

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA  
COLEGIADO DOS CURSOS DE PÓS-GRADUAÇÃO

PATOGENIA DO *VACCINIA VIRUS* GP2  
EM BOVINOS

Anselmo Vasconcelos Rivetti Júnior

Belo Horizonte

2012

Anselmo Vasconcelos Rivetti Júnior

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

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Zélia Inês Portela Lobato

Co-orientadores: Prof. Jônatas Santos Abrahão

Dra. Maria Isabel Maldonado Coelho Guedes

Belo Horizonte

2012



Aos professores, colegas e funcionários  
do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva  
que contribuíram e possibilitaram a realização deste trabalho.

À minha querida mãe  
pelo seu eterno exemplo.

Ao meu querido pai  
pelo seu carinho e exemplo  
de alegria. (*in memoriam*)

À minha esposa, Paulinha,  
pelo apoio, companhia e amizade  
em todos os momentos.

À Prof<sup>a</sup>. Zélia Lobato  
pelos seus ensinamentos.

Ao Prof. Jonska (Jônatas Abrahão)  
pela perfeita co-orientação  
e aos colegas e funcionários do  
Laboratório de Vírus-ICB  
pela constante colaboração.

À Bel (Maria Isabel Guedes)  
pela co-orientação,  
fundamental em todas  
as etapas do projeto.

*“Não podemos encontrar alibis externos para a nossa atuação. Não ignoro o Estado, os políticos ou os sindicatos. Mas não acredito em nenhuma solução que não comece comigo. Não é Deus nem o Diabo. Somos nós que temos que fazer.”*

(Herbert de Souza – “Betinho”)

---

## SUMÁRIO

---

<b>RESUMO</b> .....	12
<b>ABSTRACT</b> .....	13
<b>1- INTRODUÇÃO</b> .....	14
2.1 - Classificação .....	15
2.2 - Características do VACV .....	16
2.3 - Estrutura do genoma .....	17
2.4 - Multiplicação viral .....	18
2.5 - Importância histórica e saúde pública .....	19
2.6 - Origem do VACV .....	20
2.7 - Hospedeiros .....	21
2.8 - Transmissão .....	22
2.9 - Sinais clínicos .....	23
2.10 - VACV no Brasil acometendo bovinos e humanos .....	24
2.11 - Métodos de diagnóstico para o VACV .....	25
2.12 - Patogênese dos OPV .....	26
2.12.1 - Resposta imune .....	28
2.12.2 - Vias de excreção .....	29
2.12.2.1 - Fezes .....	30
<b>3. OBJETIVO</b> .....	31
3.1 - Objetivo geral .....	31
3.2 - Ojetivos específicos .....	31
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	31
4.1 - Locais dos experimentos .....	31
4.2 - Seleção dos animais .....	32
4.3 - Condições de alojamento e manutenção dos animais .....	32
4.4 - Vírus utilizado .....	32
4.5 - Animais inoculados .....	33
4.6 - Delineamento do experimento .....	33
4.7 - Infecção inicial .....	34
4.8 - Imunodepressão .....	34
4.9 - Reinfecção .....	34
4.10 - Coleta e processamento das amostras .....	35
4.10.1 - Fezes .....	35
4.10.2 - Sangue total .....	35
4.10.3 - Tecidos .....	36
4.11 - Provas moleculares .....	36
4.11.1 - Teste de sensibilidade analítica .....	36
4.11.2 - PCR <i>nested</i> .....	36
4.11.3 - PCR em tempo real .....	37
4.12 - Isolamento e identificação viral .....	39
4.12.1 - Cultivo celular de BSC-40 .....	39
4.12.2 - Inoculação em cultivo celular .....	39
4.12.3 - Imunoperoxidase em monocamada celular (IPMC) .....	39
4.13 - Imunohistoquímica (IHQ) .....	40

4.14 - Análise Estatística.....	40
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>41</b>
5.1 - Infecção inicial.....	41
5.1.1 - Reprodução da VB.....	41
5.1.2 - Provas moleculares .....	41
5.1.3 - Detecção do <i>Vaccinia virus</i> - GP2 no sangue .....	42
5.1.4 - Detecção do <i>Vaccinia virus</i> -GP2 nas fezes.....	45
5.2 - Imunodepressão .....	52
5.3 - Reinfecção .....	54
5.4 - Detecção do VACV em tecidos .....	57
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>64</b>
<b>7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>65</b>

---

### LISTA DE FIGURAS

---

Figura 1 - Diagramas filogenéticos. (A) Principais vírus integrantes das subfamílias dos Poxvírus. (B) Vírus integrantes do gênero dos <i>Orthopoxvirus</i> . Fonte: Duraffour et al., 2011.....	16
Figura 2 - Morfologia e estrutura do VACV. (A) e (B) Partícula de VACV oriunda de uma amostra brasileira, visualizada por microscopia de força atômica. (C) Representação esquemática de um poxvírus. Fontes: Fenner, 1989 e de Souza Trindade et al., 2007b - modificado. ....	17
Figura 3 - Esquema do ciclo de replicação dos poxvírus. Fonte: Kroon et al., 2011 - modificado.....	19
Figura 4 -Estados brasileiros com surtos diagnosticados para <i>Vaccinia virus</i> , com acometimento de bovinos e humanos durante o período de 1999 a 2011. ....	25
Figura 5 - Esquema mostrando a divisão dos animais nos grupos experimentais, duração dos acompanhamentos em cada grupo e dias pós-infecção inicial em que foram realizados a reinfecção, imunodepressão e o abate dos animais. ....	34
Figura 6 - Frequência das coletas de sangue e fezes nos grupos experimentais. ....	35
Figura 7 - Algoritmo para correção das ampliações inespecíficas, corrigidas com base na média dos valores dos Cts dos controles negativos, em que foi adicionado DNA de fezes de bovinos obtidas dos animais no dia anterior às inoculações. Fonte: Abrahão, dados não publicados). ....	38
Figura 8 - PCR <i>nested</i> do gene <i>vgf</i> para o VACV em amostras de sangue. Os amplificados foram fracionados em gel de acrilamida:bisacrilamida (29,2;0,8) (PAGE) 8% sob voltagem de 100V e corados por prata. PM: tamanho molecular; C+: controle positivo; C-: controle negativo; Amostras de sangue: 3 - positiva no 4º	

dia pós-infecção (d.p.i); 1, 2, 4, 5, 6, 7 - negativas no 19° d.p.i. Amostras de fezes: 8, 10, 14 - positivas no 8° d.p.i; 9, 11, 12, 13 - negativas no 17° d.p.i.....	42
Figura 9 - Frequência absoluta acumulada do número de vacas infectadas com DNAemia detectada pela PCR <i>nested</i> no sangue de acordo com os dias pós-infecção.....	43
Figura 10 - Quantificação relativa do DNA de VACV no sangue realizada pela PCR em tempo real nos animais infectados do grupo da infecção inicial, durante os 67 dias pós-infecção (d.p.i). .....	44
Figura 11 - Distribuição do número de amostras com DNAemia, estabelecida pela PCR <i>nested</i> , entre o 2° e o 15° d.p.i. nos oito animais do grupo da infecção inicial.....	45
Figura 12 - Quantificação relativa do DNA de VACV nas fezes dos oito animais no grupo da infecção inicial, durante os 67 dias pós-inoculação. (A) período até o 15° d.p.i. (B) período entre o 17° e o 67° d.p.i. ....	46
Figura 13 - Efeito citopático (setas), resultante da multiplicação do VACV, em cultivo celular de BSC-40. Aumento 20X (A). Imunomarcação identificando a presença do VACV pela imunoperoxidase em monocamada celular em cultivo celular de BSC-40. Aumento 40X (B). ....	49
Figura 14 - Quantificação da DNAemia pela PCR em tempo real e curva de anticorpos neutralizantes (Ac.N) e anticorpos totais (IgG total) (Matos, dados não publicados), durante a infecção inicial e a imunodepressão.....	53
Figura 15 - Quantificação do DNA de VACV nas fezes pela PCR em tempo real e curva de anticorpos neutralizantes (Ac.N) e totais (IgG total), durante a infecção inicial e a imunodepressão. ....	54
Figura 16 - DNAemia e curva de anticorpos neutralizantes (Ac.N) e anticorpos totais (IgG total), durante os 67° dias pós-infecção e os 20 dias pós reinfecção. ....	56
Figura 17 - Quantificação do DNA de VACV nas fezes e curva de anticorpos neutralizantes (Ac.N) e anticorpos totais (IgG total), durante os 67° dias pós-infecção e os 20 dias pós reinfecção. ....	57
Figura 18 - Porcentagem de animais que apresentaram detecção de DNA de VACV em órgãos pela PCR <i>nested</i> (A) Relação de tecidos positivos em cada um dos animais experimentais (B). Linf.= linfonodo; E= esquerdo; D= direito. ....	58
Figura 19 - Quantificação relativa do DNA de VACV nos linfonodos retromamários (A), nos íleos (B) e nos linfonodos mesentéricos (C) dos animais dos grupos experimentais. Os valores para os linfonodos retromamários correspondem a média entre o linfonodo retromamário esquerdo e o direito quando a detecção ocorreu em ambos em um mesmo animal. ....	59

Figura 20 - Linfonodo mesentérico (A) e placa de Peyer (B) com imunomarcações multifocais para o VACV em linfócitos do animal 1 no 92º dia pós-infecção. Aumento 40X.....	60
Figura 21 - Imunohistoquímica em íleo evidenciando imunomarcações positivas para VACV em células epiteliais (seta da esquerda) e em células caliciformes (seta da direita) presentes na submucosa do animal 1 no 92 d.p.i. Aumento 40X.....	61
Figura 22 - Proposta de patogenia na infecção local pelo <i>Vaccinia virus</i> - GP2 em bovinos.....	63

---

### LISTA DE TABELAS

---

Tabela 1 - Iniciadores utilizados para amplificação de fragmentos do gene <i>vgf</i> utilizando a PCR <i>nested</i> .....	37
Tabela 2 - Iniciadores utilizados para amplificação do gene <i>ha</i> na PCR em tempo real. ....	37
Tabela 3 - Detecções do DNA de VACV pela PCR <i>nested</i> e de partículas virais infecciosas através do isolamento viral no sangue das oito vacas durante os 67 dias pós-infecção. ....	42
Tabela 4 - Detecções do DNA de VACV pela PCR <i>nested</i> e de partículas virais infecciosas através do isolamento viral nas fezes das oito vacas durante os 67 dias pós-infecção. ....	45
Tabela 5 - Grupo imunodepressão- Resultados da PCR <i>nested</i> e do isolamento viral no sangue e nas fezes, durante os 12 d.p.im. nas vacas 2, 4, 5 e 6 submetidas à imunodepressão.....	52
Tabela 6 - Grupo reinfecção- Resultados da PCR <i>nested</i> e do isolamento viral para a detecção do DNA de VACV no sangue e nas fezes nas vacas 1, 3, 7, 9 e 10 após a reinfecção. ....	55

---

### LISTA DE QUADROS

---

Quadro 1 - Estudos referentes aos OPV sobre as suas vias e períodos de excreção viral.....	29
--	----

---

### ANEXOS

---

Anexo I - Quantificação relativa da DNAnemia do VACV pela PCR em tempo real nos oito animais, durante os 67 d.p.i na infecção inicial.....	74
Anexo II - Quantificação relativa do DNA de VACV nas amostras de fezes dos oito animais, durante os 67 d.p.i na infecção inicial.....	75



## ABREVIATURAS

Ac.N	anticorpos neutralizantes
AEC	3-amino-9-etil-carbazol
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BSA	albumina bovina sérica
BSC-40	células epiteliais de rim de macaco
°C	graus Celsius
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i>
CETEA	comitê de ética em experimentação animal
cm <sup>2</sup>	centímetros quadrados
CMLV	<i>Camelpox virus</i>
CO <sub>2</sub>	dióxido de carbono
CPXV	<i>Cowpox virus</i>
Ct	<i>ciclo threshold</i>
DNA	ácido desoxirribonucléico
d.p.i	dias pós-infecção
ECP	efeito citopático
ECTV	<i>Ectromelia virus</i>
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EGF	fator de crescimento epidérmico
ELISA	ensaio imunoenzimático em fase sólida
EV	vírus extracelular
GP1V	vírus guarani P1
GP2V	vírus guarani P2
g	unidade de medida da força centrífuga relativa
GTPV	<i>Goatpox virus</i>
ha	hemaglutinina viral
HCl	ácido clorídrico

IgG	imunoglobulina G
IHQ	imunohistoquímica
IPMC	imunoperoxidase em monocamada celular
ITRs	regiões terminais invertidas
kDA	quilo Dalton
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MCA	membrana corioalantóide
MEM	meio mínimo essencial de Eagle
MgCl <sub>2</sub>	cloreto de magnésio
MPXV	<i>Monkeypox virus</i>
µg	microgramas
µL	microlitro
m	metros
mg	miligramas
min	minutos
mL	mililitros
MV	virus maduro
ng	nanogramas
nm	nanômetros
KCl	cloreto de potássio
Kg	quilograma
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPV	<i>Orthopoxvirus</i>
PAGE	eletroforese em gel de acrilamida/bisacrilamida
pb	pares de base
PBS	solução salina tamponada contendo fosfato
PCI	fenol:clorofórmio:álcool isoamílico
PCR	reação em cadeia da polimerase
P1V	vírus Pelotas 1
P2V	vírus Pelotas 2

PSCV	<i>Pseudocowpox virus</i>
RNAM	ácido ribonucleico mensageiro
rpm	rotações por minuto
s	segundos
SFB	soro fetal bovino
SPPV	<i>Sheeppox virus</i>
U	unidades
UF	Unidade federativa
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UFP	unidade formadora de placas
UV	ultra-violeta
VACV	<i>Vaccinia virus</i>
VARV	<i>Variola virus</i>
VB	vaccínia bovina
<i>v<sub>gf</sub></i>	fator de crescimento do VACV
WR	<i>Western Reserve</i>
WV	vírus envelopado

## RESUMO

A vaccínia bovina (VB) é uma zoonose causada pelo *Vaccinia virus* (VACV), que afeta vacas leiteiras e seus ordenhadores, causando impactos econômicos e na saúde pública e animal. A apresentação clínica da doença é caracterizada pela presença de lesões localizadas na pele dos indivíduos afetados. Em bovinos não existem estudos sobre a patogênese da doença que descrevam a forma de disseminação do vírus, bem como suas vias de excreção. Este trabalho teve por objetivo estudar a ocorrência de viremia e da excreção do VACV nas fezes de vacas experimentalmente infectadas com este vírus. Para tanto, dez vacas mestiças, em lactação, sorologicamente negativas para o VACV foram utilizadas. Três tetos de cada vaca foram escarificados utilizando lixa e inoculadas com  $10^6$  UFP/50 $\mu$ L de VACV, amostra Guarani P2. Os animais foram acompanhados e coletadas amostras de sangue e fezes durante um período de 67 dias pós-infecção (d.p.i.), quando foram então divididos em dois grupos de tratamento, sendo um submetido à reinfeção e o outro à imunodepressão. Todos os animais desenvolveram lesões compatíveis com a VB (pápulas, vesículas e úlceras). Mesmo após a resolução das lesões, o DNA viral foi detectado no sangue e em tecidos linfóides e de forma intermitente e prolongada nas fezes dos animais até o último dia de coleta (67º dia pós-infecção), demonstrando que a infecção causada pelo VACV é prolongada. A detecção de partículas virais infecciosas nas fezes sugere que essa via de excreção seja uma forma de disseminação do vírus no ambiente, podendo favorecer a transmissão do VACV dentro e entre propriedades. Infecções do VACV em bovinos estão associadas à infecção de células epiteliais e caliciformes no intestino, e em macrófagos e linfócitos em tecidos linfóides. Os animais infectados e posteriormente imunodeprimidos experimentalmente, voltaram a apresentar DNAemia e permaneceram eliminando o VACV nas fezes com uma tendência a um aumento nesta excreção, podendo sugerir que exista algum mecanismo de persistência na infecção do VACV em bovinos e que este seja influenciado pelo sistema imunológico. Os animais reinfectados pelo VACV voltaram a apresentar lesões nos tetos e DNAemia. Este estudo demonstra novas evidências de que a infecção do VACV em bovinos seja sistêmica e prolongada, e que ocorra excreção viral nas fezes.

## ABSTRACT

*Bovine vaccinia (BV) is a zoonosis caused by Vaccinia virus (VACV), which affects dairy cattle and milkers, and causing economical, animal and human health impacts. By the clinical presentation of the disease, it seems that BV is a localized disease, with lesions restricted to the skin of affected individuals. But there are no studies about the pathogenesis of the disease in cows to access if there is a systemic spread of the virus and if there are different ways of VACV shedding. This work had the objective to study if occurs viremia and VACV shedding in the feces of VACV experimentally infected cows. To this end, ten crossbred lactating cows, serologically negative for VACV, were used. Three teats of each cow were scarified using sandpaper, followed by inoculation of  $10^6$  UFP/50 $\mu$ L of Guarani P2 (GP2V) strain of VACV. All animals were monitored daily and blood and feces samples were collected for 67 days post infection (d.p.i.). After this period, all animals that were previously infected were divided in two treatment groups: re-infection or immunodepression. All animals developed lesions compatible with VB (papules, vesicles and ulcers), and even after the resolution of the lesions, viral DNA was detected in the blood and lymphoid tissues, as well as an intermittent and extended detection of VACV DNA in the feces, until the last day of collection (67 day post infection), suggesting that VACV infection is chronic. The detection of VACV viable particles in the feces suggests that this is a possible route of viral shedding in the environment, which may favor VACV transmission within and among properties. VACV infections in cattle are associated with infection of epithelial cells and goblet cells in the intestine, and macrophages and lymphocytes in lymphoid tissues. In the animals experimentally infected and then immunodepression, VACV DNAemia and DNA detection in feces were observed even before the immunodepressive treatment. There was a tendency to an increase in DNA detection in the blood and feces after the treatment, suggesting that there is some mechanism of VACV persistent infection in cattle and that this is influenced by the immune system. The group of animals that were reinfected by VACV, presented lesions in the teats once more, and VACV DNAemia was observed. This study showed new evidence that VACV infection in cattle is systemic, has a chronic course and that there is viral shedding on the feces.*

## 1- INTRODUÇÃO

A expressão “varíola bovina” é comumente utilizada para descrever uma enfermidade vesicular e exantemática, caracterizada por lesões cutâneas no úbere e tetos das vacas. Existem três diferentes tipos de poxvírus que podem estar envolvidos na sua etiologia: *Cowpox virus* e o *Vaccinia virus*, pertencentes ao gênero *Orthopoxvirus* (OPV) e o *Pseudocowpox virus*, pertencentes ao gênero *Parapoxvirus* (Breman e Henderson, 2002).

O *Cowpox virus* (CPXV) é considerado exótico no Brasil possuindo distribuição restrita ao continente europeu e Ásia Central. Apesar de sua denominação ser baseada nas lesões cutâneas causadas nos bovinos, seus reservatórios naturais são roedores selvagens. Infecções naturais e a manifestação clínica ocorrem em bovinos, humanos, gatos domésticos, roedores criados como *pets* e em outros mamíferos criados em cativeiros de zoológicos (Essbauer et al., 2010).

O *Pseudocowpox virus* (PSCV) tem distribuição mundial, sendo a infecção humana conhecida como nódulo do ordenhador (Lewis-Jones, 2004). Esse vírus causa lesões clinicamente semelhantes às produzidas pelos OPV, entretanto as lesões são relativamente mais indolores do que as causadas pelos OPV (Lewis-Jones, 2004).

O *Vaccinia virus* (VACV) foi utilizado nas décadas de 50 a 70 como o vírus vacinal na campanha mundial de vacinação contra a varíola humana, promovida pela Organização Mundial de Saúde (OMS), tendo fundamental importância na

erradicação do vírus da varíola humana (*Smallpox*) no mundo em 1980 (Breman et al., 1980). Entretanto, mesmo com o fim da vacinação há mais de 30 anos o VACV tem sido constantemente isolado e caracterizado como o agente causal em surtos envolvendo bovinos e humanos que vem ocorrendo no Brasil desde o final da década de 90 (Lemos et al., 1999; Damasco et al., 2000; de Souza Trindade et al., 2003; Nagasse-Shugahara et al., 2004; Lobato et al., 2005; Madureira, 2009).

Na maioria dos diagnósticos laboratoriais desses surtos chegou-se à conclusão de se tratar de um OPV, mais precisamente um VACV. Assim tem-se utilizado para denominação desta enfermidade a expressão: “Vaccínia Bovina” (VB).

As lesões causadas pela infecção desses vírus se apresentam nas formas proliferativas, ulceradas e/ou em crostas. Quando os vírus atingem a pele, nos tetos e mais raramente no úbere, inicia-se o desenvolvimento de um eritema cutâneo caracterizado pelo aparecimento de pequenas manchas avermelhadas, com posterior formação de edema subcutâneo (pápula), que evoluem para vesículas, as quais tendem a ulcerar, seguida pela formação de crostas escuras, que terminam por cicatrizar dentro de 15 a 20 dias (Lobato et al., 2005).

A transmissão desta enfermidade entre os animais ocorre principalmente através das mãos dos ordenhadores ou equipamentos de ordenha mecânica, com a penetração dos vírus por soluções de continuidade em lesões pré-existentes nas tetas e úbere das vacas (de Souza Trindade et al., 2003). Entre fazendas, a doença é transmitida por

introdução de animais infectados no rebanho e também por ordenhadores que ordenharam animais doentes em outras propriedades. Acredita-se que a manipulação de latões contaminados possa servir também como fonte de disseminação viral (Madureira, 2009). Reservatórios naturais também podem ser responsáveis pela manutenção e circulação viral na natureza (Abrahão et al., 2009d).

A proposta deste trabalho surgiu devido à dificuldade de realizar estudos nos animais naturalmente infectados, principalmente a realização de coletas de amostras nas fases iniciais da doença. O atendimento aos focos ocorre geralmente dias depois que a infecção se instalou na fazenda, frequentemente quando as lesões já estão na fase de cicatrização, comprometendo o acompanhamento dos eventos ocorridos nas fases iniciais da doença, período em que provavelmente, possa ocorrer a maior excreção viral. Por vezes as informações em relação ao dia da infecção e sobre o curso da doença são imprecisas e de pouca confiabilidade. Além disto, nem todos os produtores concordam em abrir a sua fazenda para a equipe de pesquisa.

Este trabalho teve como objetivo promover a infecção experimental de vacas em

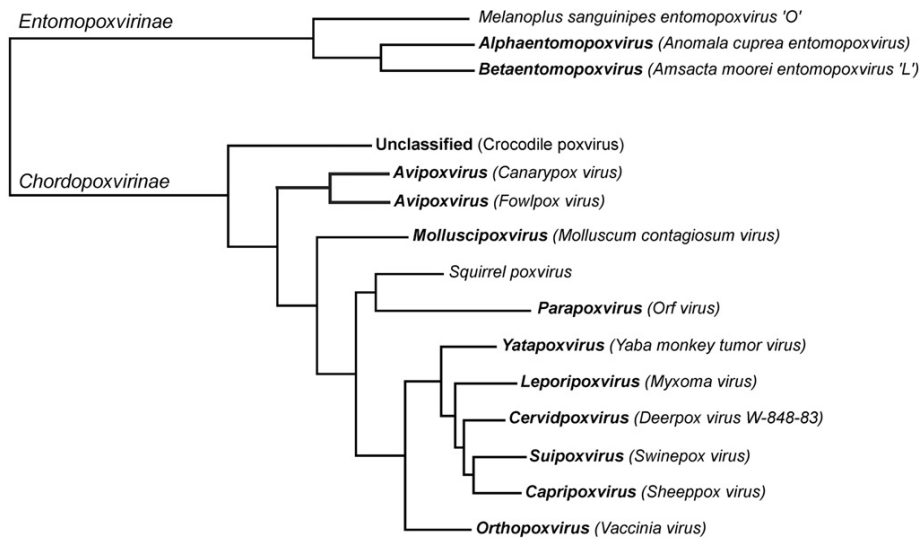
lactação com um VACV isolado de vacas doentes do estado de Minas Gerais, visando obter, com maior segurança, informações sobre a patogenia da VB em relação à distribuição do vírus em tecidos e a excreção viral, desde o primeiro momento da infecção, além da fase aguda e da fase de convalescência da doença.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 - Classificação

A família *Poxviridae* possui duas subfamílias classificadas de acordo com o espectro de hospedeiros, subfamília *Chordopoxvirinae*, que infectam vertebrados; e subfamília *Entomopoxvirinae*, que infectam insetos (Figura 1A). O VACV pertence à subfamília *Chordopoxvirinae*, sendo considerado o protótipo do gênero OPV (McFadden, 2005), que ainda possui como integrantes o *Variola virus* (VARV), *Cowpox virus* (CPXV), *Monkeypox virus* (MPXV), *Ectromelia virus* (ECTV), *Camelpox virus* (CMLV), *Raccoonpox virus*, *Taterapox virus* and *Volepox virus* (Figura 1B) (Moss, 2007). Entre os OPV, além do VACV, o VARV, MPXV e o CPXV também podem ser patogênicos ao homem (Chapman et al., 2010).

### A Poxviridae



### B Orthopoxvirus

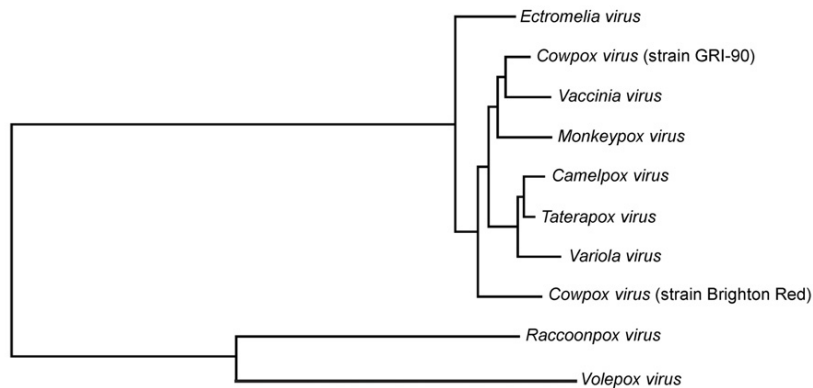


Figura 1 - Diagramas filogenéticos. (A) Principais vírus integrantes das subfamílias dos Poxvírus. (B) Vírus integrantes do gênero dos *Orthopoxvirus*. Fonte: Duraffour e colaboradores (2011).

## 2.2 - Características do VACV

Estruturalmente grandes e complexos, os vírus pertencentes à família *Poxviridae* apresenta-se em forma ovóide ou de tijolo, com corpúsculos laterais quando partícula madura e presença de envelope. São os maiores vírus animais conhecidos, medindo em média 300 x 230 nanômetros (nm) (Fenner, 2000).

As partículas virais dos diferentes gêneros apresentam pequenas diferenças entre si, entretanto as do gênero OPV são indistinguíveis (Fenner, 2000; Henderson, 2002), sendo o vírion do VACV morfológicamente na forma de um tijolo (Figura 2B) com dimensões de 360 x 270 x 250 nm. A partícula contém mais de 100 proteínas distribuídas em quatro estruturas distintas: cerne, corpúsculos laterais, membrana e envelope (Moss, 2007).



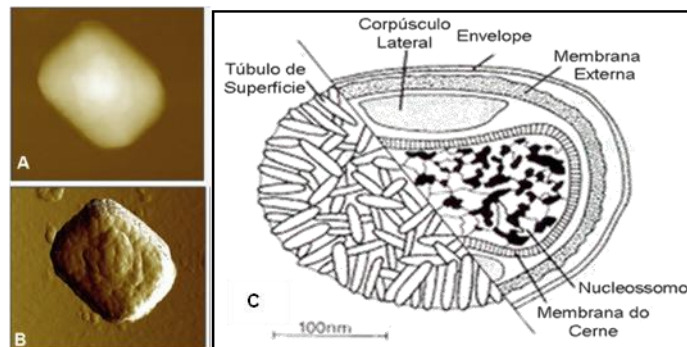


Figura 2 - Morfologia e estrutura do VACV. (A) e (B) Partícula de VACV oriunda de uma amostra brasileira, visualizada por microscopia de força atômica. (C) Representação esquemática de um poxvírus. Fontes: Fenner, (1989) e de Souza Trindade e colaboradores (2007b) - modificado.

O cerne é a estrutura mais interna da partícula viral, contendo o genoma e as enzimas, com espessura de 5 nm. Lateralmente a ele ficam situados os corpúsculos laterais. A membrana externa, de origem celular, é formada por uma bicamada lipoprotéica e circunda o cerne. Elementos tubulares, de 7 nm, denominados túbulos de superfície cobrem a membrana externa e são os responsáveis por induzirem a produção de anticorpos neutralizantes durante uma infecção. Uma membrana adicional, denominada envelope, de natureza lipoprotéica, pode ser vista em algumas partículas, externamente (Figura 2C) (Buller e Palumbo, 1991).

### 2.3 - Estrutura do genoma

O genoma do VACV consiste de uma molécula linear de DNA dupla fita com, aproximadamente, 200 genes. As sequências de DNA localizadas na porção central do genoma são conservadas e essenciais para a replicação viral, codificando principalmente, para proteínas estruturais e enzimas envolvidas no metabolismo do ácido nucléico (Esposito e Knight, 1985). Nas regiões localizadas nas duas extremidades

do genoma existem sequências idênticas denominadas regiões terminais invertidas (ITRs). As ITRs são sequências de fundamental importância, pois codificam vários genes responsáveis pelas interações vírus-hospedeiros e pelos mecanismos de patogênese (Gubser et al., 2004).

O gene *vgf* vem sendo utilizado em diversos estudos de diagnóstico e caracterização viral para isolados de VB em surtos brasileiros (de Souza Trindade et al., 2003; Leite, et al., 2005; Trindade et al., 2006). Este gene é extremamente conservado entre o gênero dos OPV, codificando a proteína “fator de crescimento do VACV” (VGF), uma proteína glicosilada de 22 a 26 KDa, exclusiva dos vírus deste gênero (Yang et al., 2005). A secreção de VGF parece estimular o crescimento e a atividade metabólica de células não infectadas e conseqüentemente, facilita a disseminação do vírus durante a infecção (Buller et al., 1988).

O gene *ha* codifica a hemaglutinina (HA), que é uma glicoproteína de superfície que está presente nas partículas virais e nas células infectadas por todos os OPV (Smith,

1993). O gene *ha* não é essencial, mas pode influenciar na virulência viral (Ropp et al., 1995). Este gene vem sendo utilizado como marcador molecular dos OPV, por apresentar blocos de deleções que caracterizam espécies ou grupos de amostras virais. A análise das sequências obtidas referentes ao gene *ha* mostraram a existência da deleção de 18 nucleotídeos na porção final do gene, presente em diversas amostras de VACV isoladas durante surtos de VB no Brasil. De acordo com essa marcação molecular foi possível agrupar as amostras brasileiras em dois grupos. O grupo 1 em que o vírus GP2V está inserido, apresenta a deleção descrita, enquanto o grupo 2 possui a sequência dos 18 nucleotídeos no gene *ha* (de Souza Trindade et al., 2007).

#### **2.4 - Multiplicação viral**

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

O ciclo tem início com a adsorção viral na membrana da célula hospedeira. Diferentes glicoproteínas virais (A21, A27, D8, F9, G9, H2 e H3) parecem estar envolvidas na formação do complexo de fusão-penetração (Moss, 2005; Ojeda et al., 2006). A capacidade de utilizar mais de um receptor para iniciar a infecção pode representar uma vantagem evolutiva, pois oferece aos vírus que possuem essa capacidade a possibilidade

de infectar diferentes tipos de células e/ou hospedeiros (Flores e Kreutz, 2007).

A penetração viral ocorre com um dos dois tipos de partículas infecciosas: vírus maduro (MV) (Figura 3) ou o vírus extracelular (EV), através da fusão entre as membranas. O DNA viral é então liberado para o citoplasma, onde ocorre a sua replicação para posteriormente ser inserido em partículas virais. O processo de expressão gênica é caracterizado pela transcrição temporal de três classes de genes (genes precoces, intermediários e tardios). As proteínas precoces participam do desnudamento completo do genoma, na sua replicação e na transcrição dos genes intermediários, cujos RNAm são traduzidos em proteínas. As proteínas intermediárias estão envolvidas principalmente na transcrição dos genes tardios, e participam das fases finais de replicação (resolução e separação das moléculas-filhas de DNA). As proteínas tardias fazem parte da estrutura vírica e participam da morfogênese dos núcleos virais, que adquirem o envelope pelo brotamento no aparelho de Golgi (empacotamento) e são liberados da célula. Alguns fatores de transcrição de genes precoces são sintetizados tardiamente na infecção e adicionados nas partículas virais para serem utilizados no início do próximo ciclo de infecção (Moss, 2007).

A primeira forma infecciosa visualizada pela microscopia eletrônica é o MV, que é liberado apenas quando ocorre a lise celular. Uma fração menor de MV é transportada para a periferia da célula e adquire duas membranas adicionais a partir do aparelho de Golgi para formar o vírus envelopado (WV). O WV então funde sua membrana externa com a membrana plasmática da célula e é liberado no meio extracelular, com

duas membranas sendo chamado agora de vírus extracelular (EV). As partículas de EV, apesar de representarem apenas um pequeno percentual das partículas virais totais são essenciais para a disseminação do vírus dentro do hospedeiro durante uma infecção (Doceul et al., 2010). Alternativamente, o WV pode fundir sua membrana externa com a membrana plasmática, mas permanecem associados com a célula. Quando isso ocorre, uma proteína viral (A36) é fosforilada, induzindo a nucleação de monômeros de actina para formar caudas de actina abaixo da partícula viral. Estas caudas de actina impulsionam a partícula viral para células vizinhas, o que fornece um mecanismo direto de disseminação de célula

a célula. As partículas associadas com os filamentos de actina são referidas como partículas virais associadas a células (Moss, 2007).

Durante a evolução do VACV e outros OPV, diversos mecanismos para induzir um estado proliferativo em células infectadas e em células vizinhas foram criados, incluindo o VGF, uma proteína viral homóloga ao fator de crescimento epidérmico (EGF) de mamíferos (Andrade et al., 2004). Quando o VGF liga-se ao receptor de EGF (EGFR) da célula, ocorre a ativação da proliferação e do estado anti-apoptótico na célula, facilitando a disseminação do vírus (Tzahar et al, 1998)

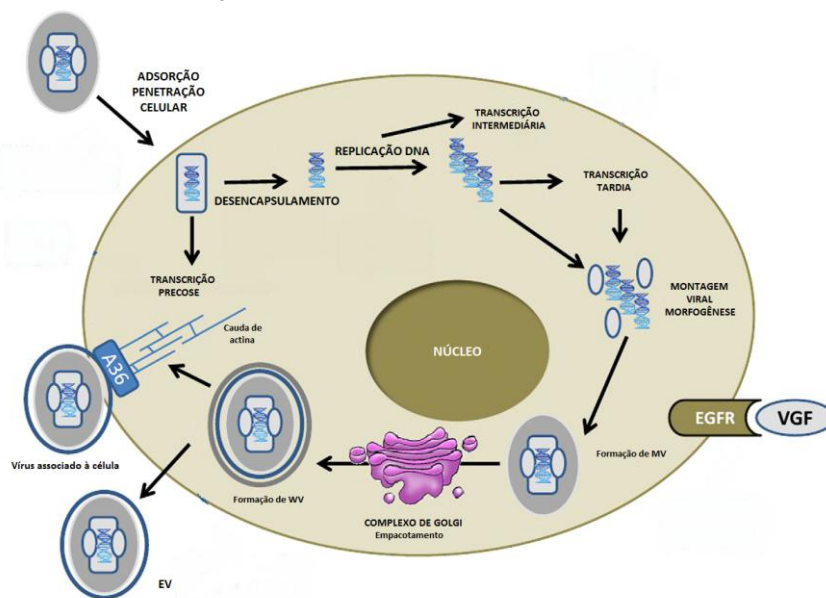


Figura 3 - Esquema do ciclo de replicação dos poxvírus. Fonte: Kroon e colaboradores (2011) - modificado.

## 2.5 - Importância histórica e saúde pública

A origem da palavra vaccínia faz referência à palavra vacina, por sua vez originada da palavra *vaccinus*, de *vacca* (vaca), em latim. Em 1796, o médico inglês Edward

Jenner retirou pequena quantidade de material das mãos de uma camponesa com lesões de varíola bovina e inoculou em um garoto de oito anos. Com o tempo, constatou-se que a criança havia se tornado imune à varíola humana. Jenner realizou esse experimento após observar que pessoas

antes infectadas com o vírus da varíola bovina (bem mais branda) dificilmente manifestavam a varíola humana, descobrindo assim a vacina contra essa enfermidade (Ferreira, 2006).

O VACV tem grande importância história na saúde pública, pois durante décadas, foi o vírus utilizado na produção da vacina contra a varíola humana, doença grave causada pelo VARV e declarada erradicada do mundo em 1980 pela OMS. O VACV foi usado como vírus vacinal por oferecer proteção cruzada contra o VARV, além de não produzir lesões generalizadas e apresentar menor virulência que o VARV (Fenner, 2000).

Diversas amostras de VACV foram utilizadas na produção destas vacinas: amostras das linhagens Lister, originada do Lister Institute, na Inglaterra, e da linhagem New York City Board of Health, originada do Laboratório Wyeth, Radnor, nos Estados Unidos. Além dessas, outras amostras foram utilizadas na China e na Índia (Henderson e Moss, 1999, citado por Ferreira, 2008a). No Brasil, o Instituto Butantã em São Paulo produziu milhões de doses de vacina com a linhagem VACV Lister, procedente da Inglaterra, sendo este vírus denominado aqui como Lister-Butantã (Lanna, 1980). No Rio de Janeiro a produção de vacinas utilizando a amostra de VACV-IOC do Instituto Oswaldo Cruz também foi amplamente utilizada durante a campanha de vacinação no Brasil (Damaso et al., 2000).

Entretanto, com a erradicação da varíola humana, a vacinação utilizando o VACV foi suspensa. Atualmente a vacinação apenas é recomendada para profissionais

que trabalham em laboratórios, manipulando estes agentes, além de alguns grupos de risco como profissionais da área de saúde e militares, nos Estados Unidos e em alguns países da Europa, devido ao receio de bioterrorismo (Hugles et al., 2011).

O VACV também tem importância história como vetor de expressão na produção de vacinas para raiva. A primeira vacina utilizando um poxvírus recombinante foi feita com o VACV, contendo o gene da glicoproteína G (gG) do vírus da raiva. Este vetor foi construído a partir da inserção do cDNA da gG do vírus da raiva no local do gene da timidina quinase em amostras Copenhagem do VACV. Essa vacina tem sido utilizada para a imunização oral de raposas e outros carnívoros de vida livre contra a raiva, a partir de 1987, na Bélgica, e tem propiciado o controle e até mesmo a erradicação desta doença em vários países europeus (Canal, 2007).

## **2.6 - Origem do VACV**

A origem do VACV ainda não está completamente estabelecida. Inicialmente algumas hipóteses sugeriram que o VACV poderia ser um mutante do VARV ou do CPXV. Entretanto, estudos filogenéticos recentes indicam que o VACV pode ter outras possíveis origens (Gubser et al., 2004; de Souza Trindade et al., 2007a). A permanência da circulação do VACV na natureza, mesmo após mais de 30 anos do encerramento da campanha de erradicação da varíola humana, faz com que a origem do vírus volte a ser discutida (de Souza Trindade et al., 2007; Abrahão et al., 2008; Drumond et al., 2008).

A primeira hipótese para tentar explicar a circulação do VACV no Brasil, sugeriu que esses vírus surgiram de amostras vacinais, durante a campanha de vacinação para a varíola humana, e que escaparam para a natureza persistindo em animais silvestres (Damaso et al., 2000). Com o avanço na realização de estudos moleculares e eco-epidemiológicos utilizando uma quantidade maior de genes do VACV foi revelada uma maior diversidade genética que permitiu dividir em dois grupos distintos as amostras envolvidas em surtos, não sendo observada uma relação direta entre as amostras envolvidas em surtos e as amostras de VACV utilizadas durante a campanha de vacinação (de Souza Trindade et al., 2007; Drumond et al., 2008). Em um surto ocorrido em 2001, no município de Guarani no estado de Minas Gerais foram isoladas duas amostras de VACV de diferentes propriedades: o *Guarani P1 virus* (GP1V) e o *Guarani P2 virus* (GP2V), contribuindo para suscitar a questão acerca da origem dos VACV (Trindade et al., 2006). A heterogeneidade genética entre estas duas amostras isoladas de um mesmo surto indicou que os VACVs circulantes no país provavelmente teriam mais de uma origem, e não apenas a vacinal, como proposto inicialmente por Damaso e colaboradores (2000).

Diante dessas novas evidências, novas hipóteses tem sido sugeridas para elucidar a origem das amostras envolvidas em surtos pelo VACV. Uma das hipótese é de que o VACV poderia ter diferentes e múltiplas origens. E mesmo considerando que exista uma origem comum, a pressão de seleção poderia gerar amostras diferentes devido à sua alta taxa de replicação em diferentes hospedeiros (revisado por Fonseca et al.,

2011). Outra hipótese sugere que exista um OPV indígena relacionado ao VACV que sempre esteve circulando na natureza. Trindade e colaboradores (2007) e Drumond e colaboradores (2008) descreveram variações genéticas em isolados brasileiros que podem sugerir a circulação de um ancestral desses isolados anterior à campanha de vacinação e que possivelmente continuam circulando até os dias de hoje.

## 2.7 - Hospedeiros

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

Bovinos, bubalinos, roedores, equinos, macacos e o homem podem ser hospedeiros do VACV (Lobato et al., 2005; Abrahão et al., 2009d; Abrahão et al. 2010c; Brum et al., 2010; Venkatesan et al., 2010). No homem, a doença tem caráter ocupacional, acometendo principalmente ordenhadores que tiveram contato com bovinos infectados que são os hospedeiros mais comumente descritos (de Souza Trindade et al., 2003; Lewis-Jones, 2004; Nagassane-Shughahara et al, 2004; Trindade et al., 2006).

Na Índia, o *Buffalopox virus*, um OPV considerado como uma subespécie do VACV, tem causado diversos surtos em humanos desde o seu primeiro relato em

1934 (Singh et al., 2007). Assim como nos casos de infecção por VACV no Brasil, nos humanos as lesões se localizam principalmente nas mãos e face, enquanto os búfalos domésticos (*Bubalus bubalis*) são acometidos nos tetos e úbere, geralmente com lesões acompanhadas de infecções secundárias como mamites (Venkatesan et al., 2010).

Equinos são também susceptíveis, como recentemente descrito em um surto envolvendo exclusivamente cavalos no sul do Brasil, em que vários animais desenvolveram lesões cutâneas no focinho, narinas externas, e nos lábios externos e internos (Brum et al., 2010). Em um trabalho posterior, duas amostras distintas de VACV, vírus Pelotas 1 (PIV) e Pelotas 2 (P2V) foram isoladas e identificadas de um mesmo equino acometido naquele surto (Campos et al., 2011).

Em duas espécies de macacos silvestres: *Cebus apella* (macaco-prego) e *Allouata caraya* (macaco barbado ou bugios) foram detectados DNA para o VACV, esses animais foram oriundos de um resgate de fauna, em uma área inundada durante a construção de usina hidrelétrica em Lajeado e Ipueiras, estado do Tocantins, na amazônia brasileira (Abrahão et al., 2010c).

Apesar de todos esses hospedeiros, o reservatório natural do VACV ainda não foi definitivamente determinado. Porém, a detecção do vírus em roedores sentinelas e silvestres, propõe que esses sejam os principais reservatórios (Lopes et al., 1965; Fonseca et al., 1998; Abrahão et al., 2009d), assim como descrito para CPXV na Europa em que roedores têm sido descritos como reservatórios, promovendo a transmissão

principalmente para felinos e animais de zoológico (Haenssle et al., 2006).

Em 1963 o vírus BeAn58058 (BAV) foi isolado de um roedor silvestre, do gênero *Oryzomys*, capturado na floresta de Utinga, na cidade de Belém, no estado do Pará (Lopes et al., 1965). O vírus SPAn 232 (SAV) e o *Cotia virus* foram isolados e re-isolados de camundongos sentinelas na estação de Cotia, estado de São Paulo (Fonseca et al., 1998). O *Belo Horizonte virus* (VBH) foi isolado de um surto exantemático no Centro de Bioterismo da UFMG, acometendo camundongos suíços provenientes da Universidade de Campinas, São Paulo (Diniz et al., 2001). Análises filogenéticas posteriores revelaram que todos os vírus citados são amostras de VACV (Fonseca et al., 1998; Marques et al., 2001; Fonseca et al., 2002; Trindade et al., 2004).

## 2.8 - Transmissão

A VB é uma zoonose classificada como uma anfixenose, pela característica de ser transmitida tanto do homem para os bovinos, quanto desses para o homem. O homem se infecta através do contato com as lesões presentes nas tetas dos animais doentes (Schatzmayr et al., 2000; Lobato et al., 2005). Lobato e colaboradores (2005), observaram casos humanos concomitantemente com casos em bovinos em 83% das propriedades envolvidas em um surto de VB, totalizando aproximadamente 110 pessoas.

Uma vez que a VB aparece em um rebanho a transmissão entre os bovinos ocorre principalmente através das mãos dos ordenhadores ou pelas ventosas dos

equipamentos de ordenha mecânica (Lobato et al., 2005) Em bezerros as lesões são observadas na gengiva, lábios e no focinho (Lobato et al., 2005; Leite et al., 2005), provavelmente devido ao contato com as lesões presentes nos tetos e úberes em vacas infectadas. A penetração dos vírus ocorre por soluções de continuidade em lesões pré-existentes nas tetas e úbere das vacas (revisado por Fenner et al., 1989; Blood e Radostitis, 1991).

Entre fazendas a doença pode ser transmitida pela introdução de bovinos infectados no rebanho e por ordenhadores que entram em contato com animais doentes em outras propriedades (Lobato et al., 2005; Megid, 2008). Estudo recente conduzido na região norte do Brasil mostrou a importância da comercialização e do trânsito de animais na difusão do VB nesta região (Quixabeira-Santos, et al., 2011).

A manipulação de latões de leite contaminados pode aumentar o risco de disseminar o VACV, caso nenhuma desinfecção seja realizada nas mãos do ordenhador ou nas alças de latões de leite. Uma vez que a mão do ordenhador pode ser infectada durante a ordenha manual através do contato direto com o teto com lesões, contaminando objetos como os latões de leite, ao tocá-los ou manuseá-los (Lobato et al., 2005; Madureira, 2009).

A transmissão do VACV através de roedores também deve ser considerada. Roedores silvestres podem ser os reservatórios naturais do vírus e contribuir para a disseminação viral, para roedores peridomiciliares, os quais por sua vez, podem ser a fonte da infecção nos surtos de VACV em bovinos (Abrahão et al., 2009d).

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

## **2.9 - Sinais clínicos**

Os OPV são epiteliotrópicos tendo como característica produzir lesões cutâneas (Esposito et al., 2001). As lesões locais causadas pelo VACV se apresentam nas formas proliferativas, ulceradas ou em crostas. Quando os vírus atingem a pele, inicia-se o desenvolvimento de um eritema cutâneo caracterizado pelo aparecimento de pequenas pápulas que evoluem para vesículas, podendo ulcerar, seguido pela formação de crostas escuras nas tetas e mais raramente no úbere, que terminam por cicatrizar dentro de 15 a 20 dias (Bremner e Henderson, 2002).

Nas vacas as lesões causadas por VACV normalmente estão confinadas às tetas e partes inferiores do úbere. O desenvolvimento de dor nas tetas pode interferir com a liberação do leite, causando retenção de leite e com isso, propiciar um ambiente rico para a ocorrência de mamite e outras infecções secundárias nas vacas afetadas (Blood e Radostitis, 1991). Lobato

e colaboradores (2005), relataram que 43% dos animais acometidos apresentaram mamite ou outro tipo de infecção secundária, durante ou após o aparecimento dos sinais clínicos.

Nos bezerros as lesões são observadas na região da boca, focinho e lábios. Reis e colaboradores (1970), citado por Madureira (2009), estudando um surto de VB no município de Patos de Minas, em Minas Gerais, em 1970, identificaram lesões no focinho de bezerro que amamentava em vaca com lesões agudas. Em um surto na cidade de Passatempo, Minas Gerais; Leite e colaboradores (2005) observaram que bezerros infectados apresentavam lesões na mucosa oral e focinho. Em 21% das propriedades visitadas em surtos na região da Zona da Mata Mineira também foi mencionada a doença em bezerros (Lobato et al., 2005).

Em humanos, a infecção é caracterizada por lesões ulcerativas e pustulares principalmente nas mãos, podendo acometer antebraços e face, além de sinais de febre, dor, mal estar, e linfadenopatia (Damaso et al., 2000; Schatzmayr et al., 2000; Lewis-Jones, 2004; Nagasse-Shugahara et al., 2004; Leite et al., 2005; Trindade et al., 2006). Entretanto, lesões podem aparecer em outros locais do corpo que apresentem soluções de continuidade na pele, considerando-se que as mãos podem apresentar grande quantidade de vírus nas feridas, ajudando a disseminar o vírus e levando à ocorrência de lesões nas pernas, no calcanhar e nos joelhos de ordenhadores (Madureira, 2009).

## **2.10 - VACV no Brasil acometendo bovinos e humanos**

Apenas dois países, Brasil e Índia, tem relatos de casos de infecções por VACV em humanos e animais, naturalmente infectados. Os outros casos envolvendo VACV ficaram restritos a acidentes ocorridos com pessoas que trabalham em laboratórios, devido à manipulação desses agentes, ou decorrentes de reações vacinais adversas em pessoas vacinadas como, por exemplo, soldados e enfermeiros vacinados, e de infecções secundárias em outros indivíduos expostos a estas pessoas vacinadas (Center for Disease Control and Prevention, 2007; Hughes et al., 2011).

A ocorrência de “varíola bovina” tem sido relatada no Brasil desde a década de 30, com registros de casos esporádicos nas décadas de 50 a 70, nos estados da Região Sudeste (Silva e Moraes, 1960; Reis et al., 1970). Nas décadas de 80 e 90 alguns casos foram descritos (Silva et al., 1986), porém, desde o final da década de 90 houve aumento exacerbado do número de relatos de surtos de uma doença semelhante à varíola bovina em diferentes regiões do país, sendo o VACV confirmado como o agente etiológico envolvido nesses surtos (Schatzmayer et al., 2000; de Souza Trindade et al., 2003; Lobato et al., 2005; Nagasse-Shugara et al., 2005).

No Brasil esses surtos causados pelo VACV tem sido descritos acometendo bovinos e o homem em 13 das 26 unidades federativas (UF) (Figura 4). Espírito Santo (Donatele et al., 2003), Bahia, Maranhão (Kroon, dados não publicados), Pernambuco (Damaso et al., 2007), Rondônia e Mato Grosso (Quixabeira-



Santos et al., 2011), Pará (Vinhote et al., 2011); Tocantins (Medaglia et al., 2009), Rio de Janeiro (Damasco et al., 2000; Schatzmayr et al., 2012), Minas Gerais (de Souza Trindade et al., 2003; Lobato et al., 2005; Leite et al., 2005; Trindade et al.,

2006, Madureira, 2009), Goiás (Nagasse-Shugahara et al., 2004), São Paulo (Mendes et al., 1999; Nagasse-Shugahara et al., 2004; Megid et al., 2008; Megid et al., 2012) e Mato Grosso do Sul (Lemos et al., 1999).

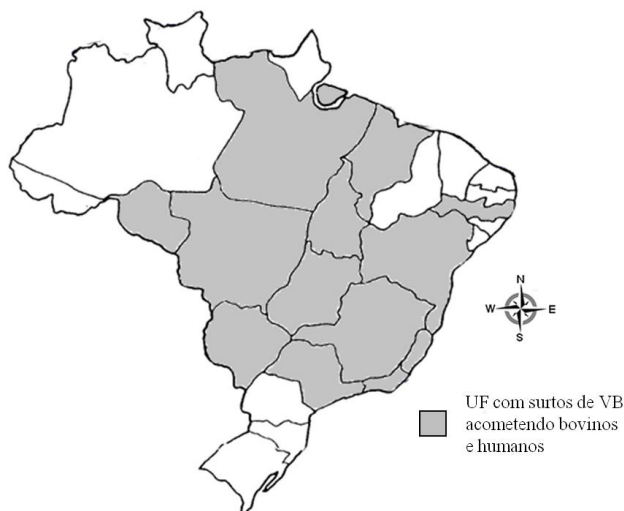


Figura 4 - Estados brasileiros com surtos diagnosticados para *Vaccinia virus*, com acometimento de bovinos e humanos durante o período de 1999 a 2011.

Lobato e colaboradores (2005), em estudo de surtos ocorridos no ano de 2001 no estado de Minas Gerais, descreveram os principais problemas causados pela doença: queda na produção de leite, que pode chegar até a 80%; ocorrência de infecção secundária, especialmente mamite em até 50% dos casos; gastos com medicamentos; acometimento de bezerros que mamam nas vacas doentes e custos com a contratação de novos empregados, pois o ordenhador doente se afasta por mais de uma semana, sendo necessária a contratação de um novo ordenhador.

## 2.11 - Métodos de diagnóstico para o VACV

O diagnóstico laboratorial pode ser realizado a partir do isolamento viral, da microscopia eletrônica, da sorologia e por técnicas de biologia molecular, tais como a reação em cadeia da polimerase (PCR) (Damaso et al., 2000; de Souza Trindade et al., 2003).

O isolamento viral é realizado em ovos embrionados de galinha através da inoculação de amostras suspeitas na membrana corioalantóide (MCA) e, após incubação por 72 horas, observa-se se há a formação de *pocks* grandes e esbranquiçados, típicos do VACV. Em

cultivo celulares, também pode ser feito o isolamento viral através da inoculação de amostras suspeitas em monocamadas de células Vero ou BSC-40, linhagens contínuas derivadas de células epiteliais de rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*), ou em cultivos primários de fibroblastos embrionários de galinha para detecção de efeito citopático (Diniz et al., 2001; Damon et al., 2007).

O teste da PCR para diagnóstico de agentes virais em materiais clínicos é realizado utilizando-se genes característicos dos OPV que codificam, por exemplo, a enzima timidina quinase (TK), o fator de crescimento do VACV (VGF) (Fonseca et al. 1998; Abrahão et al., 2010a), a proteína do corpúsculo de inclusão do tipo A (ATI) e a hemaglutinina viral (HA) (Roop et al., 1995; Fonseca et al., 1998; de Souza Trindade et al., 2003; de Souza Trindade et al., 2008). Ensaios de PCR convencionais, *semi-nested*, *nested*, multiplex e em tempo real tem sido descritos para identificar OPV ou especificamente o VACV em diversos espécimes clínicos (Fonseca et al., 1998; de Souza Trindade et al., 2003; Carletti et al., 2005; Damaso et al., 2007; de Souza Trindade et al., 2008; Abrahão et al., 2009b; Abrahão et al., 2010a). Após a amplificação pela PCR, as amostras podem ainda ser sequenciadas ou submetidas aos ensaios de RFLP (Polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição) (Meyer et al., 1997).

Anticorpos totais podem ser detectados pelos testes de ensaio imunoenzimático em fase sólida (ELISA), imunofluorescência, imunoperoxidase em monocamada celular (IPMC), e anticorpos neutralizantes pelo teste de soroneutralização por redução do

número de placas (Leite et al., 2005; Mota et al., 2010; Gerber et al., 2012 em publicação).

No diagnóstico diferencial, deve ser realizada a pesquisa para outros poxvírus, além de se considerar a possibilidade de co-infecções, como relatado em um surto na cidade de Resplendor, Minas Gerais, em que foi diagnosticada nos bovinos e em seus ordenhadores a co-infecção entre o VACV e o PSCV (Abrahão et al., 2010b). Também é recomendável que se faça o diagnóstico para várias outras enfermidades, principalmente para outras doenças vesiculares dos bovinos, como por exemplo a mamilite herpética, estomatite vesicular e febre aftosa.

## **2.12 - Patogênese dos OPV**

Nas infecções causadas pelos OPV, em que as lesões estão associadas à entrada inicial através de microabrasões na pele (revisado por Fenner et al., 1989), ocorre multiplicação inicial no local de infecção, para posteriormente o vírus atingir os linfonodos adjacentes causando linfadenopatia regional, característica esta comum aos OPV (Buller e Palumbo, 1991). No local da lesão ocorre vasodilatação dos capilares na derme da região acometida seguida pela migração de células polimorfonucleares, formando-se assim o eritema e a pústula, respectivamente, que, em seguida, evoluem para a formação de edema intra e intercelular, com a formação de vesículas, as quais possuem altos títulos virais, representando a maior fonte de infecção por contato. As vesículas, geralmente, sofrem ulceração para, posteriormente, ocorrer o desenvolvimento

de crostas, que por último evoluem para cicatrização (Buller e Palumbo, 1991).

Diversos modelos animais de estudo da patogênese dos OPV tem sido propostos para a elucidação das infecções causadas pelo VACV, ECTV, MPXV e CPXV (Esteban e Buller, 2005). Atualmente, aspectos relacionados a patogênese de amostras brasileiras isoladas de surtos de VACV tem sido estudados em modelos experimentais, utilizando camundongos e coelhos (Ferreira et al., 2008b; Campos et al., 2011; Cargnelutti et al., 2012).

Em infecções experimentais por via intranasal em camundongos Balb/c com algumas amostras brasileiras, isoladas a partir de surtos de VB, Ferreira e colaboradores (2008b) confirmaram a existência de dois diferentes grupos de VACV que circulam no Brasil com virulência e característica distintas. Sendo que em um grupo de amostras de VACV (grupo 2) (GP1V, VBH, SAV e BAV) a infecção causa sinais clínicos e morte em camundongos infectados e em outro (grupo 1) (ARAV, GP2V e PSTV), a infecção não provoca sinais clínicos ou a morte de camundongos. Nos animais infectados com amostras de VACV do grupo 2 foram observados sinais clínicos severos demonstrados pela pilo-ereção, arqueamento do dorso e perda de peso significativa. Altos títulos virais foram detectados em sítios primários da infecção como traquéia e pulmões, mas também foi observado tropismo do VACV por outros órgãos, incluindo cérebro, fígado, rins, coração e baço.

Essa separação de amostras brasileiras em dois grupos filogenéticos e com

características e virulência distintas, também foi estudada por Campos e colaboradores (2011) em duas amostras isoladas (P1V e P2V) de equino com lesões cutâneas graves. Essas amostras, apesar de terem sido isoladas de uma mesma lesão clínica exantemática, mostraram também perfis de virulência distintos em infecções intranasais com camundongos Balb/c.

Cargnelutti e colaboradores (2012), utilizando as amostras P1V e P2V, demonstraram em ambas as amostras que coelhos são mais suscetíveis ao VACV do que os camundongos, reproduzindo um quadro respiratório grave e uma doença sistêmica após a inoculação intranasal. O aparecimento de lesões nas orelhas e nas pálpebras e a presença do vírus no sangue, intestino e no pulmão indicaram uma disseminação sistêmica do vírus. A presença de grande quantidade de vírus isolado de tecido pulmonar dos coelhos infectados, sugere que as alterações pulmonares foram consequência da replicação maciça do vírus neste tecido.

A infecção pelo ECTV, também conhecido como *Mousepox*, tem sido extensivamente utilizada como modelo para o estudo da patogenia das infecções por OPV. Fenner (1948), descreveu que o ECTV, em infecções sistêmicas em camundongos multiplica-se no local de entrada, em seguida alcança a corrente sanguínea e o sistema linfático, causando viremia primária. Posteriormente, os vírus alcançam órgãos vascularizados, como o baço e o fígado, se multiplicam nestes órgãos produzindo focos necróticos, e retornam à corrente sanguínea, causando a viremia secundária. Os vírus se disseminam pela corrente sanguínea tanto como partículas livres como associados às células

sanguíneas. Após a viremia secundária, os vírus alcançam outros órgãos, como rins, intestinos, pulmões e pele, sendo que neste último tecido causam lesões ulcerativas típicas.

Nas infecções pelo VARV e pelo MPXV as manifestações clínicas são generalizadas. No homem o VARV promove a infecção através do trato respiratório, enquanto que a infecção com o MPXV em macacos ocorre através de lesões na pele e na mucosa oral. Após a multiplicação viral no sítio de entrada, ocorre o comprometimento dos órgãos linfáticos e circulação dos vírus na corrente sanguínea (viremia primária) com consequente infecção de órgãos como baço e fígado e multiplicação viral nestes, com nova circulação dos vírus na corrente sanguínea (viremia secundária). Em seguida surgem as lesões características da doença em outros órgãos como rins, intestino, pulmões e pele (Breman e Henderson, 2002; revisado por Chapman et al., 2010).

### **2.12.1 - Resposta imune**

A resposta imune contra os poxvírus é complexa e multifatorial, sendo importante para conter e eliminar as infecções causadas pelos poxvírus (Putz et al., 2006). Alguns modelos de infecção animal têm sido usados para o estudo da resposta imune em poxvírus. Chaudri e colaboradores (2006), estudando infecções com o ECTV em camundongos, demonstraram o papel importante de citocinas e linfócitos T no controle de estágios agudos, mas também mostraram que anticorpos previnem a disseminação do vírus na pele e a formação de lesões, as quais são cruciais na transmissão. A crescente evidência de que os anticorpos são necessários para a prevenção e controle de infecções pelos

poxvírus tem derrubado o forte dogma da maior importância da imunidade celular para os poxvírus, hipótese que foi dominante por muito tempo (Panchanathan et al., 2008).

Os anticorpos auxiliam no controle da infecção através de vários mecanismos como a neutralização viral, ativação do complemento, opsonização e citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos (Smith e Kotwal, 2002). Estudos em modelos animais mostraram que anticorpos neutralizantes contra OPV são imprescindíveis na geração de proteção contra novas infecções por poxvírus e também para a sua eliminação (Edghill-Smith et al., 2005). As partículas infecciosas do VACV compostas nas forma de vírus maduro intracelular e do vírus envelopado extracelular podem ser neutralizadas por anticorpos. No entanto, anticorpos neutralizantes formados contra o vírus envelopado extracelular não podem neutralizar o vírus maduro intracelular e vice-versa (Law e Smith, 2001). Este fato deve-se a composição das proteínas de membrana que são diferentes de acordo com a forma viral (Moss, 2006).

Vírus com grandes genomas, como os poxvírus, carregam genes não essenciais para a sua multiplicação, mas que codificam várias proteínas imunomodulatórias, bloqueando ou diminuindo a ação de citocinas e mecanismos do sistema imune inato (Cramptom et al, 2010). Deste modo, estas proteínas são importantes fatores de virulência que contribuem significativamente para a manutenção de infecções virais (Frebel et al., 2010).

Mesmo a resposta imune contra os poxvírus sendo complexa e multifatorial, acredita-se que a imunidade mediada por células e a imunidade humoral são complementares e essenciais nas infecções por poxvírus (Xu et al., 2004). Contudo, a resposta imune induzida pela infecção com poxvírus continua sendo bastante discutida e existe pouco consenso sobre a sua capacidade de proteção em reinfecções (Panchanathan et al., 2008).

### 2.12.2 - Vias de excreção

Estudos referentes às vias de excreção dos OPV ainda são escassos. Em infecções

causadas por outros OPV, podem ser descritas mais de uma via de excreção (Quadro 1). Na infecção por VARV as partículas virais são excretadas por fluídos orofaríngeos, secreções da conjuntiva e através da urina em pacientes humanos, ocorrendo decréscimo na concentração de vírus eliminados durante a fase de coalescência (Sarkar, 1973). Camundongos infectados com pequenas doses de ECTV, não apresentaram os sinais clínicos característicos, mas partículas virais foram detectadas em fezes, urina e em lesões próximas ao ânus, durante algumas semanas após a infecção (revisado por Fenner et al., 1989).

Quadro 1 - Estudos referentes aos OPV sobre as suas vias e períodos de excreção viral.

OPV	Hospedeiro	Excreção	Período	Referência
<i>Variola virus</i>	Humanos	fluídos orofaríngeos, secreções da conjuntiva e urina	fase de coalescência com decréscimo na concentração de vírus eliminados	Sarkar, 1973
<i>Cowpox virus</i>	Roedores ( <i>Rattus norvegicus</i> )	fezes e urina	> 30 dias	Maiboroda, 1982
<i>Ectromelia virus</i>	Camundongo	fezes, urina	semanas após a infecção	Gledhill, 1962
		fezes	47 dias pós-infecção	Wallace e, Buller, 1985
<i>Monkeypox virus</i>	Cão da pradaria ( <i>Cynomys ludovicianus</i> )	secreções orais, nasais, oculares e fezes	-	Hutson et al., 2009
<i>Vaccinia virus</i>	Camundongo (Balb/c)	fezes, urina e saliva	DNA viral e partículas viáveis 30 dias após-infecção nas fezes	Ferreira et al., 2008a
	Bovinos	leite	-	Abrahão et al., 2009c; Megid et al., 2012
	Coelhos	Secreções nasais e fezes	30 dias	Cargnelutti, et al., 2012

Infecções experimentais tem sido realizadas para estudar amostras isoladas em surtos envolvendo o VACV no Brasil. Em um

estudo utilizando a amostra Guarani P2 isolada em um surto em que houve acometimento de bovinos e de humanos, foi

realizada a inoculação intranasal de camundongos (Balb/c), sendo possível detectar DNA viral em amostras de fezes, urina e saliva (Ferreira et al., 2008a).

Em amostras de VACV isoladas de equinos com lesões cutâneas, Cargnelutti e colaboradores (2012), inoculando coelhos por via intranasal, conseguiram detectar o DNA viral em secreções nasais e nas fezes.

Nalca e Nichols (2011) relataram que em coelhos, a via de transmissão aerógena é uma importante rota de transmissão em modelo de estudo para o *Rabbitpox*. Este vírus é considerado filogeneticamente relacionado às amostras VACV-WR e VACV-Ankara. O trato respiratório é a via de infecção mais recorrente, constituindo a mais provável via de entrada nos OPV como o CMLV, o VARV e o MPXV (Coras et al., 2005; Hutson et al., 2011).

Da mesma maneira que em outros modelos envolvendo os OPV, nas infecções causadas pelo VACV em bovinos as vias de excreção não estão completamente definidas. A única via de excreção conhecida até o momento foi demonstrada por Abrahão e colaboradores, (2009c) na detecção de partículas virais infecciosas de VACV e por Megid e colaboradores, (2012) através da detecção do DNA de VACV no leite de bovinos naturalmente infectados.

#### **2.12.2.1 - Fezes**

Existem poucos dados disponíveis a respeito das vias de excreção dos poxvírus, e não é conhecida a importância dessas vias na transmissão horizontal do VACV (de Souza Trindade et al., 2007a; Abrahão et al., 2008; Drumond et al., 2008). A

constante circulação e a manutenção de partículas infecciosas na natureza representam alguns dos desafios impostos para a sua permanência. Estratégias de excreção, resistência ambiental e disseminação foram selecionadas e modeladas ao longo da evolução, e são fundamentais na logística infectiva (Maiboroda, 1982).

A presença do VACV nas fezes de *Mus musculus* (camundongos Balb/c) experimentalmente infectados, tem sido relatada em estudos que sugerem que esses excrementos possam ser relevantes para a circulação viral entre roedores. Ferreira e colaboradores (2008a) mostraram que camundongos sentinelas expostos às excretas contaminadas com VACV se infectam, e passam a eliminar partículas e DNA viral nas suas fezes, por pelo menos 30 dias pós-infecção.

Em outro estudo com o VACV foram utilizadas amostras isoladas durante um surto envolvendo somente equinos com lesões cutâneas graves, tendo Cargnelutti e colaboradores (2012) inoculado coelhos brancos da Nova Zelândia detectando o DNA nas fezes desses animais em dias alternados durante 30 dias.

A excreção viral nas fezes também já foi evidenciada para outros OPV como o CPXV, MPXV, e o ECTV (Gledhill, 1962; Maiboroda, 1982, Wallace e Buller, 1985; Hutson et al., 2009). Em um estudo sobre vias de excreção com OPV, que envolveu o CPXV (*Ratpox virus*, uma variante biológica de CPXV), Maiboroda, (1982) observou no roedor *Rattus norvegicus* uma alta de morbidade e mortalidade. No entanto, os animais que sobreviviam,

permaneciam eliminando o vírus nas fezes, por mais de 30 dias, comprovado através da observação de lesões hemorrágicas em membranas corioalantóides, após a inoculação do material biológico em ovos embrionados de galinha. Altos títulos ( $10^9$  UFP) virais foram observados, inclusive no reto dos animais, indicando que esta porção do intestino representa uma considerável fonte de disseminação de partículas virais. Em infecções de cães de pradaria (*Cynomys ludovicianus*) com amostras de MPXV (Amostra Africana do Oeste e Bacia do Congo). As inoculações foram realizadas em quatro animais através da inoculação via intradérmica por escarificação, obtendo-se detecção de DNA viral para as duas amostras de MPXV entre o 3º e o 15º d.p.i. (Hutson et al., 2009).

Também nas fezes de camundongos infectados por ECTV foram detectadas partículas virais (Gledhill, 1962; Wallace e Buller, 1985). Infecções em camundongos causadas por pequenas doses de ECTV não apresentam os sinais clínicos característicos, mas partículas virais puderam ser detectadas em fezes por semanas e também em lesões próximas ao ânus (Gledhill, 1962). Wallace e Buller (1985), após inoculação intragástrica com o ECTV em modelo murino, recuperaram partículas virais infecciosas nas fezes durante 47 d.p.i.

### **3. OBJETIVO**

#### **3.1 - Objetivo geral**

Verificar a ocorrência e quantificar a viremia e a excreção do VACV nas fezes e a sua distribuição em tecidos de vacas em

lactação experimentalmente infectadas com o vírus.

#### **3.2 - Objetivos específicos**

**3.2.1** - Estudar a ocorrência de viremia e o perfil de excreção do VACV nas fezes, estabelecendo o período e a quantidade de vírus excretado após a infecção experimental.

**3.2.2** - Estudar a excreção do VACV nas fezes de vacas infectadas e imunodeprimidas experimentalmente após a recuperação dos sinais clínicos.

**3.2.3** - Pesquisar a presença do VACV em amostras de fezes e sangue de bovinos após reinfeção experimental.

**3.2.4** - Estudar a distribuição do VACV nos bovinos, detectando e quantificando o vírus em tecidos de animais experimentalmente infectados e posteriormente reinfectados ou imunodeprimidos.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **4.1 - Locais dos experimentos**

O experimento com os animais foi realizado no Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO) pertencente ao Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), localizado no município de Pedro Leopoldo. O processamento das amostras e as análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Vírus do Instituto de Ciências Biológicas e no Laboratório de Pesquisa em Virologia Animal da Escola de Veterinária, ambos da UFMG.

#### 4.2 - Seleção dos animais

Os animais que participaram do experimento foram selecionados a partir de duas fazendas localizadas nos municípios de Confins e Pedro Leopoldo, através de exames clínicos e pelo teste de soroneutralização por redução do número de placas, sendo usado o VACV amostra Western Reserve (WR), de acordo com Leparç-Goffart e colaboradores (2005). O título do soro foi calculado pelo inverso da diluição capaz de neutralizar 50% do número de placas que foram detectadas nos controles de vírus. Foram considerados positivos os soros com títulos maiores ou iguais a 20.

#### 4.3 - Condições de alojamento e manutenção dos animais

Os animais foram vermifugados e submetidos à aplicação de carrapaticida *pour-on*, antes de serem alojados em baias de concreto com dimensões 3,5 m x 3,5 m, separadas entre si por paredes de concreto e que impediam o contato com outros animais. A cama de descanso dos animais foi constituída de serragem e feno com trocas realizadas diariamente ou sempre que necessário. A manutenção das vacas foi realizada por um funcionário e pelos estudantes envolvidos no projeto.

Devido ao longo período de manutenção em área fechada os animais foram suplementados com vitaminas A, D e E por via intramuscular. Os animais receberam duas refeições diárias, compostas cada uma por 10 kg de feno e 2 kg de ração (22 a 24% de proteína). O sal mineral foi fornecido à vontade, calculando-se aproximadamente

50 g por animal por dia. A água foi fornecida *ad libidum*.

A área do experimento possuía acesso restrito e foi planejada para que não houvesse disseminação do vírus para o ambiente. Os dejetos (fezes e cama) foram descartados duas vezes por dia em fossas de 3,0 m x 2,5 m, abertas na área experimental e, em seguida, cobertos com cal e terra. Os efluentes da lavagem das baias foram descartados em fossa séptica exclusiva para as baias de inoculação.

#### 4.4 - Vírus utilizado

Foi utilizado o VACV amostra Guarani P2 (GP2V) isolado de vacas com lesões nos tetos, no ano de 2001, a partir de um surto de VB ocorrido no município de Guarani, Minas Gerais e já caracterizado sorológica e molecularmente (Trindade et al., 2006). O vírus utilizado foi um re-isolado obtido a partir de crostas de um animal infectado experimentalmente com um clone do isolado original, durante um pré-experimento.

Estoques de amostra GP2V do VACV foram cultivados com uma multiplicidade de infecção de 0,01 em células Vero (linhagem contínua de epitélio de rim de macaco verde africano, *Cercopithecus aethiops*) obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC), catálogo número CCL-81 (Maryland, Estados Unidos) semeadas em meio mínimo essencial de Eagle (MEM) (GIBCO™) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB), gentamicina (50 µg/mL), penicilina potássica (200 U/mL) e anfotericina B (2,5 µg/mL), sob incubação a 37°C, por 1 hora, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> para adsorção



do vírus. Posteriormente foram adicionados MEM com 1% de SBF e as garrafas foram mantidas sob a mesma temperatura até o aparecimento do efeito citopático (ECP) com a destruição de 90% da monocamada. Após, o meio foi desprezado, as células foram raspadas e coletadas em tampão Tris-HCl 10 mM, pH 8,0. A suspensão obtida foi centrifugada durante 10 minutos a 1500 rpm (rotor H1000B - Sorvall RT6000 B), a 4°C, e o sedimento obtido foi mantido à temperatura de -70°C, para purificação (Trigueiro, 2004).

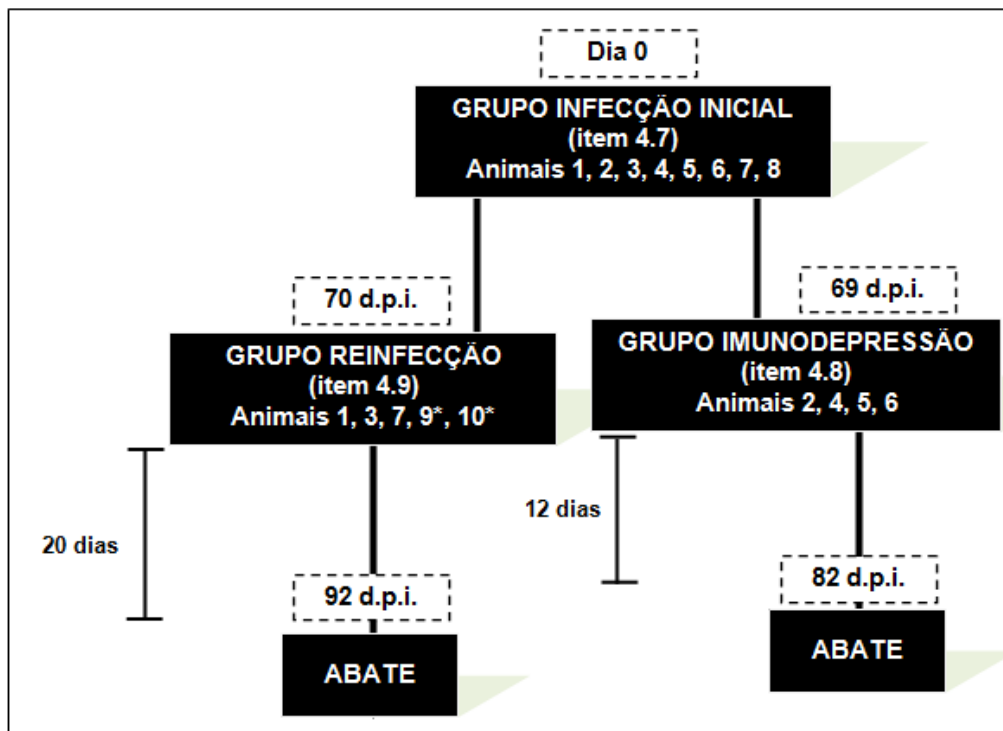
Para a purificação do vírus, o sedimento foi suspenso, em seguida centrifugado a 2.500 rpm (rotor H1000B - Sorvall RT6000 B) durante 15 minutos a 4°C. O sobrenadante obtido foi mantido em banho de gelo e o sedimento celular foi lisado duas vezes em 10 mL de solução de lise (MgCl<sub>2</sub> 1mM; Tris 10mM, pH 7,0; KCl 10mM). Após a adição desta solução, a suspensão foi incubada em banho de gelo por 10 minutos e homogeneizada mecanicamente 80 vezes em *dounce* e centrifugada duas vezes para liberação das partículas virais a 23.000 g durante 2 horas a 4°C, em colchão de sacarose a 36% em Tris-HCl, 10 mM, pH 8,0. O sedimento foi homogeneizado em 500 µL de Tris-HCl 10 mM pH 8,0, distribuído em alíquotas de 5 µL e mantido a -70 ° C (Joklik, 1962).

#### **4.5 - Animais inoculados**

Foram utilizadas dez vacas mestiças (holandês e gir) em lactação, sem bezerro ao pé e soronegativas para OPV, previamente testadas pelo teste de soroneutralização por redução do número de placas (Leparc-Goffart et al., 2005). O experimento foi realizado de acordo com as normas do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), registrado sob o número CETEA - 167/2009. A identificação de cada animal foi realizada através de brincos.

#### **4.6 - Delineamento do experimento**

O experimento constou de duas partes envolvendo dez animais, sendo que na primeira (grupo da infecção inicial) foram utilizadas oito vacas. Na segunda, as vacas foram divididas em dois grupos, o primeiro com quatro vacas (grupo da imunodepressão) e o segundo com cinco vacas (grupo da reinfecção), sendo que para tanto foram utilizadas sete vacas da primeira parte do experimento e outras duas vacas que participaram de um pré-experimento realizado 9 meses antes deste experimento (Figura 5).



\*Obs: Os animais 9 e 10 foram incorporados ao grupo da reinfecção após serem submetidos inoculação inicial em pré-experimento realizado nove meses antes deste experimento.

Figura 5 - Esquema mostrando a divisão dos animais nos grupos experimentais, duração dos acompanhamentos em cada grupo e dias pós-infecção inicial em que foram realizados a reinfecção, imunodepressão e o abate dos animais.

#### 4.7 - Infecção inicial

Para a inoculação, os tetos foram limpos e então escarificados com auxílio de uma lixa do tipo esmeril número 4 (JX-41, Lixas Doble A, Argentina), a pele de três tetos foram inoculadas com 50µL de suspensão viral contendo 10<sup>6</sup> unidades formadoras de placa (UFP) de GP2V. O teto posterior esquerdo foi reservado como controle negativo da inoculação.

#### 4.8 - Imunodepressão

Com 69 dias pós-inoculação (d.p.i), quatro dos animais que participaram da infecção inicial foram imunodeprimidos através da administração por via intramuscular de 0,1

mg de dexametasona/kg de peso vivo durante cinco dias seguidos, conforme descrito por Iketani e colaboradores, (2002).

#### 4.9 - Reinfecção

Com 70 d.p.i., cinco animais foram reinoculados com o mesmo vírus e da mesma maneira como descrito para a infecção inicial no item 4.7. Três desses animais foram oriundos do grupo da infecção inicial, enquanto dois animais foram incorporados ao grupo da reinfecção após serem submetidos a inoculação inicial em um pré-experimento realizado nove meses antes deste experimento.

Neste pré-experimento as vacas tiveram os tetos escarificados com auxílio de agulha hipodérmica em sítio delimitado na área central de cada teto (Rehfeld, 2011).

#### 4.10 - Coleta e processamento das amostras

As amostras de fezes e sangue total foram coletadas durante 90 d.p.i. Após a infecção inicial as amostras foram coletadas

diariamente durante os 15 d.p.i. e em dias alternados até o 67º d.p.i. Para os grupos dos animais reinfetados e imunodeprimidos as amostras foram coletadas diariamente até o 81º e o 90º d.p.i., respectivamente (Figura 6).

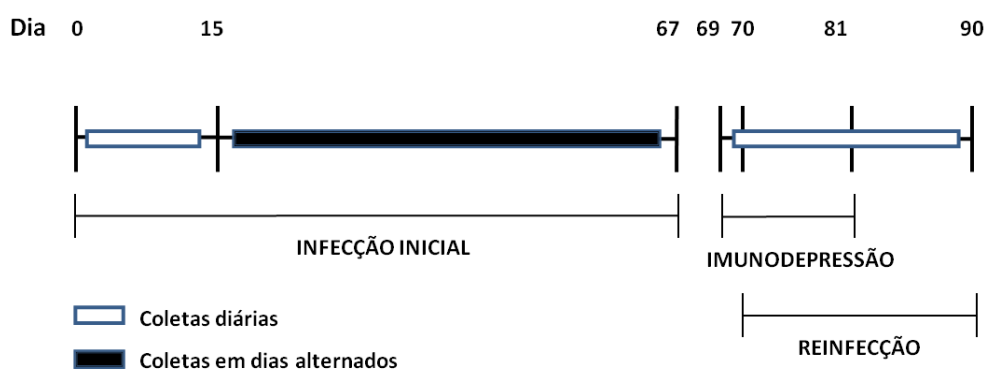


Figura 6 - Frequência das coletas de sangue e fezes nos grupos experimentais.

Durante a coleta foram utilizadas luvas de látex descartáveis, trocadas a cada coleta de amostra, assim como entre os animais. Todas as medidas necessárias foram adotadas para que houvesse a devida proteção da equipe responsável pela procedimento e também para garantir que não houvesse contaminação cruzada entre as amostras coletadas e os animais do experimento.

##### 4.10.1 - Fezes

As fezes foram coletadas uma vez ao dia no período da manhã pela via retal. Foram transportadas sob refrigeração para o laboratório e então divididas em duas alíquotas de aproximadamente 2 g cada uma, para a realização dos testes

moleculares e outra para o isolamento viral, sendo posteriormente acondicionadas a -20°C. Para a realização dos testes as alíquotas foram descongeladas e diluídas na proporção de 1g para 2 mL de PBS (500 mg mL<sup>-1</sup>).

##### 4.10.2 - Sangue total

O sangue foi obtido através de punção da veia mamária ou coccígea. Foram coletados aproximadamente 4 mL de sangue em EDTA, os quais foram transportados e acondicionados da mesma forma como descrito para as fezes. Para a realização dos testes moleculares e de isolamento viral as alíquotas foram descongeladas e diluídas na proporção de 1 mL de sangue para 2 mL de PBS.

#### 4.10.3 - Tecidos

Após o término do acompanhamento e coleta de amostras dos animais os grupos da imunodepressão e reinfecção foram abatidos no 82° e no 92° d.p.i., respectivamente. Os animais apresentavam-se clinicamente sadios e com as lesões totalmente recuperadas. O abate foi realizado em um matadouro frigorífico no qual foi realizado a coleta de fragmentos dos seguintes tecidos: tonsila, linfonodo mesentérico, íleo, baço, linfonodos retromamários, glândulas mamárias e tetos. Foram feitas alíquotas dos tecidos que tiveram o seguinte destino: fixação no tampão formalina a 10% para realização de imunohistoquímica (IHQ) e fragmentos dos mesmos tecidos, que foram inicialmente refrigerados e, posteriormente foram conservados a -70°C para realização dos testes moleculares e para tentativa de isolamento viral. As alíquotas destinadas ao isolamento viral e às provas moleculares foram maceradas utilizando nitrogênio líquido com auxílio de um pistilo em uma diluição de 1:10 em PBS.

#### 4.11 - Provas moleculares

A PCR *nested* para o gene *vgf* (Abrahão et al., 2009b) foi utilizada para detecção do DNA viral em todas as amostras de sangue, fezes e tecidos coletados. A PCR em tempo real para o gene *ha* (de Souza Trindade et al., 2008) foi utilizada em todas as amostras positivas na PCR *nested* para quantificar o DNA do VACV.

O DNA total das amostras foi extraído pela técnica de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) (PCI), segundo

Sambrook e colaboradores (1989) e quantificado por espectrofotometria através da leitura da densidade óptica a 260 nm, para avaliar a quantidade de DNA, e a 280 nm para estimar a contaminação com proteínas. A concentração de uso nas provas moleculares foi ajustada para 100 ng/μL de DNA em cada amostra analisada.

Nos controles positivos foram utilizados 10<sup>5</sup> UFP/μL de VACV-WR purificado na PCR *nested* e nas concentrações de 10<sup>4</sup> a 10<sup>0</sup> UFP por reação na PCR em tempo real. Nos controles negativos, foi adicionada água no lugar das amostras testadas para o PCR *nested* e DNA de fezes dos animais obtidas no dia anterior às inoculações.

#### 4.11.1 - Teste de sensibilidade analítica

Com o objetivo de estabelecer a sensibilidade analítica para a detecção do VACV pela PCR *nested* no sangue e nas fezes de bovinos foram coletadas amostras desses espécimes clínicos e confirmadas como negativas pela PCR *nested* a partir de seis vacas sorologicamente negativas para VACV.

Foram realizados quatro *pools* de 1 kg de fezes e quatro *pools* de 24 mL de sangue. Os *pools* de fezes e sangue foram contaminados com VACV-WR para cada um conter 1, 10, 10<sup>2</sup> e 10<sup>3</sup> UFP/g ou mL, sendo retirado 5 alíquotas de 1mL e 1g, respectivamente para sangue e fezes, em cada um desses *pools* para a realização da PCR *nested* a partir do DNA total obtido através da extração pelo método de PCI.

#### 4.11.2 - PCR *nested*

A reação de PCR *nested* para a amplificação do gene *vgf* foi realizada em duas etapas. Na primeira, foram utilizados os iniciadores VGF F e VGF R, que amplificam um fragmento de 381 pares de

bases (pb). O produto desta reação foi utilizado como molde para a segunda etapa de amplificação, que utiliza os iniciadores VGF RT-R e VGF RT-F, cujo produto final é um amplificado de 180 pb (Tabela 1) (Abrahão et al., 2009b).

Tabela 1 - Iniciadores utilizados para amplificação de fragmentos do gene *vgf* utilizando a PCR *nested*.

Iniciador	Sequência	Tamanho produto PCR (pb)	Referência
VGF R	5' ATA AAA ATT ATG GCA CAA CCA TAT C 3'	381	Fonseca et al., (1998)
VGF F	5' CGC AGG ATC CAT AAT CAG TCA TT 3'		
VGF RT-R	5'CTA ATA CAA GCA TAA TAC 3'	180	Abrahão et al., (2009b)
VGF RT-F	5' ACA CGG TGA CTG TAT CCA 3'		

Nas duas etapas de amplificação foram utilizadas as mesmas condições salinas, enzimáticas e térmicas descritas a seguir: 2,0mM de MgCl<sub>2</sub>, 10mM dos nucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 2U de *Taq* DNA polimerase (Promega), 2,0μL de Tampão 10X de *Taq* polimerase, 4pmol dos iniciadores específicos, 1μL de amostra e 500ng de albumina sérica bovina (BSA), em volume total de 20μL por reação. Desnaturação inicial de 94°C por 9 minutos, seguido por 30 ciclos de 94°C por 1 min (desnaturação), 45°C por 1 min (pareamento), 72°C por 1 min (polimerização), e uma extensão final de 72°C por 10 min.

Os fragmentos amplificados na segunda etapa foram fracionados por eletroforese em gel de acrilamida:bisacrilamida (29,2:0,8) (PAGE) 8% sob voltagem de 100V e corados por prata.

#### 4.11.3 - PCR em tempo real

A PCR em tempo real que foi utilizada amplifica um fragmento do gene *ha* utilizando iniciadores genéricos que são capazes de detectar diferentes amostras de VACV. No caso da amostra GP2V são amplificados fragmentos de 166 pb (de Souza Trindade et al., 2008) (Tabela 2).

Tabela 2 - Iniciadores utilizados para amplificação do gene *ha* na PCR em tempo real.

Iniciador	Sequência	Tamanho produto PCR (pb)	Referência
HA F	5' CAT CAT CTG GAA TTG TCA CTA CTA AA 3'	166	de Souza Trindade et al., (2008)
HA R	5' ACG GCC GAC AAT ATA ATT AAT GC 3'		

As condições da reação para a PCR em tempo real foram estabelecidas para a plataforma *Applied Biosystems Step One* (Life Technologies, EUA) em um volume total de reação de 20 µL, utilizando um mix caseiro contendo 2,0mM de MgCl<sub>2</sub>, 40mM dos nucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 2U de *Taq* DNA polimerase (Promega), 2,0µL de Tampão 10X de *Taq* polimerase, 4µM dos iniciadores específicos, fluoróforo EVA green (Roche, Branchburg, New Jersey, EUA) e 50 a 100 ng de DNA. Os ciclos foram de 95 °C por 5 min e 40 ciclos de desnaturação de 95 °C por 15 min e pareamento com 60 °C por 30 segundos. A curva de *melting* foi

estabelecida seguindo as padrões do aparelho.

Os valores de Ct (ciclo *threshold*) obtidos a partir da medida de emissão do fluoróforo a cada ciclo foram utilizados para o cálculo da quantificação da detecção do GP2V nas amostras testadas. Amplificações inespecíficas foram corrigidas com base na média dos valores dos Cts dos controles negativos, em que foi adicionado DNA de fezes de bovinos obtidas dos animais no dia anterior às inoculações, utilizando o seguinte algoritmo (Abrahão, dados não publicados) (Figura 7).

$$\left\{ \text{média Cts amostra} + \left[ \frac{\text{média Cts amostra}}{2^{(\text{média Ct negativo} - \text{média Ct amostra})}} \times \frac{\text{média Cts amostra}}{\text{média Cts negativo}} \right] \right\}$$

Figura 7 - Algoritmo para correção das amplificações inespecíficas, corrigidas com base na média dos valores dos Cts dos controles negativos, em que foi adicionado DNA de fezes de bovinos obtidas dos animais no dia anterior às inoculações. Fonte: Abrahão, (dados não publicados).

Como controle exógeno das reações foi utilizada uma PCR para a quantificação do gene B2L de parapoxvírus (Nitsche et al., 2006). Para isto, antes da extração de DNA, todas as amostras foram adicionadas de 100ng de um plasmídeo pGEM-T contendo o gene B2L clonado.

Como controle positivo foi utilizado DNA de VACV-*Western Reserve* (WR), nas concentrações de 10<sup>4</sup> a 10<sup>0</sup> UFP por reação. Baseado em estudos em desenvolvimento no Laboratório de Vírus da UFMG, no caso da PCR em tempo real descrita por de Souza Trindade e colaboradores (2008), a utilização de DNA viral como controle positivo das reações se mostrou mais favorável tecnicamente do que a utilização

de plasmídeos contendo o gene *ha* clonado, pois aproxima o *background* das reações testes e controles, quando consideramos o mix caseiro. As eficiências das reações para o gene *ha* e B2L foram calculadas previamente pelo método da curva padrão, e apresentaram valores médios de 89,9% e 95% de eficiência, respectivamente.

Por este motivo, e por ainda ser desconhecida a razão real entre o número de unidades genômicas e o número de partículas infecciosas de VACV em espécimes bovinos (o que torna difícil a análise por quantificação absoluta), foi selecionado como método de análise a quantificação por curva padrão relativa. Neste método, uma curva padrão é obtida

em cada placa do gene alvo (*ha*) e do controle exógeno (B2L), e consequentemente são gerados valores de eficiência para cada reação.

Os valores de Cts obtidos em ambas as reações, assim como os valores das eficiências geradas em cada placa, foram usados para a quantificação relativa utilizando o programa *Gene Quantification* (<http://gene-quantification.com/> - Pfaffl, 2011). Como amostra calibradora foi utilizado o VACV-WR na concentração de 10<sup>4</sup> UFP. Desta forma, na análise final das amostras, valores superiores ou inferiores a 1 indicam que a amostra testada apresenta quantidade de unidades genômicas virais maior ou menor que o calibrador, respectivamente.

#### 4.12 - Isolamento e identificação viral

As amostras positivas de sangue e fezes nas técnicas moleculares foram inoculadas em cultivo de células BSC-40 para a tentativa de detecção de partículas virais infecciosas e posteriormente identificadas pelos testes de imunoperoxidase em monocamada celular (IPMC), item 4.12.3, e PCR em tempo real, item 4.11.3, após quatro passagens.

##### 4.12.1 - Cultivo celular de BSC-40

Foram utilizadas linhagens contínuas de células BSC-40, as quais são células epiteliais de rim de macaco (*Cercopithecus aethiops*) obtidas da ATCC, catálogo número CRL-2761 (Maryland, EUA). As células foram semeadas em meio mínimo essencial (MEM) (GIBCO™) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) 43 gentamicina (50 µg/mL), penicilina

potássica (500 U/mL) e anfotericina B (2,5 µg/mL), sob incubação a 37° C, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

##### 4.12.2 - Inoculação em cultivo celular

Cultivos de BSC-40 semeados em placas de seis poços com 9 cm<sup>2</sup> de área em cada poço foram inoculadas com amostras de sangue, fezes e tecidos processadas de acordo com o item 4.10. No momento da inoculação o cultivo apresentava cerca de 80-90% de confluência celular em 24 horas. Nos inóculos foram adicionados os seguintes antimicrobianos: gentamicina (100 µg/mL), penicilina potássica (400 U/mL) e anfotericina B (5 µg/mL). Na primeira passagem o inóculo foi incubado a 37° C por 1 hora e meia com homogeneizações em intervalos de 15 minutos. Após a incubação o inóculo foi retirado e 2 mL de MEM suplementado com 1% de SFB foi acrescentado a cada poço, sendo as placas incubadas a 37° C com monitoria durante 72 horas ao microscópio invertido para a observação de efeito citopático (ECP). As amostras foram submetidas três vezes ao processo de congelamento e descongelamento, sendo a suspensão centrifugada a 1000 g durante 10 minutos a 4° C e reinoculadas por mais duas vezes, tendo o inóculo nestas duas últimas passagens permanecido no cultivo.

##### 4.12.3 - Imunoperoxidase em monocamada celular (IPMC)

Após a terceira inoculação em cultivo de BSC-40, as amostras submetidas ao isolamento que apresentaram ou não ECP foram inoculadas em placas de 96 poços (Greiner Bio-one; Cellstar, Alemanha) e após fixadas com solução de

acetona:metanol (1:1). O bloqueio para reações inespecíficas foi realizado com albumina bovina a 1,5%. Foi utilizado como anticorpo primário soro de coelho anti-VACV-GP2V, o qual foi diluído 1250 vezes juntamente com a solução de bloqueio e incubado durante 60 minutos sob agitação de 240 rpm (Ika KS 130 basic, Estado Unidos) em uma estufa à 37°C. Em seguida foi realizada uma lavagem com solução contendo Tween 20 0,5% e NaCl 0,85% (solução de lavagem). Foi então adicionada proteína G conjugada com peroxidase diluída 1:600, a qual foi incubada por 1 hora a 37° C sob agitação de 240 rpm (Ika KS 130 basic, Estado Unidos). Depois, as placas foram lavadas por uma vez com a solução de lavagem com 100 µL por vez.

A reação foi revelada pela adição de 50 µL por poço do substrato 3-amino-9-etil-carbazol (AEC) por um período de até 10 minutos à temperatura ambiente com proteção à luz. Após, foi realizada uma lavagem com solução salina (NaCl 0,85%). A reação de IPMC baseou-se em ensaios descritos por Elahi e colaboradores (1997) e Gerber e colaboradores (2012). A leitura da reação de IPMC foi realizada em microscópio óptico de luz invertida (Leitz® Diavert, Alemanha).

#### **4.13 - Imunohistoquímica (IHQ)**

Os fragmentos de tecidos coletados após o abate dos animais e acondicionados de acordo com o item 4.10.3, foram submetidos à técnica de IHQ para detecção de proteínas do VACV. Foi utilizado soro de coelho imunizado com GP2V como anticorpo primário. A solução de bloqueio utilizada foi leite em pó a 2%, e os

anticorpos secundário e terciário foram usados (Streptavidina conjugada com peroxidase) conforme instruções do Kit DAKO LSAB + System-HRP (Dako, USA). Para a revelação utilizou-se o AEC como cromógeno. A técnica foi realizada de acordo como descrito por Rehfeld (2011).

#### **4.14 - Análise Estatística**

O teste Shapiro-Wilk foi utilizado para avaliar a normalidade da distribuição das variáveis analisadas. O teste não-paramétrico Mann-Whitney foi utilizado para analisar a diferença entre a quantificação viral das fezes e do sangue entre os grupos da infecção inicial, imunodepressão e reinfeção. O teste Kruskal-Wallis foi usado para avaliar a quantificação viral entre os órgãos e entre animais. O teste exato de Fisher foi aplicado para comparar a proporção entre resultados positivos e negativos da PCR entre os grupos. A correlação de Spearman foi usada para correlacionar a quantificação viral dos órgãos com a quantificação viral do sangue e das fezes. Os resultados foram considerados significativos quando o  $P < 0,05$  (Sampaio, 1998).

As correlações entre cada grupo experimental (infecção inicial, imunodepressão e reinfeção) para a proporção de amostras positivas e a quantificação viral foram realizadas considerando intervalos de 7 dias dentro de cada grupo. Também foram feitas correlações entre grupos. No caso das correlações entre a infecção inicial e a imunodepressão foram comparados o período total de acompanhamento da imunodepressão (12 dias) com os 12 dias iniciais e finais da infecção inicial. Já no



caso das correlações entre a infecção inicial e a reinfecção foram comparados o período total de acompanhamento da reinfecção (20 dias) com os 20 dias iniciais e finais da infecção inicial.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 - Infecção inicial

#### 5.1.1 - Reprodução da VB

Todos os animais desenvolveram lesões nos tetos compatíveis com a infecção por VACV (pápulas, vesículas e úlceras), iniciando entre 2 a 4 dias pós-infecção (d.p.i.) (Rehfeld, 2011). Nas crostas oriundas dessas lesões foi detectado o DNA e a presença de partículas virais infecciosas do VACV, através da PCR *nested* e do isolamento viral em cultivo de células da linhagem BSC-40, respectivamente. A observação do quadro clínico compatível com a VB e a detecção do DNA e de partículas virais infecciosas do VACV demonstraram que a infecção experimental com o VACV em bovinos foi reproduzida. O curso clínico das lesões, desde o início com a formação das pápulas até a cicatrização das úlceras com a formação de crostas, teve a duração média de 18 dias. Em nenhum dos animais foi observado lesões nos tetos posteriores esquerdos, utilizados como controle negativo da inoculação (Rehfeld, 2011).

#### 5.1.2 - Provas moleculares

Com o objetivo de estabelecer a sensibilidade analítica da técnica de PCR *nested* desenvolvida por Abrahão e colaboradores (2009) para detecção do DNA do VACV em amostras de sangue e

fezes bovinas, foi realizado um teste de inibição e de sensibilidade utilizando amostras de fezes e sangue experimentalmente contaminadas com diluições decimais de VACV-WR. A sensibilidade analítica obtida para a PCR *nested* foi de  $10^2$  UFP/g de fezes e de 1 UFP/mL de sangue. Abrahão e colaboradores (2009) estabeleceram uma diluição ótima de 1:100 em PBS para o processamento de fezes e sangue de camundongos Balb/c obtendo uma sensibilidade analítica de 1 UFP/g ou mL para estas amostras.

A presença de inibidores da PCR em amostras clínicas pode resultar em falsos negativos, os quais podem comprometer a sensibilidade do teste, principalmente devido à ação desses inibidores na enzima *Taq* DNA polimerase (Malorny e Hoorfar, 2005). A possível diferença entre as concentrações de inibidores ou a presença de diferentes inibidores entre as fezes de bovinos e de camundongos motivaram a realização deste teste de inibição e de sensibilidade para que também fossem definidas a sensibilidade da técnica para a espécie bovina nas amostras de fezes e sangue avaliadas neste estudo.

As análises das amostras de fezes e sangue foram realizadas através da PCR *nested* para o gene *vgf* (Figura 8) e PCR em tempo real para o gene *ha*, as quais foram realizadas em todas as amostras coletadas nos primeiros 15 d.p.i., como foi observada correlação de 100% entre os resultados apresentados por essas duas técnicas, visando a otimização das análises, a técnica de PCR *nested* foi realizada em todas as outras amostras, sendo utilizada como método de triagem e apenas as positivas

foram quantificadas pela PCR em tempo real.

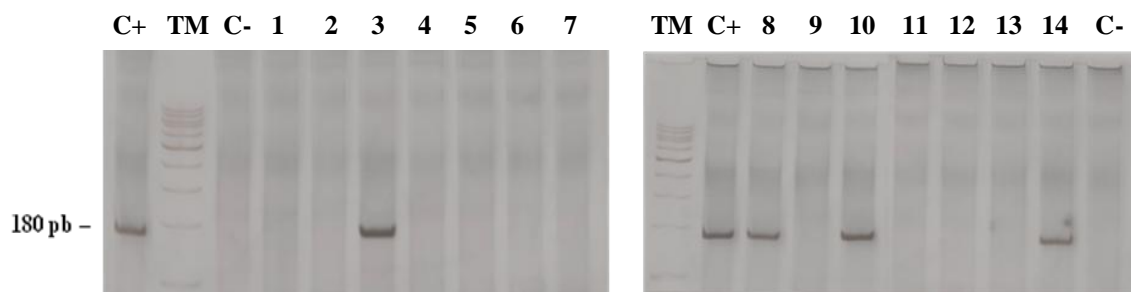


Figura 8 - PCR *nested* do gene *vgf* para o VACV em amostras de sangue. Os amplificados foram fracionados em gel de acrilamida:bisacrilamida (29,2:0,8) (PAGE) 8% sob voltagem de 100V e corados por prata. TM: tamanho molecular; C+: controle positivo; C-: controle negativo; Amostras de sangue: 3 - positiva no 4º dia pós-infecção (d.p.i); 1, 2, 4, 5, 6, 7 - negativas no 19º d.p.i. Amostras de fezes: 8, 10, 14 - positivas no 8º d.p.i; 9, 11, 12, 13 - negativas no 17º d.p.i.

### 5.1.3 - Detecção do *Vaccinia virus* - GP2 no sangue

A cinética da viremia do VACV nas vacas infectadas foi obtida através da detecção (Tabela 3) e da quantificação do DNA viral (Figura 10). Foram testadas 296 amostras de sangue nos oito animais da infecção

inicial e em 34 dessas amostras foi possível detectar a presença do DNA de VACV, sendo que em uma dessas amostras também foi isolado e identificado a presença de partículas virais infecciosas através de cultivo em células BSC-40 e pela técnica de IPMC.

Tabela 3 - Detecções do DNA de VACV pela PCR *nested* e de partículas virais infecciosas através do isolamento viral no sangue das oito vacas durante os 67 dias pós-infecção.

Animal	SANGUE																																					
	Dias pós infecção																																					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	17	19	21	23	25	27	29	31	33	39	41	43	46	48	50	53	56	60	62	64	67		
1	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
2	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
3	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
4	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
5	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
6	-	-	-	*+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ amostras positivas na PCR nested; - amostras negativas na PCR nested; \*amostra com isolamento e identificação viral

A detecção do DNA viral no sangue dos animais infectados experimentalmente, demonstra que ocorreu DNAemia iniciando-se entre o 2º e o 15º d.p.i.

Observou-se que no 4º e no 15º d.p.i essa detecção já havia ocorrido em 62,5% (5/8) e em 100% (8/8) dos animais, respectivamente (Figura 9).

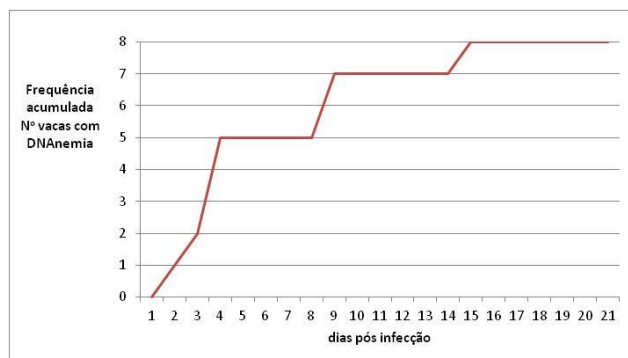


Figura 9 - Frequência absoluta acumulada do número de vacas infectadas com DNAemia detectada pela PCR *nested* no sangue demonstrando que no 4º e no 15º d.p.i essa detecção já havia ocorrido em 62,5% (5/8) e em 100% (8/8) dos animais, respectivamente acordo com os dias pós-infecção.

Não existem na literatura relatos da detecção do VACV ou de seu DNA em sangue de bovinos infectados. A presença do VACV no sangue a partir da infecção intradérmica em tetos sugere que a infecção não se limita apenas ao local, em que ocorrem as lesões, mas ao contrário tem uma disseminação sistêmica.

Infecções naturais pelo VACV em outras espécies já evidenciavam a presença de vírus no sangue de indivíduos infectados. Em 1963 o vírus BeAn58058 (BAV) foi isolado do sangue de um roedor silvestre, do gênero *Oryzomys*, capturado na floresta de Utinga, na cidade de Belém, no estado do Pará (Lopes et al., 1965). DNA de VACV foi detectado em amostras de sangue de macacos, oriundos de um resgate de fauna, na amazônia brasileira (Abrahão et al., 2010c). Também em humanos, DNAemia para o VACV foi evidenciada no sangue de soldados americanos mesmo após 21 dias de vacinação (Cohen et al., 2006).

Modelos experimentais em animais utilizando camundongos e coelhos também estabeleceram a presença do VACV no sangue. Em pesquisa visando o estudo da

virulência de amostras do VACV em camundongos, Ferreira e colaboradores (2008a) inocularam por via intranasal, diversas amostras brasileiras de VACV, entre elas o GP2V, e confirmaram a presença de DNA viral e de anticorpos anti-OPV no sangue com 30 d.p.i. Já em infecção experimental em coelhos, por via intranasal, Cargnelutti e colaboradores (2012), usando duas amostras oriundas de lesões cutâneas, distintas geneticamente (P1V e P2V) e com títulos de vírus diferentes, detectaram a presença de DNA no sangue em diferentes períodos que variaram entre o 1º e o 17º d.p.i.

No presente trabalho, detecções do DNA viral no sangue foram encontradas entre o 2º e o 15º d.p.i., sendo que foi observada concentração no número de animais com DNAemia entre o 9º e o 15º d.p.i. ( $P=0,01$ ) quando comparado intervalos de 7 dias (Figura 10), período que pode ser comparado a outros trabalhos realizados com o VACV em coelhos (Cargnelutti et al., 2012) e em outros poxvírus (Bowden et al., 2008; Hutson et al., 2009).

Em infecções de cães de pradaria (*Cynomys ludovicianus*) com amostras de MPXV (Amostra Africana do Oeste e Bacia do

Congo). A infecção experimental foi realizada em quatro animais através da inoculação via intradérmica por escarificação, obtendo-se detecção de DNA viral para as duas amostras do MPXV entre o 3º e o 15º d.p.i. (Hutson et al., 2009).

Bowden e colaboradores (2008), durante infecção experimental em nove ovelhas por via intradérmica utilizando *Sheeppox virus*

(SPPV), poxvírus pertencentes ao gênero *Capripoxvirus*, mas da mesma sub-família do gênero dos OPV (*Chordopoxvirinae*), obtiveram resultados semelhantes detectando a presença do SPPV através de isolamento e/ou pela detecção do DNA viral no sangue principalmente entre o 6º e o 14º d.p.i em 33% (3/9) e 89% (7/9) dos animais infectados.

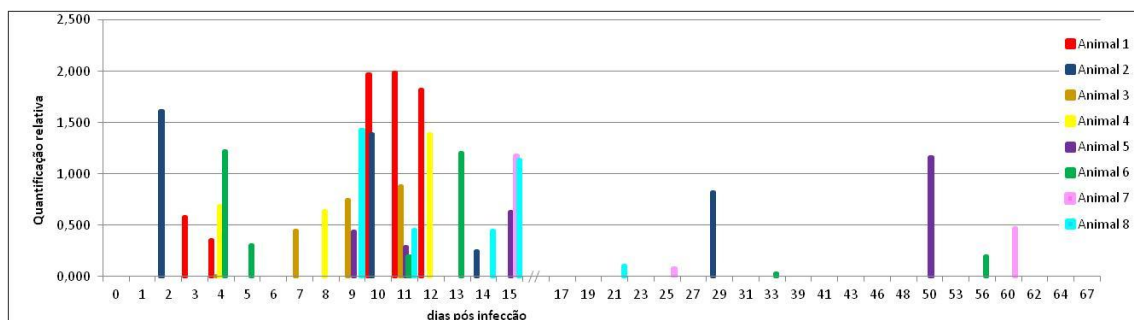


Figura 10 - Quantificação relativa do DNA de VACV no sangue realizada pela PCR em tempo real nos animais infectados do grupo da infecção inicial, durante os 67 dias pós-infecção.

A quantificação do DNA viral no sangue foi observada em todos os animais inoculados sem uma diferença estatística da carga viral entre os animais. Foi possível observar que os valores relativos variaram de 0,004 a 1,988, quando consideramos todos os animais. O animal 1 apresentou a maior média de valores relativos: 1,3427 e o animal 3 o menor valor: 0,5203. Interessantemente, o DNA viral foi detectado em amostras de sangue coletadas em dias tardios, como o 50º (animal 5), o 56º (animal 6) e o 60º (animal 7), sendo que o animal 6 apresentou o quadro de DNAemia mais prolongado, sendo possível detectar DNA viral no sangue

deste animal precocemente no 4º d.p.i. e tardiamente no 56º d.p.i. Com relação aos d.p.i. foi observado que no 12º e no 11º d.p.i. foram encontrados as maiores médias da quantificação relativa do DNA viral (0,4771 e 0,4197, respectivamente) (Anexo I).

Os resultados encontrados durante os 67 dias de acompanhamento dos animais demonstraram que o 11º d.p.i. foi o dia com a maior quantidade de animais com DNAemia (Figura 11) e a segunda maior média na quantificação relativa, o que pode sugerir que seja o pico do período de viremia a partir de uma infecção local pelo VACV em bovinos.

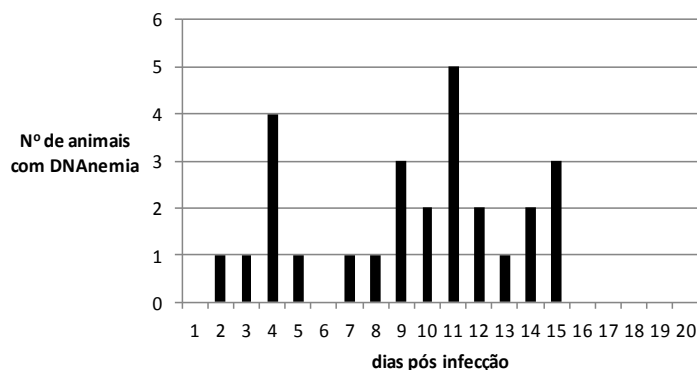


Figura 11 - Distribuição do número de animais com DNAemia, estabelecida pela PCR *nested*, entre o 2º e o 15º d.p.i. nos oito animais do grupo da infecção inicial.

A curva de anticorpos totais (IgG) e anticorpos neutralizantes (Ac.N) anti-GP2V dos animais do experimento foi estabelecida através do teste de IPMC e de soroneutralização por redução do número de placas, respectivamente (Matos, dados não publicados). Foi observado que o título de IgG total teve início a partir do 4 d.p.i. tendo elevação significativa entre o 8º e o 15º d.p.i., período este em que também foi observada a maior frequência relativa de animais com DNAemias. A curva de IgG atingiu o ápice entre o 30º e o 40º d.p.i., cerca de 20 a 30 dias após o segundo pico de detecção do DNA de VACV no sangue. Estes resultados evidenciam correlação entre a presença do vírus no sangue e o estímulo para a produção de anticorpos anti-VACV.

#### 5.1.4 - Detecção do *Vaccinia virus* -GP2 nas fezes

A presença do DNA de VACV nas fezes foi obtida através da detecção (Tabela 4) e da quantificação do DNA viral pelas PCRs *nested* e em tempo real, respectivamente. Foram avaliadas 296 amostras de fezes dos oito animais da infecção inicial em 48 dessas amostras foi possível detectar a presença do DNA de VACV, sendo que em 5 amostras foi possível detectar a presença de partículas infecciosas. A excreção do DNA de VACV nas fezes foi detectada muito precocemente, no primeiro d.p.i. 50 (4/8) dos animais já apresentaram amostras positivas.

Tabela 4 - Detecções do DNA de VACV pela PCR *nested* e de partículas virais infecciosas através do isolamento viral nas fezes das oito vacas durante os 67 dias pós-infecção.

Animal	FEZES																																				
	Dias pós infecção																																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	17	19	21	23	25	27	29	31	33	39	41	43	46	48	50	53	56	60	62	64	67	
1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+
3	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
4	-	+	-	-	-	-	+	-	*+	-	-	-	*+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	
5	*+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	*+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	
6	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
7	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-
8	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ amostras positivas na PCR *nested*; - amostras negativas na PCR *nested*; \*amostra com isolamento viral

Ferreira e colaboradores (2008a) também detectaram a presença do DNA de VACV em 80% (4/5) de camundongos Balb/c com apenas um dia pós exposição à serragem contaminada com fezes de camundongos infectados com o GP2V. Os animais, provavelmente, foram infectados por via oronasal durante a exposição às fezes contaminadas. Quando comparadas as infecções por via intradérmica com a via oronasal espera-se que nesta exista maior probabilidade de que ocorra uma disseminação sistêmica. Entretanto, tanto na infecção experimental pela via oronasal quanto intradérmica foi observada a mesma excreção precoce nas fezes, tanto no

modelo murino quanto no bovino, ambos infectados com GP2V.

A excreção do DNA de VACV nas fezes teve curso prolongado, sendo que amostras positivas foram detectadas até o último dia de acompanhamento do grupo da infecção inicial (67° d.p.i.) (Figura 12). Este resultado demonstra que a infecção em bovinos causada pelo VACV não é aguda e limitada à resolução das lesões, uma vez que foi observada a excreção viral nas fezes de forma prolongada, por um período bastante superior à cicatrização das lesões, a qual ocorreu em média, no 18° d.p.i.

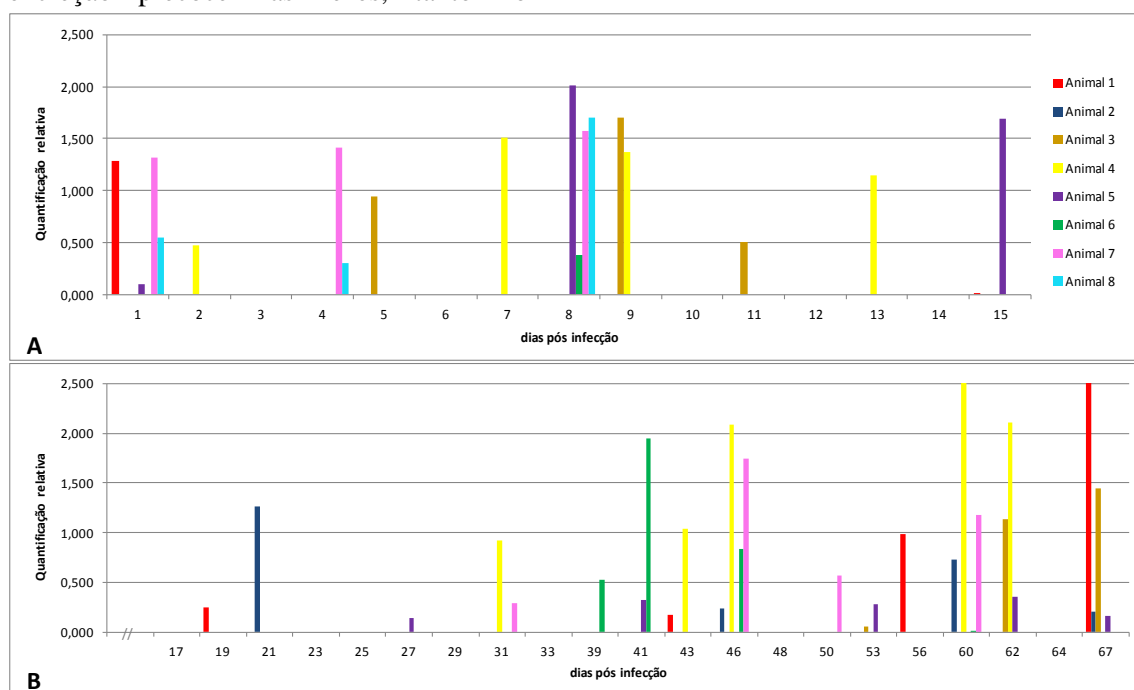


Figura 12 - Quantificação relativa do DNA de VACV nas fezes dos oito animais no grupo da infecção inicial, durante os 67 dias pós-inoculação (d.p.i.). (A) período até o 15° d.p.i. (B) período entre o 17° e o 67° d.p.i.

Em outros OPV como o ECTV, CPXV e o MPXV, a presença de vírus nas fezes também já foi comprovada (Gledhill, 1962; Maiboroda, 1982; Wallace e Buller 1985; Hutson et al., 2009). Maiboroda (1982) em

um estudo envolvendo o *Ratpox virus*, uma variante biológica de CPXV, detectou altos títulos virais ( $10^9$  UFP) no reto do roedor *Rattus norvegicus* e excreção de partículas infectantes nas fezes, por período superior a

1 mês após a infecção. Hutson e colaboradores (2009), em infecções experimentais com MPXV (amostra da Bacia do Congo), em cães de pradaria (*Cynomys ludovicianus*) utilizando a inoculação intradérmica por escarificação, também detectaram DNA viral nas fezes do 6º até o 21º d.p.i., com coletas realizadas com intervalos de 3 dias, durante 35 dias, além disto detectaram partículas virais infectantes no 18º d.p.i. Infecções em camundongos inoculados com pequenas doses de ECTV não causaram os sinais clínicos característicos, mas partículas virais foram detectadas em fezes e em lesões próximas ao ânus, durante algumas semanas após a infecção (Gledhill, 1962). Wallace e Buller (1985), após inoculação intragástrica também com o ECTV em modelo murino, recuperaram partículas viáveis nas fezes até o 47º d.p.i.

A presença do VACV nas fezes também já foi estabelecida utilizando camundongos e coelhos como modelo experimental. Através de infecção intranasal com o VACV em modelo murino e em coelhos, Ferreira e colaboradores (2008a) e Cargnelutti e colaboradores (2012), respectivamente, também conseguiram detectar partículas virais e DNA viral do VACV até o 30º d.p.i.

Quando comparadas a detecção do VACV no sangue e nas fezes, observa-se que não existe correlação, uma vez que a detecção viral no sangue concentrou maior número de amostras com DNAemia entre o 9º e o 15º ( $P=0,01$ ), enquanto que a detecção nas fezes não apresentou concentração em nenhum período, e apresentou um perfil intermitente e prolongado (Figura 17).

A detecção intermitente do vírus nas fezes pode ser devido a uma característica típica da infecção do VACV em bovinos, mas é importante considerar que a grande frequência de defecação e o volume de material fecal produzido por um bovino (11 a 16 vezes por dia e em cada evento produz 1,5 a 2,7 kg de fezes) (Petersen et al., 1956; Mathews e Sollenberger, 1996) que podem ter dificultado a detecção do vírus nas amostras coletadas. Ainda deve ser considerada a representabilidade da amostra, pois nas preparações da diluição das amostras para extração de DNA, foi utilizado apenas 1g de fezes em 2 mL de PBS, volume proporcionalmente pequeno quando considerado o grande volume de fezes produzido diariamente por um bovino

Na quantificação relativa do DNA de VACV nas fezes foi possível observar que os valores variaram de 0,0013 a 2,7142, quando consideramos todos os animais. A vaca 4 apresentou a maior média de valores relativos: 1,4916; e a vaca 5 a menor: 0,6315. Entretanto, estatisticamente não foi observada diferença na carga viral entre os animais. Considerando a evolução e a gravidade clínica das lesões, Rehfeld (2011) relatou que o animal 4 foi o que apresentou as lesões mais graves, o que pode estar correlacionado com a maior média de quantificação viral nas fezes.

Também não houve diferença estatística entre as médias das quantificações relativas, quando comparadas, considerando períodos com intervalos de 7 dias, durante a infecção inicial. Estes resultados indicam que, ao contrário da DNAemia, não há tendência de diminuição da excreção viral nas fezes, assim como não há diferença significativa

nas quantificações virais durante os 67 dias avaliados.

A presença de partículas virais infecciosas de VACV foi detectada em amostras de fezes, através do isolamento e identificação viral realizado em cultivo de células BSC-40. Observou-se a presença de efeito citopático (ECP), caracterizado pela formação de placas de lise na monocamada, e pela coloração citoplasmática pela técnica de IPMC (Figura 13). Foi possível detectar partículas virais infectantes nas fezes, no 1º, 9º, 13º e no 15º d.p.i. (duas amostras).

Os resultados obtidos no isolamento viral associado ao IPMC evidenciaram partículas virais infecciosas em cinco amostras de fezes, não demonstrando correlação com os resultados da PCR *nested* e da PCR em tempo real, que detectaram o DNA viral em

48 amostras de fezes no grupo da infecção inicial. Este fato deve-se provavelmente à menor sensibilidade da técnica de isolamento viral em cultivo celular.

Para confirmar que houve multiplicação do vírus nos cultivos celulares, foi realizada a quantificação por PCR em tempo real, na última passagem em cultivo de BSC-40 em que foram detectadas partículas virais infecciosas de VACV nas amostras de fezes, seja pelo ECP e/ou pelas imunomarcações positivas observadas na IPMC. Quando comparado a quarta com a primeira passagem foi possível demonstrar aumento na detecção do DNA de VACV em todas as amostras. O menor e o maior valor da quantidade relativa do DNA de VACV detectado nessas amostras foi de 2.56 e 16.91, respectivamente.



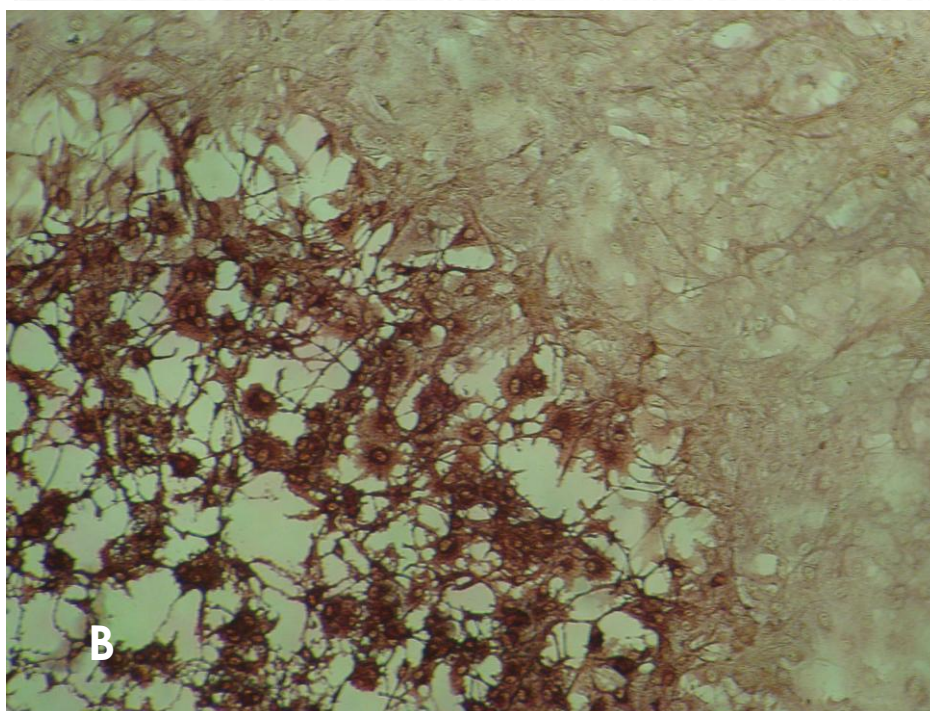
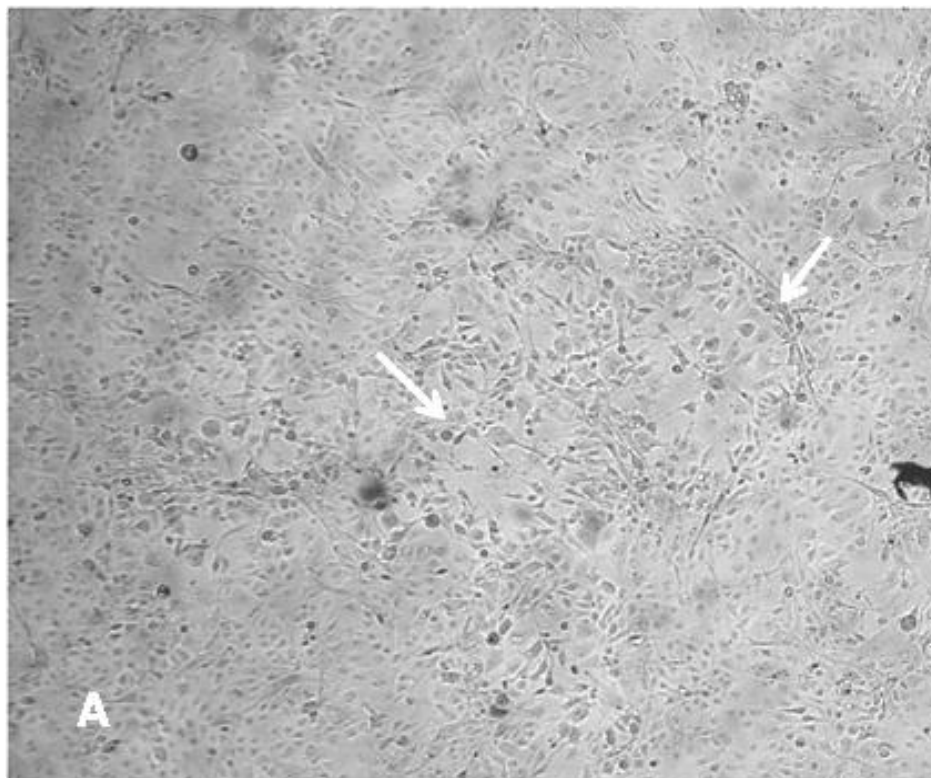


Figura 13 - Efeito citopático com formação de placas de lises (setas), resultante da multiplicação do VACV, em cultivo celular de BSC-40. Aumento 20X (A). Imunomarcção identificando a presença do VACV pela imunoperoxidase em monocamada celular em cultivo celular de BSC-40. Aumento 40X (B).

Apesar de poucas amostras de fezes terem sido positivas no isolamento viral, evidenciando a presença de partículas virais infecciosas, esses isolamentos podem ser extremamente relevantes no contexto epidemiológico da doença, alertando para a possibilidade de que essa via possa ser uma fonte pontencial de disseminação do vírus. Corroborando com essa hipótese, D'Anuniação e colaboradores (2011), contaminaram a maravalha utilizada na criação de camundongos BalB/c com fezes de bovinos infectados durante pré-experimento deste trabalho, positivas para o DNA de VACV pelo teste de PCR, observando que os camundongos se infectaram e passaram também a excretar o VACV nas fezes.

As fezes de bovinos contaminadas com VACV, podem ser fonte de transmissão do VACV para roedores, podendo servir como fonte de disseminação para roedores peridomiciliares, sendo que estes podem estabelecer um habitat que envolva mais do que uma propriedade rural, e conseqüentemente, rebanhos susceptíveis, colaborando para uma possível disseminação entre propriedades. A transmissão de partículas virais infectantes de VACV nas fezes de bovinos para roedores corrobora os achados de outros trabalhos em que algumas espécies de roedores são consideradas reservatórios em potencial para os OPV e são associados com a disseminação viral durante surtos de VACV em bovinos (Maiboroda 1982, Abrahão et al. 2009a). Como por exemplo, o CPXV em que evidências indicam que seus reservatórios sejam roedores silvestres, dos gêneros *Clethrionomys*, *Microtus* e *Apodemus* (Bennett e Baxby, 1996).

Da mesma maneira, Ferreira e colaboradores (2008a), também comprovaram a transmissão horizontal do VACV pelas fezes, em camundongos, ao demonstrar a infecção de camundongos usando serragem contendo fezes contaminadas de camundongos previamente infectados. Além disso, Abrahão e colaboradores (2009b), utilizando o modelo murino, detectaram DNA viral e partículas virais infecciosas nas fezes até 60 e 20 dias após a excreção, respectivamente, comprovando a estabilidade da partícula viral nas fezes.

Outros estudos realizados com outros OPV também mostraram a presença de partículas virais infecciosas de VARV (revisado por Fenner et al., 1989) e do ECTV (Gledhill, 1962) nas fezes, sugerindo ser essa uma via de transmissão em potencial desses vírus. Esses trabalhos reforçam a possibilidade de que as fezes de animais infectados possam ter um papel importante na disseminação do VACV no ambiente.

Estudos tem demonstrado alta estabilidade do VACV no ambiente e tem contribuído para o entendimento da sua disseminação (Essbauer et al., 2007; Abrahão et al., 2009b). De uma forma geral, os poxvírus são mais estáveis quando expostos à baixa umidade relativa do ar e temperaturas mais brandas (Essbauer et al., 2007), e além disso, o VACV é altamente susceptível aos raios ultra-violeta (UV), sendo que 56 exposição da partícula viral durante alguns segundos é suficiente para sua inativação (von Brodorotti e Mahnel, 1972).

Após a defecação de bovinos são formadas grandes placas de fezes no ambiente. O período para a degradação de uma placa de

fezes de bovinos em pastagens, possui uma variação de 1 a 231 dias, sendo que 49,3% degradam-se em até 30 dias (Paranhos da Costa et al., 1992). No caso do gado leiteiro estabulado, esse período de degradação pode ser ainda maior. As placas de fezes de bovinos tendem a sofrer um ressecamento externo quando expostas à radiação solar na superfície, entretanto, as placas poderiam fornecer camadas de material fecal protegidas dos raios UV e com diferentes níveis de temperatura e ressecamento dependendo da fase de degradação das placas. Desta forma, acredita-se que a excreção por via fecal nos bovinos poderia prolongar a estabilidade das partículas virais no ambiente, sobretudo pela elevada quantidade de matéria orgânica, propiciando grande proteção aos raios UV. Como no presente trabalho partículas virais infectantes foram detectadas aos 9º, 13º, e 15º d.p.i., períodos estes em que as placas de fezes de bovinos ainda não teriam sofrido uma completa degradação, pode-se sugerir que haveria um potencial risco de infecção pelas fezes.

Em um ambiente com fezes contaminadas por VACV, a exposição pode ocorrer de diversas maneiras. Em rebanhos leiteiros com confinamento intenso, cochos com alimentos e água contaminados com fezes infectadas com VACV podem ser uma possível via de recontaminação constante dos animais por via oral, sendo também necessária a confirmação da importância da via oral na infecção de bovinos pelo VACV. Estudos já descreveram uma alta estabilidade do VACV nas fezes (Abrahão et al., 2009a) e em alimentos e na água contaminados por mais de duas semanas (Essbauer et al., 2007).

Outra maneira possível pela qual os bovinos podem estar sendo constantemente reinfetados, estaria associada à fisiologia e ao comportamento desses animais. O fechamento completo do esfíncter dos tetos não ocorre imediatamente após a ordenha, o que favorece a entrada de microrganismos no úbere. Costa e colaboradores (1998), observaram uma elevada ocorrência de mastite em rebanhos que não foram alimentados imediatamente após a ordenha. A oferta de alimentos no cocho, após a ordenha, estimula as vacas a se manterem em estação, favorecendo o fechamento do esfíncter, e evitando assim a contaminação do canal do teto. Sendo assim, animais que ainda apresentam-se com o esfíncter aberto após a ordenha podem se deitar sobre camas contaminadas com fezes contendo partículas viáveis de VACV, causando uma reinfecção nestes animais por esta via proposta.

A manipulação direta de fezes de bovinos com o objetivo de produzir esterco para ser utilizado na adubação de plantações ou para o fornecimento de energia através de biodigestores, pode representar um risco para as pessoas que manipulam este material, uma vez que a possível presença de partículas viáveis nas fezes pode representar uma fonte de infecção em potencial. Em princípio, a infecção pode ocorrer toda vez que existir soluções de continuidade (condição essencial para penetração dos vírus) e contato com uma dose adequada de partículas do VACV, sendo que este risco em potencial deve ser melhor estudado.

A excreção viral nas fezes pode contribuir para a disseminação da doença entre propriedades e regiões, assim como

possíveis fontes de infecção para humanos. O trânsito de veículos automotores e de tração animal, assim como de pessoas e equipamentos podem funcionar como disseminadores de material fecal, e conseqüentemente, propiciar tal disseminação. Quixabeira-Santos e colaboradores (2011), demonstraram que a principal causa da disseminação de surtos ocorridos no estado de Rondônia entre os anos de 2008 e 2010 estava relacionada ao trânsito de bovinos entre propriedades.

## 5.2 - Imunodepressão

No 69º d.p.i. iniciou-se a imunodepressão nos animais 2, 4, 5 e 6, com o acompanhamento e coleta de amostras durante 12 dias, com o objetivo de estudar o comportamento viral em vacas infectadas e imunodeprimidas experimentalmente, após a recuperação dos sinais clínicos.

A imunodepressão foi comprovada através da avaliação dos níveis de linfócitos em que uma queda foi observada a partir do 1º d.p.im (dia pós imunodepressão), sendo que

os animais apresentaram linfopenia a partir do 5º d.p.im. (Rehfeld, 2011).

Como não existiam dados na literatura, o delineamento da segunda parte do experimento foi realizado baseado na hipótese de que após o processo de cicatrização ou em poucos dias não seria mais possível detectar a excreção do VACV nas fezes ou no sangue. Entretanto, a excreção viral nas fezes não apenas teve o seu curso estendido após a resolução das lesões (18º dia), como foi observada até o último dia de coleta (67º dia) da infecção inicial.

Nos animais imunodeprimidos não foram observadas lesões nos tetos, mas interessantemente, nos animais 2 e 6 foi observada uma lesão ulcerativa na mucosa oral (Rehfeld, 2011), confirmada como positiva através da PCR *nested* a partir de suabes nas lesões. As detecções do DNA de VACV nas fezes e no sangue ocorreram durante o período analisado até o 11º e o 12º dia d.p.im., respectivamente (Tabela 5).

Tabela 5 - Grupo imunodepressão- Resultados da PCR *nested* e do isolamento viral no sangue e nas fezes, durante os 12 d.p.im. nas vacas 2, 4, 5 e 6 submetidas à imunodepressão.

		IMUNODEPRESSÃO																									
		SANGUE												FEZES													
d.p.i.		69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81
d.p.im.		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	
Animais	4	-	-	-	-	-	-	+	*+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	5	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	
	6	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	

d.p.i.= dias pós inoculação; d.p.im.= dias pós imunodepressão; + amostras positivas na PCR *nested*; - amostras negativas na PCR *nested*; \*amostra com isolamento viral

A DNAnemia, que durante a infecção inicial concentrou-se até o 15º d.p.i. e nos últimos dias não havia sido mais detectada,

após a imunodepressão voltou a se ser observada nos quatro animais do grupo.

Observou-se também aumento da concentração de IgG total após a

imunodepressão correlacionando-se com o retorno da DNAemia (Matos, dados não

publicados) (Figura 15).

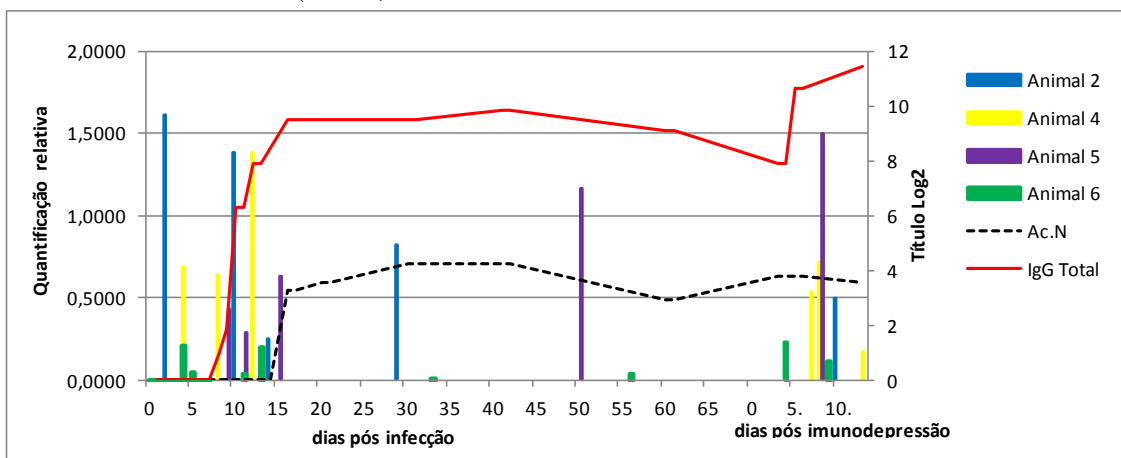


Figura 14 - Quantificação da DNAemia pela PCR em tempo real e curva de anticorpos neutralizantes (Ac.N) e anticorpos totais (IgG total) (Matos, dados não publicados), durante a infecção inicial e a imunodepressão

Esses resultados sugerem que o VACV pode persistir em outros tecidos dos animais, uma vez que, com a imunodepressão, observou-se retorno da DNAemia, sugerindo retorno na replicação viral e viremia. Neste caso, pode-se sugerir que o VACV possa causar uma infecção persistente em bovinos.

Relatos de infecções persistentes já foram descritas para outros poxvírus. Sentsui e colaboradores (1999), após a administração de interferon gama, promovendo condições que induzem à modificação das reações imunes, em vacas sem nenhum sinal clínico conseguiram através de sorologia, PCR e identificação por microscopia eletrônica estabelecer a presença de um parapoxvírus bovino. Com isso, sugeriram que este vírus é capaz de causar infecções persistentes mesmo em vacas sem sinais clínicos. Pahlitzsch e colaboradores (2006) descreveram também um relato de caso de uma infecção persistente por CPXV. A transmissão ocorreu através do contato

entre gatos contaminados e uma criança que desenvolveu uma lesão edematosa de face na região da narina direita. O processo de cicatrização da lesão foi prolongado com numerosas áreas de linfadenite, e em um nódulo persistente que foi retirado dois anos após o início das lesões, constatou-se a presença do DNA de CPXV.

Comparando os 12 dias de acompanhamento pós imunodepressão com os 12 dias após a infecção inicial observamos que existe tendência percentual a maior excreção viral nas fezes no grupo imunodeprimido (13/32, 40%) em relação ao grupo da infecção inicial (7/32, 13%), apesar de não encontrarmos diferença estatística ( $P < 0,05$ ). Ainda, quando consideramos os 12 dias de observação pós imunodepressão com os 12 dias que antecederam a imunodepressão observamos que também não houve diferença estatística, entre o número de amostras de fezes positivas.

Estudos em modelos animais mostraram que Ac.N contra os OPV são imprescindíveis na geração de proteção contra novas infecções por poxvírus e também para a sua excreção (Edghill-Smith et al., 2005). Entretanto, a excreção viral nas fezes não sofreu diminuição, permanecendo constante mesmo na presença de anticorpos (Figura 15), observou-se aumento no título de IgG total, que provavelmente está correlacionado com novo estímulo promovido pelo aumento de

vírus no sangue, verificado pelo aumento da DNAemia. Este fato sugere que a excreção viral nas fezes seja pouco ou não seja influenciada pela presença de anticorpos circulantes, uma vez que apesar de não existir diferença estatística entre as médias das quantificações virais nestes dois períodos, descritivamente as quantificações na imunodepressão foram menores do que na infecção inicial.

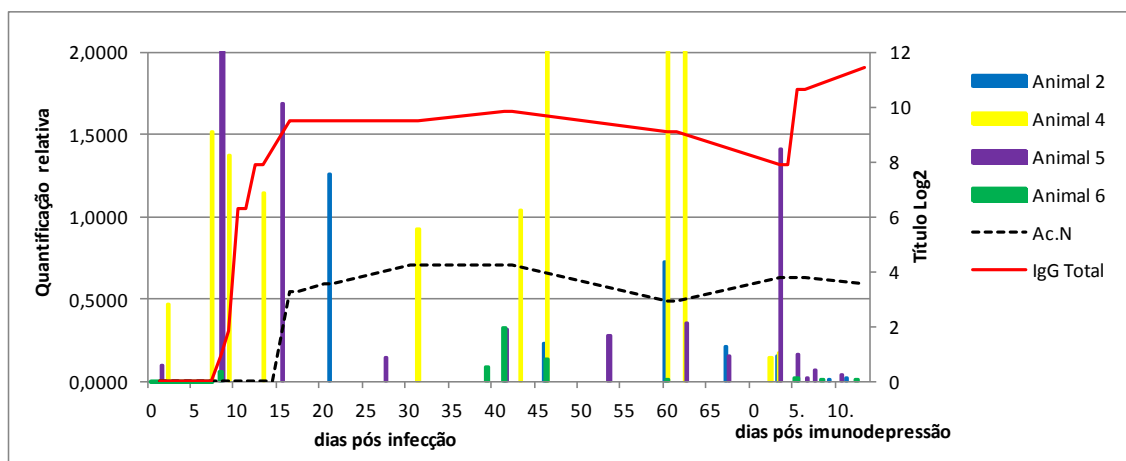


Figura 15 - Quantificação do DNA de VACV nas fezes pela PCR em tempo real e curva de anticorpos neutralizantes (Ac.N) e totais (IgG total), durante a infecção inicial e a imunodepressão.

A evidência de sinais clínicos na m 60 oral em dois animais do grupo imunodeprimido, associada com a observação de que a maior quantidade de amostras de fezes positivas para o VACV foi detectada neste grupo quando comparado com o mesmo período da infecção inicial, sugere que alterações na resposta imunológica de um animal ou rebanho pode ser um fator que favoreça o aumento na excreção do VACV nas fezes de animais infectados.

### 5.3 - Reinfecção

Foram reinfecados, com a mesma amostra de VACV (GP2V) no 70° d.p.i, os animais 1, 3, 7 e no 270° d.p.i. os animais 9 e 10, sendo o acompanhamento e a coleta de amostras nesses animais realizados durante 20 dias para a pesquisa da presença do VACV em amostras de fezes e sangue de bovinos após a reinfecção experimental.

O reaparecimento de lesões nos tetos ocorreu em quatro dos cinco animais reinfecados, sendo que as vesículas e

pápulas foram observadas inicialmente entre o 2° e o 5° d.p.i., não existindo alteração considerável quando comparado com a infecção inicial, em que o aparecimento das lesões ocorreu entre o 2° e o 4° d.p.i. Porém, as lesões observadas foram menores e a resolução ocorreu entre o 9° e o 10° d.p.i., período bem mais curto quando comparado com a infecção inicial, que ocorreu em média no 18° d.p.i. A apresentação clínica da VB em animais reinfecados sugere que a infecção pelo VACV não induz uma imunidade protetora, que seja capaz de impedir que os sinais clínicos sejam novamente evidenciados,

apesar de ter alguma influência pois a duração e a gravidade das lesões foram menores.

Da mesma maneira, os animais submetidos à reinfecção continuaram a apresentar intermitência na excreção de VACV nas fezes (Tabela 6), não sendo detectada apenas no animal 7. Entretanto, este animal apresentou lesões nos tetos e houve detecção e quantificação do DNA de VACV no sangue, confirmando que a infecção pelo VACV foi restabelecida em todos os animais.

Tabela 6 - Grupo reinfecção- Resultados da PCR *nested* e do isolamento viral para a detecção do DNA de VACV no sangue e nas fezes nas vacas 1, 3, 7, 9 e 10 após a reinfecção.

		REINFECÇÃO																																	
		SANGUE										FEZES																							
d.p.i.		70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	90	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	90
d.p.r.		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	20	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	20		
	1	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+		
	3	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Animais	7	-	+	-	*+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
	9	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	*+	*+	-	*+	-	-	-	
	10	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	*+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	*+	-	-	-	-

d.p.i.= dias pós inoculação; d.p.im.= dias pós reinfecção; + amostras positivas na PCR nested; - amostras negativas na PCR nested; \*amostra com isolamento viral

Os animais 9 e 10, que foram submetidos a infecção inicial e a reinfecção com um período de intervalo de 9 meses entre as duas infecções voltaram a apresentar DNAemia e detecção do DNA de VACV nas fezes. Mesmo com um maior intervalo entre a infecção inicial e a reinfecção não foi observada entre os animais do grupo da reinfecção nenhuma diferença estatística entre a quantidade ou a carga viral de amostras positivas no sangue e nas fezes. Entretanto, Rehfeld (2011), observou que esses dois animais apresentaram lesões mais graves nos tetos quando comparados com outros três animais na reinfecção, sugerindo que a imunidade protetora gerada pelo VACV não é duradoura.

Nos animais 1, 3 e 7 que foram submetidos a infecção inicial e a reinfecção com um período de intervalo de 70 dias entre as duas infecções, observou-se aumento significativo ( $P = 0,03$ ) na DNAemia quando comparados os 20 dias de acompanhamento da reinfecção com os últimos 20 dias da infecção (Figura 16). Observa-se também aumento na concentração de anticorpos circulantes (IgG total e AcN), provavelmente correlacionado com o novo estímulo promovido pelo aumento de vírus no sangue, verificado pelo aumento da DNAemia.

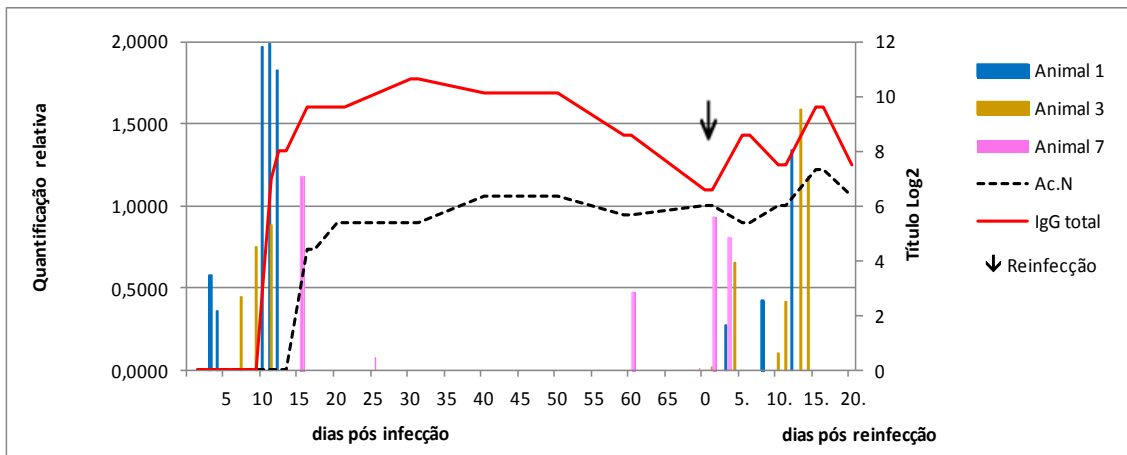


Figura 16 - DNAemia e curva de anticorpos neutralizantes (Ac.N) e anticorpos totais (IgG total), durante os 67<sup>o</sup> dias pós-infecção e os 20 dias pós reinfecção.

Não houve diferença entre a quantificação viral e a quantidade de amostras positivas no sangue, entre os grupos da infecção inicial e da reinfecção, quando comparado os primeiros 20 dias da infecção inicial com o período de acompanhamento de 20 dias da reinfecção. Este resultado, sugere que após a reinfecção houve replicação viral, e interessante este fato ocorreu mesmo na presença de anticorpos circulantes.

Xu e colaboradores (2004), demonstraram em infecções de camundongos pelo VACV, que a imunidade mediada por células e a imunidade humoral são complementares e essenciais. Contudo, a resposta imune produzida para poxvírus continua sendo bastante discutida e existe pouco consenso sobre a sua capacidade de proteção para reinfecções (Panchanathan et al, 2008).

Não foi observada diferença entre a quantidade e a quantificação das amostras detectadas com DNA do VACV nas fezes nos animais reinfecados, quando se compara os 20 dias da reinfecção com períodos com intervalos de 20 dias da infecção inicial (Figura 17). Com isso, pode-se sugerir que a reinfecção não promoveu aumento na excreção viral nas fezes, sendo que o limite de infecção pode ter sido atingido ou mesmo que o novo estímulo promoveu uma resposta mais efetiva. Esta hipótese se correlaciona com o retorno das visualizações de lesões, após a reinfecção, em que foi observado abrandamento das lesões, com curso clínico mais curto.



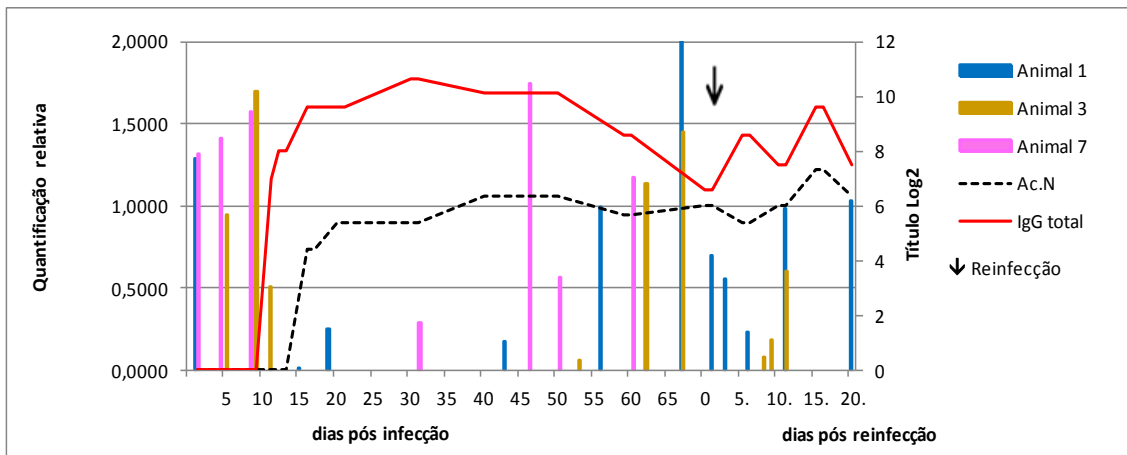


Figura 17 - Quantificação do DNA de VACV nas fezes e curva de anticorpos neutralizantes (Ac.N) e anticorpos totais (IgG total), durante os 67<sup>o</sup> dias pós-infecção e os 20 dias pós reinfeção.

#### 5.4 - Detecção do VACV em tecidos

Foi possível detectar e quantificar de forma relativa a distribuição do VACV em tecidos das vacas experimentalmente infectadas e posteriormente reinfectadas ou imunodeprimidas.

O DNA de VACV foi detectado pela PCR *nested* nos linfonodos mesentéricos, íleos e em pelo menos um dos linfonodos retromamários (direito ou esquerdo) de todos os animais. Na tonsila foi possível detectar a presença do DNA de VACV em apenas um animal, enquanto que no baço e fígado o DNA estava presente em 50% (4/8) dos animais (Figura 18).

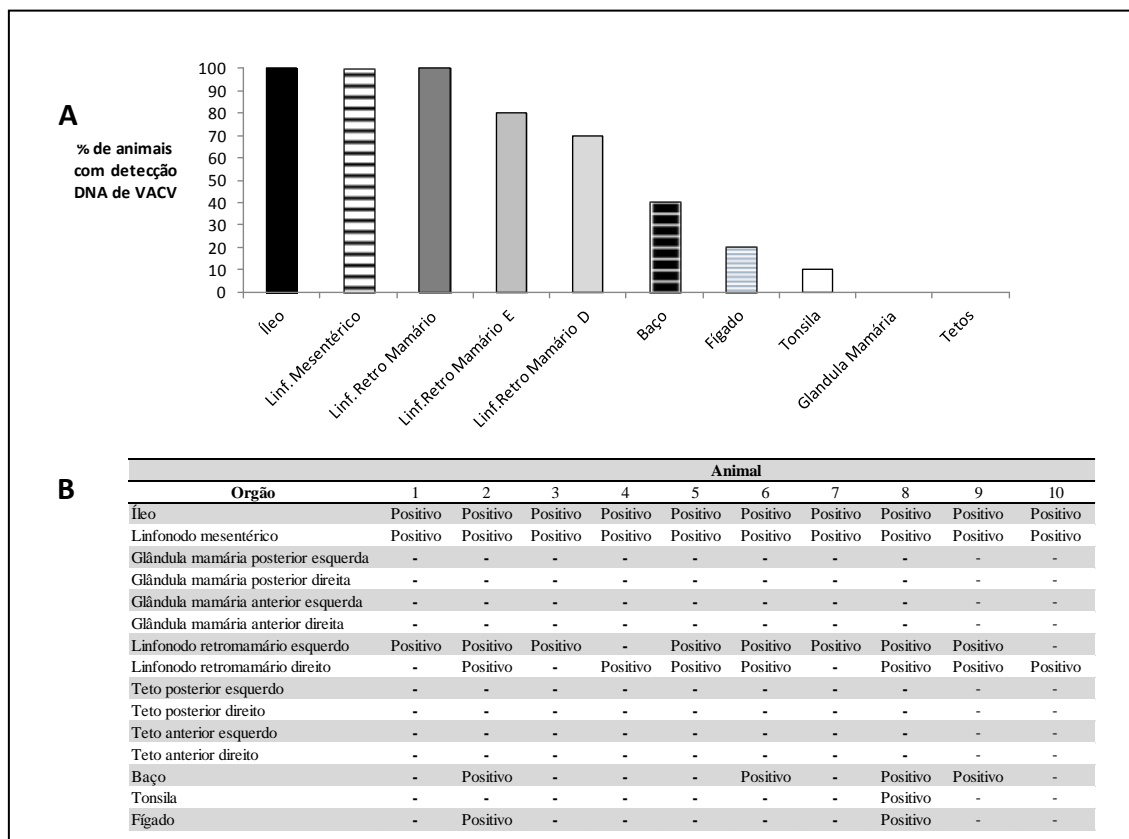


Figura 18 - Porcentagem de animais que apresentaram detecção do DNA de VACV em órgãos pela PCR *nested* (A) Relação de tecidos positivos em cada um dos animais experimentais (B). Linf.= linfonodo; E= esquerdo; D= direito.

Na quantificação relativa realizada pela PCR em tempo real, as amostras de íleo, linfonodo mesentérico e linfonodos retromamários apresentaram correlação na detecção qualitativa apresentada pela PCR *nested*. Não houve diferença estatística entre a quantificação apresentada entre os tecidos ou entre animais quando considerado apenas um tecido ou quando considerado os grupos imunodeprimidos e reinfetados. Entretanto, descritivamente, quando comparada a quantificação entre os tipos de amostras analisadas (sangue, fezes e tecidos), podemos observar que a quantidade de vírus nos tecidos foi menor do que no sangue e nas fezes, sendo que

entre os tecidos, as maiores quantidades de vírus encontradas foram nos linfonodos retromamários, mesentérico e no íleo, respectivamente (Figura 19).

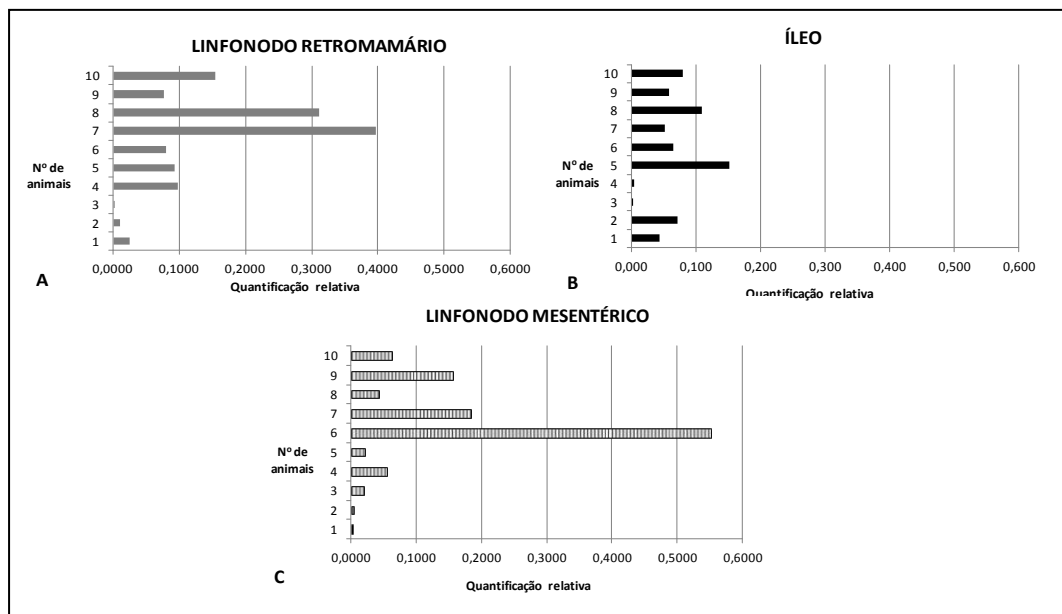


Figura 19 - Quantificação relativa do DNA de VACV nos linfonodos retromamários (A), nos íleos (B) e nos linfonodos mesentéricos (C) dos animais dos grupos experimentais. Os valores para os linfonodos retromamários correspondem a média entre o linfonodo retromamário esquerdo e o direito quando a detecção ocorreu em ambos em um mesmo animal.

Em nenhum animal foi possível fazer a quantificação relativa do DNA viral no baço, tonsila e fígado. Esta divergência entre a PCR *nested* e a PCR em tempo real se deve provavelmente à natureza das amostras, uma vez que algum inibidor presente nestes órgãos poderia ter interferido na reação da PCR em tempo real.

A infecção dos tecidos linfóides também foi constatada pela técnica de IHQ que evidenciou a presença de imunomarcações para o VACV. A comparação entre os resultados obtidos na IHQ nos linfonodos mesentéricos, retromamários, baço, tonsila e a parte distal do íleo mostrou uma concordância com a PCR *nested*. Nestes tecidos, as imunomarcações foram detectadas em macrófagos, linfócitos, células epiteliais e células caliciformes. Essa infecção associada a células também

foi relatada em infecções por via aerógena pelo MPXV em monócitos de macacos (Zauch et al. 2001) e em macrófagos presentes no intestino delgado de macacos imunizados por via enteral com o VACV (Osipov et al., 1977).

A imunomarcação nos linfonodos mesentéricos (Figura 20A) e nos íleos foi observada em todos os animais, e especificamente nos íleos, foi observada imunomarcação em macrófagos e linfócitos localizados nas Placas de Peyer (Figura 20B), sendo que nos animais 1 e 8 foi observada hiperplasia nestes aglomerados linfonodulares. Essa afinidade do VACV por esses tecidos linfóides localizados no intestino também foi relatada por Ferreira e colaboradores (2008a), que demonstraram também uma hiperplasia nas placas de Peyer localizadas no íleo de camundongos Balb/c infectados com amostras de VACV-

WR e GP2V. Goff e colaboradores (2007), em infecções com CPXV, também demonstraram através de titulações e ensaios de imunofluorescência, intensa

multiplicação viral no intestino de camundongos Balb/c, assim como nos linfonodos e tecidos adiposos mesentéricos.

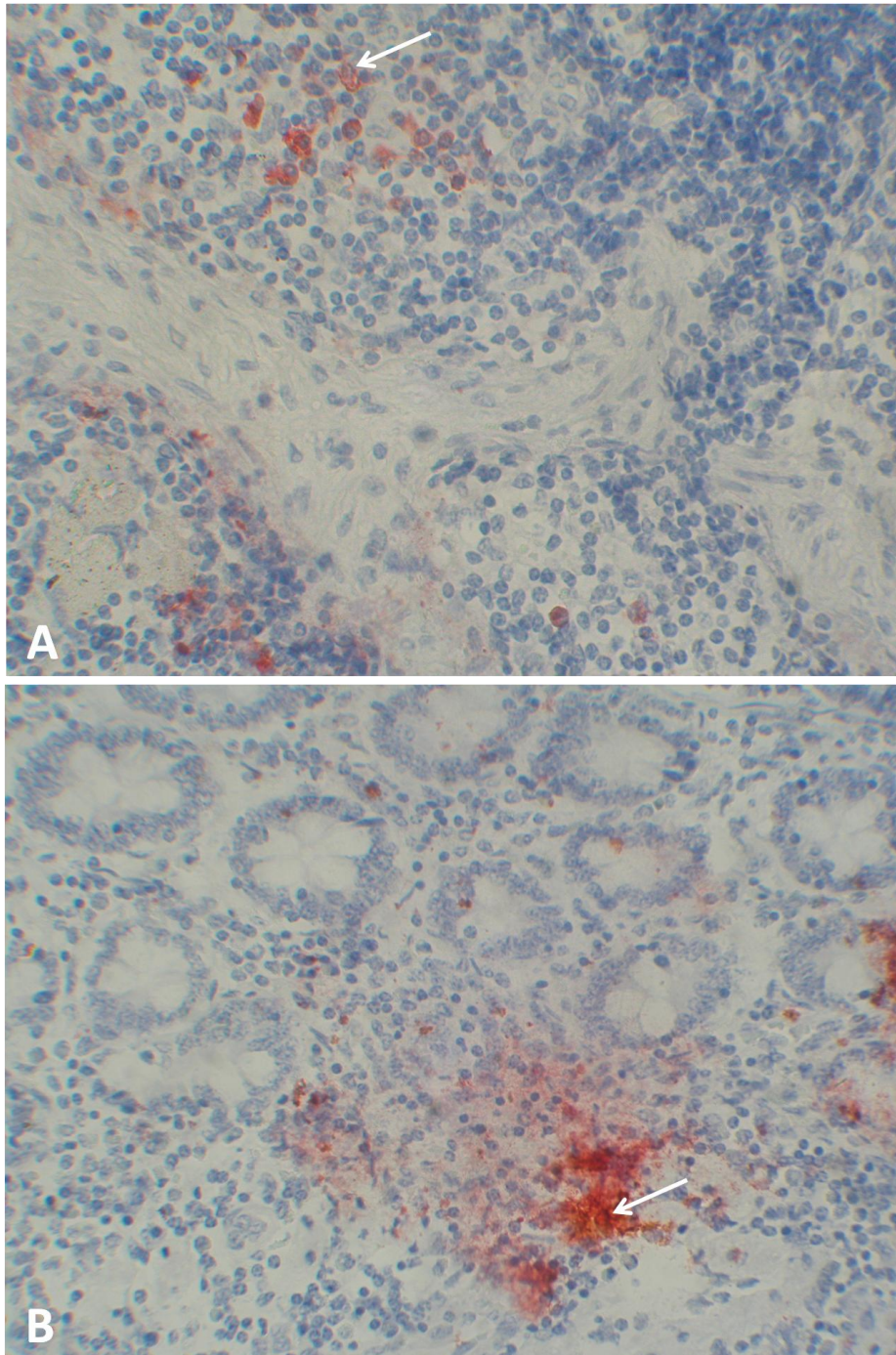


Figura 20 - Linfonodo mesentérico (A) e placa de Peyer (B) com imunomarcações multifocais para o VACV em linfócitos do animal 1 no 92º dia pós-infecção. Aumento 40X.

No íleo do animal 1 foram observadas áreas com intensa imunomarcção em células epiteliais e nas células caliciformes (Figura 21). As células epiteliais de revestimento são células indiferenciadas multipotentes que originarão os tipos celulares diferenciados. Como exemplo temos, as células de Goblet ou células caliciformes que são células diferenciadas presentes nas mucosas dos tratos respiratório, ocular e digestivo. Com função glandular, essas

células secretam mucina, que no intestino se dissolve na água formando o muco. Na secreção da mucina, essas células utilizam o mecanismo merócrino, eliminando somente as secreções ficando suas células intactas, ou o mecanismo apócrino em que são eliminadas partes das células junto com a secreção (Junqueira e Carneiro, 2004; Spencian e Oliver, 1991).

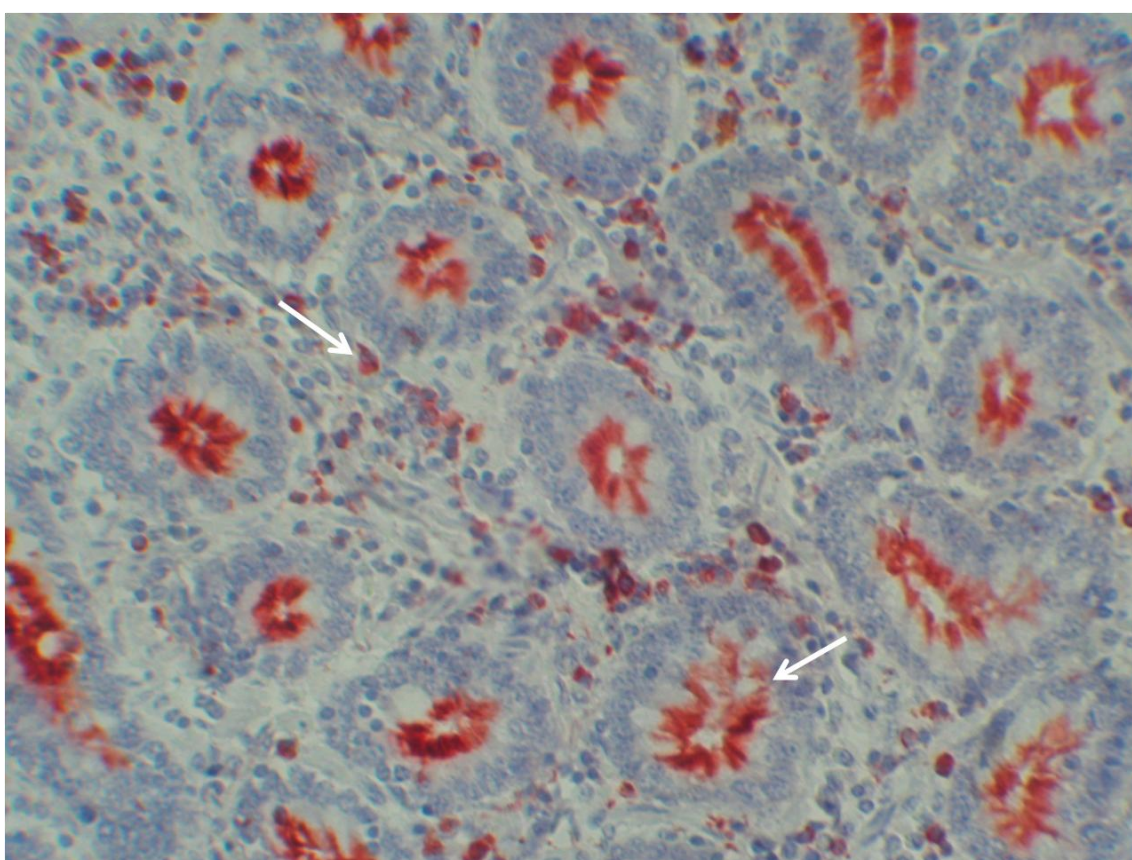


Figura 21 - Imunohistoquímica em íleo evidenciando imunomarcções positivas para VACV em células epiteliais (seta da esquerda) e em células caliciformes (seta da direita) presentes na submucosa do animal 1 no 92 d.p.i. Aumento 40X.

A infecção das células caliciformes no intestino pelo VACV provavelmente depende da presença de receptores que permitirão que o vírus adsorva e penetre nestas células. Células caliciformes produzem muco rico em glicoproteínas que protege e lubrifica a superfície desses epitélios, entretanto, essa matriz pode

também atuar como adesivos para vírus e bactérias e, assim, facilitar a adsorção ou a colonização (Rogers, 1997).

Elementos de expressão ubíqua e de caráter aniônico, como os glicosaminoglicanos e outros componentes da matriz extracelular, como condroitina sulfato e heparano

sulfato, vêm sendo apontados como possíveis receptores celulares envolvidos na adsorção dos poxvírus (Hsiao et al., 1999; Moss, 2001; *revisado por* McFadden, 2005). Diferentes glicoproteínas virais (A21, A27, D8, F9, G9, H2 e H3) parecem estar envolvidas na formação do complexo de fusão-penetração (Moss, 2005; Ojeda et al., 2006). A adsorção do vírus maduro do VACV com glicosaminoglicanos na superfície da célula é mediada por três proteínas de membrana, as proteínas A27, D8 e H3 (Bengali et al., 2009).

A infecção das células caliciformes poderiam facilitar a disseminação de partículas virais nas fezes, uma vez que possuem intensa multiplicação, sendo constantemente renovadas. As células do epitélio intestinal são substituídas completamente em período de 2 a 7 dias, sendo liberadas junto com as fezes (Crosnier, 2006). Da mesma maneira, o mecanismo de secreção de muco do tipo apócrino, que libera parte da células junto com a mucina, poderia também contribuir para a disseminação de partículas virais nas fezes.

A infecção do epitélio intestinal pelo VACV já foi evidenciada em experimentos com macacos (*Macacus rhesus*), após a imunização por via enteral, em que houve detecção do VACV por imunofluorescência em macrófagos presentes no epitélio intestinal (Osipov et al., 1977). A presença do VACV no intestino também já foi descrita em infecções experimentais envolvendo camundongos e coelhos

(Ferreira et al., 2008a; Cargnelutti et al., 2012). Entretanto, pela primeira vez, utilizando o modelo bovino, foi comprovado que a infecção intradérmica nos tetos pelo VACV dissemina-se para o trato digestivo acometendo linfonodos mesentéricos e o intestino na região do íleo.

Detalhes da patogenia do VACV em bovinos são desconhecidos. A partir dos resultados obtidos neste trabalho, associado a recentes estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa e aos trabalhos de patogenia em outros OPV e em VACV em outros modelos animal, propõe-se que a infecção intradérmica do VACV em tetos de bovinos inicia-se com a penetração do vírus no epitélio local, a partir de uma solução de continuidade, onde ocorre multiplicação primária com formação de lesões vesiculares e exantemáticas (pápulas, vesículas e úlceras). Após a replicação local de entrada e com a penetração na derme as partículas virais podem se disseminar a partir de vasos sanguíneos e linfáticos atingindo os linfonodos regionais, no caso os retromamários. Com o acometimento desses linfonodos regionais, através da infecção de macrófagos e linfócitos, o vírus seria disseminado para os linfonodos mesentéricos e conglomerados linfonodulares ileais (placas de Peyer), células epiteliais e caliciformes localizadas no íleo, que a partir da infecção deste promoveriam a excreção de partículas virais nas fezes. Posteriormente, também poderia ocorrer a disseminação do VACV para outros tecidos linfoides, como baço, fígado, tonsila e outros linfonodos (Figura 22).

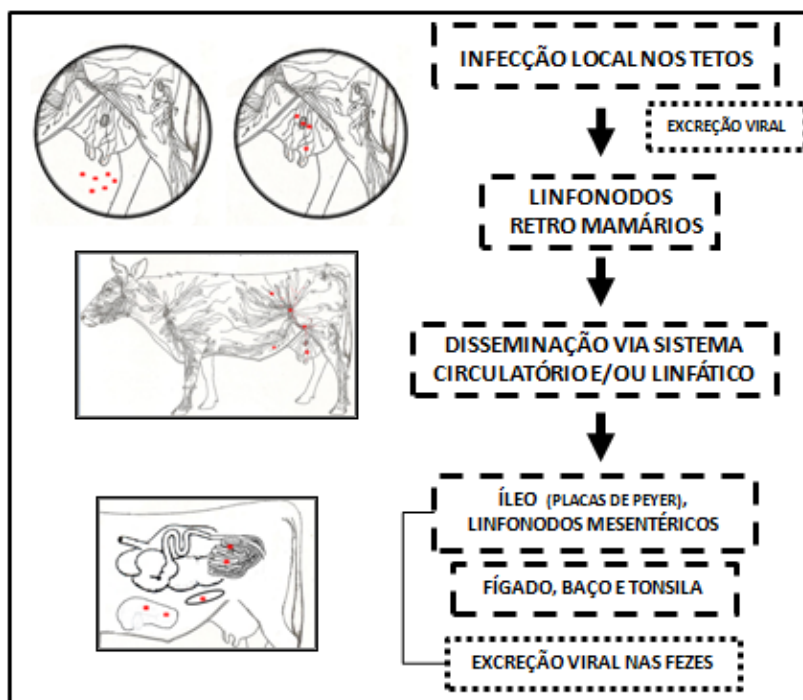


Figura 22 - Proposta de patogênese na infecção local pelo *Vaccinia virus* - GP2 em bovinos.

Durante pré-experimento realizado por Rehfeld (2011) foi observado pela IHQ que em dois animais, no 4º d.p.i., os tetos, a glândula mamária e os linfonodos retromamários foram positivos para o VACV, e que com 9 d.p.i, outros dois animais já apresentavam imunomarcagem mais discreta e localizada nos mesmos tecidos, quando comparado com os animais sacrificados no 4º d.p.i. No presente estudo, após o 82º d.p.i, observou-se ausência de imunomarcagem nos tetos e glândulas mamárias sugerindo que o VACV não permanece no sítio primário de infecção. A detecção em tecidos linfóides e a excreção prolongada do vírus nas fezes mesmo após a resolução das lesões, mostra novas evidências que contribuem para o estudo da patogênese do VACV em bovinos, demonstrando pela primeira vez, neste modelo experimental, que ocorre

disseminação sistêmica do VACV com uma infecção prolongada.

A detecção em tecidos de outros OPV, como o ECTV, CPXV e o VARV também evidencia possíveis infecções sistêmicas. Fenner (1948), descreveu linfadenopatia nos linfonodos adjacentes ao local de infecção nas infecções pelos OPV. Em camundongos, infecções causadas pelo ECTV progredem da multiplicação no local de entrada e alcançam a corrente sanguínea e o sistema linfático, com posterior disseminação para diversos órgãos como fígado, baço, rins e intestino (Fenner, 1948). Em infecção experimental por via aerógena com o CPXV, em modelos símios (*Macaca fascicularis*), foi reproduzida infecção sistêmica com quadro hemorrágico e detecção do DNA em diversos tecidos como linfonodos, timo, baço, medula óssea e pulmão (Zaucha et al., 2001). Utilizando

também como modelo o macaco (*Macaca fascicularis*) em infecções por via endovenosa com o VARV, Wahm-Jensen e colaboradores (2011) observaram o desenvolvimento de doença hemorrágica com comprometimento sistêmico detectando a presença do vírus em baço, fígado, medula óssea, linfonodos, pulmão, rim, coração, testículos, cérebro e no sangue.

Em experimentos com o VACV em camundongos e coelhos, infecções sistêmicas também foram observadas (Ferreira et al., 2008b; Cargnelutti et al., 2012). Ferreira e colaboradores (2008b), demonstraram que em infecções intranasais de camundongos Balb/c com algumas amostras brasileiras de VACV, isoladas a partir de surtos de VB, podem causar sinais clínicos severos demonstrados pela pilo-ereção, arqueamento do dorso e perda de peso significativa. Altos títulos virais foram constatados em sítios primários da infecção como traquéia e pulmões, mas também foi observado tropismo do VACV por outros órgãos, incluindo cérebro, fígado, rins, coração e baço. Em coelhos também inoculados por via intranasal, Cargnelutti e colaboradores (2012) demonstraram quadro respiratório grave e doença sistêmica evidenciada pelo aparecimento de lesões nas orelhas e nas pálpebras e pela presença do vírus no intestino e no pulmão.

Os recentes estudos de infecção experimental com o VACV em modelo murino e em coelhos, associados aos resultados encontrados neste trabalho em modelo bovino, evidenciam que a infecção por VACV promove disseminação para diversos tecidos e sinalizam para uma disseminação sistêmica.

## 6. CONCLUSÕES

A infecção experimental pelo VACV em bovinos demonstrou que o vírus apresenta disseminação sistêmica, que pode ser comprovada pela detecção e quantificação do DNA viral no sangue, fezes e em tecidos linfóides, demonstrando, pela primeira vez, que o VACV é capaz de causar este tipo de infecção em bovinos.

Infecções do VACV em bovinos produz infecção de células epiteliais e caliciformes no intestino, e em macrófagos e linfócitos em tecidos linfóides.

A detecção de partículas viáveis do VACV nas fezes de vacas em lactação experimentalmente infectadas sugere que essa via de excreção seja uma forma de disseminação do vírus no ambiente, podendo favorecer a transmissão da VB dentro e entre propriedades.

A DNAnemia e a detecção do DNA de VACV nas fezes persistiu mesmo após a resolução das lesões nos tetos dos animais, demonstrando que a infecção causada pelo VACV não seja aguda, e sim, prolongada.

Os animais infectados e posteriormente imunodeprimidos experimentalmente, voltaram a apresentar DNAnemia e permaneceram eliminando o VACV nas fezes com tendência a aumento nesta excreção, podendo sugerir que exista algum mecanismo de persistência na infecção do VACV em bovinos e que este seja influenciado pelo sistema imunológico.

A reinfecção dos animais pelo VACV demonstrou que pode ocorrer o reaparecimento de lesões nos tetos e recrudescimento da viremia mesmo na presença de anticorpos circulantes.



## 7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHÃO, J.S. *Transmissão de Vaccinia virus em modelo murino: eliminação e resistência das partículas virais*. 2008. nf. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

ABRAHÃO, J.S. ; TRINDADE, G.S.; FERREIRA, J.M.S et al. Long-lasting stability of Vaccinia virus strains in murine feces: implications for virus circulation and environmental maintenance. *Arch. Virol.*, v.155, p. 1200-1222, 2009a.

ABRAHÃO, J.S.; LIMA, L.S.; ASSIS, F.L. et al. Nested-multiplex PCR detection of Orthopoxvirus and Parapoxvirus. *Virol J.*, v. 6, n.140, p. 1-5, 2009b.

ABRAHÃO, J.S.; OLIVEIRA, T.M.L.; CAMPOS, R.K. et al. Bovine Vaccinia Outbreaks: Detection and isolation of vaccinia virus in milk samples. *Foodborne Pathog. Dis.*, v. 6, p. 1-6, 2009c.

ABRAHÃO, J.S., GUEDES, M.I.M.; TRINDADE, G.S. et al. One more piece in the VACV ecological puzzle: Could peridomestic rodents be the link between wildlife and bovine vaccinia outbreaks in Brazil? *PLoS ONE*, v.4, n.10, p.e7428, 2009d.

ABRAHÃO, J.S.; DRUMOND, B.P.; DA SILVA-FERNANDES, A.T. et al. Rapid detection of by semi-nested PCR directly from clinical specimens: A useful alternative for routine laboratories. *J. Med. Virol.*, v. 82, p. 692-699, 2010a.

ABRAHÃO, J.S.; SILVA-FERNANDES, A.T.; ASSIS, F.L. Human Vaccinia virus and Pseudocowpox virus co-infection: Clinical description and phylogenetic characterization. *J Clin Virol.* v., 48, p. 69–72, 2010b.

ABRAHÃO, J.S.; SILVA-FERNANDES, A.T.; LIMA, L.S. et al. *Vaccinia virus* Infection in Monkeys, Brazilian Amazon. *Emerg. Infect. Dis.*, v.16, n.6, p. 976-979, 2010c.

ANDRADE, A.A.; SILVA, P.N.; PEREIRA, A.C. et al. The vaccinia virus-stimulated mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway is required for virus multiplication. *Biochem. J.* v.381, p.437–446, 2004.

BENNETT, M.; BAXBY, D. Cowpox. *J. Clin. Microbiol.* v.45, n.4, p.157-158, 1996.

BENGALI, Z.; TOWNSLEY, A.C.; MOSS, B. Vaccinia virus strain differences in cell attachment and entry. *Virology*, n.389, p.132-140, 2009.

BENNING, N.E.; HASSETT. Vaccinia virus infection during murine pregnancy: a new pathogenesis model for vaccinia fetal. *J. Virol.*, v.78, n.78, p.3133-9, 2004.

BLOOD, D. C.; RADOSTITS, O. M. *Doenças causadas por vírus e clamídias*. 7<sup>a</sup> ed, Rio de Janeiro: Guanabara, 1991. In: Clínica Veterinária. cap. 21, p.1737.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 44 de 02 de outubro de 2007. Diretrizes gerais para a Erradicação e a Prevenção da Febre Aftosa. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisc/consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=18117>>. Acesso em 22/02/2011.

BREMAN J.G.; ARITA I. The confirmation and maintenance of smallpox eradication. *N. Engl. J. Med.*, v. 303, p. 1263-1273, 1980.

BREMAN, J.G.; HENDERSON, D.A. Diagnosis and management of smallpox. *N. Engl. J. Med.*, v.346, p.1300-1308, 2002.

- BRUM, M.C.S.; DOS ANJOS, B.L.; NOGUEIRA, C.E.W. et al. An outbreak of orthopoxvirus-associated disease in horses in southern Brazil. *J. Vet. Diagn. Invest.* 22(1):143-7, 2010.
- BULLER, R.M.; CHAKRABARTIS, S.; MOSS, B. et al. Cell proliferative response to vaccinia virus is mediated by VGF. *Virology*, v. 164(1), p. 182-192, 1988.
- BULLER, R.M.; PALUMBO, G.J. Poxvirus pathogenesis. *Microbiol. Rev.*, v.55, n.1, p.80-122, 1991.
- CARGNELUTTI, J.F.; SCHMIDT, C.; MASUDA, E.K. et al., Vaccinia viruses isolated from cutaneous disease in horses are highly virulent for rabbits, *Microb. Pathog.*, v.52, n.3, p.192-199, 2012.
- CARLETTI, F.; DI CARO, A.; CALCATERRA, S. et al. Rapid, differential diagnosis of orthopox and herpesviruses based upon real-time PCR product melting temperature and restriction enzyme analysis of amplicons. *J. Virol. Methods*. v.29, n.1, p.97-100, 2005.
- CAMPOS, R.K.; BRUM, M.C.S.; NOGUEIRA, C.E.W. et al. Assessing the variability of Brazilian Vaccinia virus isolates from a horse exanthematic lesion: coinfection with distinct viruses. *Arch. Virol.* v.156, p. 275-283, 2011.
- CANAL, G.W. *Poxviridae*. In: FLORES, E.D. (org.), *Virologia Veterinária*. Ed. UFSM. Santa Maria/RS, 2007, Cap. 18, p. 491-504.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Household Transmission of Vaccinia Virus from Contact with a Military Smallpox Vaccinee Illinois and Indiana. *MMWR Morb. Mortal Wkly. Rep.*, v. 56 (19); p.478-481, 2007.
- CHAPMAN, J.L.; NICHOLS, D. K.; MARTINEZ, M. J. et al. Animal Models of Orthopoxvirus Infection. *Vet. Pathol.*, v. 47, p.852, 2010.
- CHAUDHRI,G.; PANCHANATHAN, V.; BLUETHMANN, H. Obligatory requirement for antibody in recovery from a primary poxvirus infection. *J. Virol*, v.80, n.13, p. 6339-6344, 2006.
- COHEN, H.W.; GOULD, R.M.; SIDEL, V.W. Detection of Vaccinia DNA in the Blood Following Smallpox Vaccination. *JAMA*. v. 295, n. 16, p.1898-1900, 2006.
- CORAS, B.; ESSBAUER, S.; PFEFFER, M. Cowpox and a cat. *Lancet*. v. 362, p. 446, 2005.
- COSTA, E.O.; RIBEIRO, A.R.; WATANABE, E.T. et al. Infectious bovine mastitis caused by environmental organisms. *Zentralbl Veterinarmed B.*, v.45, p.65-71, 1998.
- CRAMPTON SP, VOYNOVA E, BOLLAND, S. Innate pathways to B-cell activation and tolerance. *Ann N Y Acad Sci.*, v.1183, n.6, p.58-68, 2010.
- CROSNIER, C.; STAMATAKI, D.; LEWIS, J. Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. *Nat Rev Genet.*, n.7, p. 349-359, 2006.
- D'ANUNCIAÇÃO, L.; GUEDES, M.I.M.C.; OLIVEIRA, T.L. et al. Filling one more gap: experimental evidence of horizontal transmission of Vaccinia virus between bovines and rodents. *Vector Borne Zoonotic Dis*. v.12, n.1, p.61-64, 2012.

- DAMASO, C.R.A.; ESPOSITO, J.J.; CONDIT, R.C. et al. An emergent poxvirus from humans and cattle in Rio de Janeiro State: Cantagalo vírus may derive from Brazilian smallpox vaccine. *Virology*, v. 277, p.439-449, 2000.
- DAMASO, C.R.A.; REIS, S.A.; JESUS, D.M. et al. A PCR-based assay for detection of emerging vaccinia-like viruses isolated in Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis.*, v.57, n.1, p.39-46, 2007.
- DAMON, I.K. Poxviruses. In: KNIPE, D.M. , HOWLEY, P.M., editors, *Fields virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p. 2947–75.
- DE SOUZA TRINDADE G.; DA FONSECA F.G.; MARQUES J.T. Araçatuba virus: a vaccinia like virus associated with infection in humans and cattle. *Emerg. Infect. Dis.* v.9, p. 155-160, 2003.
- DE SOUZA TRINDADE, G.; EMERSON, G.; CARROLL, D. et al. Brazilian Vaccinia viruses and their origins. *Emerg. Infect. Dis.*, v.13, p.965-972, 2007a.
- DE SOUZA TRINDADE, G; DRUMOND, B.P. GUEDES, M.I.M.C. et al. Zoonotic Vaccinia Virus infection in Brazil: Clinical description and implications for health professionals. *J. Clin. Microbiol.*, v.45, n.4, p. 1370–1372, 2007b.
- DE SOUZA TRINDADE, G.; LI, Y. ; OLSON, V. A. et al. Real-time PCR assay to identify variants of Vaccinia virus: Implications for the diagnosis of bovine vaccinia in Brazil. *J Virol Methods.*, v. 152, p. 63-71, 2008.
- DINIZ S, TRINDADE G, et al. Surto de varíola murina em camundongos suíços em biotério - relato de caso. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* v.8, n.5, p.152-156, 2001.
- DOCEUL, V.; HOLLINSHEAD, M.; VAN DER LINDEN, L et al. Repulsion of superinfecting virions: a mechanism for rapid virus spread. *Science.* v.327, n.87, p.873-6, 2010.
- DONATELE, D.M.; TRAVASSOS, C.E.P.F., et al. Epidemiologic study of bovine poxviral disease in the southern region of Espírito Santo state, Brazil. Em: XIV Encontro Nacional de Virologia, 2003, Florianópolis. *Virus Reviews & Research – Journal of the Brazilian Society for Virology.* v.2, n.5, p.45-9, 2003.
- DRUMOND, B. P.; LEITE, J. A.; FONSECA, C. A. et al. Brazilian Vaccinia virus strains are genetically divergent and differ from the Lister vaccine strain. *Microbes Infect.*, v.10, n.2, p.185- 197, 2008.
- DURAFFOUR. S.; MEYER, H.; ANDREI, G. Camelpox virus. *Antiviral Res.* v.92, n.2, p.167-86, 2011.
- EDGHILL-SMITH, Y.; GOLDING, H.; MANISCHEWITZ, J. et al. Smallpox vaccine-induced antibodies are necessary and sufficient for protection against monkeypox virus. *Nat. Med.*, v.11, n.7, p.740-747, 2005.
- ELAHI, S.M.; HARPIN, S.; CORNAGLIA, E. et al. Antigenic variation among bovine viral diarrhea virus (VDBV) strains and the role of different cell fixation methods in immunoassays. *Can. J. Vet. Res.*, v.61, p.34–38, 1997.
- ESPOSITO, J.J. e KNIGHT, J.C. Orthopoxvirus DNA: a comparison of restriction profiles and maps. *Virology*, v. 143, n.1, p.230-51. 1985.
- ESPOSITO, S.; FENNER, F. Poxviruses. In: Field B.N.; Knipe, D.M.; HOWLEY, P.M., editors. *Fields virology*, 4<sup>o</sup> ed, vol 2.

- Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins; p. 2885–2921, 2001.
- ESTEBAN, D.J.; BULLER, R.M. *Ectromelia virus*: the causative agent of mousepox. *J. Gen. Virol.*, v.86, p.2645-59, 2005.
- ESSBAUER, S.; MEYER, H.; PORSCH-OZCURUMEZ, M. et al. Long-lasting stability of vaccinia virus (orthopoxvirus) in food and environmental samples. *Zoonoses Public Health*, v.54, p.118-124, 2007.
- ESSBAUER, S.; PFEFFER, M.; MEYER, H. Zoonotic poxviruses. *Vet. Microbiol.* v.140, p. 229-236, 2010.
- FENNER, F.; WITTEK, R.; DUMBELL, K.R. The Pathogenesis, pathology, and immunology of orthopoxvirus infections. In: *The Orthopoxviruses*, p 85-141. San Diego, CA: Academic Press. 1989.
- FENNER, F., BULLER, R.M. Mousepox. In: *Viral Pathogenesis*, ed. Nathansan N, p. 535–553. Lippincott-Raven, Philadelphia, PA, 1997.
- FENNER, F. Adventures with poxviruses of vertebrates. *FEMS Microbiol. Rev.*, v.24, p.123-133, 2000.
- FERREIRA, P. Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ. *Varíola*. Agência Fiocruz de Notícias. 2006. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/ccs/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=310&sid=6>> Acesso em: 09/02/11.
- FERREIRA, J. M. S.; ABRAHÃO, J. S.; DRUMOND, B. P. et al., Vaccinia virus: shedding and horizontal transmission in a murine model. *J. Gen. Virol.*, v.89, t.12, 2986-2991, 2008a.
- FERREIRA, J. M. S.; DRUMOND, B. P.; GUEDES, M. I. M. C. et al. Virulence in murine model shows the existence of two distinct populations of Brazilian Vaccinia virus strains. *PLoS ONE*, v.3, n.8, p.1-10, 2008b.
- FLORES, E.D.; KREUTZ, L.C. Replicação viral. In: FLORES, E.D. (org.), *Virologia Veterinária*. Ed. UFSM. Santa Maria/RS, 2007, Cap. 05, p.109-134.
- FONSECA, F. G.; LANNA, M. C. S.; CAMPOS, M. A. S. et al. Morphological and molecular characterization of the poxvirus BeAn 58058. *Arch. Virol.*, v.143, n.9, p.1171-1186, 1998.
- FONSECA, F. G.; TRINDADE, G. S.; SILVA, R. L. et al. Characterization of vaccinia-like virus isolated in a Brazilian forest. *J. Gen. Virol.*, v.83, n.1, p. 223-228, 2002.
- FONSECA, F. G.; KROON, E. G.; NOGUEIRA, M.L. et al. Zoonotic vaccinia virus outbreaks in Brazil. *Future Virology*, v.6, n.6, p. 697-707, 2011.
- FREBEL, H., RICHTER, K., OXENIUS, A. How chronic viral infections impact on antigen-specific T-cell responses. *Eur J Immunol.*, v.40, n.3, p.654-63, 2010.
- GERBER, P.F.; MATOS, A.C.; GUEDES, M.I.M.C. et al. Validation of an immunoperoxidase monolayer assay for total anti- *Vaccinia virus* antibody titration. *J Vet Diagn Invest.*, v.24, n.2, p.355-358, 2012.
- GLEDHILL, A. W. Latent Ectromelia. *Nature*, v. 196, p. 298, 1962.
- GOFF, A.; TWENHAFEL, N.; GARRISON, A. et al. In vivo imaging of cidofovir treatment of cowpox virus infections. *Virus Res.*, v. 128, p. 88-98, 2007.

- GUBSER, C.; HUE, S.; KELLAM, P. et al. Poxvirus genomes: a phylogenetic analysis. *J. Gen. Virol.*, v.85, p.105-17, 2004.
- HAFEZ, E.S.E.; BOUISSOU, M.F. The behavior of cattle. In: E.S.E. Hafez (Ed.) Behaviour of domestic animals. London: Bailliere, TINDALL & COX, 1969, p. 203 – 244.
- HAENSSLE, H.A.; KIESSLING, J.; KEMPF, V.A. et al. Orthopoxvirus infection transmitted by a domestic cat. *J Am Acad Dermatol.* v.54, n.2, p.1-4., 2006.
- HARPER, G.J. Airborne micro-organisms: survival tests with four viruses. *J. Hyg.* v.59, n.8, p.479-86, 1961.
- HENDERSON, D.A.; MOSS, B. Smallpox and vaccinia in vaccines. In: PLOTKIN, S.A.; ORESTEIN, W.A., eds. Vaccines, 3<sup>o</sup> ed. Philadelphia: W. B. Saunders, p.74-97, 1999.
- HSIAO, J.C.; CHUNG, C.S.; CHANG, W. Vaccinia envelope D8L protein binds to cell surface chondroitin sulfate and mediates intracellular mature virions adsorption to cells. *J. Virol.*, v.73, n.10, p.8750-8761, 1999.
- HUGHES, A.L.; FRIEDMAN, R. Poxvirus genome evolution by gene gain and loss. *Mol. Phylogenet Evol.* v.35, n.1, p.186-195, 2005.
- HUGHES, C.M.; BLYTHE, D.; YU, L. Vaccinia virus infections in martial arts gym, Maryland, USA, 2008. *Emerg Infect Dis.*, v.17, n.4, p. 730-733, 2011.
- HUTSON, C.L.; OLSON, V.A.; CARROLL, D.S. et al. A prairie dog animal model of systemic orthopoxvirus disease using West African and Congo Basin strains of monkeypox virus. *J Gen Virol.* v.90, n.2, p.323-33, 2009.
- HUTSON, C.L.; CARROLL, D.S.; GALLARDO-ROMERO, N. Monkeypox disease transmission in an experimental setting: prairie dog animal model. *PLoS ONE.* v.6, n.12, p. e28295, 2011.
- IKETANI, Y.; INOSHIMA, Y. et al. Persisten parapoxvirus infection in cattle. *Microbiol. Immunol.* v.46, n.4, p.285-291, 2002.
- JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Histologia Básica. 10<sup>a</sup> ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2004. 495 p.
- JOKLIK, W.K. The purification fo four strains of poxvirus. *Virology.* v.18, p.9-18, 1962.
- KROON, E.G.; MOTA, B.E.F.; ABRAHAO, J.S. et al. Zoonotic Brazilian Vaccinia virus: From field to therapy. *Antiviral Res.* v.92, n.2, p.150-163, 2011.
- LANNA, M.C. (1980) *Propriedades biológicas dos poxvirus silvestres Cotia e BeAn58058 Isolados no Brasil. Belo Horizonte – MG.* 1980. nf. 105. Dissertação (Mestrado) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- LAW, M.; SMITH, G.L. Antibody neutralization of the extracellular enveloped form of vaccinia virus. *Virology* v.280, p.132–142, 2001.
- LEITE J.A.; DRUMOND B.P.; TRINDADE G.S.; Passatempo virus, a vacciniavirus strain, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* v. 12, p. 1935-1938, 2005.
- LEPARC-GOFFART, I.; POIRIER, B.; GARIN, D. et al. Standardization of a neutralizing anti-vaccinia antibodies titration method: an essential step for titration of vaccinia immunoglobulins and

- smallpox vaccines evaluation. *J Clin Virol.* v.32, n.1, p.47-52, 2005.
- LEWIS-JONES, S. Zoonotic poxvirus infections in humans. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, v.17, p.81-89, 2004.
- LOBATO, Z.I.P.; TRINDADE, G.S.; FROIS, M.C.M. et al. Surto de varíola bovina causada pelo vírus *Vaccinia* na região da Zona da Mata Mineira. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.57, n.4, p.423-429, 2005.
- LOPES, S.; LACERDA, J. P.; FONSECA, I. E. et al. Cotia Virus: a new agent isolated from sentinel mice in Sao Paulo, Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 14, n.1, p.156-157, 1965.
- MACFADDEN, G. Poxvirus Tropism. *Nature Reviews.*, v.3, n.3, p.201-213, 2005.
- MADUREIRA, M.C. *Vaccinia Bovina no Estado de Minas Gerais, 2005-2007.* 2009. nf. Tese (Doutorado) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- MAIBORODA A.D. Experimental infection of Norwegian rats (*Rattus norvegicus*) with ratpox virus. *Acta Virol.* v.2, n.65, p.106-9, 1982.
- MALORNY, A.; HOOFFAR, J. Toward standardization of diagnostic PCR testing of fecal samples lessons from the detection of *Salmonellae* in Pigs. *J. Clin. Microbiol.*, p. 3033-3037, 2005.
- MARQUES, J.T.; TRINDADE, G.D., et al. The genome of *Cowpox virus* contains a gene related to those encoding the epidermal growth factor, transforming growth factor alpha and vaccinia growth factor. *Virus Genes.* v.18, n.2, p.151-60, 2001.
- MATHEWS, B.W.; SOLLENBERGER, L.E. Grazing systems and spatial distribution of nutrients in pastures: soil considerations. In: NUTRIENT CYCLING IN FORAGE SYSTEMS. 1996, Columbia. Proceedings... Columbia: University of Missouri, 1996. p.213-229.
- MAZUR, C.; FERREIRA, I.I.; RANGEL FILHO, F.B. et al. Molecular characterization of Brazilian isolates of orf virus. *Vet. Microbiol.*, v.73, p.253-259, 2000.
- MEDAGLIA, M.L.; PESSOA, L.C. et al. Spread of cantagalo virus to northern Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* v.15, n.7, p.1142-3, 2009.
- MEGID, J.; APPOLINÁRIO, C.M.; LANGONI, H. Vaccinia virus in humans and cattle in southwest region of São Paulo, Brazil. *Am. J. Trop. Hyg.*, v.79, n.5, p.646, 2008.
- MEGID, J.; BORGES, I.A.; ABRAHÃO, J.S. et al. Vaccinia Virus Zoonotic Infection, São Paulo State, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.*, v.18, n.1, p.189-191, 2012.
- MOSS B. Poxvirus entry and membrane fusion. *Virology.* v.344, n.1, p.48-54, 2006.
- MOSS, B. *Poxviridae: The Viruses and Their Replication.* In: Knipe, D.M.H., Peter, M. (Eds.), *Fields Virology* Philadelphia, PA, 5 ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2007, p. 2906-2945.
- MOTA, B.E.; TRINDADE, G.S.; DINIZ, T.C. et al. Seroprevalence of orthopoxvirus in an Amazonian rural village, Acre. Brazil. *Arch. Virol.* v.155, p.1139-1144, 2010.
- NAGASSE-SUGAHARA, T. K.; KISIELIUS, J. J.; UEDA-ITO, M. et al. Human vaccinia-like virus outbreaks in Sao Paulo and Goias States, Brazil: virus detection, isolation, and identification. *Rev*

*Inst Med Trop Sao Paulo.* v.46, n.6, p.315-322, 2004.

NALCA, A.; NICHOLS, D.K. Rabbitpox: a model of airborne transmission of smallpox. *J. Gen. Virol.*, v.92, p. 31-35, 2011.

NITSCHKE, A.; BUTTNER, M.; WILHELM, S. et al. Real-time PCR detection of parapoxvirus DNA. *Clin Chem.* v.52, n.2, p.316-319, 2006.

OJEDA, S.; DOMI, A.; MOSS, B. Vaccinia virus G9 protein is an essential component of the poxvirus entry-fusion complex. *J Virol.* v.80, n.19, p.9822-9830, 2006.

OSIPOV, V.I.; VOROB'EV, A.A.; PODKUÏKO, V.N. et al. Penetration of vaccinia virus through the mucosa of the small intestine and its dissemination in the body following enteric immunization of monkeys. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol.* v.6, p.35-37, 1977.

PAHLITZSCH, R.; HAMMARIN, A.; WIDELL, A. A Case of Facial Cellulitis and Necrotizing Lymphadenitis due to Cowpox Virus Infection. *Clin Infect Dis.*, n.43, p.737-742, 2006.

PANCHANATHAN, V.; CHAUDHRI, G.; KARUPIAH, G. Correlates of protective immunity in poxvirus infection: where doe antibody stand? *Immunol Cell Biol.* n.86, p. 80-86, 2008.

PARANHOS DA COSTA, M.J.R.; RODRIGUES, L.R.A.; SOUZA, R.C. et al. Disintegration of dung pats in coast-cross pastures grazed by Holstein cows. In U. Kopke & D.G. Schulz (Eds). Proceedings of the 9<sup>th</sup> International Scientific Conference of IFOAM, São Paulo, 1992, p. 226-232.

PETERSEN, R.G.; LUCAS, H.L.; WOODHOUSE, W.W. The distribution of

excreta by freely grazing cattle and its influence on pasture fertility. 1. Excretal density. 2. Effect of returned excreta on the residual concentration of some fertilizer elements. *Agron. J.*, v.48, p.440 – 449, 1956.

PFAFFL, M.W. The Reference in qPCR - Academic & Industrial Information Platform. version 91.6. Disponível em: <<http://gene-quantification.com/>>.

PUTZ, M.M.; MIDGLEY, C.M.; LAW, M. et al. Quantification of antibody responses against multiple antigens of the two infectious forms of Vaccinia virus provides a benchmark for smallpox vaccination. *Nat. Med.*, v.12, n.11, p.1310-1305, 2006.

QUIXABEIRA-SANTOS, J.C.; MEDAGLIA, M.L.G.; PESCADOR, C.A. et al. Animal Movement and Establishment of Vaccinia Virus Cantagalo Strain in Amazon Biome, Brazil. *Emerg Infect Dis.* v.17, n.4, p.726-729, 2011.

REHFELD, I.S. Estudo da Vaccinia bovina em vacas secas e lactantes experimentalmente inoculadas com o *Vaccinia virus*. 2011. nf. Tese (Mestrado) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

ROGERS, D.F. Airway goblet cells: responsive and adaptable front-line defenders. *Eur Respir J*, n.7, p.1690-1706, 1994.

ROPP, S.L.; JIN, Q.; KNIGHT, J.C. et al. PCR Strategy for Identification and Differentiation of Smallpox and other Orthopoxviruses. *J Clin Microbiol.* v.33, n.8, p.2069-2076, 1995.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor University Press, 2 ed. 1989.

- SAMPAIO, I.B.M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. 1ed. Belo Horizonte. FEP – MVZ, p. 221, 1998.
- SARKAR, J.K.; MITRA, A.C.; MURKHERJEE, M.K. et al. Virus excretion in smallpox. 2. Excretion in the throats of household contacts. *Bull World Health Organ*. v.48, p.523-527, 1973.
- SENTSUI, H.; MURAKAMI, K.; INOSHIMA, Y et al. Isolation of parapoxvirus from a cow treated with interferon-gama. *Vet Microbiol*. v.70, p.143-152, 1999.
- SCHATZMAYR, H. G.; LEMOS, E. R.; MAZUR, C. et al. Detection of poxvirus in cattle associated with human cases in state of Rio de Janeiro: preliminary report. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. v.95, n.5, p.625-627, 2000.
- SCHATZMAYR, H. G.; COSTAB, R.V.C.; GONÇALVES, M.C.R. et al. Human and animal infections by vaccinia-like viruses in the state of Rio de Janeiro: A novel expanding zoonosis. *Vaccine*. In Press, 2012.
- SILVA, P.L.; VIANA, F.C.; RIBEIRO, S.C.A. et al. Surto de varíola bovina no município de Prata-MG. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.38, p.323-330, 1986.
- SINGH, R.K.; HOSAMANI, M., BALAMURUGAN, V. et al. Buffalopox: an emerging and re-emerging zoonosis. *Anim Health Res Rev*. v.8, p.105-114, 2007.
- SMITH, G.L. Vaccinia virus glycoproteins and immune evasion. The sixteenth Fleming Lecture. *J Gen Virol*. v.74, p.1725-1740, 1993.
- SMITH, S. A.; KOTWA, G. J. Immune Response to Poxvirus Infections in Various Animals. *Crit Rev Microbiol.*, v.28, n.3, p.149-185, 2002.
- SPECIAN, R.D.; OLIVER, M.G. Functional biology of intestinal goblet cells. *Am J Physiol*, n. 260, p.183-93, 1991.
- TRIGUEIRO, R. C. *Imunoevasão em orthopoxvirus isolados no Brasil: Análise dos genes B18R e E3L*. 2004. Dissertação (Mestrado) Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- TRINDADE, G.S.; FONSECA, F.G.; MARQUES, J.T. et al. Belo Horizonte vírus: vaccinia-like virus lacking the A type inclusion body gene isolated from infected mice. *J. Gen. Virol.*, v.85, n.7, p. 2015-2021, 2004.
- TRINDADE, G.S. ; LOBATO, Z.I.P ; DRUMOND, B.P. et al. Isolation of Two Vaccinia Virus Strains From a Single Bovine Vaccinia Outbreak In Rural Area From Brazil: Implications On The Emergence Of Zoonotic Orthopoxviruses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 75, p. 486-490, 2006.
- TZAHAR, E.; MOYER, J.D.; WATERMAN, H. et al. Pathogenic poxviruses reveal viral strategies to exploit the ErbB signaling network. *Embo J*. v.17, p.5948–5963, 1998.
- OVERMAN, J.R., TAMM, I.; Multiplication of vaccinia virus in the chorioallantoic membrane in vitro. *Virology*, v. 3, p. 173–84, 1957.
- VERKATESAN, G.; BALAMURUGAN, V.; PRABHU, M. et al. Emerging and re-emerging zoonotic buffalopox infection: a severe outbreak in Kolhapur (Maharashtra), India. *Veterinaria Italiana.*, v.46, n.4, p.439-448, 2010.
- VINHOTE, W.M.S.; CAMPOS, K. F., SILVA, N. S. Bovine vaccinia outbreak affecting bovine and human in amazon



region - Brazil. Anais do Congresso da WBC, 2011.

VON BRODOROTTI, H.S.; MAHNEL, H. Comparable analysis of UV sensitivity of viruses. *Zbl. Vet. Med*, v.167, n.1, p.74-8, 1972.

WALLACE, G.D.; BULLER, R.M. Kinetics of Ectromelia virus (mousepox) transmission and clinical response in C57BL/6j, BALB/cByj and AKR/J inbred mice. *Lab Anim Sci*. v.35, n.1, p.41-46, 1985.

WAHL-JENSEN, V.; CANN, J.A.; RUBINS, K.H. Progression of pathogenic events in cynomolgus macaques infected with Variola virus. *PLoS ONE*. v.6, n.10, p.e24832, 2011.

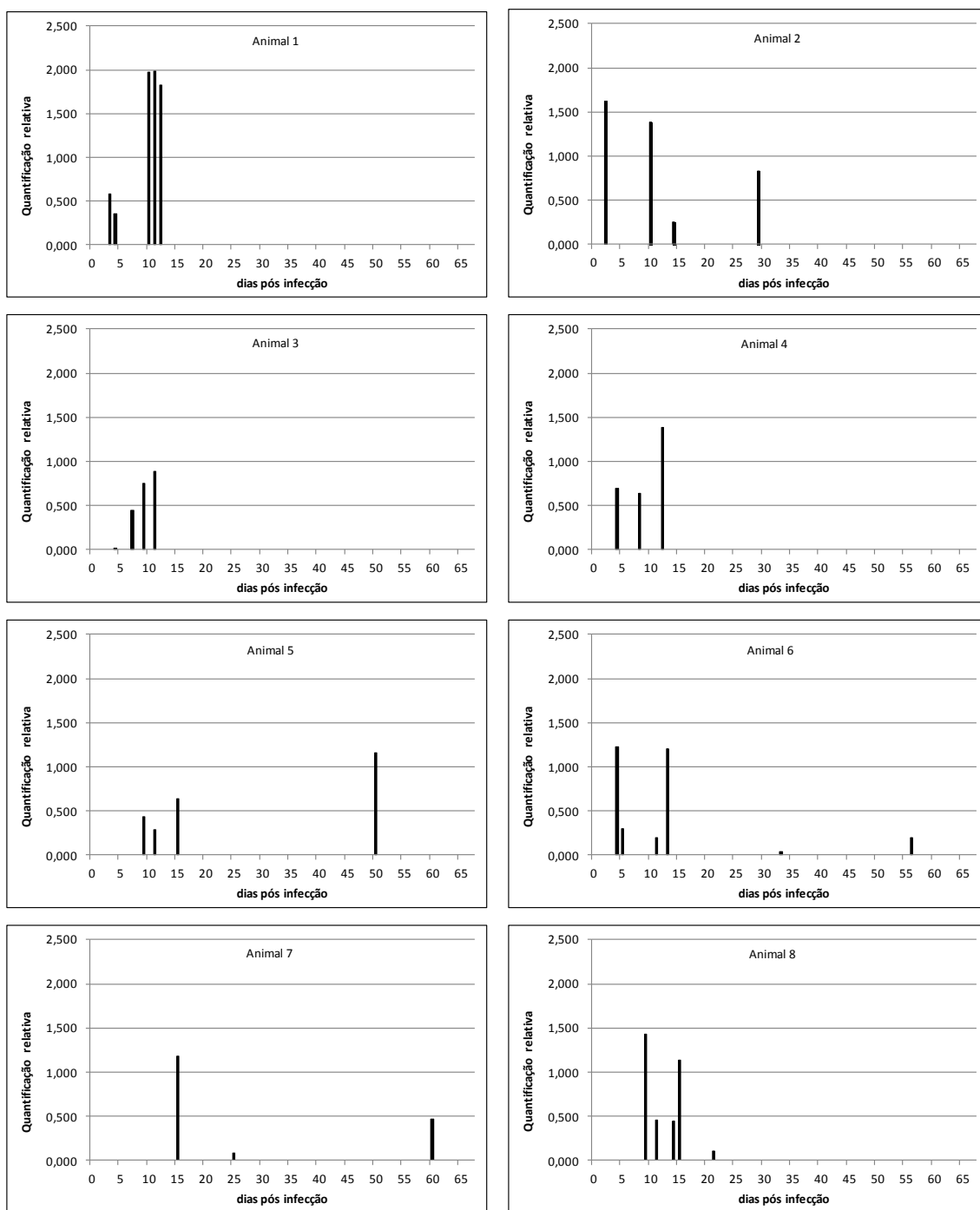
XU, R.; JOHNSON, A.J.; BEVAN, M.J. Cellular and humoral immunity against Vaccinia virus infection of mice. *J. Immunol*, v.172, n.10, p.6265-6271, 2004.

ZAUCHA, G.M.; JAHRLING, P.B.; GEISBERT, T.W. et al. The pathology of experimental aerosolized monkeypox virus infection in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Lab Invest* v.81, p.1581-1600, 2001.

YANG G.; PEVEAR, D.C.; DAVIES, M.H. et al. An orally bioavailable antipoxvirus compound (ST-246) inhibits extracellular virus formation and protects mice from tethal orthopoxvirus challenge. *J. Virol.*, p. 13139-49, 2005.

## ANEXO I

Quantificação relativa da DNAemia do VACV pela PCR em tempo real nos oito animais, durante os 67 d.p.i na infecção inicial.



## ANEXO II

Quantificação relativa do DNA de VACV nas amostras de fezes dos oito animais, durante os 67 d.p.i na infecção inicial.

