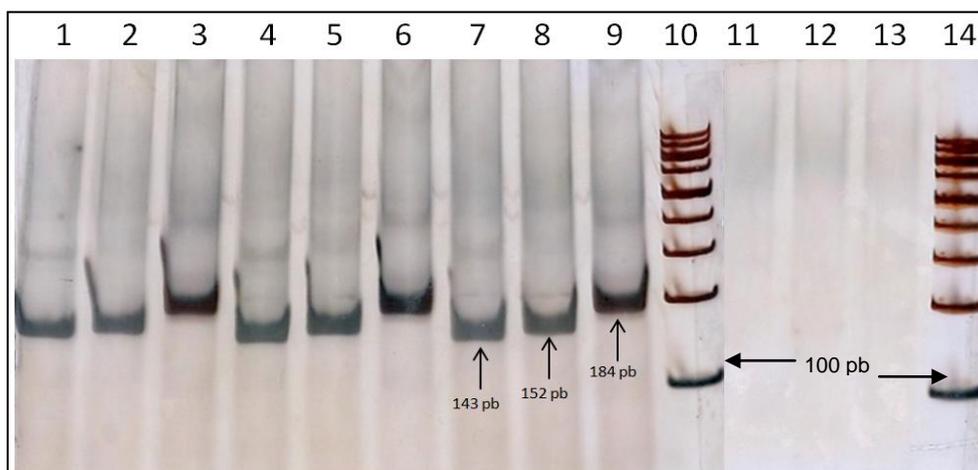


Figura 16: Detecção do gene *ha* em amostras clínicas coletadas durante surto de vaccínia bovina na cidade do Serro em 2011. Amostras de crostas foram coletadas, processadas em PBS e submetidas à PCR utilizando conjunto de iniciadores descritos por Trindade e colaboradores (2008). As PCR foram fracionadas em PAGE 8%, que foi corado pela prata. Canaletas (1-3): amostra (crosta) coletada de paciente (Serro/2011); canaletas (4-6): amostra (crosta) bovina (Serro/2011); canaletas (7-9): controle positivo (VACV-GP1V); canaletas (11-13): controle negativo; canaletas (10 e 14): padrão molecular. Para cada amostra foram utilizados três pares de iniciadores (Tabela 3) e os tamanhos esperados dos fragmentos estão indicados na figura.

6.2.2 Análise do gene *ati*

O gene *ati* vem sendo utilizado na caracterização molecular de VACV-BR devido ao grande polimorfismo entre as diferentes amostras. Com excessão da amostra SAV, os vírus do grupo 2 apresentam uma grande deleção neste gene. Todas as amostras datadas de 2005 à 2009 foram testadas para a presença do gene *ati*. Todas as 38 amostras previamente identificadas como pertencentes ao grupo 1 de VACV-BR, através da análise do gene *ha* (item 5.2.1), foram positivas para a presença do gene *ati*. Além disso, das 20 amostras não detectadas na análise do gene *ha*, 13 foram positivas para o gene *at*, ou seja, provavelmente pertencentes ao grupo 1.

Dentre as amostras coletadas entre 2010-2011, foram selecionadas algumas de cada Estado para a análise da presença do gene *ati*. Foram selecionadas amostras de 12 propriedades do Estado da Bahia (13 amostras analisadas), 04 de Goiás (6 amostras analisadas), 04 do Espírito Santo (6 amostras), 03 de Minas Gerais (7

amostras analisadas) e 01 propriedade do Estado do Pará (2 amostras analisadas). Os resultados estão representados na **Tabela 6**.

Tabela 6. Análise da presença do gene *ati*. Estão representadas na tabela amostras coletadas durante o período de 2010 e 2011

Estado	Amostras analisadas	Amostras positivas
Bahia	13	4
Goiás	6	4
Espírito Santo	6	1
Minas Gerais	7	6
Pará	2	2

As amostras coletadas no Serro, Minas Gerais, identificadas como sendo do grupo 2 de VACV-BR (item 5.2.1), apresentaram o gene *ati* íntegro na região analisada, como visto apenas nas amostras SAV e VACV-WR. Para todas as demais amostras identificadas como sendo do grupo 1 de VACV-BR, foi possível detectar a presença do gene *ati*. A **Tabela 7** sumariza as amostras em que foi possível caracterizar o perfil dos genes *ha* e *ati* de forma completa. De uma forma geral, foi possível observar que a grande maioria das amostras virais apresenta o perfil do grupo 1 considerando o gene *ha*, e apresenta o gene *ati* completo na região analisada. Todavia, algumas exceções puderam ser observadas, como as amostras 63, 64 e 65, revelando possíveis polimorfismos nestes genes.

Tabela 7: Caracterização do perfil dos genes *ha* e *ati* de amostras envolvidas em surtos de VB. Estão representadas na tabela todas as amostras coletadas no período de 2005 a 2009, positivas na triagem molecular utilizando o gene *vgf* (amostras de 1 a 58), além de amostras coletadas em 2011 selecionadas para esta caracterização.

ID da Amostra	Espécime	Espécie	Ano/Período	Município/ Estado	PCR <i>vgf</i>	PCR <i>ha</i>			PCR <i>ati</i>
						Genérico	BVV	BVnDel	
1	Crosta	Bovino	2009	Paraguaçu/MG	+	+	+	-	+
2	Crosta	Bovino	2009	Paraguaçu/MG	+	+	+	-	+
3	Crosta	Bovino	2009	Paraguaçu/MG	+	+	+	-	+

4	Crosta	Bovino	2009	Paraguaçu/MG	+	+	+	-	+
5	Crosta	Bovino	2009	Paraguaçu/MG	+	+	+	-	+
6	Suabe	Humano	2008	Argirita/MG	+	+	+	-	+
7	Suabe	Humano	2008	Argirita/MG	+	+	+	-	+
8	Suabe	Humano	2008	Argirita/MG	+	+	+	-	+
9	liquido vesicular	Humano	2008	Argirita/MG	+	+	+	-	+
10	Crosta	Bovino	2009	Lagoa da prata/MG	+	+	+	-	+
11	Suabe	Bovino	2005-2009	Espírito Santo	+	-	-	-	-
12	Suabe	Humano	2005-2009	Espírito Santo	+	+	+	-	+
13	Crosta	-	2005-2009	Espírito Santo	+	+	+	-	+
14	Crosta	-	2005-2009	Espírito Santo	+	-	-	-	+
15	Crosta	-	2005-2009	Espírito Santo	+	+	+	-	+
16	Crosta	Bovino	2005-2009	Espírito Santo	+	-	-	-	-
17	Crosta	-	2005-2009	Espírito Santo	+	-	+	-	-
18	Crosta	Bovino	2005-2009	Espírito Santo	+	-	+	-	-
19	Suabe	Humano	2005	Serro/MG	+	+	+	-	+
20	Crosta	Bovino	2005-2009	Resplendor/MG	+	+	+	-	+
21	Crosta	-	2005	Serro/MG	+	+	+	-	+
22	Crosta	-	2005-2009	Espírito Santo	+	-	+	-	+
23	Crosta	Humano	2005	Serro/MG	+	+	+	-	+
24	Crosta	Bovino	2005	Serro/MG	+	+	+	-	+
25	Crosta	Bovino	2005-2009	Resplendor/MG	+	+	+	-	+
26	Suabe	Humano	2005-2009	Espírito Santo	+	+	+	-	+
27	Suabe	-	2005-2009	Minas Gerais	+	+	+	-	+
28	Crosta	Bovino	2005-2009	Minas Gerais	+	-	+	-	+
29	Crosta	Bovino	2005-2009	Minas Gerais	+	+	+	-	+
30	Crosta	-	2005	Serro/MG	+	-	+	-	+
31	Crosta	Bovino	2005-2009	Minas Gerais	+	-	+	-	+
32	Suabe	Humano	2005	Acaiaca/MG	+	-	-	-	+
33	Suabe	-	2005-2009	Resplendor/MG	+	+	+	-	+
34	Crosta	Bovino	2005-2009	Resplendor/MG	+	+	+	-	+
35	Crosta	Bovino	2005	Serro/MG	+	-	+	-	+
36	Suabe	Bovino	2005-2009	Bambuí/MG	+	-	+	-	+
37	Suabe	Humano	2005	Acaiaca/MG	+	+	+	-	+
38	Suabe	-	2005	Espírito Santo	+	+	+	-	+

39	Crosta	-	2005-2009	Serro/MG	+	+	+	-	+
40	Crosta	-	2005-2009	Serro/MG	+	+	+	-	+
41	Crosta	Bovino	2005-2009	Resplendor/MG	+	+	+	-	+
42	Suabe	-	2005-2009	Espírito Santo	+	+	+	-	+
43	Suabe	Humano	2005	Serro/MG	+	+	+	-	+
44	Crosta	-	2005	Serro/MG	+	+	+	-	+
45	Crosta	-	2008	Espírito Santo	+	+	+	-	+
46	Crosta	Bovino	2005-2009	Minas Gerais	+	+	+	-	+
47	Suabe	-	2005	Serro/MG	+	+	+	-	+
48	Suabe	Humano	2005	Jequeri/MG	+	-	-	-	+
49	Crosta	-	2005	Serro/MG	+	+	+	-	+
50	Crosta	-	2005-2009	Minas Gerais	+	-	-	-	+
51	Crosta	Bovino	2005-2009	Resplendor/MG	+	-	-	-	-
52	Crosta	-	2005-2009	Espírito Santo	+	-	+	-	+
53	Crosta	Humano	2005	Serro/MG	+	+	+	-	+
54	Suabe	-	2005-2009	Serro/MG	+	+	+	-	+
55	Crosta	-	2005-2009	Minas Gerais	+	-	+	-	+
56	Crosta	Bovino	2005	Serro/MG	+	-	+	-	+
57	Crosta	Bovino	2005-2009	Minas Gerais	+	-	-	-	-
58	Crosta	-	2005	Serro/MG	+	+	+	-	+
59	Suabe	Humano	2011	Carangola/MG	+	+	+	-	+
60	Suabe	Humano	2011	Carangola/MG	+	+	+	-	+
61	Crosta	Bovino	2011	Pará	+	+	+	-	+
62	Crosta	Bovino	2011	Pará	+	+	+	-	+
63	Crosta	Humano	2011	Serro/MG	+	+	+	+	+
64	Crosta	Humano	2011	Serro/MG	+	+	+	+	+
65	Crosta	Bovino	2011	Serro/MG	+	+	+	+	+

6.3 ISOLAMENTO VIRAL

Para o isolamento viral das amostras datadas de 2005-2009, foram selecionadas 23 amostras dentre aquelas cujos registros foram localizados e que foram positivas na triagem por *vgf*, análise do gene *ha* e presença do gene *ati*. Das amostras testadas, 9 (39,1%) foram positivas, apresentando efeito citopático (ECP) típico de uma

infecção por VACV em monocamada de CEF após 24-48 horas de infecção. Ao todo, foram isoladas 06 amostras virais provenientes de amostras bovinas, e 03 de amostras humanas. Todas as amostras isoladas estiveram envolvidas em surtos no estado de Minas Gerais, nos municípios de Paraguaçu (2009), Argirita (2008), Lagoa da Prata (2009), Resplendor (2008) e Serro (2005). Os espécimes clínicos foram considerados negativos no isolamento somente após a terceira passagem sem que se observasse nenhum efeito da infecção viral na monocamada.

Para as amostras datadas de 2010-2011 foram utilizadas células BSC-40 para o isolamento viral. Foi possível realizar o isolamento viral de amostras provenientes de todos os estados, a exceção do estado do Espírito Santo (**Tabela 8**). No estado da Bahia, foi feito isolamento viral de amostras humanas do município Mundo Novo (2011). Em Goiás, foi possível isolar vírus de amostras bovinas coletadas em duas propriedades vizinhas envolvidas num mesmo surto, no município de Vila Propício. Em Minas Gerais, foi feito isolamento viral em uma amostra humana coletadas durante surto na cidade de Carangola (2011), e de humanos e bovinos coletadas durante surto na região do Serro (2011). No estado do Pará foram isoladas duas amostras virais de amostras bovinas envolvidas em um mesmo surto (2011).

Tabela 8: Amostras de VACV isoladas de amostras coletadas entre 2010 e 2011 envolvidas em surtos de VB

Estado	n amostras	Fonte		Ano
		Humano	Bovino	
Bahia	2	2	0	2011
Goiás	4	0	4	2011
Espírito Santo	0	0	0	2011
Minas Gerais	4	3	1	2011
Pará	2	0	2	2011

Não foi possível isolar vírus de amostras coletadas no estado do Espírito Santo. n = número de amostras virais isoladas.

Para todas as amostras virais isoladas, foi realizada a purificação de placas virais. No total, 26 clones foram obtidos e cada clone foi multiplicado em monocamada de

células VERO, aliquotados e armazenados em freezer -80°C para os estudos posteriores.

6.4 SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE FILOGENÉTICA

Dentre as amostras analisadas, foram selecionadas 11 amostras para sequenciamento e análise filogenética (**Tabela 9**). Estas amostras foram submetidas à extração do DNA (Sambrook et al., 1989), seguida por PCR para os genes *ha* (Roop et al, 1995) e *ati* (Meyer et al, 1997). Foram selecionadas duas amostras, dentre aquelas datadas de 2005 à 2009, para sequenciamento, uma proveniente do estado do Espírito Santo, denominada Espírito Santo virus 1 (ESV1) e uma do estado de Minas Gerais, denominada Serro Bovino 2005 virus (SB2005V). As sequências do vírus ESV1 foram obtidas após extração de DNA diretamente da amostra clínica, uma vez que não foi possível isolar vírus desta amostra. Para as demais amostras, foi realizada a extração do DNA do estoque semente de cada clone viral selecionado. Dentre as amostras datadas de 2010-2011, foram selecionadas amostras representativas de cada estado (**Tabela 9**). Foram obtidas sequências de aproximadamente 750pb e 1570pb dos genes *ha* e *ati*, respectivamente.

Tabela 9: Amostras selecionadas para sequenciamento parcial dos genes *ha* e *ati*.

Nome da Amostra	ID da Amostra	Genes	Estado/UF	Fonte
Espirito Santo virus 1	ESV1	<i>ha</i> e <i>ati</i>	ES	Bovino
Serro Bovino 2005 virus	SB2005V	<i>ha</i> e <i>ati</i>	MG	Bovino
Mundo Novo virus	MUNV	<i>ha</i> e <i>ati</i>	BA	Humano
Goias virus 1	GOV1	<i>ha</i> e <i>ati</i>	GO	Bovino
Baixo Guandu 1 virus	BGV1	<i>ha</i> e <i>ati</i>	ES	Bovino
Carangola virus	CARV	<i>ha</i> e <i>ati</i>	MG	Humano
Serro humano 1 virus	SH1V	<i>ha</i>	MG	Humano
Serro humano 2 virus	SH2V	<i>ha</i> e <i>ati</i>	MG	Humano
Serro Bovino 1 virus	SB1V	<i>ha</i>	MG	Bovino
Para virus 1	PARV1	<i>ha</i>	PA	Bovino
Para virus 2	PARV 2	<i>ha</i> e <i>ati</i>	PA	Bovino

As amostras **ESV1** e **SB2005V** são amostras obtidas de espécimes clínicos coletados em 2005.

As demais amostras foram coletadas em 2011.

6.4.1 Análise do gene *ha*

A análise das sequências obtidas para o gene *ha*, revelou uma grande similaridade entre as amostras ESV1, SB2005V, MUNV, GOV1, BGV1, CARV, PARV1 e PARV2 quanto às sequências nucleotídicas (nt), variando de 99,5 a 100%, e sequências de aminoácidos (aa), variando entre 99,1 a 100%. Estas amostras apresentaram grande similaridade com amostras do grupo 1 de VACV-BR, como por exemplo, GP2V, S2V, MARV e ARAV apresentando 99,2 a 99,8% de similaridade para nt e 99,1 a 100% para aa. PARV1 e PARV2 apresentaram 100% de similaridade entre si para sequências de nt e aa. BGV1, CARV e GOV1 apresentaram 100% de similaridade entre suas sequências nucleotídicas e de aminoácidos para o gene *ha* (**Figura 17**).

As amostras SH1V, SH2V e SB1V apresentaram 100% de similaridade entre elas para nt e aa, considerando o gene *ha*. Estas amostras apresentaram altos valores de similaridade de nt (99,1 à 99,8%) e aa (98,7 à 99,5%) com amostras do grupo 2 de VACV-BR, como por exemplo GP1V, BAV, SAV e VBH. Enquanto que, para as demais amostras sequenciadas, bem como para amostras do grupo 1 de VACV-BR, as amostras SH1V, SH2V e SB1V apresentaram valores inferiores de similaridade de nt (96%) e aa (93,2 à 94%) (**Figura 17**).

Amostras	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	
1GP1V(DQ206436)	ID	99,1%	100,0%	100,0%	99,1%	93,6%	93,6%	93,6%	93,2%	93,6%	93,2%	93,6%	92,7%	98,5%	99,5%	99,5%	93,2%	93,2%	93,6%	92,7%	93,6%	93,6%	94,0%	94,0%	93,2%	93,2%
2YBH(DQ206435)	99,2%	ID	99,1%	99,1%	100,0%	92,7%	92,7%	92,7%	92,3%	92,7%	92,3%	92,7%	91,9%	98,7%	98,7%	98,7%	92,3%	92,3%	92,7%	92,7%	92,7%	92,7%	93,2%	93,2%	93,2%	92,3%
3SAY(DQ222922)	100,0%	99,2%	ID	100,0%	99,1%	93,6%	93,6%	93,6%	93,2%	93,6%	93,2%	93,6%	92,7%	98,5%	99,5%	99,5%	93,2%	93,2%	93,6%	93,6%	93,6%	93,6%	94,0%	94,0%	94,0%	93,2%
4BAY(DQ206442)	99,8%	99,1%	99,8%	ID	99,1%	93,6%	93,6%	93,2%	93,6%	93,2%	93,6%	92,7%	98,5%	99,5%	99,5%	93,2%	93,2%	93,6%	93,6%	93,6%	93,6%	94,0%	94,0%	94,0%	93,2%	
5P1V(GU183768)	99,2%	100,0%	99,2%	99,1%	ID	92,7%	92,7%	92,3%	92,7%	92,3%	92,3%	92,7%	91,9%	98,7%	98,7%	98,7%	92,3%	92,3%	92,7%	92,7%	92,7%	93,2%	93,2%	93,2%	92,3%	
6PARV1	96,0%	95,3%	96,0%	95,9%	95,3%	ID	100,0%	99,5%	100,0%	99,5%	100,0%	99,1%	94,0%	94,0%	94,0%	94,0%	99,5%	99,5%	100,0%	99,1%	99,1%	99,5%	99,5%	99,5%	99,5%	
7PARV2	96,0%	95,3%	96,0%	95,9%	95,3%	100,0%	ID	100,0%	99,5%	100,0%	99,5%	100,0%	99,1%	94,0%	94,0%	94,0%	99,5%	99,5%	100,0%	99,1%	99,1%	99,5%	99,5%	99,5%	99,5%	
8GOV1	95,9%	95,1%	95,9%	95,7%	95,1%	99,8%	99,8%	ID	99,5%	100,0%	99,5%	100,0%	99,1%	94,0%	94,0%	94,0%	99,5%	99,5%	100,0%	99,1%	99,1%	99,5%	99,5%	99,5%	99,5%	
9ESV1	95,6%	94,9%	95,6%	95,4%	94,9%	99,5%	99,5%	99,7%	ID	99,5%	99,1%	99,5%	99,5%	93,6%	93,6%	93,6%	99,1%	99,1%	99,5%	99,5%	99,7%	99,1%	99,1%	99,1%	99,1%	
10BGV1	95,9%	95,1%	95,9%	95,7%	95,1%	99,8%	99,8%	100,0%	99,7%	ID	99,5%	100,0%	99,1%	94,0%	94,0%	94,0%	99,5%	99,5%	100,0%	99,1%	99,1%	99,5%	99,5%	99,5%	99,5%	
11MUV	95,7%	95,0%	95,7%	95,6%	95,0%	99,7%	99,7%	99,8%	99,5%	99,8%	ID	99,5%	98,7%	93,6%	93,6%	93,6%	99,1%	99,1%	99,5%	99,5%	99,7%	99,1%	99,1%	99,1%	99,1%	
12CARV	95,9%	95,1%	95,9%	95,7%	95,1%	99,8%	99,8%	100,0%	99,7%	100,0%	99,8%	ID	99,1%	94,0%	94,0%	94,0%	99,5%	99,5%	100,0%	99,1%	99,1%	99,5%	99,5%	99,5%	99,5%	
13SB2005V	95,6%	94,9%	95,6%	95,4%	94,9%	99,5%	99,5%	99,7%	99,7%	99,7%	99,7%	99,7%	ID	93,2%	93,2%	93,2%	98,7%	98,7%	99,1%	98,2%	98,2%	98,7%	98,7%	98,7%	98,7%	
14SHV	99,8%	99,1%	99,8%	99,7%	99,1%	96,1%	96,1%	96,0%	95,7%	96,0%	95,9%	95,0%	95,7%	ID	100,0%	100,0%	93,6%	93,6%	94,0%	93,2%	93,2%	93,6%	93,6%	93,6%	93,6%	
15SHZV	99,8%	99,1%	99,8%	99,7%	99,1%	96,1%	96,1%	96,0%	95,7%	96,0%	95,9%	95,0%	95,7%	100,0%	ID	100,0%	93,6%	93,6%	94,0%	93,2%	93,2%	93,6%	93,6%	93,6%	93,6%	
16SBTV	99,8%	99,1%	99,8%	99,7%	99,1%	96,1%	96,1%	96,0%	95,7%	96,0%	95,9%	95,0%	95,7%	100,0%	100,0%	ID	93,6%	93,6%	94,0%	93,2%	93,2%	93,6%	93,6%	93,6%	93,6%	
17P2V(GU183770)	95,9%	95,1%	95,9%	95,7%	95,1%	99,8%	99,8%	99,7%	99,4%	99,7%	99,5%	99,7%	99,4%	96,0%	96,0%	96,0%	ID	100,0%	99,5%	99,5%	99,5%	99,1%	99,1%	99,1%	100,0%	
18MURV(DQ247770)	95,7%	95,0%	95,7%	95,6%	95,0%	99,7%	99,7%	99,5%	99,2%	99,5%	99,4%	99,5%	99,2%	95,9%	95,9%	95,9%	99,8%	ID	99,5%	99,5%	99,5%	99,1%	99,1%	99,1%	100,0%	
19TOCA(GU322369)	95,9%	95,1%	95,9%	95,0%	95,1%	99,8%	99,8%	99,7%	99,4%	99,7%	99,5%	99,7%	99,4%	96,0%	96,0%	96,0%	99,7%	99,7%	99,5%	ID	99,1%	99,1%	99,5%	99,5%	99,5%	
20TCAQ(GU322360)	96,0%	95,3%	96,0%	95,9%	95,3%	99,7%	99,7%	99,5%	99,2%	99,5%	99,4%	99,5%	99,2%	95,9%	95,9%	95,9%	99,8%	99,8%	99,7%	99,5%	ID	100,0%	99,5%	99,5%	99,5%	
21CTGV(AE29247)	96,0%	95,3%	96,0%	95,9%	95,3%	99,7%	99,7%	99,5%	99,2%	99,5%	99,4%	99,5%	99,2%	95,9%	95,9%	95,9%	99,8%	99,8%	99,7%	99,5%	100,0%	ID	99,5%	99,5%	99,5%	
22ARAV(AV523994)	96,1%	95,4%	96,1%	96,0%	95,4%	99,8%	99,8%	99,7%	99,4%	99,7%	99,5%	99,7%	99,4%	96,0%	96,0%	96,0%	99,7%	99,7%	99,5%	99,7%	99,8%	ID	100,0%	100,0%	99,1%	
23MARV(GQ226040)	96,1%	95,4%	96,1%	96,0%	95,4%	99,8%	99,8%	99,7%	99,4%	99,7%	99,5%	99,7%	99,4%	96,0%	96,0%	96,0%	99,7%	99,7%	99,5%	99,7%	99,8%	100,0%	ID	100,0%	99,1%	
24SVZ(EF063677)	96,1%	95,4%	96,1%	96,0%	95,4%	99,8%	99,8%	99,7%	99,4%	99,7%	99,5%	99,7%	99,4%	96,0%	96,0%	96,0%	99,7%	99,7%	99,5%	99,7%	99,8%	100,0%	ID	100,0%	99,1%	
25GP2V(DQ206437)	95,9%	95,1%	95,9%	95,7%	95,1%	99,8%	99,8%	99,7%	99,4%	99,7%	99,5%	99,7%	99,4%	96,0%	96,0%	96,0%	100,0%	100,0%	99,8%	99,7%	99,8%	99,7%	99,7%	99,7%	99,7%	

Figura 17: Percentual de similaridade entre amostras de VACV, baseado nas sequências nucleotídicas (valores em preto) e aminoácidos (valores em vermelho) do gene *ha*. Nas posições 6 a 16 se encontram as amostras analisadas neste trabalho.

agruparam juntamente com as amostras do grupo 2 de VACV-BR. A análise filogenética corrobora com todos os resultados moleculares até aqui apresentados.

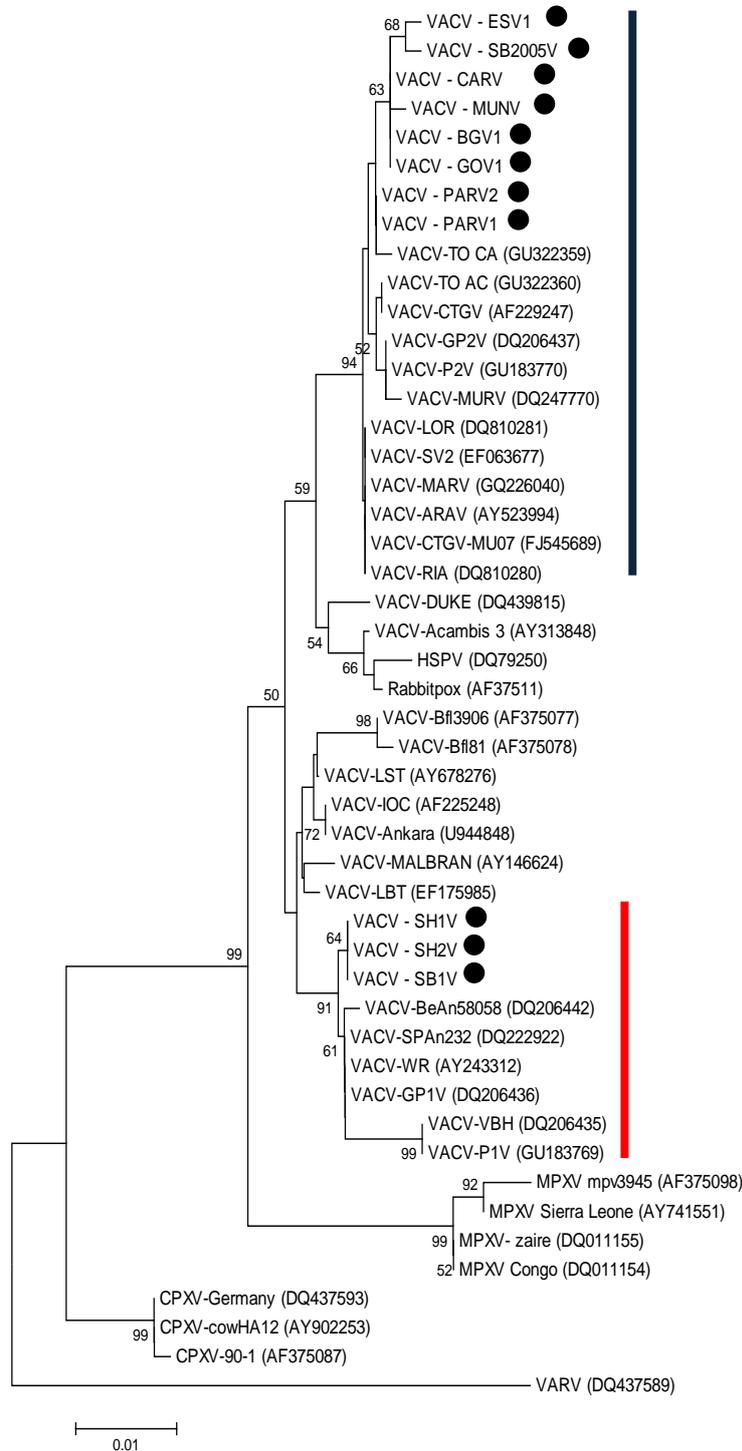


Figura 19: Árvore filogenética baseada na sequência nucleotídica do gene *ha*. As sequências obtidas no presente estudo foram alinhadas com as sequências de outros OPV disponíveis no GenBank, e utilizadas para a construção da árvore filogenética usando o método de *Neighbor-joining*, com valor de bootstrap de 1000 replicatas (MEGA 4.0). Em destaque (pontos pretos) as amostras de VACV analisadas no presente trabalho. A linha azul indica amostras de VACV-BR grupo1 e a linha vermelha indica amostras de VACV-BR grupo 2.

6.4.2 Análise do gene *ati*

Como mais uma ferramenta de análise e comparação genética entre amostras de VACV, sequências do gene *ati* de amostras estudadas neste trabalho, compreendendo aproximadamente 1570pb, foram alinhadas com sequências de outros OPV obtidas no GenBank, utilizando MEGA 4.0. A análise das sequências revelaram uma grande similaridade de nt (99,6 a 99,9) e aa ($\geq 99,3\%$) entre as amostras ESV1, SB2005V, MUNV, GOV1, BGV1, CARV e PARV2. Estas também apresentaram uma grande similaridade com amostras do grupo 1 de VACV-BR, como MURV, ARAV, PSTV e GP2V. Além disso, apresentaram valores inferiores de similaridade de nt ($\leq 96,6\%$) e aa ($\leq 95,2\%$) com as amostras SAV e WR. As amostras GP2V e ESV1 apresentaram 100% de identidade tanto para a sequências de nt quanto para aa. GP2V apresentou também grande similaridade de nt (99,9%) e aa (100%) com a amostra BG1V. A amostra SH2V apresentou baixos valores de similaridade de nt ($\leq 96,6\%$) e aa ($\leq 95,2\%$) com as demais amostras sequenciadas neste trabalho, e altos valores de similaridade com as amostras SAV (nt = 99%; aa = 98%) e WR (nt = 99,7; aa = 99,8). Não foram obtidas sequências do gene *ati* da amostra PARV1, SH1V e SB1V (**Figura 20**)

Amostras de VACV	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1 SAV (DQ516056)	ID	98,2%	98,0%	93,4%	93,2%	93,2%	93,4%	93,8%	93,6%	93,2%	92,6%	93,4%	93,4%	93,2%
2 WR (AY243312)	99,2%	ID	99,8%	94,8%	94,6%	94,6%	94,8%	95,2%	95,0%	94,6%	94,0%	94,8%	94,8%	94,6%
3 SH2V	99,0%	99,7%	ID	94,8%	94,6%	94,6%	94,8%	95,2%	95,0%	94,6%	94,0%	94,8%	94,8%	94,6%
4 MUNV	95,9%	96,5%	96,4%	ID	99,7%	99,7%	99,5%	99,5%	99,7%	99,5%	98,3%	99,1%	99,1%	99,7%
5 BG1V	95,9%	96,5%	96,4%	99,8%	ID	100,0%	99,7%	99,3%	99,5%	99,7%	98,5%	99,3%	99,3%	100,0%
6 ESV1	95,9%	96,4%	96,4%	99,9%	99,9%	ID	99,7%	99,3%	99,5%	99,7%	98,5%	99,3%	99,3%	100,0%
7 GOV1	95,9%	96,5%	96,4%	99,8%	99,8%	99,9%	ID	99,5%	99,7%	99,5%	98,3%	99,1%	99,1%	99,7%
8 CARV	96,1%	96,6%	96,6%	99,8%	99,7%	99,8%	99,8%	ID	99,7%	99,1%	97,9%	98,7%	98,7%	99,3%
9 SB2005V	95,9%	96,5%	96,4%	99,8%	99,7%	99,8%	99,8%	99,8%	ID	99,3%	98,1%	98,9%	98,9%	99,5%
10 PARV2	96,0%	96,6%	96,5%	99,8%	99,9%	99,8%	99,8%	99,6%	99,6%	ID	98,3%	99,1%	99,1%	99,7%
11 MURV (DQ516059)	95,8%	96,4%	96,3%	99,2%	99,2%	99,2%	99,2%	99,0%	99,0%	99,1%	ID	98,7%	98,7%	98,5%
12 ARAV (DQ516057)	96,1%	96,7%	96,6%	99,5%	99,5%	99,6%	99,5%	99,4%	99,4%	99,4%	99,5%	ID	99,5%	99,3%
13 PSTV (DQ516060)	96,0%	96,6%	96,5%	99,4%	99,4%	99,4%	99,4%	99,2%	99,2%	99,3%	99,4%	99,7%	ID	99,3%
14 GP2V (DQ516058)	95,9%	96,4%	96,4%	99,9%	99,9%	100,0%	99,9%	99,8%	99,8%	99,8%	99,2%	99,6%	99,4%	ID

Figura 20: Percentual de similaridade entre VACV, baseado nas sequências nucleotídicas (valores em preto) e aminoácidos (valores em vermelho) do gene *ati*. Nas posições 3 a 10 se encontram as amostras analisadas neste trabalho.

O alinhamento das sequências nucleotídicas das amostras analisadas neste trabalho e de amostras de OPV obtidas no GenBank, revelou a presença de duas deleções, de 21 e 12 pares de bases, respectivamente, compartilhada entre as amostras do grupo 1 de VACV-BR e as amostras ESV1, SB2005V, MUNV, GOV1, BGV1, CARV e PARV2 (**Figura 21**). As amostras SAV, WR e SH2V não apresentaram esta deleção.

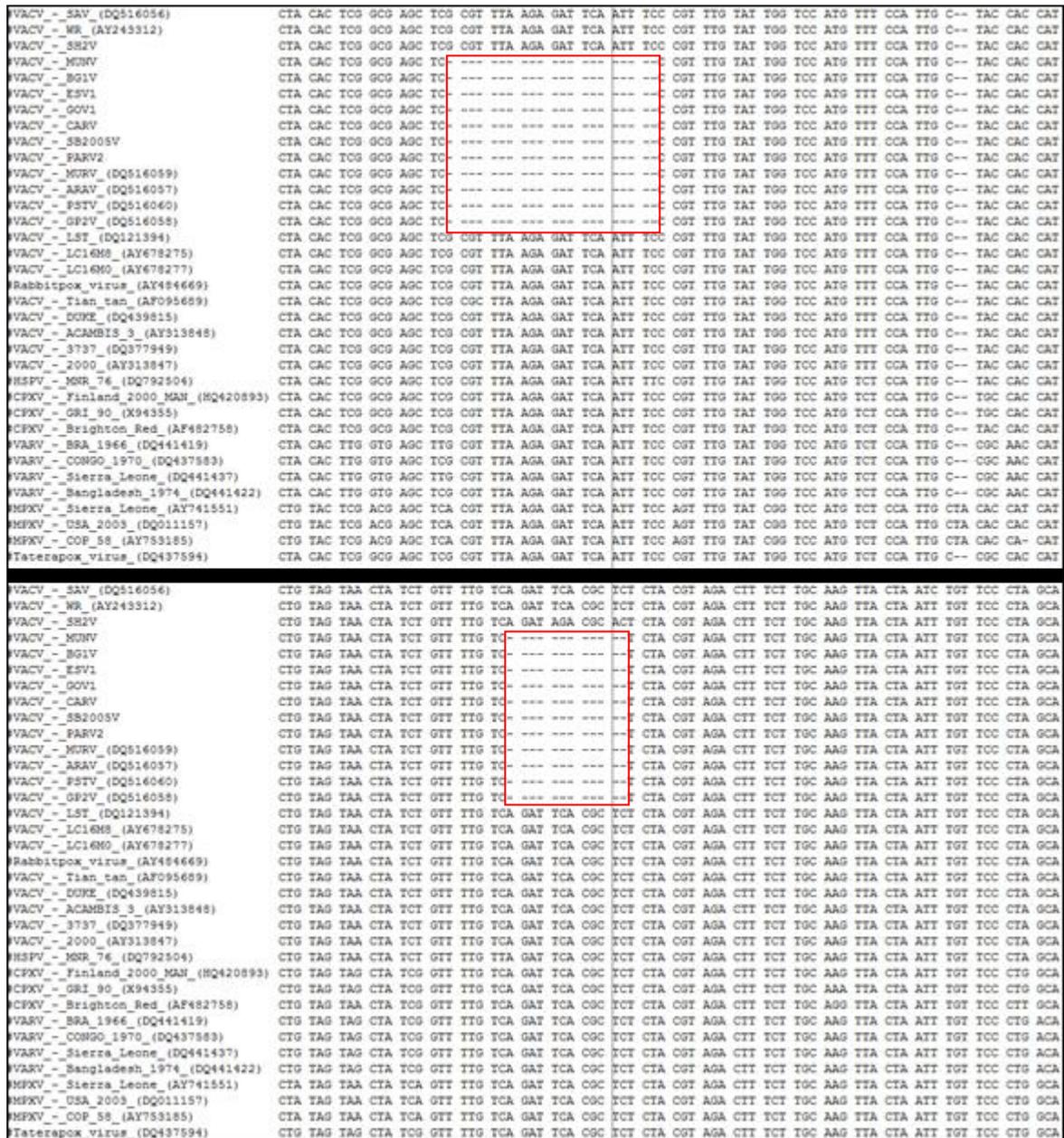


Figura 21: Sequência de nucleotídeo do gene *atí* de amostras de VACV-BR e outras amostras de VACV e OPV. Os retângulos vermelhos destacam as deleções de (A) 21 e (B) 12nt, presentes em todas as amostras de VACV-BR do grupo 1 e amostras ESV1, SB2005V, MUNV, GOV1, BGV1, CARV e PARV2. As amostras SAV, WR e SH2V não apresentam deleção na sequência analisada. A região representada corresponde ao intervalo de nucleotídeos 135669 e 135909 no genoma do VACV-WR (AY243312)

Baseada nas sequências nucleotídicas do gene *ati*, foi construída uma árvore filogenética, assim como para o gene *ha*, utilizando o método de *Neighbor-joining*, com valores de significância baseado em 1000 replicatas (**Figura 22**). As amostras ESV1, SB2005V, MUNV, GOV1, BGV1, CARV e PARV2 se agruparam juntamente com as demais amostras do grupo 1 de VACV-BR, especialmente à amostra GP2V. Enquanto que a amostra SH2V se agrupou juntamente com as amostras WR e SAV, corroborando com as análises de similaridade entre as sequências nucleotídicas e de aminoácidos.

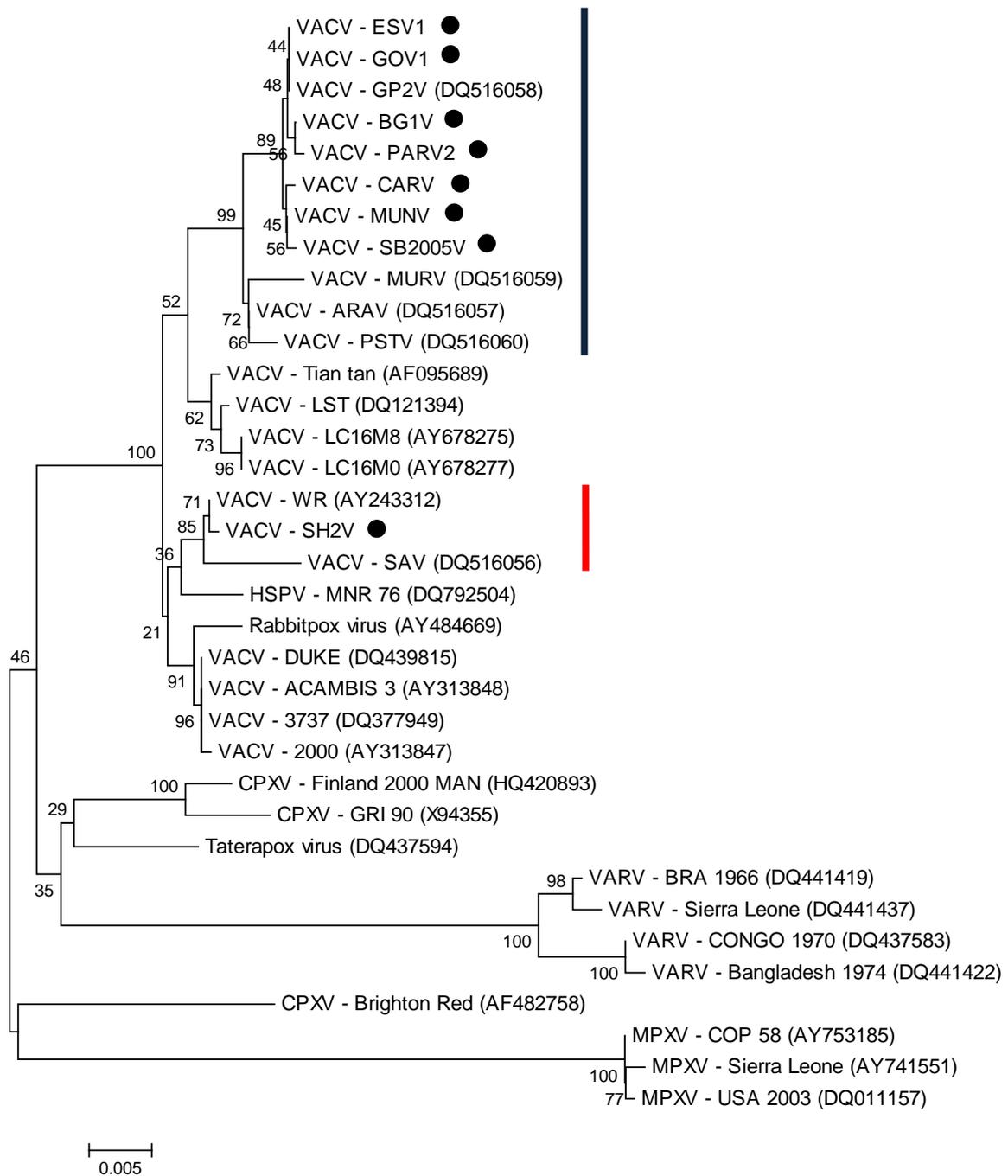


Figura 22: Árvore filogenética baseada na sequência nucleotídica do gene *ati*. As sequências obtidas no presente estudo foram alinhadas com as sequências de outros OPV disponíveis no GenBank, e utilizadas para a construção da árvore filogenética, Neighbor-joining, com valor de bootstrap de 1000 replicatas (MEGA 4.0). Em destaque (pontos pretos) as amostras de VACV analisadas no presente trabalho. A linha azul indica amostras de VACV-BR grupo 1 e a linha vermelha indica amostras de VACV-BR grupo 2.

6.5 CARACTERIZAÇÕES BIOLÓGICAS

Considerando o perfil genético atípico das amostras SH1V, SH2V, e SB1V, isoladas durante um surto na região do Serro/MG no ano de 2011, foram realizados ensaios *in vitro* e *in vivo* a fim de avaliar o fenótipo destas amostras.

6.5.1 Ensaio de fenótipo de placa

Foram inoculadas em monocamada de células BSC-40 (**item 4.10**) as amostras recém isoladas SH2V e SB1V, a amostra GP1V, como controle de VACV-BR do grupo 2, a amostra GP2V como controle de VACV-BR do grupo 1, e WR, a amostra protótipo dos OPV (**Figura 23**). Como controle negativo, a monocamada celular foi inoculada com PBS. As amostras WR, GP1V, SH2V e SB1V apresentaram placas de lise grandes e de tamanho similar entre si. Por outro lado, a amostra GP2V apresentou placas de lise de tamanho menor em relação às demais amostras. Este teste foi feito em duplicata, utilizando meio semi-sólido a fim de evitar a formação de placas satélites. Nenhuma placa de lise foi observada na monocamada inoculada com PBS (dados não mostrados).

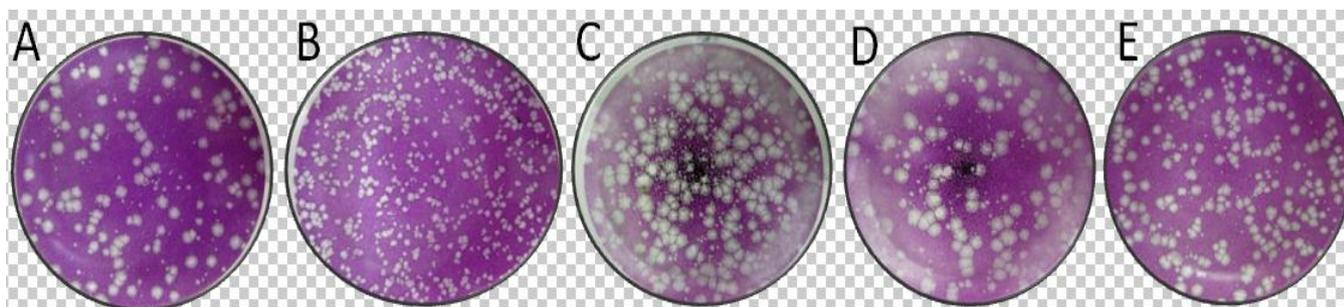


Figura 23: Ensaio de fenótipo de placa em células BSC-40. GP1V (A); GP2V (B); SH2V (C); SB1V (D) e WR (E). SH2V e SB1V (C e D) apresentaram placas de lise de tamanho grande, similar a GP1V, membro do grupo 2 de VACV-BR e à amostra VACV-WR. A amostra GP2V (B), membro do grupo 1 de VACV-BR apresentou placas de lise de tamanho menor em relação as apresentadas pelas demais amostras testadas.

6.5.2 Ensaio de virulência em camundongos Balb-C

Com o objetivo de analisar a virulência das amostras SH2V e SB1V em modelo murino, grupos de 4 camundongos Balb-C foram inoculados pela via intranasal com

10⁶ PFU/10uL das amostras mencionadas. As amostras GP1V e GP2V foram utilizadas para estudos comparativos de virulência. Grupo controle negativo foi inoculado com PBS sob as mesmas condições. Após a inoculação, os animais foram pesados diariamente, e os sinais clínicos, quando presentes, foram registrados. Os camundongos de todos os grupos foram mantidos no biotério do Departamento de Microbiologia da UFMG, em gaiolas com microisoladores, e fluxo de ar individualizado.

O grupo inoculado com PBS não apresentou nenhum sinal clínico, e os animais ganharam peso (média de 2,4 kg) gradualmente até o 12° d.p.i. (**Figura 24; Figura 25.B**). O grupo de animais inoculados com GP2V também não apresentou quaisquer sinais da infecção apresentando ganho médio de peso de 9,5% (2,14 kg) ao final dos 12 dias de observação (**Figura 24; 25.D**).

Todos os animais do grupo inoculado com GP1V apresentaram arqueamento de dorso, pilo-ereção, edema de face e das patas (**Figura 25.A**) do 4° ao 12° d.p.i. Os animais deste grupo apresentaram perda de peso do 4° ao 8° d.p.i (**Figura 24**). Contudo, ao final dos 12 dias de observação, os animais deste grupo acumularam uma perda média de 29,1% (média de 6.03 kg) do peso inicial. No 12° d.p.i um dos animais do grupo desenvolveu lesões nas patas, porém a causa destas lesões não foi determinada. Esta lesão apresentava sinais de ulceração e formação de crosta. Uma possível fonte dessa infecção seria o contato com as fezes ou maravalha contaminadas, ou até mesmo brigas entre os animais.

Os animais infectados com SH2V apresentaram arqueamento de dorso do 2° ao 12° d.p.i. Demais sinais como pilo-ereção, edema de face e patas foram observados do 4° ao 12° d.p.i (**Figura 25.C**). Os animais deste grupo apresentaram perda de peso do 4° ao 8° d.p.i, semelhante ao grupo infectado com GP1V. A perda média ao final dos 12 dias de observação foi de 27,8%. No ápice da infecção (8 d.p.i), a perda média de peso dos animais infectados com SH2V (32,9%) e GP1V (32,4%) foi bastante semelhante. Não foi observado óbito nos grupos de animais infectados com SH2V e GP1V (**Figura 24.B**).

Interessantemente, o grupo de animais infectados com SB1V apresentou mortalidade de 25% no 5º d.p.i, e de 100% no 6º d.p.i (**Figura 24.B**). Os animais chegaram a apresentar uma perda média de peso de 38,8% (**Figura 24.A**). Os animais deste grupo manifestaram os mesmos sinais clínicos descritos para os grupos GP1V e SH2V, porém mais graves (**Figura 25.E**). Estes animais desenvolveram também alopecia periocular e balanopostite, não observados nos demais grupos.

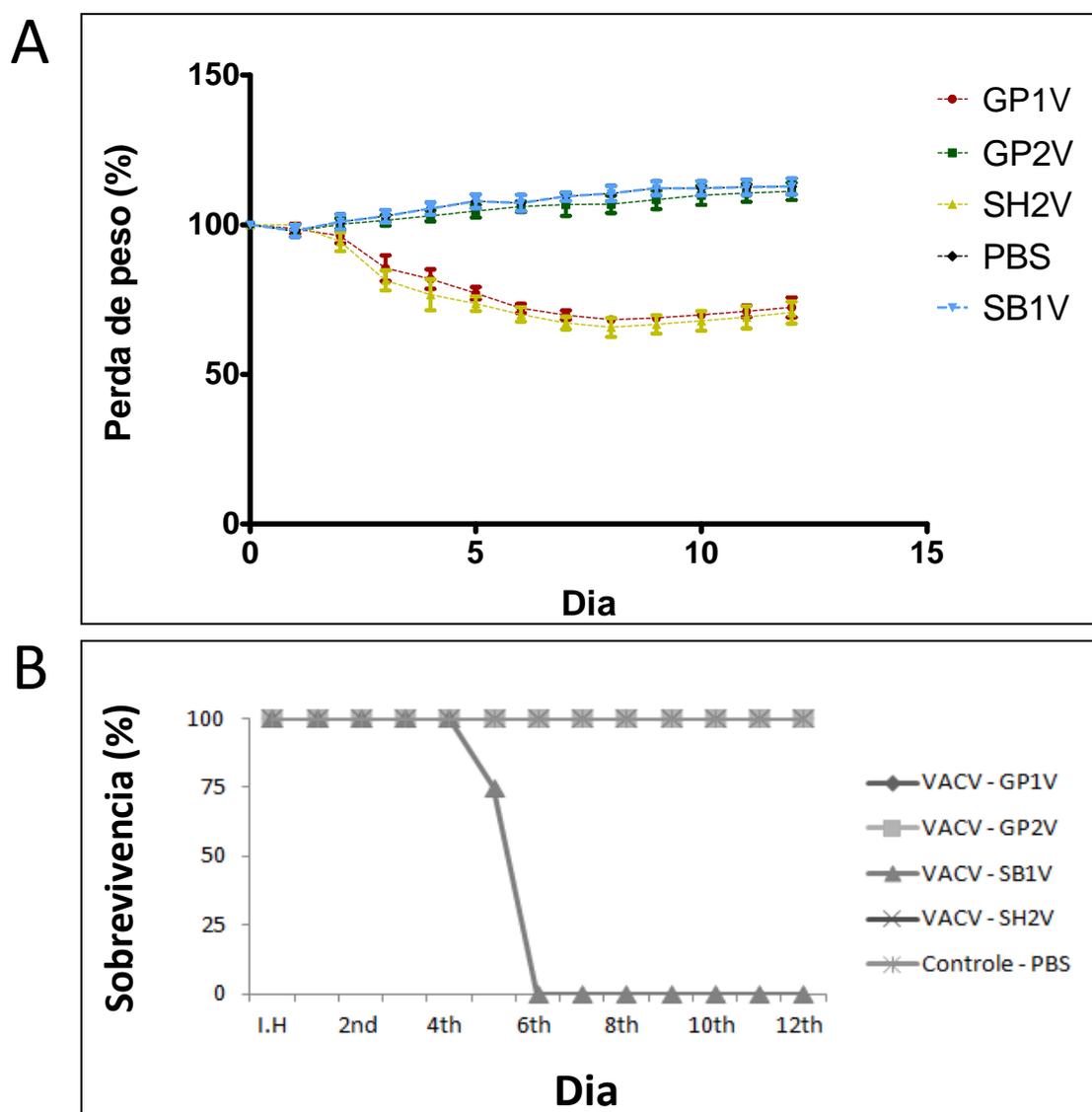


Figura 24: Variação absoluta da média diária do peso (A) e curva de sobrevivência (B) de camundongos Balb-C infectados pela via intra-nasal. Grupos de 4 camundongos foram inoculados com 10^6 PFU/10uL das amostras GP1V, GP2V, SB1V e SH2V. O peso dos animais foi monitorado por 12 dias. O grupo controle foi inoculado com PBS.

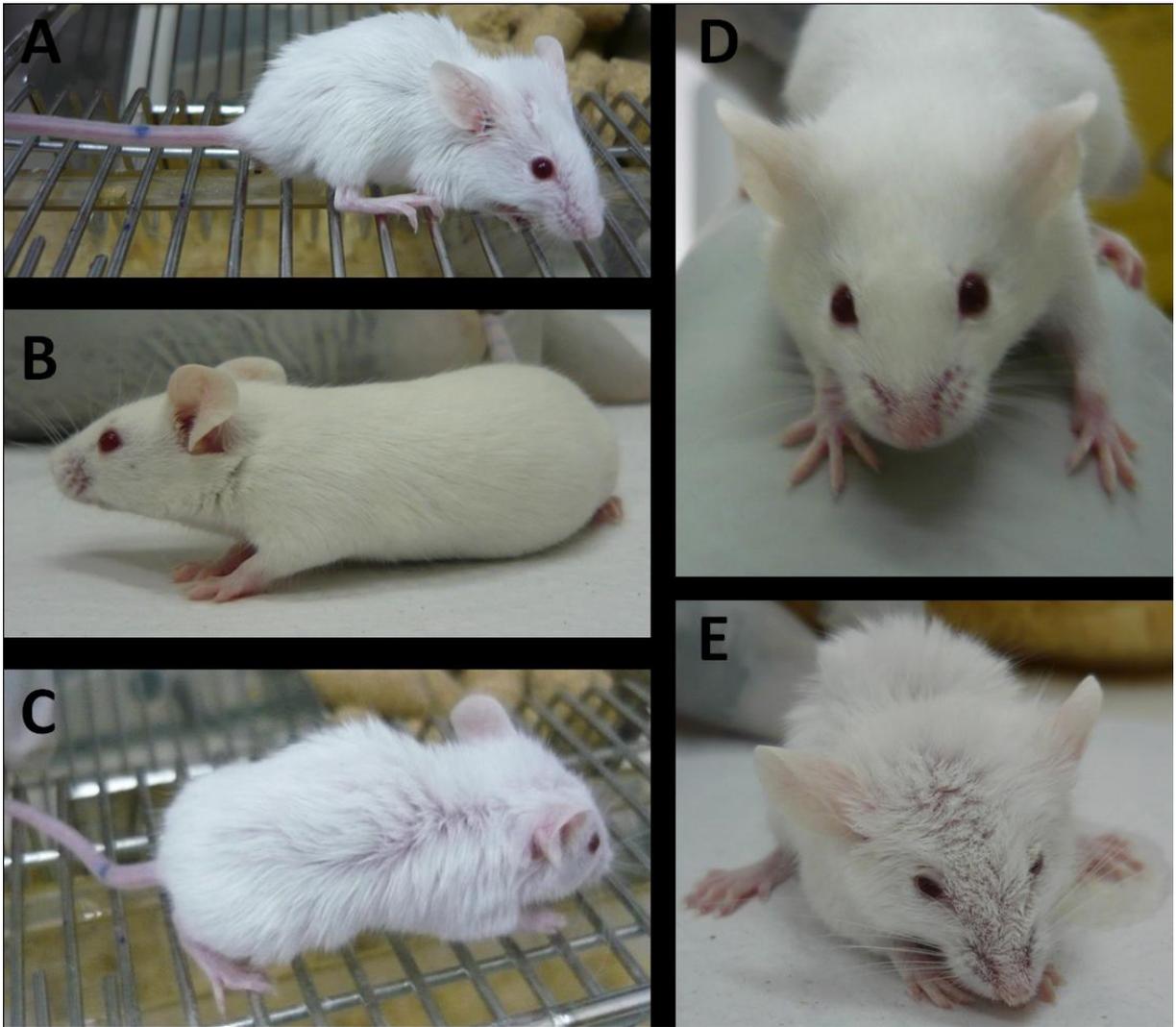


Figura 25: Sinais clínicos observados após infecção de camundongos Balb-C com amostras de VACV. (A) GP1V (B) PBS; (C) SH2V; (D) GP2V; (E) SB1V. Os sinais clínicos apresentados foram: perda de peso, pilo-ereção, arqueamento de dorso, edema de face e patas (A) (C) e (E), balanopostite e alopecia periorcular (E). Os animais foram inoculados com 10^6 PFU/10uL de cada amostra pela via intranasal.

7. DISCUSSÃO

Nos últimos 12 anos, surtos de uma doença exantemática afetando o gado leiteiro, e eventualmente o homem, em várias regiões do Brasil, vêm sendo frequentemente relatados e associados ao VACV (Fonseca et al, 1998; Damaso et al, 2000; Fonseca et al, 2002; de Sousa Trindade et al, 2003; Trindade et al, 2004; Leite et al, 2005; Trindade et al, 2006a; Trindade et al, 2006b; de Sousa Trindade et al, 2007; Medaglia et al, 2009; Trindade et al, 2009; Abrahão et al, 2009a; Fernandes et al, 2009; Campos et al, 2010). Desde então vários grupos de pesquisa vêm trabalhando na detecção e caracterização das amostras envolvidas nos surtos. Já se sabe hoje que o VACV circula em pelo menos 13 estados brasileiros compreendendo todas as 5 regiões do Brasil. Neste trabalho é mostrada a diversidade genética existente entre amostras de VACV envolvidas em diferentes surtos sem relação espacial e/ou temporal.

Durante este trabalho, foram analisados dois grupos de amostras clínicas coletadas em períodos diferentes. O primeiro grupo consistiu de amostras envolvidas em surtos de VB nos Estados de Minas Gerais e Espírito Santo durante o período de 2005 a 2009. Amostras deste grupo apresentaram uma positividade de 41% na triagem feita utilizando PCR para o gene *vgf*. O segundo grupo consistiu de amostras envolvidas em surtos ocorridos nos Estados da Bahia, Goiás, Minas Gerais, Espírito Santo e Pará durante o período de 2010 a 2011, período em que este trabalho foi desenvolvido. Amostras deste grupo apresentaram uma positividade de 42,3% na mesma triagem, semelhante à observada para o primeiro grupo de amostras. O armazenamento das amostras do primeiro grupo não pareceu influenciar a detecção viral pelo *Nested-vgf*. O método utilizado na triagem das amostras, PCR-*Nested* para o gene *vgf*, é capaz de detectar até 1 ng de DNA viral (clonado em plasmídeo pGem-T) e apresenta uma sensibilidade de 94,4% para amostras clínicas (Abrahão et al, 2009b). Novas ferramentas utilizando PCR em tempo real vêm sendo desenvolvidas com o objetivo de aumentar a sensibilidade de detecção de orthopoxvirus (Li et al, 2007; Trindade et al, 2008).

Trindade e colaboradores (2007), e posteriormente vários outros autores, identificaram o agrupamento das amostras de VACV isoladas no Brasil em dois

grupos geneticamente distintos (**Figura 9**). Desde o estabelecimento desta classificação, várias amostras de VACV isoladas durante surtos no Brasil, vêm sendo caracterizadas e classificadas dentro destes grupos. Até o presente momento, vários isolados vêm sendo estudados a fim de avaliar a re-incidência ou o surgimento de novas amostras de VACV circulantes no Brasil. Estes estudos têm demonstrado que amostras de VACV, com perfil genético semelhante às demais amostras de VACV do grupo 1, são os mais frequentemente isolados durante surtos no Brasil, afetando tanto o gado leiteiro com o homem. Até o presente momento não se tinha relato de isolamento de VACV do grupo 2 em humanos. No entanto, ainda pouco se sabe qual o impacto de uma infecção com este tipo de VACV para a saúde humana.

Neste estudo, foi mostrado que amostras de VACV do grupo 1 são de fato as mais frequentemente isoladas durante surtos de vaccínia bovina no Brasil. Dentre 64 amostras avaliadas quanto ao perfil genético, utilizando reação de PCR para o gene *ha*, capaz de discriminar amostras dos diferentes grupos de VACV (Trindade et al, 2008), 41 (64,1%) das amostras pertenciam ao grupo 1 de VACV, enquanto que apenas 3 amostras (4,6%) pertenciam ao grupo 2. As demais amostras (31,2%) não tiveram seu perfil determinado, provavelmente por se tratarem daquelas datadas de 2005 à 2009, podendo ter sofrido algum tipo de degradação; e/ou devido à sensibilidade desta reação, inferior a utilizada na triagem das amostras, uma vez que a PCR para *ha* foi designada originalmente para reações em tempo-real. Levando em conta que somente a reação genérica de *ha* foi padronizada para PCR em tempo-real nas condições do Laboratório de Vírus, optamos por realizar a reação do modo convencional. Todavia, assim que todo o set de detecção do gene *ha* estiver padronizado, será possível testar as amostras negativas, assim como comparar as sensibilidades entre o PCR em tempo real e o convencional, considerando cada uma das reações.

Amostras de diferentes grupos de VACV-BR apresentam perfis genéticos também distintos quanto ao gene viral *ati*. Amostras do grupo 1 apresentam grande polimorfismo entre si, sendo este gene frequentemente utilizado em estudos filogenéticos (Leite et al, 2007). Nas amostras de VACV-BR do grupo 2, com exceção de SAV, o gene *ati* está quase totalmente deletado. Corroborando com a

literatura, as amostras analisadas, classificadas através da análise do gene *ha* como pertencentes ao grupo 1 de VACV-BR, apresentaram o gene *ati* íntegro na região que a PCR semi-*Nested* aqui apresentada foi projetada. Outras 13 amostras, cuja classificação através da análise do gene *ha* não pode ser estabelecida, também apresentaram o gene *ati* íntegro no genoma. Interessantemente, as amostras identificadas como pertencentes ao grupo 2 de VACV-BR também apresentaram o gene *ati* íntegro. O perfil contendo os genes *ha* e *ati* sem deleções é observado apenas nas amostras SAV e WR. Este é o primeiro relato de amostras com este perfil isoladas durante um surto de VB.

Esta PCR do tipo “semi-*Nested*” para o gene *ati* (**item 4.12.3**), foi projetada durante este estudo, e designada como mais uma ferramenta de detecção e identificação preliminares de amostras de VACV-BR. As condições da reação foram as mesmas utilizadas para a reação de PCR-*Nested* para o gene *vgf*, modificando apenas as temperaturas de pareamento dos iniciadores. Contudo, esta reação necessita ser padronizada de forma sistemática, a fim de se determinar sua sensibilidade e especificidade.

Diferentemente da detecção por métodos moleculares, o isolamento viral é sensivelmente prejudicado pela manipulação e armazenamento inadequados das amostras clínicas, que devem ser feitas em gelo e freezer -70°C, respectivamente. As amostras do primeiro grupo (2005-2009) foram armazenadas em freezer -20°C desde a data de sua coleta e processamento até o presente estudo. Mesmo assim, de 21 amostras deste grupo selecionadas para o isolamento viral, foi possível isolar vírus de nove (42,8%) amostras. Para o isolamento viral destas amostras foram utilizadas células CEF. Os demais isolamentos foram feitos utilizando células BSC-40 devido à indisponibilidade de ovos embrionados para preparação de células CEF. Destes isolados, 15 clones virais foram obtidos e mantidos em freezer -70°C para estudos posteriores.

Do grupo de amostras datadas de 2010 à 2011 foram selecionadas 18 amostras para isolamento viral sendo duas da Bahia, quatro de Goiás, três do Espírito Santo, sete de Minas Gerais e duas do Estado do Pará. Destas, 12 amostras (66,6%) foram positivas, superior ao valor observado para as amostras mais antigas analisadas

neste trabalho. O tempo de coleta e o armazenamento certamente contribuíram para o maior sucesso no isolamento viral a partir das amostras mais recentes. Não foi possível isolar vírus das três amostras do Estado do Espírito Santo selecionadas para o isolamento, provavelmente devido à baixa carga viral. Não foi possível isolar vírus de espécimes clínicos como soro e urina (provenientes do Estado de Minas Gerais). Todos os vírus isolados neste trabalho foram obtidos a partir de crostas ou suabe de lesão (humanas e/ou bovinas). Até o presente momento, não existem relatos de isolamento viral a partir de amostras de soro ou urina de humanos ou bovinos, mesmo sendo possível a detecção viral por PCR (dados não publicados).

Para seqüenciamento e análise filogenética foram escolhidas duas amostras datadas de 2005 à 2009, sendo uma de origem bovina, coletada durante surto ocorrido em 2005 na região do Serro/MG e uma de origem humana, coletada durante surto ocorrido em 2005 no Estado do Espírito Santo. Deste último não foi possível isolar vírus, sendo utilizado para seqüenciamento o DNA viral extraído diretamente da amostra clínica, assim como foi feito para a amostra BG1V, também proveniente do Estado do Espírito Santo. O sequenciamento de amostras de VACV é uma ferramenta muito importante para estudos moleculares, mesmo quando não é possível realizar o isolamento viral. Abrahão e colaboradores (2010), caracterizaram molecularmente amostras de VACV detectadas em espécimes de primatas da floresta amazônica, sem realização de isolamento viral. Para as demais amostras analisadas no presente estudo foi utilizado DNA extraído de vírus isolado para seqüenciamento dos genes *ha* e *ati*. Não foi possível seqüenciar todos os clones obtidos. Estes permanecerão preservados em uma coleção para estudos posteriores.

Em estudos anteriores já foi demonstrado que diferentes populações de VACV podem co-circular durante um mesmo surto (Trindade et al, 2006) e até mesmo em um mesmo hospedeiro (Campos et al, 2010). Tais evidências reforçam a importância de se caracterizar diferentes clones virais isolados durante um mesmo surto e também de uma mesma amostra. Durante este trabalho foram isolados vários clones, porém apenas um clone de cada amostra foi analisado devido ao curto período de execução do trabalho. Contudo, os demais clones permanecerão armazenados em freezer -70°C para estudos futuros.

Foram obtidas 11 sequências nucleotídicas para o gene *ha* (**tabela 8**). As análises filogenéticas demonstraram que as amostras ESV1, SB2005V, MUNV, GOV1, BGV1, CARV, PARV1 e PARV2 se agruparam com as demais amostras do grupo 1 de VACV-BR, enquanto que as amostras SH1V, SH2V, SB1V se agruparam com amostras do grupo 2. As amostras PARV1 e PARV2 apresentaram 100% de similaridade de nt e aa entre si, sendo visualizadas lado a lado na árvore filogenética (**Figura 19**), sugerindo tratar-se de um mesmo isolado. Esta proximidade é esperada entre amostras envolvidas em um mesmo surto, apesar da possibilidade de co-circulação de mais de um tipo genético. A amostra BG1V, CARV e GOV1 apresentaram 100% de similaridade de nt e aa para o gene *ha*, no entanto esta perfeita identidade não foi observada para o gene *ati*. ESV1 se agrupou próximo à SB2005V, amostras temporalmente relacionadas, apresentando homologia de 99,7% para sequência de nt. A amostra SB2005V, proveniente da região do Serro/MG, apresentou homologia de 99,4% com a amostra Serro 2 virus (S2V), amostras temporal e espacialmente relacionadas, revelando uma grande diversidade de vírus circulantes nesta região. Outro resultado que reforça essa afirmação é o agrupamento das amostras SH1V, SH2V e SB1V com as demais amostras do grupo 2 de VACV-BR. Estas amostras foram recentemente isoladas na mesma região onde foram detectadas as amostras S2V e SB2005V. Estes resultados corroboram com estudos prévios (Trindade et al, 2006) e indicam mais uma vez que diferentes amostras de VACV circulam em Minas Gerais. Todavia, o motivo pelo qual amostras de VACV do grupo 1 são mais isolados que amostras do grupo 2 ainda é alvo de investigação. Uma possível explicação para este fato seria que amostras do grupo 1 circulariam de forma silenciosa entre roedores, pois são menos virulentas, permitindo que o vírus seja eliminado pelas fezes destes animais de forma contínua e por um período prolongado na natureza (Ferreira et al., 2008).

O primeiro isolamento de VACV no Brasil ocorreu em 1963 no Estado do Pará (Lopes et al, 1965). A amostra circulante, isolada de um roedor silvestre, foi denominada BeAn 58058 (BAV). Após 48 anos uma nova amostra de VACV, isolada durante surto de VB, apresentando um perfil genético diferente de BAV, foi isolada no Estado do Pará e denominada PARV (PARV1 e PARV2). Não se sabe quando nem como esta amostra foi introduzida nesta região. Estes dois isolados

demonstram a potencialidade de co-circulação de diferentes amostras de VACV em uma mesma região, mas os impactos para a saúde humana e animal ainda são desconhecidos.

A análise das oito sequências obtidas para o gene *ati* (**Tabela 8**) novamente demonstra o agrupamento das amostras ESV1, SB2005V, MUNV, GOV1, BGV1, CARV, e PARV2 juntamente com amostras de VACV-BR do grupo 1 (**Figura 20**). Todas as amostras analisadas apresentaram similaridade de nt acima de 99,8% com a amostra GP2V, sendo observada 100% de similaridade entre GP2V e ESV1. Devido ao grande polimorfismo observado nas sequências do gene *ati* entre diferentes isolados de VACV, foram observados valores de similaridade de nt e aa inferiores aos observados para o gene *ha*, sendo esta uma ferramenta importante para o estudo filogenético de amostras de VACV-BR.

Após análise do gene *ati*, foi observada uma sub-divisão entre as amostras do grupo 2 de VACV-BR. Amostras como SAV e WR apresentam o gene *ati* mais íntegro, enquanto outras amostras apresentam uma deleção quase total deste gene, como por exemplo VBH, GP1V e BAV. As amostras isoladas durante surto na região do Serro/MG em 2011 apresentaram o mesmo perfil de SAV e WR. Assim, foram selecionadas as amostras SH2V e SB1V para ensaio de fenótipo de placa em monocamada celular e ensaio de virulência em camundongo. Amostras do grupo 2 de VACV-BR geralmente provocam grandes placas de lise em monocamada celular quando comparadas às provocadas por VACV-BR do grupo 1. As amostras analisadas neste trabalho também formaram grandes placas de lise em monocamada de células BSC-40. Esta característica pode ser associada à virulência em modelo murino, uma vez que o tamanho da placa de lise em monocamada celular está relacionado a capacidade de disseminação viral. E tal associação foi comprovada em teste feito em camundongos. O isolado SH2V apresentou o mesmo perfil de virulência da amostra GP1V, o que reforça a sua classificação dentro do grupo 2 de VACV-BR. Interessantemente, a amostra SB1V se mostrou mais virulenta que as demais analisadas, com uma taxa de mortalidade de 100% nas condições testadas. Este resultado necessita ser confirmado para garantir a exatidão dos dados aqui apresentados. Caso seja confirmado, outros genes de virulência e imunomodulação devem ser analisados com o intuito de explicar tal variação nos

perfis de virulência de SH2V e SB1V. O presente estudo apresentou resultados divergentes aos dados apresentados por Ferreira e colaboradores (2008), considerando a mortalidade associada a amostra GP1V. Entretanto, considerando a morbidade associada à inoculação intranasal de GP1V, observamos sinais clínicos muito similares aos descrito por Ferreira e colaboradores (2008), incluindo perda de peso, pilo-ereção e arqueamento de dorso.

O estudo do polimorfismo entre as diferentes amostras de VACV isoladas abre as portas para estudos envolvendo a genética evolutiva destes isolados, a patogênese e até mesmo métodos de controle antivirais. O VACV encontra-se amplamente distribuído em todo país, e cada vez mais, diferentes variáveis vêm sendo inseridas nesta equação. Uma vigilância epidemiológica mais ativa se faz importante, porém não mais que os estudos que visam revelar a real diversidade deste vírus. Com essas medidas supracitadas, poderemos avançar na descoberta da (s) origem (s) do VACV no Brasil, e o motivo pelo qual este vírus se tornou endêmico no nosso país.

8. CONCLUSÕES

- 1- Diferentes amostras de VACV circulam no país: baseado nos genes *ha* e *ati*, foi possível observar diferenças entre as diversas amostras analisadas, variando desde substituições pontuais, até blocos de deleções de dezenas a centenas de nucleotídeos.
- 2- Amostras de VACV pertencentes ao grupo 1 são mais frequentemente isoladas que amostras do grupo 2. As causas biológicas e/ou metodológicas deste fato ainda não foram elucidadas.
- 3- O presente trabalho fornece as primeiras análises de sequências nucleotídicas obtidas de VACV isolados na Bahia e Espírito Santo. De uma forma geral, os resultados aqui apresentados demonstraram que amostras de VACV-BR do grupo 1 encontram-se hoje circulando nestas regiões, assim como no estado de Goiás. Uma possível fonte destes vírus poderia ser o tráfego de animais entre estas regiões e o estado de Minas Gerais, que apresenta um grande rebanho leiteiro, e onde o VACV é endêmico. Outra possível fonte seria o meio silvestre, onde a circulação do VACV já foi demonstrada. Contudo, a participação da vida silvestre nos surtos de VB ainda não foi estabelecida e permanece em estudo.
- 4- As amostras SH1V, SH2V e SB1V foram identificadas como novas amostras pertencentes ao grupo 2 de VACV-BR. Este grupo é constituído por amostras que não apresentam uma deleção de 18nt no gene *ha*, uma assinatura molecular dos VACV-BR grupo1, além de induzirem à formação de grandes placas de lise em células BSC-40, e também por serem virulentas para camundongos quando inoculados pela via intranasal. Os isolado SH1V e SH2V são especialmente importantes por se tratarem das primeiras amostras deste grupo a serem isoladas de um pacientes humanos.

9. BIBLIOGRAFIA

ABRAHÃO, J.S; TÉRCIA, M.L. OLIVEIRA; RAFAEL K. CAMPOS; MARIETA C. MADUREIRA; KROON, E.G; ZÉLIA I.P. LOBATO. **Bovine Vaccinia Outbreaks: Detection and Isolation of Vaccinia Virus in Milk Samples**. Foodborne Pathogens and diseases, v. 6, n. 9, p 1141-1146, 2009.

ABRAHÃO, J. S; GUEDES, M. I. M; GILIANE, S. T; FLÁVIO, G. F; RAFAEL, K. C; BRUNO, F. M; ZÉLIA, I. P. L; ANDRE, T. SILVA-FERNANDES; GISELE, O. L. R; LARISSA, S. L; PAULO, C. P. F; CLÁUDIO, A. B; KROON, E.G. **One More Piece in the VACV Ecological Puzzle: Could Peridomestic Rodents Be the Link between Wildlife and Bovine Vaccinia Outbreaks in Brazil?**. Plos one, v. 4, Is.10, p. 1-7, 2009a.

ABRAHÃO, J. S; LARISSA, S. L; ASSIS, F. L; ALVES, P. A; ANDRE, T. SILVA-FERNANDES; COTA, M. M. G; FERREIRA, V. M; RAFAEL, K. C; MANSUR, C; ZÉLIA, I. P. L; TRINDADE, G. S; KROON, E.G. **Nested-multiplex PCR detection of Orthopoxvirus and Parapoxvirus directly from exanthematic clinical samples** Virology Journal, v. 140, p. 1-5; 2009b.

ABRAHÃO, J. S; TRINDADE, G. S; FERREIRA, J. M. S; RAFAEL, K. C; CLÁUDIO, A. B; PAULO, C. P. F; KROON, E.G. **Long-lasting stability of Vaccinia virus strains in murine feces: implications for virus circulation and environmental maintenance**. Arch Virol, v. 154, p. 1551–1553, 2009c.

ABRAHÃO, J. S; ANDRE, T. SILVA-FERNANDES; ASSIS, F. L; GUEDES, M. I. M; DRUMOND, B. P; LEITE, J. A; COELHO, L. F. L; TURRINIE, F; FLÁVIO, G. F; ZÉLIA, I. P. L; MADUREIRA, M. C; CLÁUDIO, A. B; PAULO, C. P. F; TRINDADE, G. S; KROON, E.G. **Human Vaccinia virus and Pseudocowpox virus co-infection: Clinical description and phylogenetic characterization**. Journal of Clinical Virology, v. 48, p. 69–72, 2010.

ABRAHÃO, J. S; ANDRE, T. SILVA-FERNANDES; LARISSA, S. L; RAFAEL, K. C; GUEDES, M. I. M; COTA, M. M; ASSIS, F. L; BORGES, I. A; Milton, F. S. J; ZÉLIA, I.

P. L; CLÁUDIO, A. B; PAULO, C. P. F; TRINDADE, G. S; KROON, E.G. **Vaccinia Virus Infection in Monkeys, Brazilian Amazon.** Emerging Infectious Diseases, v. 16, n. 6, p 976-979, 2010.

ADAMS, M. M; AMANDA, D. R; MOYER, R. W. **Rabbitpox Virus and Vaccinia Virus Infection of Rabbits as a Model for Human Smallpox.** Journal of Virology, v. 81, n. 20, p. 11084–11095, 2007.

AMEGADZIE, B. Y; SISLER, J. R; MOSS, B. **Characterization of a 7-kilodalton subunit of vaccinia virus DNA-dependent RNA polymerase with structural similarities to the smallest subunit of eukaryotic RNA polymerase II.** Virology, v. 186, p. 777–782, 1992.

BASIL M. ARIF. **Recent advances in the molecular biology of entomopoxviruses** Journal of General Virology, v. 76, p. 1-13, 1995.

BAXBY, D. SHACKLETON, W.B., et al. (). **Comparison of cowpox-like viruses isolated from Europeans zoos. Brief report.** Arch Virol. v. 61(4), p.337-40, 1979.

BERKELMAN RL. **Human Illness Associated with Use of Veterinary Vaccines.** Clinical Infectious Diseases, v. 37, p. 407–14, 2003.

BRIODY, B.A. **Response of mice to ectromelia and vaccinia viruses.** Bacteriol Rev, v. 23, p. 61–95, 1959.

BRUM, M. C. S; DOS ANJOS, B. L; NOGUEIRA, C. E. W; AMARAL, L. A; RUDI, W; FLORES, E. F. **An outbreak of orthopoxvirus-associated disease in horses in southern Brazil.** J Vet Diagn Invest, v. 22, p. 143–147, 2010.

BASIL, M.A. **Recent advances in the molecular biology of entomopoxviruses.** Journal of General Virology, v. 76, p. 1-13, 1995.

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

CAMPOS, R.K; BRUM, M. C. S; NOGUEIRA, C. E; DRUMOND, B. P; ALVES, P. A; SIQUEIRA-LIMA, L; ASSIS, F. L; TRINDADE, G. S; BONJARDIM, C. A; FERREIRA, P. C; RUDI, W; FLORES, E. F; KROON, E. G; ABRAHÃO, J. S. **Assessing the variability of Brazilian Vaccinia virus isolates from a horse exanthematic lesion: coinfection with distinct viruses.** Archives of Virology, v. 156(2), p. 275-83, 2010.

CAROLINE, G; STE´PHANE, H; PAUL, K; GEOFFREY, L. S. **Poxvirus genomes: a phylogenetic analysis.** Journal of General Virology, v. 85, p. 105–117, 2004.

CHANTREY, J; MEYER, H; BAXBY, D; BEGON, M; BOWN, K.J; HAZEL, S.M, et al. **Cowpox: reservoir hosts and geographic range.** Epidemiol Infect, v.122, p. 455–60, 1999.

D'ANUNCIAÇÃO L, GUEDES MI, OLIVEIRA TL, REHFELD I, BONJARDIM CA, FERREIRA PP, DE SOUZA TRINDADE G, LOBATO ZP, KROON EG, ABRAHÃO JS. **Filling One More Gap: Experimental Evidence of Horizontal Transmission of Vaccinia Virus Between Bovines and Rodents.** Vector Borne Zoonotic Disease, v. 12(1), p. 61-4, 2012.

DA FONSECA, F.G; G.S. TRINDADE, R.L.A. SILVA, C.A. BONJARDIM, P.C.P. FERREIRA, E.G. KROON. **Characterization of a Vaccinia-like virus isolated in a Brazilian forest.** J. Gen. Virol, v. 83, p. 223e228, 2002.

DAMASO, C. R. A; JOSEPH, J. E; RICHARD, C. C; NISSIN, M. **An Emergent Poxvirus from Humans and Cattle in Rio de Janeiro State: Cantagalo Virus May Derive from Brazilian Smallpox Vaccine.** Virology, v. 277, p. 439- 449, 2000.

DAMON, I. K. **The viruses end their replication.** Fields Virology, 5th Ed., v. 2, cap. 22, p. 2948-2975, 2007.

DINIZ, S; TRINDADE, G. S; DA FONSECA, F. G; KROON, E. G. **An outbreak of mousepox in Swiss mice in a laboratory animal facility – case report.** Arq Braz Med Vet Zootec, v. 53, p. 152–156, 2001.

DOCEUL, V; HOLLINSHEAD, M; LINDEN, L.V.D; SMITH, G.L. **Repulsion of superinfecting virions: a mechanism for rapid virus spread.** Science, v. 327, n. 5967, p. 873 – 876, 2010.

DONATELE, D. M; TRAVASSOS, C. E. P. F; LEITE, J. A; KROON, E. G. **Epidemiologia da poxvirose bovina no Estado do Espírito Santo, Brasil.** Braz. J. vet. Res. anim. Sci, v. 44, n. 4, p. 275-282, 2007.

DRUMOND, B. P; LEITE, J. A; FONSECA, F. G; CLÁUDIO, A. B; PAULO, C. P. F; KROON, E.G. **Brazilian Vaccinia virus strains are genetically divergent and differ from the Lister vaccine strain.** Microbes and Infection, v. 10, p. 185-197, 2008.

EMBRAPA. **Plataforma nacional de recursos genéticos** – Rede microbiana. <http://plataformarg.cenargen.embrapa.br/pnrg/> 2010.

ESSBAUER, S; MARTIN, P; HERMANN, M. **Zoonotic poxviruses,** Veterinary Microbiology. v. 140, p. 229–236, 2010.

FENNER, F; WITTEK, R. et al. **The Ortopoxviruses.** 1ª ed. Academic Press. San Diego, Califórnia. 1988.

FERNANDES T. **The smallpox vaccine: its first century in Brazil.** Hist Cienc Saude Manguinhos, v. 6, p. 29-51, 1999.

FERNANDES, A.T. S; TRAVASSOS, C. E. P. F; FERREIRA, J. M. S; ABRAHÃO, J. S; ROCHA, E. S. O. FERREIRA, F. V; DOS SANTOS, J. R; BONJARDIM, C. A; FERREIRA, P. C. P; KROON, E. G. **Natural human infections with *Vaccinia virus* during bovine vaccinia outbreaks.** Journal of Clinical Virology, v. 44, p. 308–313, 2009.

FERREIRA, J. M. S; DRUMOND, B. P; GUEDES, M. I. M; XAVIER, M. A. P; LEITE, C. M. A; ARANTES, R. M. E; MOTA, B. E. F; ABRAHÃO, J. S; ALVES, P. A; OLIVEIRA, F. M; FERREIRA, P. C. P; BONJARDIM, C. A; ZÉLIA, I. P. L; KROON,

E.G. **Virulence in Murine Model Shows the Existence of Two Distinct Populations of Brazilian Vaccinia virus Strains.** Plos one, v. 3, Is. 8, p. 1-10, 2008a.

FERREIRA, J. M. S; ABRAHÃO, J. S; DRUMOND, B. P; OLIVEIRA, F. M; ALVES, P. A; XAVIER, M. A. P; ZÉLIA, I. P. L; BONJARDIM, C. A; FERREIRA, P. C. P; KROON, E.G. **Vaccinia virus: shedding and horizontal transmission in a murine model.** Journal of General Virology, v. 89, p. 2986–2991, 2008b.

FERRIER-REMBERT, A; DRILLIEN, R; TOURNIER, J.N; GARIN, D; CRANCE, J.M. **Intranasal cowpox virus infection of the mouse as a model for preclinical evaluation of smallpox vaccines.** Vaccine, v. 25, p. 4809–4817, 2007.

FONSECA, F.G; LANNA, M.C.S; CAMPOS, M A.S; KITAJIMA, E. W; PERES, J.N; GOLGHER, R.R; FERREIRA, P.C.P; KROON, E.G. **Morphological and molecular characterization of the poxvirus BeAn 58058.** Arch Virol, v. 143, p. 1171–1186, 1998.

FONSECA, F.G; KROON, E.G; NOGUEIRA, M.L; TRINDADE, G.S. **Zoonotic Vaccinia virus outbreaks in Brazil.** Future Virology, v. 6, p.1-11, 2011.

FUNAHASHI, S; SATO, T; SHIDA, H. J. **Cloning and Characterization of the Gene Encoding the Major Protein of the A-type Inclusion Body of Cowpox Virus** Gen. Virol, v. 69, p. 35–47, 1988.

GUARNER, J; JOHNSON, B.J; PADDOCK, C.D; SHIEH, W.J; GOLDSMITH, C.S; REYNOLDS, M.G, et al. **Monkeypox transmission and pathogenesis in prairie dogs.** Emerg Infect Dis, v.10, p.426–31, 2004.

GILLESPIE, C. A. **A practical approach to variola.** The Internet Journal of Academic Physician Assistants, v. 4, n. 2, 2005.

GUBSER, C; HUE, S; KELLAM, P; SMITH, G. L. **Poxvirus genomes: a phylogenetic analysis.** Journal of General Virology, v. 85, p. 105–117, 2004.

HALL, T. A. **BIOEDIT: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT.** Nucleic Acids Symp, v. 41, p. 95–98, 1999.

HARRIS, N; ROSALES, R; MOSS B. **Transcription initiation factor activity of vaccinia virus capping enzyme is independent of mRNA guanylation.** Proc Natl Acad Sci U S A, v. 90, p. 2860-2864, 1993.

http://www.agricultura.gov.br/portal/page?_pageid=33,971401&_dad=portal&_schema=PORTAL. Acesso: 06/08/2010

<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2009>. **Virus Taxonomy: 2009 Release.** Acesso: 29/05/10

HUTSON, C.L; OLSON, V.A; CARROLL, D.S; ABEL, J.A; HUGHES, C.M; ZACHARY, H. B; SONJA, W; JOSHUA, SELF; JORGE, E. O; PAUL, N. H; MICHAEL, D; KEVIN, L. K; INGER, K. D; RUSSELL L. R. **A prairie dog animal model of systemic orthopoxvirus disease using West African and Congo Basin strains of monkeypox virus.** Journal of General Virology, v. 90, p. 323–333, 2009.

ICTVdB Management (2011). 00.058. **Poxviridae.** In: ICTVdB - The Universal Virus Database, version 4. Buchen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA

ICTVdB Management (2011). 00.058.1. **Chordopoxvirinae.** In: *ICTVdB - The Universal Virus Database*, version 4. Buchen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA

ICTVdB Management (2011). 00.058.1.01.001. **Vaccinia virus.** In: *ICTVdB - The Universal Virus Database*, version 4. Buchen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA

JACOBS, N; CHEN, R. A; GUBSER, C. N. P; SMITH, G. L. **Intradermal immune response after infection with *Vaccinia virus***. Journal of General Virology, v. 87, p. 1157–1161, 2006.

JOHNSTON, J. B; MCFADDEN, G. **Poxvirus Immunomodulatory Strategies: Current Perspectives**. Journal of Virology, v. 77, n. 11, p. 6093–6100, 2003.

JOKLIK, W. K. **The purification of four strains of poxvirus**. Virology, v. 18, p. 9-18, 1962.

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

KECK, J.G; BALDICK, C.J; MOSS B. **Role of DNA replication in vaccinia virus gene expression: A naked template is required for transcription of three late transactivator genes**. Cell, v.61, p. 801-809, 1990.

KURTH, A; GUDRUN, W; HANS-PETER, G; ANGELIKA, P; GEORG, P; ANDREAS, N. **Rat-to-Elephant-to-Human Transmission of Cowpox Virus**. Emerging Infectious Diseases, v. 14, No. 4, p. 670-671, 2008.

LEWIS-JONES, S. **Zoonotic poxvirus infections in humans**. Journal of infectious diseases, v. 17(2), p. 81-89, 2004.

LEITE, J. A; DRUMOND, B. P; TRINDADE, G. S; Zélia I.P. Lobato; FONSECA, F.C; SANTOS, J. R; MADUREIRA, M. C; GUEDES, M. I. M. C; FERREIRA, J. M. S; BONJARDIM, C. A; FERREIRA, P. C. P; KROON, E. G. **Passatempo Virus, a Vaccinia Virus Strain, Brazil**. Emerging Infectious Diseases, v. 11, n. 12, p. 1935-1939, 2005.

LEITE, J. A; DRUMOND, B. P; TRINDADE, G. S; BONJARDIM, C. A; FERREIRA, P. C. P; KROON, E. G. **Virus Genes**, v. 35, p. 531–539, 2007.

LI, Y; ROPP, S.L; ZHAO, H. DAMON, I.K; ESPOSITO, J.J. **Orthopoxvirus pan-genomic DNA assay**. Journal of Virology Methods, v.141, p154–65, 2007

LOBATO, Z.I.P; TRINDADE, G.S; FROIS, M.C.M; RIBEIRO, E.B.T; DIAS, G.R.C; TEIXEIRA, B.M et al. **Surto de varíola bovina causada pelo vírus vaccínia na região da Zona da Mata Mineira.** *Arq Bras Med Vet Zootec*, v. 57, p 423-429, 2005..

LOPES, S. LACERDA, J.P., et al. **Cotia virus: a new agent isolated from sentinel mice in São Paulo, Brazil.** *The Am j trop med hyg.* 1965.

MARENNIKOVA, S.S; MALTSEVA, N.N; KORNEEVA, V.I; GARANINA, N. **Outbreak of pox disease among carnivora (felidae) and edentata.** *J infect dis*, v. 135(3), p. 358-66, 1977.

MCFADDEN, G. **Poxvirus tropism.** *Nature reviews*, v. 3, p. 201-213, 2005.

MEDAGLIA, M. L. G; LEILA, C. G.D; PESSOA, E. R.C; SALES, T. R.P; DAMASO, C. R. **Spread of Cantagalo Virus to Northern Brazil.** *Emerging Infectious Diseases*, v. 15, No. 7, p 1142-1143, 2009.

MEGID, J; CAMILA, M.A; HÉLIO, L; EDVIGES, M.P; LIRIA, H.O. **Short Report: Vaccinia Virus in Humans and Cattle in Southwest Region of São Paulo State, Brazil.** *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 79(5), p. 647–651, 2008.

MERCER, J; STEPHAN, K; FLORIAN I.S; JOSH, C; CHRISTINE, B; ARI, H. **Vaccinia virus strains use distinct forms of macropinocytosis for host-cell entry.** *PNAS Early Edition*, P. 1-6, 2010.

MEYER, H; RZIHA, H. J. **Characterization of the gene encoding the A-type inclusion protein of camelpox virus and sequence comparison with other orthopoxviruses.** *Journal of General Virology*, v. 74, p. 1679-1684, 1993.

MEYER, H; PFEFFER, M; RZIHA, H. J. **Sequence alterations within and downstream of the A-type inclusion protein genes allow differentiation of othopoxvirus species by polymerase chain reaction.** *Journal of General Virology*, v. 75, p. 1975–1981, 1994.

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

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

MOSS, B. **Poxviridae: the viruses and their replication.** In: Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M., Griffin, D.E. (Eds.), Fields virology, vol. 2, fourth ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 2849–2884, 2001.

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

MOSS, B. **Poxviridae: The Viruses and Their Replication.** Fields Virology, 5th Edition. v. 2, c. 22, p. 2906 – 2945, 2007.

MORIKAWA, S; SAKIYAMA, T; HASEGAWA, H; SAIJO, M; et al. **An attenuated LC16m8 smallpox vaccine: analysis of full-genome sequence and induction of immune protection,** J. Virol, v. 79, p.11873e11891, 2005.

OSTERRIEDER, N; MEYER, H; PFEFFER, M. **Characterization of the gene encoding for the A-type inclusion body protein of mousepox virus.** Virus Genes, v. 8, p. 125–135, 1994.

PATEL, D. D; PICKUP, D. J; JOKLIK, W. K. **Isolation of cowpox virus A-type inclusions and characterization of their major protein component.** Virology, v. 149 (2), p. 174-189, 1986.

PELKONEN, P.M. TARVAINEN, K., et al. **Cowpox whit severe generalized eruption, Finland.** Emerg Infct Dis. V.9, N.11, p. 1450-1461,2003.

RAOULT, D.; LA SCOLA, B.; BIRTLES, R. **The Discovery and Characterization of Mimivirus the Largest Known Virus and Putative Pneumonia Agent.** Clin Infect Dis Jour. 2007. 45:95-102

RISI, J.B. **Varíola**. Arquivos de Higiene, Ministério da Saúde, Departamento Nacional de Saúde, v. 24, p. 119-169, 1968.

ROBERTS, K. L; SMITH, G. L. **Vaccinia virus morphogenesis and dissemination**. Cell press: trends in microbiology, v. 16, n. 10, p. 472-479, 2008.

ROPP, S.L; JIN, Q.I; KNIGHT, J.C; MASSUNG, R.F; ESPOSITO, J.J. **PCR strategy for identification and differentiation of smallpox and other orthopoxviruses**. Journal of clinical Microbiology, v. 33, p. 2069-2076, 1995.

SANGER F, NICKLEN S, et al. **DNA sequencing with chain-terminating inhibitors**. 1977. Biotechnology, v. 24, p. 104-108, 1992.

SMITH, G.L. AND MCFADDEN, G. **Smallpox: anything to declare?**. Nat Rev Immunol. 2002.

SILVA-FERNANDES, A. T; TRAVASSOS, C. E. P. F; FERREIRA, J. M. S; ABRAHÃO, J. S; ROCHA, E. S. O; FERREIRA, F. V; SANTOS, J. R; BONJARDIM C. A; FERREIRA, P. C. P; KROON, E. G. **Natural human infections with Vaccinia virus during bovine vaccinia outbreaks**. Journal of Clinical Virology, v. 44, p. 308–313, 2009.

SCHATZMAYR, H. G; RENATA, V. C. C; MÁRCIA, C. R. G; DÉBORA, F. B; VALÉRIA, H. B; MANUEL, E. V. S. LUIS, A. C. B; ORTRUD, M. B. **Human infections caused by vaccinia-like poxviruses in Brazil**. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 42, p. 672-676, 2009.

TRINDADE, G. S; DA FONSECA, F. G; JOÃO, T. M; NOGUEIRA, M. L; MENDES, L. C. N; BORGES, A. S; PEIRÓ, J. R; PITUCO, E. M CLÁUDIO A. B; PAULO; C. P. FERREIRA; ERNA; G. K. **Araçatuba Virus: A Vaccinialike Virus Associated with Infection in Humans and Cattle**. Emerging Infectious Diseases, v. 9, n. 2, p. 155-160, 2003.

TRINDADE, G. S; DA FONSECA, F. G; JOÃO, T. M; SUELI, D; JULIANA A. L; STEFANIE DE BODT; YVES VAN DER PEER; CLÁUDIO A. B; PAULO; C. P. FERREIRA; ERNA; G. K. **Belo Horizonte virus: a vaccinia-like virus lacking the A-type inclusion body gene isolated from infected mice** Journal of General Virology, v.85, p. 2015–2021, 2004.

TRINDADE, G.S; LOBATO, Z. I. P; DRUMOND, B. P; LEITE, J. A; TRIGUEIRO, R. C; GUEDES, M. I. M. C; FONSECA, F. G; JOÃO R. DOS SANTOS; CLÁUDIO A. BONJARDIM; PAULO C. P. FERREIRA; ERNA G. KROON. **Short report: isolation of two *Vaccinia virus* strain from a single bovine vaccinia outbreak in rural área from Brazil: implications on the emergence of zoonotic orthopoxviruses.** Am. J. Trop. Med. Hyg, v. 75, p 486–490, 2006.

TRINDADE, G. S; DRUMOND, B. P; GUEDES, M. I. M. C; LEITE, J. A; MOTA, B. E. F; CAMPOS, M. A; FONSECA, F. G; NOGUEIRA, M. L; LOBATO, Z. I. P; BONJARDIM, C. A; FERREIRA, P. C. P; KROON, E. G. **Zoonotic Vaccinia Virus Infection in Brazil: Clinical Description and Implications for Health Professionals.** Journal of clinical microbiology, v.45, p. 1370–1372, 2007a.

TRINDADE, G. S; GINNY L. EMERSON; DARIN S. CARROLL; ERNA G. KROON; INGER K. DAMON. **Brazilian Vaccinia Viruses and Their Origins.** Emerging Infectious Diseases, v. 13, No. 7, p. 965-972, 2007b.

TRINDADE, G. S; VILELA, J. M. C; FERREIRA, J. M. S; AGUIAR, P. H. N; LEITE, J. A; GUEDES, M. I. M. C; LOBATO, Z. I. P; MADUREIRA, M. C; DA SILVA, M. I. N; DA FONSECA, F. G; KROON, E. G. ANDRADE, M. S. **Use of atomic force microscopy as a diagnostic tool to identify orthopoxvirus.** Journal of Virological Methods, v. 141, p. 198–204, 2007c.

TRINDADE, G. S; YU LI; VICTORIA, A. OLSON; GINNY, EMERSON; RUSSELL, L. REGNERY; FLAVIO, GUIMARAES DA FONSECA; ERNA, GEESIEN KROON; INGER DAMON. **Real-time PCR assay to identify variants of *Vaccinia virus*: Implications for the diagnosis of bovine vaccinia in Brazil.** Journal of Virological Methods, v. 152, p. 63–71, 2008.

TRINDADE, G. S; GUEDES, M. I. M. C; DRUMOND, B. P; MOTA, B. E; ABRAHÃO, J.S; LOBATO, Z. I. P; LEITE, J. A; OLIVEIRA, R.C; NOGUEIRA, M. L; KROON, E. G; FONSECA, F.G. **Zoonotic Vaccinia Virus: Clinical and Immunological Characteristics in a Naturally Infected Patient.** Clinical Infectious Diseases, v. 48, p. 37-40, 2009.

TULMAN, E.R; DELHON, G; AFONSO, C.L; LU, Z; ZSAK, L; SANDYBAEV, N.T; KEREMBEKOVA, U.Z; ZAITSEV, V.L; KUTISH, G.F; ROCK, D.L. **Genome of horsepox virus.** J Virol, v.80(18), p. 9244-58, 2006.

ULAETO, D; GROSENBACH, D; HRUBY, D. E. J. **The vaccinia virus 4c and A-type inclusion proteins are specific markers for the intracellular mature virus particle.** Virology, v. 70, p. 3372–3377, 1996.

VORA, S; INGER, D; VINCENT, F; STEPHEN, G. W; MADELYN, K; SARAH, L. S.; SUSAN, I. G; SYLVIA, G. H., et al. **Severe Eczema Vaccinatum in a Household Contact of a Smallpox Vaccinee.** Clinical Infectious Diseases, v. 46, p. 1555-1561, 2008.

VOS JC, SASKER M, STUNNENBERG HG. **Vaccinia virus capping enzyme is a transcription initiation factor.** EMBO J, v. 10, p. 2553-2558, 1991.

WOLFS TF, WAGENAAR JA, NIESTERS HG, OSTERHAUS AD. **Rat-to-human transmission of Cowpox infection.** Emerg Infect Dis, v. 8(12), p.1495-6, 2002.

YANG, Z; S. E; MARTENS, C. A; BRUNO, D. P; PORCELLA, S. F; MOSS, B. **Expression Profiling of the Intermediate and Late Stages of Poxvirus Replication.** Journal of Virology, v. 85, p.9899-9908, 2011

YOGESH K. G;; CHANDRASHEKHAR, G. R; PRAGYA, D. Y; BABASAHEB, V. T; ARUNA, S; MILIND, D. P; ATANU, BASU; DEVENDRA, T. M; AKHILESH, C. M. **Buffalopox outbreak in humans and animals in Western Maharashtra, India.** Preventive Veterinary Medicine, v.100, p.242– 247, 2011.

ANEXO 1 : PUBLICAÇÕES RELACIONADAS AO TRABALHO DE MESTRADO

ANEXO 2: PUBLICAÇÕES NÃO RELACIONADAS AO TRABALHO DE MESTRADO

TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS CIENTÍFICOS

- **Validation of a bovine elisa anti-igg to detect anti-vacv antibodies in buffaloes sera.** Apresentação em forma de poster. “XXII Encontro Nacional de Virologia” Atibaia-SP, outubro/2011
- **Isolation and characterization of Vaccinia virus samples involved in human and bovine outbreak in Serro, Minas Gerais.** Apresentação oral e em forma de pôster. “VI Fórum de Microbiologia”. Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Junho/2011
- **“Detection of Vaccinia virus in blood and feaces of experimentally infected cows”.** Apresentado em forma de poster. “XXI Encontro Nacional de Virologia”, Gramado-RS, Outubro/2010.
- **“Experimental inoculation of Vaccinia virus in cows”.** Apresentado em forma de pôster. “XXI Encontro Nacional de Virologia”, Gramado-RS, Outubro/2010.
- **“Brazilian poxviruses co-circulation and co-infection: competition or adaptive advantage?”.** Apresentação em forma de poster. “Smallpox Eradication after 30 years: Lessons, legacies and innovations Rio de Janeiro, 2010