

À Prof. Zélia Lobato pela orientação deste trabalho.

À Dra. Maria Isabel e ao prof. Jônatas Abrahão pela co-orientação.

Aos professores, colegas e funcionários do:

Laboratório de Microbiologia do Leite da Escola de Veterinária,

Laboratório de Vírus do ICB,

LANAGRO,

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, especialmente aos meus colegas do laboratório de Pesquisa em Virologia Animal.

Aos queridos ordenhadores que trabalharam conosco neste projeto: sr. José e sr. Geraldo.

Aos meus familiares,

Aos animais que participaram deste experimento,

À Deus pela oportunidade de crescimento e aprendizado!

---

## SUMÁRIO

---

RESUMO .....	13
INTRODUÇÃO.....	16
REVISÃO DE LITERATURA .....	18
2.1 Família Poxviridae .....	18
2.1.1 Classificação .....	18
2.1.2 Morfologia da partícula .....	19
2.1.3 Estrutura do genoma.....	20
2.1.4 Ciclo de multiplicação dos <i>poxvirus</i> .....	21
2.1.5 Vias de infecção e patogênese dos <i>Orthopoxvirus</i> .....	23
2.1.6 Vias de excreção dos OPV .....	24
2.2 Vírus Protótipo do Gênero <i>Orthopoxvirus</i> : VACV.....	25
2.2.1 Ocorrência do VACV no Brasil.....	26
2.2.2 <i>Vaccinia virus</i> GP2 (VACV-GP2) .....	27
2.2.3 Sinais clínicos da VB .....	27
2.2.4 Transmissão da VB .....	29
2.2.5 Vias de infecção e patogênese do VACV.....	29
2.2.6 Vias de excreção do VACV.....	31
2.2.7 Viabilidade do VACV e de outros OPV.....	32
2.2.8 Patógenos possivelmente veiculados através do leite .....	34
OBJETIVOS.....	366
3.1 Objetivo geral: .....	366
3.2 Objetivos específicos .....	366
MATERIAL E MÉTODOS.....	377
4.1 Local do Experimento e Instalações.....	37
4.2 Seleção e manutenção dos animais .....	37
4.3 Vírus utilizado .....	38
4.4 Escarificação e inoculação.....	38

4.5 Descrição geral do experimento.....	39
4.6 Descrição geral da Fase 1 .....	39
4.6.1 Coleta de amostras de leite nos dias pares .....	40
4.6.2 Coleta de amostras de leite nos dias ímpares.....	40
4.6.2.1 Processamento das amostras de leite dos Grupos 1 e 2 da Fase 1.....	40
4.6.2.1.1 Produção do queijo.....	41
4.6.2.1.2 Separação das fases do leite através da centrifugação.....	41
4.6.2.1.3 Pasteurização do leite .....	41
4.6.2.1.4 Esterilização do leite e produção de iogurte .....	42
4.7 Avaliação da qualidade do leite .....	42
4.8 Descrição geral da Fase 2: Imunodepressão .....	43
4.8.1 Coleta das amostras de leite dos animais da Fase 2 .....	43
4.9 Provas Moleculares .....	43
4.9.1 Extração do DNA das amostras com o kit PROMEGA .....	43
4.9.2 PCR <i>nested</i> para o gene <i>vgf</i> .....	43
4.9.3 PCR em tempo real .....	44
4.9.3.1 Determinação da curva padrão do VACV gene <i>vgf</i> da PCR em tempo real.....	44
4.10 Pesquisa de partículas virais viáveis .....	45
4.10.1 Cultivo de células BSC-40.....	45
4.10.2 Isolamento viral.....	46
4.10.3 Imunoperoxidase em monocamada celular (IPMC).....	46
4.11 Comitê de Ética em Experimentação Animal – CETEA.....	46
4.12 Análise Estatística.....	46
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
5.1 Reprodução da VB .....	48
5.2 Resultados da Fase 1 .....	49
5.2.2 Resultados da avaliação dos parâmetros de qualidade da PCR em tempo real para detecção do VACV gene <i>vgf</i> .....	49

---

5.2.1 Resultados da <i>PCR nested</i> da PCR em tempo real para detecção do VACV gene <i>vgf</i> nas amostras de leite da Fase 1 .....	50
5.2.4 Resultados das avaliações dos parâmetros de qualidade do leite: CCS e peso .....	60
5.2.5 Resultados dos queijos produzidos a partir do leite dos TI das vacas experimentalmente inoculadas com o VACV-GP2 .....	63
5.2.5.1 Resultado do isolamento das amostras de queijo e soro previamente positivas na PCR <i>nested</i> para detectar o VACV gene <i>vgf</i> .....	67
5.2.6 Resultados das fases do leite obtidas a partir da centrifugação do leite dos TI das vacas experimentalmente inoculadas com o VACV-GP2 .....	68
5.2.7 Resultados das amostras de leite obtidas a partir dos TI das vacas experimentalmente inoculadas com o VACV-GP2 e submetidas à pasteurização .....	72
5.2.8 Resultados das amostras de leite obtidas a partir dos TI das vacas experimentalmente inoculadas com o VACV-GP2 e submetidas à esterilização e produção de iogurte. ....	73
5.2.9 Resultados do isolamento das amostras de leite da Fase 1 .....	75
5.3 Resultados da Fase 2 .....	75
5.3.1 Resultados da PCR <i>nested</i> para detecção do VACV-GP2 gene <i>vgf</i> no leite.....	73
5.3.2 Resultado da PCR em tempo real para detecção do VACV gene <i>vgf</i> nas amostras de leite da Fase 2.....	76
5.3.4 Resultados das avaliações dos parâmetros de qualidade do leite: CCS e peso .....	77
5.3.5 Resultado do isolamento viral das amostras de leite dos animais submetidos à se imunodepressão .....	8080
CONCLUSÕES .....	82
BIBLIOGRAFIA .....	85

---

---

## LISTA DE FIGURAS

---

Figura 1: Diagramas filogenéticos. (A) Família <i>Poxviridae</i> e as subfamílias <i>Entomopoxvirinae</i> e <i>Chordopoxvirinae</i> . (B) Vírus do gênero <i>Orthopoxvirus</i> .....	19
Figura 2: Morfologia dos Poxvirus. (A) Representação esquemática da partícula viral de um poxvirus. (B) Eletromicrografia de secção longitudinal do <i>Cowpox virus</i> . lb – Corpúsculos laterais, c –Cerne. A barra representa 100 nm. (C) Eletromicrografia em contraste negativo do VACV. ....	20
Figura 3: Representação esquemática do genoma dos poxvirus.....	21
Figura 4: Ciclo de multiplicação do VACV. ....	23
Figura 5: Estados onde amostras brasileiras de VACV foram isoladas, com acometimento de humanos e bovinos durante o período de 1999 a 2013. ....	26
Figura 6: Lesões e evolução de uma infecção primária de VACV em humanos.....	28
Figura 7: Lesões causadas pelo VACV em bovinos num surto de VB em Mariana (MG). (A) e (B): Lesões ulcerativas nas tetas das vacas em lactação. ....	29
Figura 8: Características, localização e evolução das lesões causadas pelo VACV-GP2 em vacas secas experimentalmente inoculadas. ....	31
Figura 9: Ciclo de patógenos veiculados através do leite iniciando no ambiente de ordenha até sua transferência para o leite e derivados.....	34
Figura 10: Estrutura do LANAGRO onde ocorreu a inoculação experimental de VACV-GP2. (A) visão interna do corredor que dá acesso às baias; (B) visão externa das baias; (C) visão interna de uma das baias.....	37
Figura 11: Escarificação e inoculação do VACV-GP2 nos tetos. (A) Escarificação da do teto com lixa e (B) inoculação do teto com VACV-GP2.....	39
Figura 12: Representação esquemática da evolução temporal do experimento: Fase 1 e Fase 2.. ....	39
Figura 13: Coleta de leite com o uso de uma cateter estéril nos dias pares.....	40
Figura 14: Diluição seriada do estoque de VACV-GP2 de título $1,3 \times 10^9$ UFP ml em leite. ....	45
Figura 15: Evolução das lesões em uma vaca lactante experimentalmente inoculada com VACV-GP2. 4° d.p.i. Vesícula e pápula (seta); 5° e 7° d.p.i. úlcera (seta); 10° d.p.i. úlcera e crosta (seta); 15° e 18° d.p.i. fase de cicatrização. ....	48
Figura 16: Lesão ulcerada na mucosa oral de uma vaca lactante experimentalmente inoculada com VACV-GP2 no 7°d.p.i. (seta) .....	49

Figura 17: Curva padrão e resultado da sensibilidade da PCR em tempo real para detecção do VACV gene <i>vgf</i> .....	50
Figura 17 A: Amplificação do DNA do VACV gene <i>vgf</i> pela PCR nested nas amostras de leite..	51
Figura 18: Número de amostras positivas nos TC e TI para o DNA do VACV durante a Fase 1.	52
Figura 19: Amostras de leite positivas para o DNA do VACV gene <i>vgf</i> entre as Fases 1 e 2. ...	53
Figura 20: Média da quantificação do DNA do VACV gene <i>vgf</i> nas amostras de leite dos TI e TC pela PCR em tempo real durante a Fase 1. As barras verticais indicam o desvio padrão. ....	55
Figura 21: Média do logaritmo na base 10 (Log <sub>10</sub> ) da contagem de células somáticas (CCS) das oito vacas inoculadas com VACV-GP2, considerando os tetos controle e infectados durante a Fase 1. ....	60
Figura 22: Evolução do percentual do peso do leite em relação ao peso inicial no dia 0, considerando TC e TI durante a Fase 1.....	62
Figura 23: Quantificação absoluta em UG/ml nas amostras de soro do queijo da Fase 1.....	65
Figura 24: Quantificação absoluta em UG/g nas amostras da massa do queijo da Fase 1. ....	65
Figura 25: Amostras de creme e célula positivas na PCR <i>nested</i> para detectar o DNA do VACV gene <i>vgf</i> durante a Fase 1. As amostras foram obtidas a partir da centrifugação das amostras de leite do G1 e G2 e .....	68
Figura 26: Quantificação do DNA do VACV gene <i>vgf</i> nas amostras de célula, obtidas a partir da centrifugação do leite, Fase 1. ....	69
Figura 27: Quantificação do DNA do VACV gene <i>vgf</i> nas amostras de creme, obtidas a partir da centrifugação do leite, Fase 1.....	70
Figura 28: Amostras de leite submetidas à pasteurização lenta e positivas para o DNA do VACV gene <i>vgf</i> nos G1 e G2 durante a Fase 1. ....	71
Figura 29: Quantificação do DNA do VACV gene <i>vgf</i> nas amostras de leite submetidas à pasteurização lenta durante a Fase 1. ....	72
Figura 30: Amostras de leite submetidas à esterilização e posteriormente à produção de iogurte e positivas para o DNA do VACV gene <i>vgf</i> nos G1 e G2 durante a Fase 1.....	73
Figura 31: Quantificação do DNA do VACV gene <i>vgf</i> nas amostras de leite submetidas à esterilização e posterior produção de iogurte durante a Fase 1. ....	74
Figura 33: Amostras de leite positivas para o DNA do VACV gene <i>vgf</i> durante a Fase 2. ....	76
Figura 34: Quantificação do DNA do VACV gene <i>vgf</i> nas amostras de leite dos TC e TI durante a Fase 2.....	78
Figura 35: Média do Logaritmo na base 10 (Log <sub>10</sub> ) da contagem de células somáticas (CCS) das 4 vacas submetidas à imunodepressão, considerando os tetos controle e infectados.....	79

Figura 36: Evolução do percentual do peso do leite em relação ao peso inicial no dia 0, considerando TC e TI durante a Fase 2.....80

Figura 37: Efeito citopático com formação de placas de lise (seta preta) e imunomarcação evidenciada pela cor vermelho-cobre (seta azul) identificando a presença do VACV pela IPMC em monocamada de BSC-40 previamente inoculadas com amostra de leite do 5º d.p.mi. Aumento 40X. ....82

---

## LISTA DE TABELAS

---

Tabela 1: Iniciadores utilizados para amplificação de fragmentos do gene <i>vgf</i> – PCR <i>nested</i> .....	44
Tabela 2: Distribuição das amostras de leite positivas para o DNA do VACV na PCR <i>nested</i> gene <i>vgf</i> nos TC e TI de acordo com o tipo de coleta (manual ou sonda).....	54
Tabela 3: Comparação entre a média da quantificação do DNA do VACV nos TI e TC. ....	56
Tabela 4: Frequência de amostras positivas na PCR <i>nested</i> para detecção do gene <i>vgf</i> do VACV nas amostras de leite da Fase 1 considerando 4 períodos.....	56
Tabela 5: Comparação da quantificação do DNA de VACV (gene <i>vgf</i> ) através da PCR em tempo real nas amostras de leite da Fase 1 considerando quatro períodos.....	56
Tabela 6: Comparação da média do Log <sub>10</sub> da CCS nos TC e TI na Fase 1. ....	60
Tabela 7: Média do peso do leite nos tetos controle e tetos infectados durante a Fase 1.....	62
Tabela 8: Detecções de DNA do VACV pela PCR <i>nested</i> gene <i>vgf</i> nas amostras de queijo e no soro dos Grupos 1 e 2 produzidos durante a Fase 1.....	63
Tabela 9: Média da quantificação do DNA do VACV gene <i>vgf</i> em UG/g nas amostras de massa e em UG/ml soro dos G1 e G2 durante a Fase 1.....	66
Tabela 10: Distribuição das amostras de leite positivas para o DNA do VACV na PCR <i>nested</i> gene <i>vgf</i> nos TC e TI de acordo com o tipo de coleta (manual ou sonda) durante a Fase 2. ....	74
Tabela 11: Comparação da média do Log <sub>10</sub> da CCS nos TC e TI na Fase 2. ....	78/79
Tabela 12: Comparação da média do Log <sub>10</sub> da CCS nos tetos controle e infestados de acordo com a detecção do DNA do VACV gene <i>vgf</i> pela PCR <i>nested</i> durante a Fase 2.....	80
Tabela 13: Média do peso do leite nos tetos controle e tetos infectados durante a Fase 2.....	81



---

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

$\mu$ L – Microlitro

$\mu$ M – micromolar

ACTB -  $\beta$ -actina bovina

AEC – 3-amino-9-etil-carbazol

ALT – alanina aminotransferase

AN – anticorpos neutralizantes

ARAV – Vírus Araçatuba

ATCC – American Type Cell Collection

BAV – Vírus BeAN 58058

BIV – Vírus da imunodeficiência bovina

BoHV-4 - Herpesvirus bovino tipo 4

BSC-40 – Células epiteliais de rim de macaco

CCS – contagem de células somáticas

CDC – *Center for Disease Control and Prevention*

CETEA – Comitê de Ética em Experimentação Animal

CEV – Vírus envelopado célula associado

CMLV – *Camelpox virus*

CMT – *California Mastitis Test*

CPXV – *Cowpox virus*

CS – Células Somáticas

CTGV – Cantagalo vírus

d.p.i. – dia pós infecção

d.p.im. – dia pós imunodepressão

DMS - Dexametasona

DNA – Acido desoxirribonucléico

ECMV – Ectromelia virus

ECP – Efeito citopático

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

EEV – Vírus envelopado extracelular

EV – Vírus extracelular

FEP - cateter estéril de fluoroetilenopropileno

FIOCRUZ – Instituto Oswaldo Cruz

G1 – Grupo 1

G2 – Grupo 2

ICB – Instituto de Ciências Biológicas

ICTV – *International Committee on Taxonomy of Viruses*

IEV – Vírus envelopado intracelular

IHQ – imuno-histoquímica

IMA – Instituto Mineiro de Agropecuário

IMV – Vírus maduro intracelular

IOC – Instituto Oswaldo Cruz

IPMC – imunoperoxidase em monocamada celular

ISO - *International Organization for Standardization*

ITRs – regiões terminais invertidas

LANAGRO – laboratório Nacional Agropecuário

LRM – linfonodo retromamário

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MARV – Mariana virus

MEM – meio mínimo essencial

mL – Mililitro

mM – mili Molar

MPXV – *Monkeypox virus*

MURV – Muriaé virus

nm – nanômetro

°C – Graus Celsius

OMS – Organização Mundial de Saúde

OPV – *Orthopoxvirus*

P1V – vírus Pelota 1

P2V – vírus Pelota 2

PAGE – eletroforese em gel de acrilamida/bisacrilamida

pb – Pares de base

PB – Proteína bruta

PBS – Tampão salina fosfato

pH - potencial hidrogeniônico

PSTV – Vírus Passatempo

r.p.m. – Rotações por minuto

SAV – SPAN 232 vírus

SFB – Soro fetal bovino

SN - soroneutralização

*SPSS- Statistical Package for the Social Science*

TAD – teto anterior direito

TAE – teto anterior esquerdo

TC – Teto controle

TI – Tetos infectados

TPD – teto posterior direito

TPE – teto posterior esquerdo

TPEs – tetos posteriores esquerdo

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

UFP – Unidade formadora de placa

UFP/  $\mu$ L - Unidades formadoras de placa / microlitro

UFP/ml – Unidades formadoras de placa / mililitro

UG/  $\mu$ L – Unidades genômicas / microlitro

UHT - Ultra-high temperature

V - volts

VACV - *Vaccinia virus*

VACV-BR – amostras de *Vaccinia virus* brasileiras

VACV-GP1 – *Vaccinia virus* amostra Guarani P1

VACV-GP2 – *Vaccinia virus* amostra Guarani P2

VACV-WR -*Vaccinia virus* amostra Western Reserve

VARV – *Variola virus*

VB – *Vaccinia Bovina*

VBH – Vírus Belo Horizonte

*vgf* – fator de crescimento doVACV

VGF F – *vgf forward primer*

VGF R – *vgf reverse primer*

VSV – vírus da estomatite vesicular

WR – *Western Reserve*

---

## RESUMO

---

A vaccínia bovina (VB) é uma zoonose emergente, causada pelo *Vaccinia virus* (VACV), um *Orthopoxvirus* (OPV). A doença é caracterizada pelo surgimento de lesões ulceradas nas tetas de vacas em lactação e mãos dos ordenhadores, podendo ocasionalmente acometer bezerros que mamam em vacas doentes. O DNA do VACV, assim como partículas virais infecciosas, pode ser detectado em amostras de leite de vacas naturalmente infectadas. Entretanto, não se sabe o período e o padrão de eliminação viral no leite, nem se a detecção de VACV no leite é devida a uma infecção localizada ou sistêmica. O objetivo do trabalho foi detectar e quantificar o DNA do VACV em leite, queijo, leite pasteurizado, iogurte e nas fases do leite após ter sido submetido a processo de centrifugação, nas amostras de leite de vacas experimentalmente inoculadas com o VACV amostra GP2, durante 33 dias. Além disso, foi feita a pesquisa de partículas virais viáveis nas amostras de leite e queijo. Em outra fase do experimento, após tratamento das vacas com droga imunodepressora, foi pesquisada a presença de DNA viral e o mesmo foi quantificado utilizando a técnica de PCR convencional e PCR em tempo real, respectivamente, nas amostras de leite. O DNA do VACV pode ser detectado no leite de forma intermitente em vacas experimentalmente infectadas a partir do 1º dia pós-inoculação (d.p.i.) até o 33º d.p.i., indicando que o VACV continua sendo eliminado no leite mesmo após a resolução das lesões, a qual ocorreu no 22º d.p.i. Foi possível detectar DNA de VACV nas frações de creme e células do leite, obtidas após a centrifugação do leite, e no soro de leite de amostras de leite pasteurizado e iogurte. Além disso, foi possível isolar partículas virais viáveis de VACV no queijo, soro do queijo e no leite de vacas previamente inoculadas com o VACV e posteriormente submetidas a tratamento com imunodepressor, reforçando a hipótese de nova replicação viral em locais distintos daquele da inoculação inicial após tratamento com imunodepressor. A redução na produção do leite e o aumento da contagem de células somáticas (CCS) foram mais significativos nos tetos que foram inoculados com o VACV-GP2 quando comparados aos tetos que serviram de controle e, portanto não foram inoculados com o vírus, reforçando a hipótese de associação entre a presença do vírus no teto e o comprometimento da qualidade do leite. A detecção tanto do DNA quanto de partículas infecciosas do VACV em amostras de leite, mesmo após o término da fase clínica da doença, reforça a hipótese de que o VACV pode causar infecção persistente em bovinos, além de chamar a atenção para o potencial risco à Saúde Pública associado ao consumo de leite proveniente de vacas que foram acometidas pela VB.

---

## ABSTRACT

---

Bovine vaccinia (VB) is an emerging zoonotic disease caused by *Vaccinia virus* (VACV), an *Orthopoxvirus* (OPV). The disease is characterized by the emergence of ulcerated lesions in the teats of dairy cows and in milkers hands and can occasionally affect calves that suck in sick cows. The DNA of VACV, as well as infectious viral particles can be detected in milk samples of naturally infected cows. However, it is unknown the period and the pattern of viral shedding in the milk or if the VACV detection in milk is due to a localized or systemic infection. The objective of this study was to detect and quantify the VACV DNA in milk, cheese, pasteurized milk, yogurt and milk phases after centrifugation, on milk samples collected from cows experimentally inoculated with VACV-GP2 strain during 33 days. Moreover, viral isolation was attempted in milk and cheese samples. In another phase of the experiment, after the cows received immunosuppressivetreatment, the presence of viral DNA and its quantities in milk samples were determined by conventional and real time PCR, respectively. The VACV DNA could be detected intermittently in milk of cows experimentally infected from the 1<sup>st</sup> day post-infection (dpi) until the 33<sup>th</sup> dpi, indicating that VACV is still eliminated in milk even after the resolution of the lesions, which occurred at the 22<sup>nd</sup> dpi. It was possible to detect VACV DNA in milk cream and cellular fractions, after milk centrifugation, as well as in whey from pasteurized milk and yogurt. Moreover, it was possible to isolate VACV viable viral particles in cheese, cheese whey and milk of cows inoculated with VACV and then subjected to treatment with immunosuppressive drug, reinforcing the hypothesis of new viral replication in different locations from the initial inoculation site, after the immunosuppressive treatment. The reduction in milk production and increase in the somatic cell count (SCC) were more significant in the teats that were inoculated with VACV-GP2 when compared to teats that served as a control and therefore were not inoculated with the virus, reinforcing the hypothesis of association between the presence of virus in the teats and compromised quality of milk. The detection of both VACV DNA and infectious particles in milk samples, even after the end of the clinical stage of the disease, strengthens the hypothesis that VACV can cause a persistent infection in cattle, as well as draw attention to the potential risk to the Public health associated with the milk consumption from cows that were affected by VB.

## INTRODUÇÃO

A vaccínia bovina (VB) é uma zoonose emergente, causada pelo *Vaccinia virus* (VACV) um *Orthopoxvirus* (OPV). Popularmente, a doença é conhecida como “varíola bovina”, sendo caracterizada pelo surgimento de lesões ulceradas nas tetas das vacas em lactação e mãos dos ordenhadores, podendo ocasionalmente acometer bezerros que mamam em vacas doentes.

A partir do final da década de 90, houve aumento progressivo de surtos de VB, acometendo humanos e vacas em lactação em vários estados do Brasil, incluindo Minas Gerais (Leite et al., 2005; Trindade et al., 2007), Espírito Santo (Donatele et al., 2007); Tocantins (Medaglia et al., 2009); Rio de Janeiro (Damaso et al., 2000; Schatzmayer et al., 2000; Schatzmayer et al., 2012); São Paulo (Megid et al., 2008); Rondônia (Quixabeira-Santos, 2011) e Maranhão (Assis et al., 2009). Recentemente, o VACV foi isolado a partir de lesões ulceradas em cavalos crioulos de um haras localizado em Pelotas, no Rio Grande do Sul (Campos et al., 2010; Brum et al., 2010).

Dentre as regiões acometidas pela VB, a Sudeste merece destaque pelo número crescente de surtos notificados, além de ser a maior produtora de leite do Brasil (IBGE, 2013). Os principais prejuízos relacionados à doença estão associados à ocorrência de mastites, redução brusca na produção de leite, gastos com medicamentos, afastamento temporário e contrato de um novo ordenhador (Rehfeld et al., 2013; Madureira, 2009; Lobato et al., 2005; Leite et al., 2005).

Apesar do comprometimento do rebanho e da possibilidade de veiculação do VACV através do leite e seus derivados, sabe-se que nos surtos da doença, o leite continua a ser ordenhado e comercializado normalmente. A detecção tanto do DNA quanto de partículas infecciosas do VACV em amostras de leite provenientes de surtos de VB em Minas Gerais (Abrahão et al., 2009c) e em leite experimentalmente inoculado e submetido a tratamentos térmicos (Oliveira et al., 2010) chamam a atenção para o potencial risco à Saúde Pública associado ao consumo do leite proveniente dos surtos de VB.

A presença de DNA do VACV no leite levantou algumas hipóteses acerca da origem destas partículas virais. Elas poderiam ser oriundas das lesões exantemáticas e crostas presentes nos tetos das vacas, que durante o movimento de ordenha, desprenderiam do teto, contaminando o leite (Abrahão et al., 2010c). Outra hipótese estaria apoiada na possível infecção viral sistêmica causada pelo VACV, podendo também ser resultado das duas condições associadas. Estudo recente realizado pelo nosso grupo evidenciou desenvolvimento de infecção sistêmica em bovinos experimentalmente inoculados com uma amostra de VACV brasileira. Foi possível detectar tanto DNA do VACV quanto partículas virais infecciosas no sangue, em tecidos e linfonodos de vacas experimentalmente inoculadas (Rivetti et al., 2013).

Estudos acerca da detecção do VACV no leite de bovinos naturalmente infectados, são muitas vezes inviabilizados por vários fatores, dentre eles, a dificuldade do produtor em identificar um surto de VB nas fases iniciais da doença e a localização das propriedades que frequentemente são distantes dos centros de pesquisa, dificultando a coleta diária de amostras assim como do acompanhamento da evolução clínica da VB. Nosso estudo propôs uma infecção experimental em vacas em lactação com uma amostra do VACV com o objetivo de acompanhar a evolução clínica diária da VB além de responder algumas perguntas, como: - A partir de qual dia pós-infecção com o VACV, pode ser detectado DNA viral no leite? - A excreção viral no leite, persiste ou cessa após a resolução das lesões causadas pelo VACV? - A ocorrência da VB influencia a qualidade do leite obtido? - Após tratamento com imunodepressor, os animais

voltam a apresentar sinais clínicos da doença?-É possível detectar partículas virais infecciosas em amostras de leite dos animais submetidos a tratamento imunodepressor?



## REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Família Poxviridae

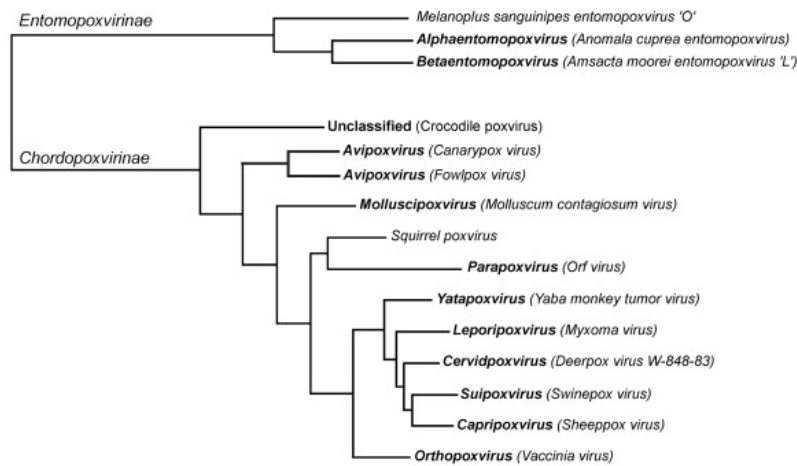
#### 2.1.1 Classificação

A família *Poxviridae* é subdividida em duas subfamílias: *Chordopoxvirinae* e *Entomopoxvirinae* (Figura 1A). A primeira, *Chordopoxvirinae*, é dividida em onze gêneros: *Orthopoxvirus*, *Parapoxvirus*, *Yatapoxvirus*, *Molluscipoxvirus*, *Cervidpoxvirus*, *Capripoxvirus*, *Crocodylidpoxvirus*, *Suipoxvirus*, *Avipoxvirus*, *Leporipoxvirus* e *Cerdopoxvirus* (ICTVdb, 2012). A espécie *Squirrel poxvirus* permanece sem gênero definido, sendo classificada como *Chordopoxvirinae*.

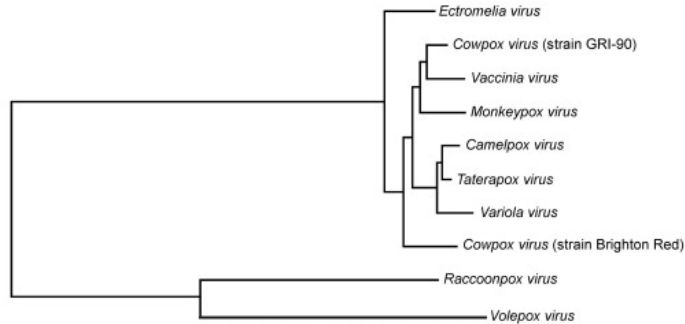
A segunda subfamília, *Entomopoxvirus*, compreende apenas vírus cujos hospedeiros são invertebrados, sendo dividida em três gêneros: *Alphaentomopoxvirus*, *Betaentomopoxvirus* e *Gammaentomopoxvirus*. Sendo as espécies *Diachasmimorpha entomopoxvirus* e *Melanoplus sanguinipes entomopoxvirus 'O'*, sem gênero definido (ICTVdb, 2012).

Dentre os vírus da subfamília *Chordopoxvirinae*, pode-se destacar o VACV, protótipo do gênero OPV (Moss, 2007) (Figura 1B). Amostras de VACV foram utilizadas mundialmente para a imunização contra a varíola humana (Damon, 2010). Recentemente, ele vem sendo isolado a partir de lesões exantemáticas coletadas em surtos de VB acometendo humanos e bovinos. Além do VACV, outros vírus do gênero OPV são zoonoses e, portanto, relevantes para a Saúde Pública: *Varíola vírus* (VARV), *Cowpox vírus* (CPXV) e o *Monkeypox vírus* (MPXV) (revisado por Essbauer, 2010). Além do gênero OPV, outros três gêneros da subfamília *Chordopoxvirinae*, possuem vírus capazes de causar infecções em humanos: *Parapoxvirus*, *Yatapoxviru*, e *Molluscipoxvirus*.

## A Poxviridae



## B Orthopoxvirus



**Figura 1: Diagramas filogenéticos.**(A) Família *Poxviridae* e as subfamílias *Entomopoxvirinae* e *Chordopoxvirinae*. (B) Vírus do gênero *Orthopoxvirus*.

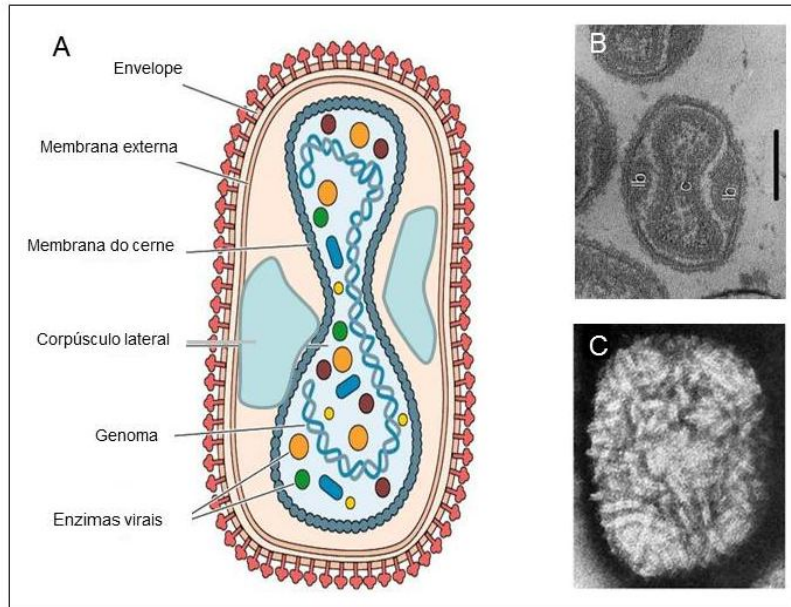
Fonte: Duraffour et al., 2011.

### 2.1.2 Morfologia da partícula

O VACV é o protótipo da família *Poxviridae*, sendo o vírus mais estudado da família (Moss, 2007). Através de microscopia eletrônica, eletromicrografia e criotomografia eletrônica, a estrutura das partículas virais maduras e intermediárias do ciclo do VACV puderam ser identificadas e caracterizadas (Moss, 2007; Cyrklaff, 2005) (Fig 2).

Os *poxvírus* possuem forma ovóide ou de tijolo, de formato heterogêneo, podendo variar de tamanho (entre 200 e 360 nm), tendo quatro estruturas fundamentais distintas que compreendem: o cerne, corpúsculos laterais, membrana e envelope (Cyrklaff et al., 2005; Buller e Pallumbo, 1991). O cerne é a estrutura mais interna da partícula, apresenta a forma de disco bicôncavo, envolto por uma fina membrana e envolve o material genético (Fig. 2B). O DNA e várias proteínas são organizados dentro do cerne viral formando o nucleocapsídeo. Seu material genético consiste de uma molécula de DNA dupla fita, formando uma cadeia polinucleotídica covalentemente fechada nas extremidades (Moss, 2007). Nas concavidades do cerne encontram-se os corpúsculos laterais, cuja função ainda não é bem definida. A membrana externa circunda todo o cerne e é composta por uma bicamada lipoprotéica com túbulos de superfície arranjados

irregularmente, formando uma camada em paliçada (Cyrklaffet al., 2005) (Fig 2C). Algumas formas virais apresentam o envelope, uma membrana adicional que circunda completamente a partícula viral. Tanto a membrana externa quanto o envelope desempenham um importante papel na interação vírus-célula (Buller e Pallumbo, 1991).

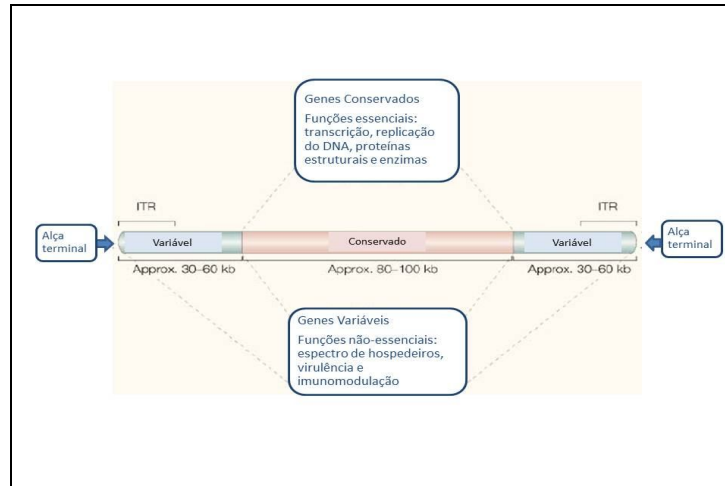


**Figura 2: Morfologia dos Poxvirus.**(A) Representação esquemática da partícula viral de um poxvirus. (B) Eletromicrografia de secção longitudinal do *Cowpox virus*. lb – Corpúsculos laterais, c –Cerne. A barra representa 100 nm. (C) Eletromicrografia em contraste negativo do VACV.

Fontes: (A) Harrison et al, 2004 (modificado); (B) ICTVdb, 2013; (C) Wilton et al., 1995

### 2.1.3 Estrutura do genoma

O genoma do poxvírus consiste em uma molécula linear de DNA fita dupla, com tamanho variando entre 130 a 375 Kb (ICTV, 2012) (Fig. 3). Quanto às características estruturais, o genoma dos poxvirus, sobretudo dos OPV, possui uma região central que contém genes estruturais e relacionados à replicação do vírus, enquanto as regiões terminais invertidas (ITRs), localizadas nas alças terminais do genoma, contém genes que codificam proteínas responsáveis pela virulência e imunomodulação. (Moss, 2007; Smith et al, 2002).



**Figura 3: Representação esquemática do genoma dos poxvirus.** O genoma pode ser dividido em uma região central conservada que codifica proteínas essenciais para a replicação viral e as regiões terminais invertidas (ITRs) que são variáveis e codificam proteínas que não são essenciais para a replicação do vírus, no entanto, codificam proteínas que são responsáveis pelas interações vírus-hospedeiro e pelos mecanismos de patogênese.

Fonte: Adaptado de Smith e McFadden, 2002.

O gene *vgf* extremamente conservado dentro do gênero OPV e possui função similar ao fator de crescimento epidérmico (EGF) e ao fator de crescimento transformante- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ) (Buller et al., 1998). Dentre outras atividades, o gene *vgf* codifica uma proteína responsável por estimular o crescimento e o aumento de atividade metabólica das células não infectadas facilitando, portanto, a disseminação viral (Buller et al, 1998). Atualmente, este gene vem sendo amplamente utilizado para a identificação de surtos de VB ocorridos no Brasil através da utilização da técnica de PCR (Trindade et al., 2008).

#### 2.1.4 Ciclo de multiplicação dos poxvirus

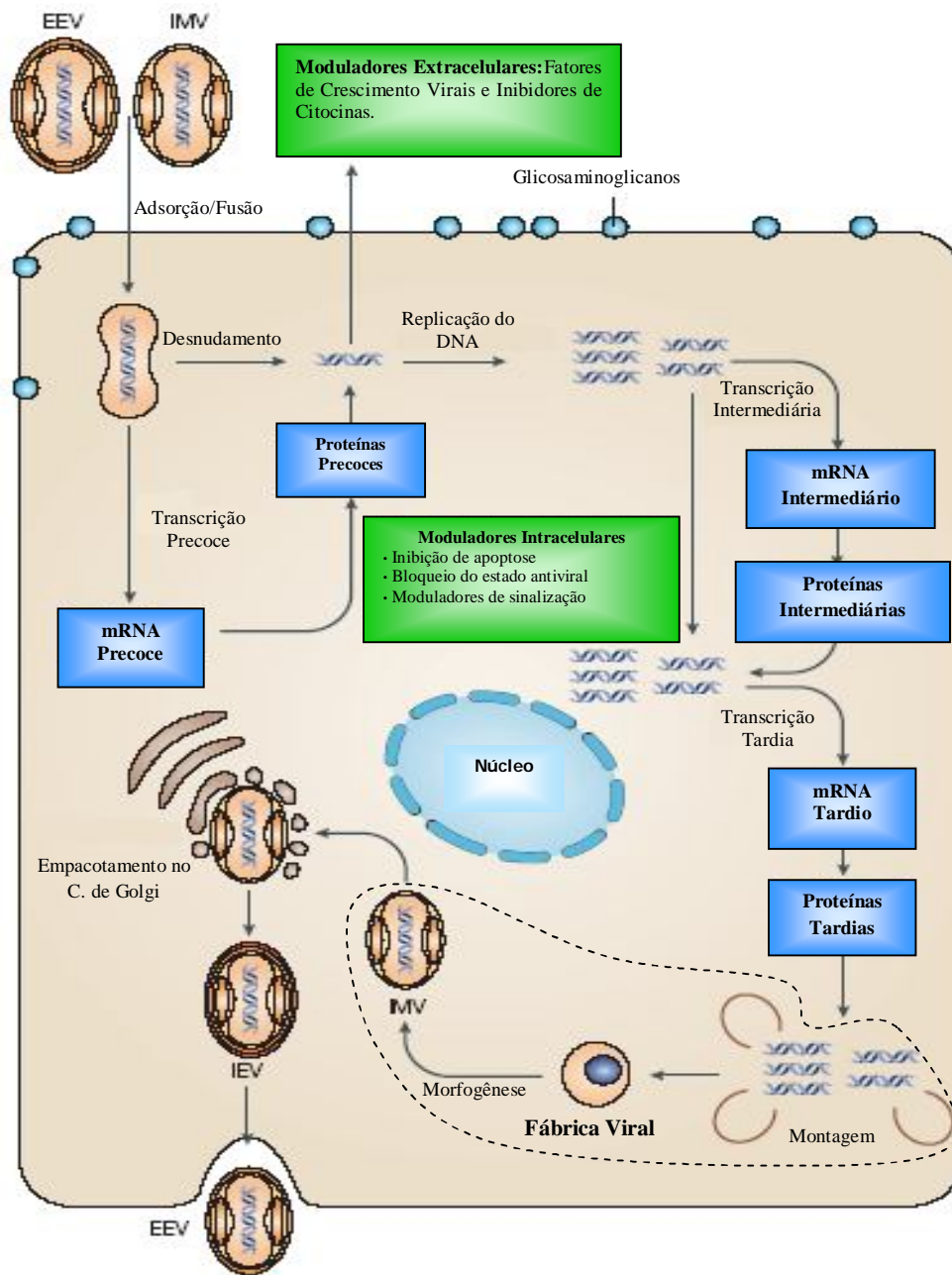
O ciclo de multiplicação dos poxvirus ocorre inteiramente no citoplasma da célula infectada, sendo minimamente dependente da célula hospedeira para a sua replicação (Moss, 2007). O ciclo de multiplicação da família *Poxviridae* pode ser estudado através do vírus protótipo do gênero OPV, o VACV (Fig. 4).

Durante o ciclo de multiplicação do VACV, podem ser produzidos os seguintes tipos de partículas virais: vírus maduro (IMV); vírus envelopados intracelulares (IEV) e vírus envelopados extracelulares (EEV), sendo o último chamado de vírus envelopado célula associado (CEV) quando a partícula viral permanece aderida à membrana celular (McFadden, 2005). As partículas virais capazes de iniciar uma infecção do VACV são EEV e IMV, sendo os IMV's as formas mais abundantes e estáveis. Já os CEV e EEV são importantes na disseminação viral dentro do hospedeiro (Smith et al., 2002b). Algumas proteínas presentes nos IMV's são responsáveis pela adesão viral à superfície celular. Os EEV's por sua vez, possuem uma membrana externa que é previamente removida para que haja a fusão de membranas (Moss, 2007).

O ciclo de multiplicação inicia-se a partir da fusão do envelope viral à membrana da célula hospedeira, que ocorre com o auxílio de uma proteína viral conservada denominada VV-28 (Fig. 4). Após o desnudamento primário, o cerne viral é liberado no citoplasma da célula hospedeira dando início a transcrição de genes precoces pelas enzimas presentes no cerne viral

(McFadden, 2005; McLennan, 2007). Os genes precoces são responsáveis pela resposta imune moduladora, pelos fatores de crescimento celular além de fatores de transcrição para os genes intermediários. Os fatores de transcrição para os genes intermediários são a RNA polimerase viral, enzima *capping* e proteínas VITF-1 e VITF-3 (Moss, 2007; McFadden, 2005; Harris et al., 1993; Vos et al., 1991). Em seguida ocorre o desnudamento secundário, a partir do qual o DNA começa a ser replicado formando concatêmeros. A transcrição e tradução de genes intermediários e tardios vão dar início à produção de proteínas estruturais essenciais para a construção de novas partículas virais (Moss, 2007). Já foram caracterizadas 53 proteínas virais intermediárias, sendo as proteínas A1, A2 e G8 responsáveis pela regulação da síntese de genes tardios (Yang et al., 2011). Enquanto a transcrição de genes precoces está sob o controle de fatores transcricionais virais, a transcrição de genes intermediários e tardios são co-regulados por genes virais e do hospedeiro (McFadden, 2005; Moss, 2007).

A morfogênese acontece em sítios celulares específicos, conhecidos como corpúsculos de inclusão do tipo basófilo ou “fábricas virais” (*revisado por Yoder et al., 2004*). O vírus imaturo (IV) é a primeira partícula viral formada apresentando a forma ovóide ou esférica. Os IV's dão origem aos IMV's após clivagens proteolíticas de elementos de capsídeo e condensação do cerne viral, constituindo a maioria das partículas infecciosas (Moss, 2007). Além disso, nesta etapa, a partícula viral adquire forma de tijolo, característica das partículas dos poxvírus (*revisado por Roberts e Smith, 2008*). Algumas partículas IMV podem ser transportadas até o complexo de Golgi, onde adquirem uma dupla membrana, dando origem aos vírus envelopados intracelulares (IEV) (Roberts e Smith, 2008; Dubochet, 1993; Moss, 2007). Os IEV podem dar origem aos vírus envelopados extracelulares (EEV) ou permanecerem associados à membrana plasmática da célula, formando os vírus envelopados célula-associados (CEV), importante na dispersão viral célula-célula (McFadden, 2005; Roberts e Smith, 2008; Moss, 2007; Doceul *et al.*, 2010). As proteínas de membrana dos IMV's e IEV's desempenham vários papéis no ciclo de vida dos VACV. Algumas destas proteínas têm sido utilizadas como alvos para vacinação em vários modelos de infecção pelos OPV (Smith et al, 2002).



**Figura 4: Ciclo de multiplicação do VACV.**

Fonte: McFadden, 2005 (traduzido)

### 2.1.5 Vias de infecção e patogênese dos *Orthopoxvirus*

Considerando as vias de infecção natural dos vírus do gênero OPV, eles podem ser divididos em três grupos: aqueles que têm como via principal de infecção o trato respiratório, sendo esta a via

mais frequente. No segundo grupo estão relacionados os vírus que se multiplicam nos sítios primários de infecção, normalmente a epiderme e mucosas e no terceiro grupo, os vírus que infectam seus hospedeiros através do trato gastrointestinal. A via de infecção natural do *Camelpox virus*, VARV e MPXV, é o trato respiratório já as infecções por VACV, CPXV e ECMV (*Ectromelia virus*) ocorrem através de lesões de continuidade na epiderme ou mucosas (revisado por Fenner et al., 1989). A ingestão de roedores contaminados é principal via de infecção do CPXV em gatos domésticos e felinos de zoológicos (Coras, 2005). O ECMV, além da via de infecção através de lesões de continuidade na pele, também pode ser transmitido através do trato gastrointestinal. Alguns roedores podem se alimentar da carcaça de outros animais infectados, favorecendo a disseminação do vírus (Coras, 2005).

Fenner e colaboradores (1948) propuseram o modelo de patogênese dos OPV, considerando uma infecção experimental em um camundongo com o ECMV. A infecção dá-se início após a introdução do ECMV através de lesões de continuidade na pele ou através da inoculação experimental. Após cerca de oito horas, o vírus alcança os linfonodos regionais, onde ocorre a multiplicação viral. A necrose das células do linfonodo favorece a liberação de partículas virais. Após, estas partículas virais alcançam a corrente sanguínea, mas são prontamente fagocitadas por macrófagos no fígado, baço e, possivelmente, medula óssea. Nestes órgãos ocorre a multiplicação viral no interior das células, dando início à segunda fase da infecção, sendo denominada viremia secundária, por volta do 4º d.p.i. Esta viremia é favorecida pela liberação de partículas virais no sangue favorecendo a disseminação viral. Nesta fase, observa-se a presença de lesões ulceradas generalizadas. Recentemente, Ma e colaboradores, (2013) em infecção experimental em camundongos com o ECMV (*Ectromelia virus*), observaram que após penetrar no epitélio das patas de roedores, o vírus alcança o linfonodo poplíteo através da via linfo hematogênica, posteriormente o fígado, onde ocorre a sua multiplicação, matando o hospedeiro (Ma et al., 2013). Neste mesmo estudo, Ma e colaboradores (2013), observaram que ratos tratados com anticorpos anti-proteína de partícula IMV, não desenvolveram a doença, ficando evidente a participação das partículas IMV na disseminação do vírus.

Os sinais clínicos observados nas infecções pelos poxvirus variam muito. Elas podem ser localizadas ou generalizadas, dependendo da virulência da amostra viral, da via de infecção, do tipo de hospedeiro e do seu *status* imunológico (revisado por Fenner et al., 1989). Os vírus do gênero *Orthopoxvirus* penetram na epiderme, multiplicam-se no local de infecção inicial e, através dos vasos linfáticos, alcançam os linfonodos regionais. A partir dos linfonodos, as partículas virais chegam ao sangue e órgãos distantes do sítio inicial de infecção (Flinte et al., 2009; Virgin, 2007). As lesões observadas na evolução clínica do VACV tanto em humano quanto em bovinos evoluem de forma progressiva na seguinte ordem: mácula, pápula, vesícula, pústula, úlcera e crosta. A dilatação local dos vasos sanguíneos da derme produz uma mácula, que evolui para uma pápula devido ao edema e infiltrado celular. A pústula pode ser formada em decorrência do acúmulo excessivo de exsudato celular. Após, a pústula evolui para úlcera e crosta (Fenner, 1979).

### **2.1.6 Vias de excreção dos OPV**

As vias e o período de excreção dos OPV são variados. Na infecção por VARV, partículas virais podem ser detectadas nos fluidos orofaríngeos, secreções da conjuntiva e urina de seres humanos acometidos. O período de excreção viral nos fluidos, secreções da conjuntiva e da urina de pacientes acometidos pelo VARV é prolongado naqueles pacientes que não possuem imunização prévia quando comparados aos pacientes que já foram imunizados (Sarkar, 1973a; Sarkar, 1973b).

*Ectromelia virus* (ECMV), um representante dos poxvirus que acometem roedores, foi detectado nas fezes e urina de camundongos em até 47 dias pós-infecção (Wallace e Buller, 1985). O *Monkeypox virus* é responsável por uma doença zoonótica que acomete primatas

humanos e não humanos principalmente no continente Africano, causando uma doença caracterizada por lesões ulceradas em humanos similares às aquelas causadas pelo VARV (Shchelkunov et al., 2002; Learned et al., 2005). Hutson e colaboradores (2009) detectaram o DNA do *Monkeypox virus* em secreções orais, nasais, oculares e fezes de cães da pradaria inoculados experimentalmente via nasal ou intra-dérmica.

O CPXV é o agente etiológico de uma doença zoonótica endêmica na Europa e oeste da Ásia que normalmente acomete humanos, roedores, e animais domésticos, tais como cães e cavalos. No entanto, o vírus já foi identificado em surtos acometendo animais silvestres de cativeiro como elefantes, rinocerontes, antas e alguns carnívoros (Marennikova, 1972; 25 Baxby, 1979; Meyer, 1998; Pelkonen, 2003; Kurth et al., 2009). Os felinos muitas vezes servem de hospedeiro intermediário, transmitindo a doença dos roedores, prováveis reservatórios naturais do CPXV, para os humanos e outros animais. O CPXV identificado nas fezes e urina dos roedores *Rattus norvegicus* por um período superior a 30 dias (Mairboroba, 1982).

## **2.2 Vírus Protótipo do Gênero *Orthopoxvirus*: VACV**

O VACV foi utilizado durante quase duas décadas na campanha de vacinação da Organização Mundial da Saúde para erradicação da varíola humana (VARV) no mundo (Smith e McFadden, 2002a). A imunização ocorreu até 1980, sendo a VARV erradicada do mundo pela OMS três anos depois do último caso humano notificado no mundo (Smith e McFadden, 2002a). O sucesso da imunização está diretamente relacionado com a antigenicidade cruzada observada entre as espécies do gênero OPV (Trindade et al., 2007b; Moss, 2007).

No Brasil, a vacinação contra a VARV iniciou antes de 1804, através de escravos que viajaram em navios negreiros de Portugal até o Brasil. A imunização era feita através do contato das lesões causadas pela vacinação nos braços de pessoas previamente vacinadas com aquelas que não tinham sido imunizadas. Entre 1804 a 1887, a vacinação da população brasileira foi feita da mesma forma: braço a braço (Trindade et al., 2007b). Somente a partir de 1887 a primeira amostra vacinal produzida em bezerros foi importada pelo Instituto Oswaldo Cruz (VACV-IOC). Posteriormente a amostra vacinal Lister, produzida no Lister Institute, Inglaterra também foi amplamente utilizada no Brasil (Trindade et al., 2007b). Além destas, o Brasil também produziu vacinas a partir das amostras vacinais Lister e VACV-IOC, sendo a primeira denominada Lister-Butantã (Lanna, 1980; Damaso et al., 2000). Atualmente, a vacinação contra a VARV a partir de amostras de VACV ocorre apenas em trabalhadores de laboratórios que manipulam o VACV e outros vírus do gênero OPV, além de militares e profissionais da saúde nos EUA, considerando uma possível ameaça terrorista com o VARV (Lederman et al., 2009; Smith e McFadden, 2002).

Mesmo após o fim da campanha de vacinação para erradicação da varíola humana, há mais de duas décadas, o VACV vem sendo isolado a partir de lesões exantemáticas nas mãos de ordenhadores e tetos de vacas em lactação em surtos de VB no Brasil (Damaso et al., 2000; Leite et al., 2005; Trindade et al., 2006; Megid et al., 2008; Trindade et al., 2009; Nagasse-Sugahara et al., 2004; Lobato et al., 2005; Megdalia et al., 2009). No entanto, segue incerta a origem do VACV que circula no Brasil, assim como dos possíveis hospedeiros naturais responsáveis pelos mecanismos de transmissão e disseminação do VACV. Uma hipótese para a origem das amostras de VACV que circulam no Brasil, estaria relacionada com as amostras vacinais utilizadas nas campanhas de vacinação no Brasil até a erradicação da VARV (Damaso et al., 2010). Durante surtos de VB, várias amostras de VACV brasileiras (VACV-BR) foram isoladas. Através de análises filogenéticas, foi possível comprovar a existência de dois grupos monofiléticos distintos das amostras de VACV-BR, sendo que estas amostras não foram agrupadas diretamente com as amostras vacinais de VACV que foram utilizadas na campanha de erradicação da varíola humana no Brasil (Drumond et al., 2008). Amostras de VACV



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

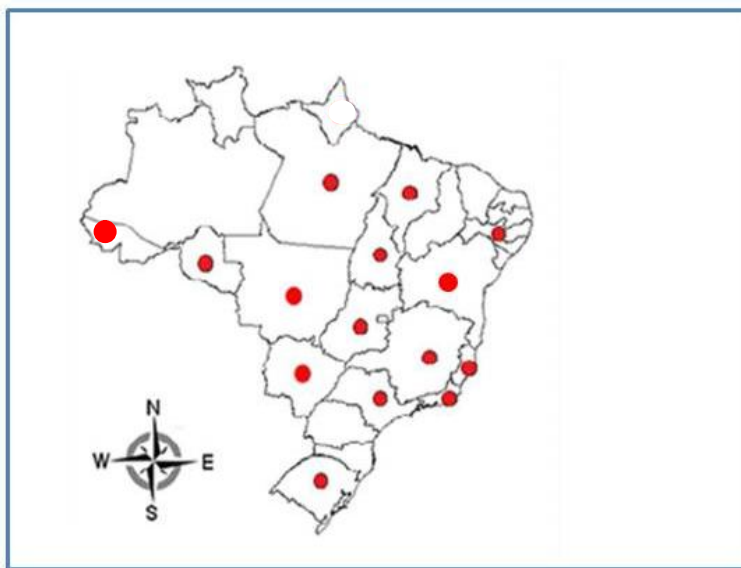
Uma subespécie de VACV, *Buffalopoxvirus*, tem sido isolada a partir de lesões exantemáticas acometendo rebanho de búfalos e mãos dos ordenhadores na Índia, Paquistão, Bangladesh, Rússia e Indonésia (Singh, 2007).

Em laboratórios de pesquisa, o VACV tem sido aplicado como vetor de expressão para estudo da biologia molecular dos *poxvirus*, produção *in vitro* de proteínas ou para produção de vacinas vivas (Pastorett e Vanderplasschen, 2003).

### 2.2.1 Ocorrência do VACV no Brasil

Os primeiros isolamentos do VACV no Brasil ocorreram a partir de lesões em roedores. O vírus SPAn 232 (SAV) foi isolados de camundongos sentinelas na estação florestal de Cotia, São Paulo em 1961 (Lopes et al., 1965; da Fonseca et al., 2002). Em 1963, o VACV amostra BeAn 58058 virus(BAV), foi isolado a partir do sangue de um roedor do gênero *Oryzomes sp* capturado em uma floresta no estado do Pará (Lopes et al., 1965). Em 1993, uma amostra viral foi isolada a partir de camundongos suíços do Centro de Bioterismo da UFMG, sendo denominada *Belo Horizonte virus* (VBH). Os animais apresentavam sinais clínicos semelhantes à varíola murina, com lesões generalizadas no dorso, face, focinho e patas (Diniz et al., 2001).

A partir da década de 90, houve aumento progressivo dos isolamentos de VACV em quase todos os estados do Brasil, relacionados principalmente aos surtos de VB (Fig.5). Em 1999, o Araçatuba virus (ARAV) foi isolado a partir de lesões ulcerativas nodulares das tetas e úberes de vacas da raça Girolanda no município de Araçatuba, São Paulo (Trindade et al., 2003b).



**Figura 5: Estados onde amostras brasileiras de VACV foram isoladas, com acometimento de humanos e bovinos durante o período de 1999 a 2013.**

Fonte: Abrahão, 2010 (modificado)

Em Minas Gerais, os primeiros surtos foram identificados na Zona da Mata, em 1999. Desde então, vários surtos foram identificados em todas as regiões do estado, incluindo: Vale do Rio Doce, Triângulo Mineiro/Alto Paranaíba, Sul/Sudoeste de Minas, Campo das Vertentes, Vale do

Mucuri e região metropolitana de Belo Horizonte (Lobato et al., 2005). Em 2000, em um surto de VB, o Muriaé virus (MURV) foi isolado a partir de lesões das mãos de um ordenhador, no município de Muriaé, Minas Gerais (Trindade et al., 2007). Em 2001, duas amostras de VACV foram isoladas em um mesmo surto, em fazendas próximas, na cidade de Guarani, Minas Gerais: Guarani P1 virus (GP1) e Guarani P2 virus (GP2) (Trindade et al., 2006;). A partir da caracterização molecular e dos estudos de virulência em camundongos BALB/c, foi possível observar a heterogeneidade genética e fenotípica existente entre as amostras GP1 e GP2 (Trindade et al., 2006; Ferreira et al., 2008a). Análises de regiões conservadas do genoma de GP1 e GP2 demonstraram que as amostras apresentavam maior similaridade filogenética com outras amostras de VACV-BR do que entre si. Desta forma, as amostras de VACV-BR foram divididas em dois grandes grupos filogenéticos (Drumond et al., 2008).

Em 2003, na cidade de Passatempo, no estado de Minas Gerais, foi isolado o Passatempo virus (PSTV) (Leite et al., 2005). Em 2005, a amostra SV2 foi isolada a partir de um surto na região do Serro, Minas Gerais (Trindade et al., 2009). No mesmo ano, Abrahão e colaboradores isolaram a amostra Mariana virus (MARV), proveniente de um surto na região de Mariana, Minas Gerais.

Estudos recentes revelaram a ocorrência de surtos VB em estados que até então não haviam sido acometidos: Pernambuco (Damaso *et al.*, 2008), Rondônia (Quixabeira-Santos, 2011), Maranhão (Assis *et al.*, 2009), Tocantins (Medaglia *et al.*, 2009), além de novos surtos nos estados de Minas Gerais (Kroon *et al.*, dados não publicados), Rio de Janeiro (Silva-Fernandes *et al.*, 2009), São Paulo (Megid *et al.*, 2008) e Espírito Santo (Donatele et al., 2003). Em 2010, Brum e colaboradores descreveram um surto causado por VACV acometendo cavalos crioulos em um haras localizado em Pelotas, Rio Grande do Sul (Brum et al., 2010; Campos et al., 2010).

### **2.2.2 Vaccinia virus GP2 (VACV-GP2)**

O VACV-GP2 foi isolado a partir de lesões nas tetas de uma vaca, em um surto confirmado de VB ocorrido em 2001, no município de Guarani, localizado na região sudoeste de Minas Gerais (Trindade et al., 2006). Durante um inquérito epidemiológico ocorrido na região, foram coletados crostas das tetas de duas vacas doentes. Elas pertenciam a duas fazendas diferentes, P1 e P2, distantes cerca de 10 km. A partir do isolamento viral, soroneutralização, PCR e microscopia de força atômica, ambos os vírus isolados foram caracterizados como sendo amostras de VACV. No entanto, a partir de diagnóstico molecular realizado através do seqüenciamento dos genes A26L, B18R, E3L, C11R, J2R, A56R e estudos filogenéticos apontaram que as amostras apresentavam divergências moleculares suficientes para serem agrupadas em clados diferentes da árvore filogenética, sendo denominadas GP1 e GP2.

O VACV-GP2 alinhou-se com amostras de VACV brasileiras isoladas (VACV-BR) a partir de surtos de VB (ARAV, CTGV e PSTV), já a amostra GP1 foi agrupada com as amostras VACV *Western Reserve* (VACV-WR) e VBH. Estes resultados mostraram que existe diversidade nas amostras isoladas no Brasil e reforça a hipótese de que estas amostras não possuem uma única origem, mas múltiplas origens. Ademais, ambas as amostras não se alinharam com as amostras de VACV Lister ou IOC utilizadas nas campanhas de vacinação para erradicação da varíola humana no Brasil, afastando a hipótese de que as amostras circulantes no Brasil seriam provenientes de amostras vacinais citadas (Drumond et al., 2008).

Além de apresentarem diferenças genéticas, o VACV-GP1 e VACV-GP2 também apresentam diferenças quanto à virulência em camundongos experimentalmente inoculados, sendo que o GP1, VBH, SAV e BAV causaram doença e morte nos animais inoculados e GP2, ARAV e PSTV não causaram nenhum sinal clínico (Ferreira et al., 2008a).

### **2.2.3 Sinais clínicos da VB**

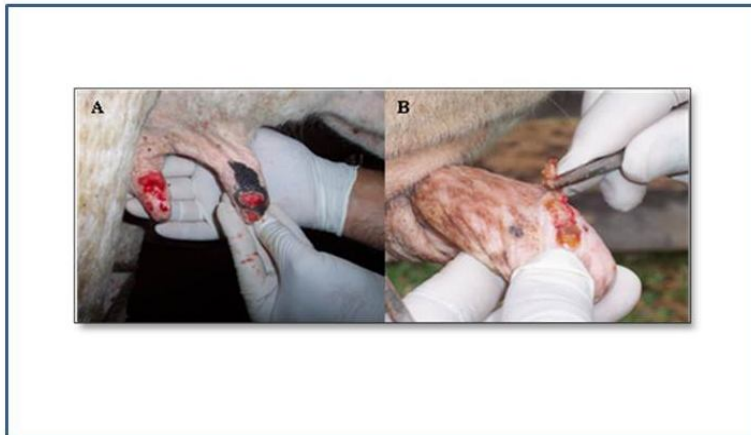
As lesões típicas de *poxvírus* foram observadas em todos os surtos de VB identificados no Brasil. Em humanos, as lesões são comumente encontradas nas mãos e dedos, no entanto, alguns autores já relataram lesões em outras partes do corpo, como nariz, região ocular e boca (Megid et al., 2008; Silva et al., 2008; Silva-Fernandes et al.,2009). Quanto à evolução clínica, elas são similares em homens e animais acometidos. Trindade e colaboradores (2009) descreveram a evolução clínica de uma infecção primária causada pelo VACV em humanos (Fig. 6). Inicialmente, pode-se observar o surgimento de máculas e pápulas seguidas por edema e dor local. Após, surgem vesículas que, depois de 3 a 4 dias, evoluem para pústulas umbilicadas envoltas por tecido inflamatório e úlceras com tecido enegrecido. Em alguns casos, a linfadenopatia periférica também pode ser observada (Trindade et al., 2009). As queixas de mialgia, dor de cabeça e artralgia, além de linfadenopatia axilar, cervical e inguinal, e anorexia são frequentemente observadas durante a evolução clínica da infecção pelo vírus da VB em humanos (Trindade et al., 2003a; Trindade et al., 2003b; Nagasse-Sugahara et al., 2004; Leite et al., 2005; Silva et al., 2008; Megid et al., 2008; Silva-Fernandes et al.,2009).



**Figura 6: Lesões e evolução de uma infecção primária de VACV em humanos.**(A)Pápula inicial na base do dedo médio. (B) Lesões poucos dias depois: presença de pústulas e úlceras (C) Detalhes da figura A. (D) Detalhes da figura B. (E) linfadenopatia periférica no braço direito de um paciente acometido na fase de pústulas e úlceras. A progressão completa da doença foi de 21 a 25 dias.

Fonte: Trindade et al., 2009 (modificado)

Em bovinos acometidos, as lesões podem ser observadas nos tetos e úbere (Fig. 7). A presença de lesões de continuidade nos tetos pode favorecer o estabelecimento de infecções secundárias, como mastites bacterianas nas tetas, causando redução de até 50% na produção de leite (Lobato et al., 2005). Os bezerros comumente se infectam durante a amamentação e apresentam lesões no focinho, gengiva e mucosa oral. Em todos os focos da VB, pode-se observar a rápida disseminação da doença dentro da propriedade. Quanto ao tipo de manejo, tanto propriedades com ordenha manual quanto mecânica foram acometidas pela doença. No entanto, somente vacas em lactação e bezerros que mamam em vacas doentes foram acometidos (Madureira, 2009; Lobato et al., 2005). A doença no estado, entretanto, muitas vezes não é notificada. O acometimento de pequenas propriedades rurais e de acesso médico precário favorece a subnotificação dos casos (Trindade et al., 2009).



**Figura 7: Lesões causadas pelo VACV em bovinos num surto de VB em Mariana (MG).**(A) e (B): Lesões ulcerativas nas tetas das vacas em lactação.

Fonte: Surto de VB no município de Mariana, MG. Fotos do arquivo pessoal da dra. Marieta Madureira, 2009.

#### **2.2.4 Transmissão da VB**

Em muitos surtos de VB, constatou-se que a transmissão da doença de uma vaca para a outra dentro do rebanho se deu através das mãos do ordenhador infectado ou através das ventosas do equipamento de ordenha mecânica (Madureira, 2009). Durante a ordenha, as partículas virais presentes nas lesões ulceradas nas tetas e úbere, podem invadir, através de lesões de continuidade, o tecido das mãos e braços dos ordenhadores (Trindade et al., 2006; Trindade et al., 2007). Entre fazendas a doença pode ser transmitida através da introdução de animais doentes no rebanho ou através das mãos de ordenhadores que entram em contato com animais doentes em outras propriedades (Madureira, 2009; Lobato et al., 2005; Megid, 2008).

Embora sejam elucidados alguns mecanismos de transmissão da doença, existem poucos estudos acerca dos possíveis hospedeiros e reservatórios naturais do VACV responsáveis pelos mecanismos de transmissão e disseminação do vírus. Recentemente, o VACV foi detectado no sangue de macacos na Amazônia (Abrahão et al., 2010a). Em 1963, o VACV foi isolado do sangue de um roedor do gênero *Oryzomys sp* capturado no estado do Pará (Brasil) (Lopes et al., 1965). Embora o VACV tenha sido isolado em animais selvagens, permanecia desconhecida a participação destes animais na transmissão e disseminação do VACV em surtos de VB. Em trabalho recente, Abrahão e colaboradores (2009d), identificou a presença de DNA e de partículas virais viáveis de VACV no sangue de roedores peridomésticos (*Rattus rattus* e *Mus musculus*) capturados nas proximidades de um foco de VB em Mariana, Minas Gerais. A partir daí, foi proposto um modelo hipotético de transmissão da VB, que inclui a participação de roedores peridomésticos no elo de ligação entre o ciclo silvestre do VACV e o ambiente das fazendas. Roedores peridomésticos poderiam ingerir ou aspirar de fezes contaminadas de bovinos infectados e, posteriormente infectar animais selvagens presentes nos arredores das fazendas (Abrahão et al., 2009d; Abrahão et al., 2010a).

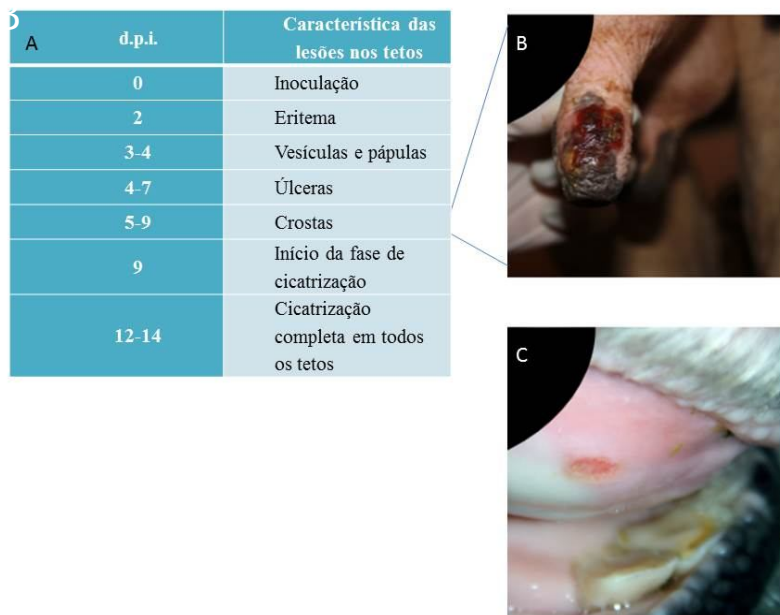
#### **2.2.5 Vias de infecção e patogênese do VACV**

Estudos recentes de patogenia utilizando diferentes formas de inoculação e modelos animais reforçam as evidências de uma infecção sistêmica causada pelo VACV (Ferreira et al., 2008; Campos et al., 2011; Rehfeld et al., 2013; Cargnelutti et al., 2012a; Cargnelutti et al., 2012b;

Rivetti et al., 2013). Ferreira e colaboradores (2008a) inocularam via intranasal camundongos com amostras de VACV-BR. O experimento revelou altos títulos virais em vários órgãos como: traqueia, pulmões, cérebro, fígado, coração e baço. Estes achados apontaram para uma infecção sistêmica associada ao VACV. Além disso, foi possível observar um grupo de amostras mais virulenta e outro que não causou sinais clínicos nos animais inoculados. Os animais inoculados com as amostras GP1, VBH, SAV ou BAV apresentaram sinais clínicos mais severos como: pilo-ereção, arqueamento do dorso, perda de peso e morte. Já os animais inoculados com as amostras GP2, PSTV ou ARAV não apresentaram sinais clínicos.

Estudos recentes do nosso grupo acompanharam a evolução clínica de vacas secas experimentalmente inoculadas com o VACV-GP2, uma amostra de VACV-BR (Rehfeld et al., 2013). Vacas secas foram inoculadas nos tetos com VACV-GP2 e acompanhadas diariamente a fim de caracterizar a evolução clínica, aspecto e evolução das lesões. Além disso, alguns animais foram necropsiados para a pesquisa de imunomarcações para o VACV através da imunohistoquímica (IHQ). Quanto a evolução clínica, todos os animais apresentaram as lesões típicas causadas pelo VACV, sendo o período de incubação curto (2-3 dias) (Fig. 8). Apenas um animal desenvolveu lesão na gengiva, sendo confirmada através da PCR como sendo uma lesão causada pelo VACV (Fig. 8-C). Através da IHQ foi possível concluir que o vírus tende a desaparecer rapidamente do local de inoculação, uma vez que as imunomarcações detectadas nos tetos diminuíram progressivamente, de acordo com a evolução das lesões. A disseminação viral através da via linfática pode ser comprovada através da imunomarcação positiva em linfonodos retromamários (LRM). Além disso, foi observada imunomarcação positiva para o VACV em macrófagos localizados na região perivascular da derme. Através do exame clínico foi detectado o aumento de volume dos LRM através da palpação. Este foi o primeiro trabalho descrevendo a evolução clínica do VACV em bovinos.

Rivetti e colaboradores (2013), em infecção experimental de VACV-GP2 no teto de vacas lactantes, demonstrou que a infecção pelo VACV é sistêmica e persistente. A presença de DNA do VACV no sangue, fezes e tecidos linfoides apontam que o VACV apresenta disseminação sistêmica, com multiplicação viral em órgãos distantes do sítio primário de infecção. Além disso, a detecção de DNA e de partículas viáveis de VACV nas fezes, que persistiu mesmo após a resolução das lesões nos tetos inoculados, demonstrou que a infecção causada pelo VACV não é aguda, e sim, prolongada. Além disso, sugere que as fezes pode ser uma via de excreção do vírus no ambiente, podendo favorecer a transmissão do vírus entre propriedades rurais.



**Figura 8: Características, localização e evolução das lesões causadas pelo VACV-GP2 em vacas secas experimentalmente inoculadas.**(A) Evolução das lesões nos tetos das vacas experimentalmente inoculadas com VACV-GP2. (B) Úlcera e crosta no teto de uma vaca inoculada com VACV-GP2 no 8º d.p.i. (C) Ulceração na boca de uma vaca experimentalmente inoculada com VACV-GP2 no 7º d.p.i.

Fonte: Rehfeld et al., 2013 (modificado)

### 2.2.6 Vias de excreção do VACV

A maioria dos estudos acerca das vias de excreção dos VACV é desenvolvida em espécies de laboratório como coelhos e camundongos (Cargnelutti et al., 2012; D'anunção et al., 2012; Ferreira et al., 2008b; Abrahão, 2009a). Recentemente, um estudo do nosso grupo, detectou a presença de DNA do VACV assim como de partículas infecciosas nas fezes de vacas experimentalmente inoculadas como VACV-GP2 (Rivetti et al., 2013).

Embora sejam conhecidas algumas vias de excreção viral, ainda não é conhecida a importância destas na transmissão horizontal do VACV. Recentemente, Abrahão e colaboradores (2010a; 2009b) propuseram um modelo hipotético no qual, os roedores participariam da disseminação e transmissão do VACV e fariam o elo entre o ciclo silvestre do VACV no ecossistema selvagem e o ambiente das fazendas (Abrahão et al., 2010a). As evidências de que a eliminação do VACV nas fezes de roedores reforça a hipótese de participação destes animais na cadeia de transmissão da VB. Vários estudos foram conduzidos a fim de avaliar a viabilidade viral nas fezes de roedores.

Ferreira e colaboradores (2008b) detectaram partículas virais infecciosas e DNA do VACV nas fezes de camundongos Balb/c experimentalmente infectados com o vírus. Camundongos sentinelas, expostos às excretas contaminadas com VACV se infectaram e passaram a eliminar o VACV nas fezes por pelo menos 30 dias. Além das fezes, foi possível detectar DNA do VACV na urina entre o 7º a 9º dia pós-infecção, indicando que a eliminação viral através da urina ocorre somente na fase aguda da doença (Abrahão, 2008).

Abrahão e colaboradores (2009a) analisaram a estabilidade das partículas infecciosas assim como do DNA de VACV nas fezes de camundongos experimentalmente inoculados intra-nasal com diferentes amostras de VACV. As fezes foram coletadas e armazenadas sob diferentes condições térmicas e de umidade, a fim de mimetizar as condições climáticas comumente encontradas em surtos de VB no Brasil. Os resultados mostraram que foi possível recuperar partículas infecciosas de VACV em até 20 dias enquanto o DNA viral pode ser detectado até o 69º dia pós infecção. A viabilidade do VACV nas fezes por tempo prolongado apontam que as fezes podem abrigar o vírus por semanas, mesmo sob condições de temperatura e umidade variadas, servindo, portanto como uma fonte potencial de manutenção do VACV na natureza e propiciando a sua circulação entre os roedores que são comumente encontrados próximos às instalações das fazendas.

D´anunção e colaboradores (2012) detectaram a presença de DNA de VACV nas fezes de camundongos expostos a fezes de bovinos experimentalmente inoculados com o VACV-GP2. Camundongos Balb/c foram expostos a fezes de vacas inoculadas experimentalmente com o VACV-GP2 por 20 dias. Foi possível detectar tanto o DNA de VACV quanto partículas virais infecciosas nas fezes dos camundongos. Este modelo de transmissão do VACV pode ocorrer em áreas de surto da VB, sugerindo uma possível transmissão horizontal do VACV dos bovinos infectados para roedores.

Além de roedores, outros animais também foram avaliados afim de avaliar a detecção de DNA VACV nas fezes. Cargnelutti e colaboradores (2012) inocularam coelhos com amostras de VACV isoladas a partir de um surto acometendo cavalos no sul do Brasil. Foi possível detectar o DNA do VACV nas fezes destes animais por até 30 dias.

Apesar dos inúmeros estudos com roedores e outros animais de laboratórios, a pesquisa de excreção viral em bovinos é recente. Rivetti e colaboradores (2013) identificaram a presença de DNA viral assim como de partículas infecciosas de VACV nas fezes de vacas experimentalmente inoculadas com o VACV-GP2. A detecção de partículas virais viáveis sugere que esta via de excreção possa ser uma forma de disseminação do VACV no ambiente, podendo favorecer a disseminação do VACV. Esta hipótese pode ser reforçada pelo experimento realizado por D´anunção e colaboradores (2012) que detectaram a presença de DNA de VACV nas fezes de camundongos expostos a fezes de bovinos experimentalmente inoculados.

Além das fezes, a presença do DNA VACV assim como de partículas virais infecciosas no leite de vacas em um surto de VB chama a atenção para outra possível rota de veiculação do VACV (Abrahão et al., 2009c). Além disso, O VACV-GP2 permaneceu viável no leite mesmo após ter sido submetido à pasteurização lenta (62 – 65 °C/30 minutos), havendo pequena redução no título viral após o tratamento térmico (Oliveira et al., 2010). Este resultado chama a atenção para a estabilidade da partícula viral, podendo o leite servir como potencial veículo de disseminação do VACV. Embora não tenham sido identificadas lesões no trato gastrointestinal associado a ingestão de leite nos surtos de VB, o *Buffalopox virus* foi identificado como sendo o agente etiológico de lesões na boca de uma criança que ingeriu leite contaminado em um surto acometendo bubalinos na Índia (revisado por Berkelman, 2003).

### **2.2.7 Viabilidade do VACV e de outros OPV**

Em estudo prévio, foi avaliada a viabilidade do VACV-GP2 no leite experimentalmente inoculado após diferentes condições de armazenamento, produção de leite fermentado e queijo e após tratamento térmico (pasteurização lenta 62-65°C/30 min). O VACV-GP2 permaneceu viável no leite após temperaturas de armazenamento em geladeira, câmara fria e -20°C durante 48 horas (Oliveira et al., 2010). Foi possível observar grande semelhança nos resultados das três formas de armazenamento a partir dos valores médios das reduções dos títulos virais. No entanto, apesar de ser observada menor redução no título viral das amostras estocadas a -20°C, o resultado aponta que, estatisticamente, a redução média do título viral para as todas as temperaturas de armazenamento foi igual ( $P > 0,05$ ).

As temperaturas acima avaliadas estão de acordo com a instrução normativa número 51 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (Brasil, 2002). Segundo esta legislação, o leite cru tipo C pode permanecer estocado sob refrigeração a 4 °C ou menos por até 24 horas até ser enviado para o estabelecimento beneficiador. No entanto, este período pode ser estendido para 48 horas quando o leite é proveniente de propriedades que realizam a segunda ordenha no final da tarde.

Huq (1976) avaliou a persistência da viabilidade do VARV em crostas sob diferentes condições de temperatura. Foi possível detectar partículas virais infecciosas além de DNA viral por até oito semanas quando as crostas foram mantidas a 4°C ou a -20°C. No entanto, o título do vírus das crostas mantidas a -20 °C foi superior durante todo o período do experimento quando comparado aos títulos do vírus recuperados da crosta que foi mantida a 4°C.

A temperatura do leite, de outros alimentos e até a da água pode influenciar a viabilidade de muitos vírus. O pH, bem como a luz UV e outros fatores, pode interferir na viabilidade do VACV (Essbauer et al., 2007). No entanto, Mahnel e colaboradores (1977), não observaram a interferência do pH das amostras no título do vírus inoculado em água de diferentes fontes. O título viral do VACV inoculado experimentalmente em água de beber (pH 7,52), rio ou lago (pH 8,05) reduziu 1-2 logs depois de 200 dias estocado a 10° C. Essbauer e colaboradores (2007) observaram que a água de chuva ligeiramente ácida e a presença de proteína favoreceram a viabilidade do VACV no ambiente. Além disso, o vírus permaneceu viável sobre as superfícies de alimentos como salsichas e tecidos de algodão.

Essbauer e colaboradores (2007) avaliaram a viabilidade do VACV (amostra *Munich 1*) em água de chuva, quando estocado a 4 °C. O vírus permaneceu viável durante todo o período do experimento (duas semanas). Neste experimento, a temperatura de 4°C também foi capaz de manter o vírus viável sem redução significativa no título do vírus. Em alimentos como pão, salada e salsicha inoculados experimentalmente com o VACV e armazenados durante 14 dias a 4°C, também foi possível detectar a presença tanto do DNA viral quanto de partículas virais viáveis.

Outros vírus também foram avaliados quanto à viabilidade após armazenamento a 4°C. O *Ectromelia virus*, um OPV, também permaneceu mais estável mantido a 4°C quando comparado as demais temperaturas testadas: 23 °C a 25 °C ou 37 °C (Batt e Jacoby, 1987).

Sauerbrei e Wutzler (2009) avaliaram a resistência do VACV ao calor seco utilizando um instrumento capaz de emitir calor, o *Keredusy*. VACV foi resistente ao calor quando exposto durante uma hora às temperaturas de 40 °C, 75 °C, 85 °C e 95 °C. A redução significativa do título viral (redução de pelo menos 4 log<sub>10</sub> o título inicial do vírus) foi observada somente quando exposto a temperatura de 95°C durante duas horas. Nas demais temperaturas o VACV não sofreu redução do título viral, sendo, portanto, resistente às temperaturas testadas.

A pasteurização tem como objetivo eliminar microorganismos patogênicos como *Mycobacterium tuberculosis* e *Coxiella Burnetti*. No entanto, a sua efetividade na inativação de vírus de importância para a Saúde Pública também deve ser considerada (Bona et al., 2005). O vírus da aftosa, por exemplo, embora não apresente riscos diretos à saúde humana, representa uma ameaça aos rebanhos de bovinos e ovinos. Contudo, a sua viabilidade no leite após diferentes processos de pasteurização é bastante estudada. O vírus da aftosa foi totalmente eliminado do leite após ter sido submetido a temperatura de 63°C durante um minuto com pH 6,7. Mantendo a mesma temperatura e pH 7,6, o vírus foi inativado somente após dois minutos (Sellers, 1969).

O vírus da aftosa permaneceu viável nos queijos tipo *Camembert* (pH=5) e *Cheddar* produzido a partir de leite aquecido a 63°C durante 6 segundos. O leite cru utilizado para a produção de queijos e derivados representa risco potencial de disseminação de doenças provenientes tanto de microorganismos eliminados pelo leite quanto daqueles adquiridos a partir da utilização de utensílios contaminados no momento da ordenha (Bona et al., 2005; Oliver et al., 2005).

Em Minas Gerais, a Lei Estadual n° 14.185 de 31/01/2002 determina que o início do processamento do queijo Minas artesanal deve ocorrer em até 90 minutos após o começo da ordenha, utilizando-se culturas lácticas naturais como “pingo”, soro fermentado ou soro-



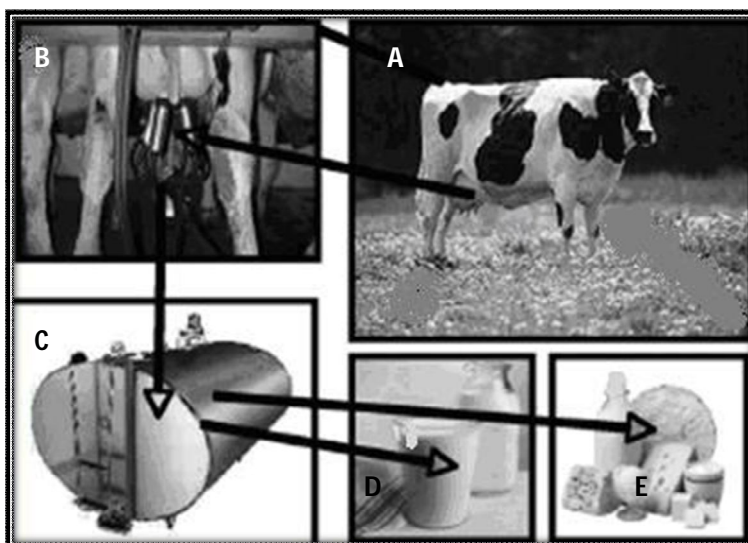
fermento, coalho e sal e sem que ocorra qualquer tipo de tratamento térmico prévio com o leite (Minas Gerais, 2002). Em focos da doença, a utilização do leite cru para a produção de queijo pode oferecer risco tanto para o queijeiro, que normalmente manipula a massa sem nenhum tipo de proteção (como luvas), quanto para as pessoas que consomem estes produtos, caracterizando um risco à Saúde Pública.

Embora o VACV permaneça viável tanto no leite após tratamentos térmicos quanto após o processamento para produção de queijo, ainda não se sabe a respeito da transmissão do vírus através da ingestão de produtos contendo o vírus. No entanto, a adoção de medidas que visem o controle da disseminação da doença no rebanho bem como não consumir leite cru ou produtos produzidos sem prévio tratamento são importantes, haja vista o risco potencial de consumo de leite cru para a Saúde Pública.

### 2.2.8 Patógenos possivelmente veiculados através do leite

O consumo de leite sem prévio tratamento térmico oferece risco à Saúde Pública na medida em que ele pode veicular várias bactérias patogênicas, dentre elas: *Salmonella*, *Campylobacter*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium bovis*, *Escherichia coli* e *Mycobacterium bovis* (Jayarao e Henning, 2001; Murinda et al., 2002; Guide..., 2003; Van Kessel et al., 2004; Oliver et al., 2005). No entanto, alguns autores destacam a possibilidade de veiculação de vírus através do leite, sobretudo quando estes oferecem uma ameaça à Saúde Pública (Sellers, 1969; Callis et al., 1975; Venables et al., 1997; Jayarao e Henning, 2001; Bona et al., 2005; Oliver et al., 2005; Tomasula e Konstance, 2007; Kaiser, 2008).

Normalmente o leite produzido na glândula mamária de animais saudáveis não contém bactérias ou vírus patogênicos aos humanos. No entanto, se o animal apresentar uma infecção sistêmica ou intra-mamária, os microorganismos podem ser eliminados juntamente com o leite no momento da ordenha (LeJeune e Rajala-Schultz, 2009). Além disso, o leite também pode ser contaminado a partir do contato direto com utensílios contaminados no momento da ordenha (Fig. 6) (Oliver et al., 2005; LeJeune e Rajala-Schultz, 2009).



**Figura 9: Ciclo de patógenos veiculados através do leite iniciando no ambiente de ordenha até sua transferência para o leite e derivados.**(A) Os microorganismos patogênicos podem estar diretamente relacionados com a manipulação de utensílios contaminados no momento da

ordenha ou com microorganismos eliminados junto com o leite; (B) o leite torna-se contaminado durante a ordenha mecânica ou manual; (C) O leite contaminado é encaminhado aos tanques de expansão; (D) e (E) O consumo de leite não pasteurizado e outros produtos produzidos a partir de leite não pasteurizado favorece a disseminação dos patógenos.

Fonte: Oliver (2005).

Rohrbach et al. (1992), em avaliação dos microorganismos isolados a partir de tanques de expansão de leite nos estados do Tennessee e Virginia (EUA), observou que quase 35% dos produtores de leite que participaram da pesquisa afirmaram consumir leite cru estocado em tanques de expansão das fazendas, porém, 25% destes mesmos tanques estavam contaminados com um ou mais patógenos. O consumo de leite não pasteurizado bem como de queijos produzidos a partir de leite não pasteurizado representa ameaça a Saúde Pública (Oliver et al., 2005; Leedom, 2006; Jayarao et al., 2006). Entretanto, alguns microorganismos resistem à pasteurização (exemplo: *Listeria monocytogenes*), formando biofilmes que garantem a sua persistência no ambiente e favorecem a contaminação dos produtos lácteos (Oliver et al., 2005). A pasteurização lenta do leite consiste em mantê-lo sob temperatura de 62 °C a 65 °C durante 30 minutos, sendo comumente realizado em tanques onde o leite é mantido sob agitação mecânica durante todo o processo (Brasil, 1952). Embora não seja adotado em escala industrial, este processo pode ser empregado em laticínios de pequeno porte para o abastecimento público ou para produção de derivados lácteos de acordo com a instrução normativa numero 51 de 18 de setembro de 2002 (Brasil, 2002). A pasteurização tem como principais objetivos a destruição de bactérias patogênicas e a redução da microbiota saprófita. No entanto, a viabilidade viral no leite após processos de pasteurização é abordada, sobretudo quando se trata de vírus que podem ser veiculados através do leite elevando a disseminação da doença no rebanho, como o vírus da aftosa. A aftosa é altamente contagiosa, sendo o leite cru um veículo para a disseminação do vírus durante a transferência para tanques de expansão ou para indústrias (Tomasula e Konstance, 2004).

Sellers (1969) avaliando a viabilidade do vírus da aftosa no leite, observou a importância do pH e da temperatura na inativação do vírus. No leite inoculado com partículas virais e mantido à temperatura de 63°C, observou-se a completa inativação do vírus após um minuto com pH 6,7. Contudo, mantendo a mesma temperatura e pH 7,6, o vírus foi inativado somente após dois minutos. Além do leite, o vírus da aftosa também pode sobreviver no queijo tipo *Cheddar* com pH 5,0 durante até 4 meses (Callis et al., 1975). Outros vírus também podem ser veiculados através do leite. Venables e colaboradores (1997), pesquisaram a viabilidade do vírus da imunodeficiência bovina (BIV) no leite cru e após sofrer processo de pasteurização. A transmissão do vírus foi constatada através da PCR e sorologia do grupo de animais que foi alimentado com o leite cru contendo vírus. No entanto, nenhum animal inoculado com o leite previamente pasteurizado contendo o BIV, desenvolveu a doença.

Embora as rotas conhecidas de infecção natural do VACV não incluam a ingestão de alimentos que contenham o vírus, o leite pode apresentar partículas virais uma vez que lesões presentes na teta e úbere podem se soltar durante a ordenha, contaminando o leite. Dentre os membros do gênero OPV, apenas o *Monkeypox virus* (MPXV) é sabidamente transmitido pela carne de animais selvagens mal-cozidas além das outras formas de transmissão comuns ao VACV, que incluem o contato de lesões de continuidade da pele com lesões de animais doentes.

## **OBJETIVOS**

### **3.1 Objetivo geral:**

Estudar a excreção do VACV no leite de vacas em lactação experimentalmente inoculadas.

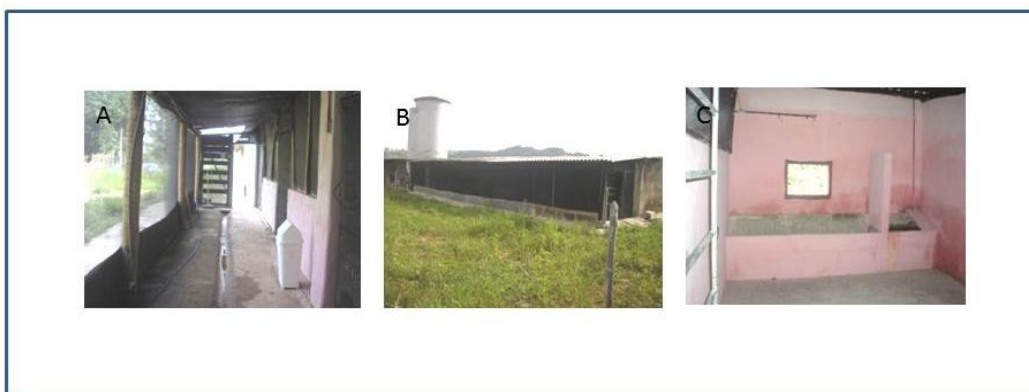
### **3.2 Objetivos específicos**

- Pesquisar a presença de DNA viral utilizando a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em leite, queijo, leite pasteurizado, iogurte e nas fases do leite após ter sido submetido a processo de centrifugação, obtido a partir de leite de animais experimentalmente inoculados com o VACV amostra GP-2 durante toda a evolução clínica da doença.
- Quantificar o DNA do VACV através da PCR em tempo real nas amostras de leite, queijo, soro do queijo, leite pasteurizado, iogurte e nas fases do leite obtidas após a centrifugação.
- Realizar análises de qualidade do leite, através da contagem de células somáticas e pesagem diária do leite a fim de verificar a correlação entre estes critérios de qualidade e a presença do vírus no leite.
- Estabelecer o período de excreção do vírus em animais experimentalmente infectados.
- Pesquisar a presença de DNA viral utilizando a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em leite de animais previamente inoculados com o VACV amostra GP-2 e posteriormente submetidos a tratamento imunodepressor.
- Quantificar o DNA do VACV através da PCR em tempo real nas amostras de leite de animais previamente inoculados com o VACV amostra GP-2 e posteriormente submetidos a tratamento imunodepressor.
- Estudar a viabilidade do VACV amostra GP2 em amostras de leite previamente positivas na PCR.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Local do Experimento e Instalações

O experimento foi realizado no Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO), localizado no município de Pedro Leopoldo-MG (Fig. 10). A etapa de processamento das amostras e realização dos testes moleculares e de viabilidade viral foi realizada na no Laboratório de Pesquisa em Virologia Animal da Escola de Veterinária – UFMG e no Laboratório de Vírus do Instituto de Ciências Biológicas – UFMG. Os animais foram distribuídos dois a dois em baias de concreto com dimensões 3,5 x 3,5 metros, com instalações elétricas e hidráulicas e separadas por paredes. Todas as frestas e aberturas foram teladas a fim de impedir a entrada de insetos e roedores. Os efluentes da lavagem das baias foram descartados em fossa séptica exclusiva para as baias de inoculação. A cama de serragem dos animais era trocada diariamente, sendo composta por serragem e feno. Todos os dejetos foram descartados em fossas apropriadas e posteriormente cobertas com cal e terra. O leite ordenhado que não foi utilizado no experimento foi desprezado em fossa séptica exclusiva.



**Figura 10: Estrutura do LANAGRO onde ocorreu a inoculação experimental de VACV-GP2.**(A) visão interna do corredor que dá acesso às baias; (B) visão externa das baias;(C) visão interna de uma das baias.

Fonte: Rehfeld, 2011 (modificado)

### 4.2 Seleção e manutenção dos animais

As vacas selecionadas para o experimento foram avaliadas previamente através de exames clínicos e sorológicos. Foram selecionadas oito vacas lactação, sem bezerro ao pé, soronegativas para *Orthopoxvirus* (OPV) pelo teste de soroneutralização pela redução do número de placas (SN) além de apresentarem bom estado geral de fazendas localizadas nos municípios de Confins e Pedro Leopoldo – MG. Todas as vacas foram vermifugadas e receberam banhos de carrapaticidas, além de brincos de identificação. Durante a fase de adaptação, precedente ao início do experimento, os animais foram mantidos em baias individuais, sendo oferecida alimentação e água. Durante as fases de adaptação e do experimento, os animais receberam duas refeições diárias, compostas cada uma por 10 kg de feno de Tyfton tipo B e 2 kg de ração com 22 a 24% de Proteína Bruta (PB). O sal mineral foi fornecido à vontade, calculando-se aproximadamente 50 g por animal por dia. A água foi fornecida *ad libidum*. A manutenção dos animais e a limpeza das instalações foram realizadas por um funcionário exclusivo, previamente treinado.

### 4.3 Vírus utilizado

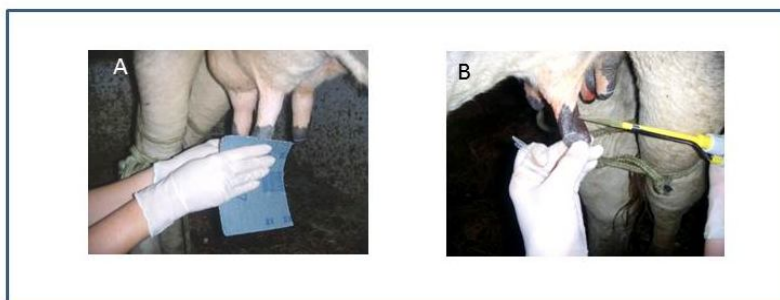
O inóculo utilizado foi a amostra de VACV-GP2 re-isolado obtido a partir de crostas de um animal infectado experimentalmente durante um pré-experimento realizado pelo nosso grupo. A amostra viral *Vaccinia virus* Guarani P2 (VACV GP2) foi isolado de vacas com lesões nas tetas durante um surto de VB ocorrido em 2001, no município de Guarani/MG (Trindade *et al.*, 2006). O vírus foi multiplicado, purificado e clonado conforme descrito por Campos e Kroon (1993).

Resumidamente, estoques de amostra VACV-GP2 foram cultivados com uma multiplicidade de infecção de 0,01 em células Vero (linhagem contínua de epitélio de rim de macaco verde africano, *Chlorocelrus aeothiops*) 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 SFB e as garrafas foram mantidas sob à mesma temperatura até o aparecimento do efeito citopático (ECP) com a destruição de 90% da monocamada. 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).

### 4.4 Escarificação e inoculação

Três tetos de cada vaca foram inoculados com 50 µl de suspensão viral contendo 10<sup>6</sup> UFP/ml de VACV-GP2, por região (Fig. 11). O teto posterior esquerdo (TPE) de cada vaca serviu de controle negativo. Ele foi escarificado, porém, não foi inoculado. Todos os tetos foram divididos em região cranial e caudal, sendo feitas escarificações em toda área de cada região dos tetos com o auxílio de uma lixa do tipo esmeril número 4 (JX-41, Lixas Doble A, Argentina) com 120 de granulagem sendo realizados 10 movimentos ascendentes e 10 descendentes. (Fig. 11 A). A região do óstio (1,5 cm acima) foi protegida para que não houvesse a formação de lesões, prejudicando a ejeção do leite. O TPE foi chamado de *teto controle* (TC), uma vez que apesar de ter sido escarificado, ele não foi inoculado com o vírus. Os demais tetos: teto posterior direito (TPD) e tetos anteriores direito e esquerdo (TAD e TAE) foram escarificados e inoculados e, portanto, foram chamados *tetos infectados* (TI).

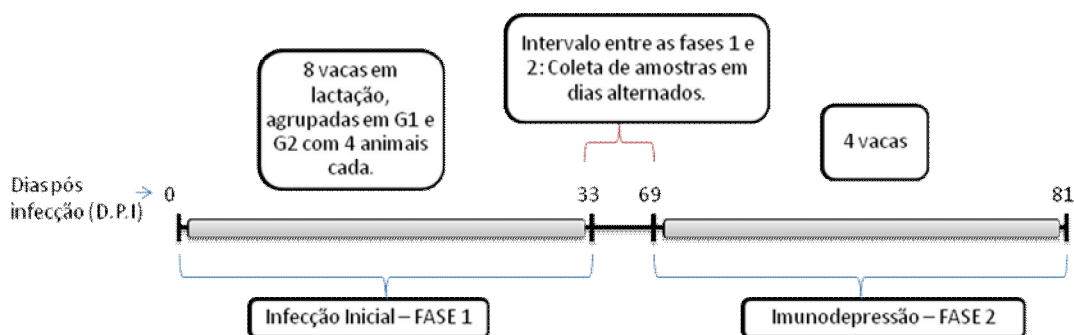


**Figura 11: Escarificação e inoculação do VACV-GP2 nos tetos.**(A) Escarificação da do teto com lixa e (B) inoculação do teto com VACV-GP2.

Fonte: Rehfeld, 2011 (modificado)

#### 4.5 Descrição geral do experimento

O experimento foi realizado em duas etapas. Na primeira, denominada infecção experimental (Fase 1), oito vacas em lactação foram inoculadas (Item 4.4), acompanhadas clinicamente e ordenhadas para a obtenção de amostras de leite (conforme descrito no item 4.6.1) diariamente até o 33º dia pós infecção (d.p.i). A partir do 33º até o 69º d.p.i. as amostras de leite foram obtidas em dias alternados. No 69º d.p.i. iniciou-se a segunda etapa do experimento, denominada Fase 2, na qual quatro animais previamente inoculados na Fase 1 foram submetidos a tratamento com imunodepressor e as amostras coletadas conforme o item 4.7.1 até o final do experimento.



**Figura 12: Representação esquemática da evolução temporal do experimento: Fase 1 e Fase 2.**Na Fase 1 oito animais foram inoculados e acompanhados diariamente até o 33º dia pós infecção. A partir do 69ºd.p.i., quatro animais da Fase 1 foram imunodeprimidos, dando início à Fase 2. Estes animais foram acompanhados até o 81ºd.p.i. No intervalo entre as duas fases, o acompanhamento aconteceu em dias alternados.

#### 4.6 Descrição geral da Fase 1

Foram formados dois grupos de quatro animais cada: G1 (animais: 1, 2, 3, 4) e G2 (animais 5 a 8). A formação de dois grupos teve o objetivo de simular o processamento de produtos lácteos a partir de um *pool* do leite de vários animais, situação frequentemente encontrada nas indústrias lácteas. A coleta das amostras de leite de todos os animais foi realizada diariamente, de duas formas, dependendo do dia de coleta: par ou ímpar, como descrito abaixo (Item 4.6.1 e Item 4.6.2).

#### 4.6.1 Coleta de amostras de leite nos dias pares

Nos dias pares, a partir do 2º dia pós- infecção (d.p.i.), após a assepsia do óstio mamário com iodo glicerinado a 1%, um cateter estéril de fluoroetilenopropileno (FEP) (2,1mm calibre e 30mm de comprimento) foi introduzido no óstio de cada teto para a coleta de amostras de leite dos três TI e outro exclusivo para a coleta do leite no TC (Fig. 13).



**Figura 13: Coleta de leite com o uso de uma cateter estéril nos dias pares.** O cateter estéril foi introduzido no óstio mamário após a assepsia com iodo. Foi utilizado um cateter para a coleta dos TI e outro para a coleta da amostra do TC.

Fonte: Rehfeld, 2011 (modificado)

A amostra do TI foi obtida a partir da introdução do cateter no óstio mamário dos três TI, sendo coletada uma alíquota de leite de cada teto infectado formando um *pool*, em um frasco estéril identificado, exclusivo por vaca e de volume total 50 ml. A amostrado TC também foi coletado e armazenado em um frasco estéril e exclusivo por vaca, com o mesmo volume do frasco descrito acima. As amostras foram mantidas congeladas em freezer -20 °C até o processamento e realização da PCR para pesquisa de DNA viral (Item 4.9.1 e Item 4.9.2 ). Posteriormente, todas as amostras positivas foram submetidas à PCR em tempo real para quantificação do DNA viral (Item 4.9.3). Algumas amostras de leite positivas para o DNA viral foram inoculadas em cultivo de células BSC-40 para pesquisa de partículas virais infecciosas (Item 4.10.2 e Item 4.10.3).

#### 4.6.2 Coleta de amostras de leite nos dias ímpares

Nos dias ímpares (a partir do 1º d.p.i) após a assepsia do óstio com iodo glicerinado a 1%, o leite foi ordenhado manualmente. Os TI de cada vaca foram ordenhados e reunidos em baldes identificados, exclusivos por vaca. O TC de cada vaca também foi ordenhado em um balde exclusivo e identificado. Foram retiradas alíquotas de leite de ambos os baldes, TI e TC de cada vaca. Os frascos para coleta destas alíquotas eram estéreis, com volume total 50 ml e foram identificados com o número da vaca, tipo de amostra (TI ou TC) e d.p.i. Os frascos foram mantidos congelados em freezer -20 °C até a realização da PCR para pesquisa de DNA viral (Item 4.9.1 e Item 4.9.2). Posteriormente, todas as amostras positivas foram submetidas à PCR em tempo real para quantificação do DNA viral (Item 4.9.3). Algumas amostras de leite positivas para o DNA viral foram inoculadas em cultivo de células BSC-40 para pesquisa de partículas virais infecciosas (Item 4.10).

##### 4.6.2.1 Processamento das amostras de leite dos Grupos 1 e 2 da Fase 1

Somente nos dias ímpares, o leite dos baldes correspondentes a ordenha dos TI das vacas 1, 2, 3 e 4 foram reunidos em um galão identificado com o nome do grupo: G1. O leite dos baldes dos TI das vacas 5, 6, 7 e 8 também foram reunidos em outro galão, identificado com G2. Ambos os baldes foram mantidos refrigerados (10° C) e encaminhados ao Laboratório de Tecnologia do Leite na Escola de Veterinária da UFMG até o processamento, que ocorria sempre no mesmo dia da coleta. Quatro litros de leite de cada galão (G1 e G2) foram destinados à produção de um queijo (Item 4.6.2.1.1) (sendo, portanto, produzido um queijo por grupo). Cerca de um litro e meio de leite de cada galão (G1 e G2), foi reservado para o processamento e obtenção de iogurte (Item 4.6.2.1.5), de leite esterilizado (Item 4.6.2.1.4) e pasteurizado (Item 4.6.2.4), além da obtenção das fases do leite após a centrifugação (Item 4.6.2.1.2).

#### **4.6.2.1.1 Produção do queijo**

Nos dias ímpares foram produzidos dois queijos, a partir de quatro litros de leite de cada grupo experimental (G1 e G2). O leite foi aquecido em banho-maria com temperatura digital microcontrolada até 38°C. Quatro mL de coalho<sup>1</sup> foram adicionados e homogeneizados durante dois minutos, seguido de repouso absoluto durante 50-60 minutos, até a formação de uma massa firme. Após a coagulação do leite, foram efetuados cortes longitudinais e transversais em toda a extensão do recipiente a fim de favorecer a liberação do soro. Com o auxílio de uma escumadeira, a massa foi misturada até a sua redução e liberação quase completa do soro. A massa foi cuidadosamente retirada do recipiente e acomodada em formas plásticas apropriadas. Foram retiradas duas alíquotas de soro obtidas a partir do corte da massa e identificadas de acordo com o grupo. Após a realização da prensagem manual, o queijo foi armazenado em câmara fria com temperatura controlada digitalmente (10°C) durante 24 horas. Após 24 horas em câmara fria, o queijo foi desenformado, pesado, macerado e homogeneizado com o auxílio de um bastão. Seis alíquotas de massa foram recolhidas de cada queijo e armazenadas a -20°C em tubos estéreis, identificados com o nome do grupo (G1 ou G2) e o d.p.i correspondente a data da coleta do leite. Os tubos foram mantidos congelados à -20° C até o processamento das amostras (4.9.1) para a realização da *PCRnested* gene *vgf*(4.9.2) e da PCR em tempo real (4.9.3).

#### **4.6.2.1.2 Separação das fases do leite através da centrifugação**

Quarenta mililitros de leite de cada grupo experimental foram acondicionados em frascos estéreis identificados e submetidos à centrifugação em centrífuga refrigerada a 4°C, 2500 rpm durante 15 minutos. Após a centrifugação, pode ser observada a formação de três fases: superior, intermediária e inferior. Cada fase foi recolhida e acondicionada em tubo estéril identificado e armazenadas a -20°C. Os tubos foram mantidos congelados à -20° C até o processamento das amostras (4.9.1) para a realização da *PCRnested* gene *vgf*(4.9.2) e da PCR em tempo real (4.9.3).

#### **4.6.2.1.3 Pasteurização do leite**

Para a pasteurização, 500 mL de leite de cada grupo experimental foram acondicionados em frascos de vidro e submetidos à pasteurização lenta (62-65°C/30 minutos) em banho-maria com temperatura digital microcontrolada. Para verificar a eficiência da pasteurização, foi realizada a pesquisa da atividade das enzimas fosfatase alcalina e lactoperoxidase. Durante a correta pasteurização do leite, a enzima fosfatase é inativada e a peroxidase permanece ativa, já que esta só consegue ser totalmente destruída em temperaturas superiores a 80°C (BRASIL, 2002). Portanto, foi considerado eficiente o método de pasteurização para as amostras de leite que apresentaram o teste de fosfatase alcalina negativa e peroxidase positiva. O protocolo utilizado

---

<sup>1</sup>Coalho marca: Ha-La. Fabricante: Chr Hansen



para avaliação dos dois parâmetros foi definido pela Instrução Normativa Número 68, de 12 de dezembro de 2006 (BRASIL, 2006).

Logo após resfriamento à temperatura ambiente, alíquotas do leite pasteurizado foram acondicionadas em tubos identificados e armazenadas a -20°C. Os tubos foram mantidos congelados à -20°C até o processamento das amostras (4.9.1) para a realização da PCR<sup>nested</sup> gene *vgf*(4.9.2) e da PCR em tempo real (4.9.3).

#### **4.6.2.1.4 Esterilização do leite e produção de iogurte**

Alíquotas de 500 mL de leite de cada grupo experimental foram acondicionadas em frascos identificados e colocadas em autoclave convencional para esterilização a 100°C durante 10 minutos. Logo após resfriamento à temperatura ambiente. Para a produção do iogurte, os frascos contendo o leite esterilizado foram mantidos em banho-maria até atingirem a temperatura de 43-44 °C. Após, foi adicionada cultura de iogurte natural a 3% (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*). Após 3 horas de fermentação e formação do coágulo, os frascos foram mantidos a temperatura ambiente, sendo o pH do coágulo determinado a partir da utilização do pHmetro<sup>2</sup>. Alíquotas do iogurte foram acondicionadas em tubos identificados e armazenadas a -20°C até o processamento das amostras (4.9.1) para a realização da PCR<sup>nested</sup> gene *vgf*(4.9.2) e da PCR em tempo real (4.9.3).

#### **4.7 Avaliação da qualidade do leite**

Diariamente, uma alíquota de 50 ml de cada balde (TI e TC) correspondente a cada vaca, foi retirada e transferida para frascos estéreis e identificados contendo bronopol. Estas amostras foram mantidas refrigeradas a 4°C até a análise de contagem das células somáticas (CCS) que ocorreu no Laboratório de Análise de Leite da Escola de Veterinária da UFMG. A técnica utilizada para a CCS foi a citometria de fluxo conforme o protocolo Internacional ISO 13366-1:2008 de Contagem de Células Somáticas.

Além da avaliação da CCS, diariamente, após a coleta das amostras nos dias pares e ímpares, o leite das vacas foi pesado. Os TI de cada vaca foram ordenhados manualmente, esgotados e reunidos em balde exclusivo, identificado com o número correspondente ao brinco do animal. O TC de cada vaca também foi ordenhado manualmente até o esgotamento completo em balde exclusivo e identificado por animal. Posteriormente, os baldes foram pesados com o auxílio de uma balança portátil tipo relógio de 50kg com subdivisão de 500g, previamente calibrada. O peso do leite dos TI e TC de cada animal foi registrado diariamente em formulário próprio.

Durante todo o experimento, alguns animais foram submetidos ao teste de mastite através do teste *California Mastitis Test* (CMT). O princípio da prova baseia-se na reação de um detergente (alquil-aril-sulfonato de sódio) que auxilia no rompimento das células do leite e exposição do núcleo das células presentes no leite, principalmente dos leucócitos. Quanto maior a concentração de material nuclear, maior a viscosidade do leite, sendo a interpretação do teste dada a partir de um escore que varia desde a ausência da mudança na viscosidade (-) até a presença de pouca (+), média (++) ou muita viscosidade (+++) (Dirksen e et al., 1993).

#### **4.8 Descrição geral da Fase 2: Imunodepressão**

Quatro animais que participaram da Fase 1 (animais 2, 4, 5 e 6) (Item 4.6) foram tratadas com dexametasona (DMS) via intramuscular, na dose de 0,1mg/Kg por dia, durante cinco dias

---

<sup>2</sup>Modelo: pH 21 Fabricante: HANNA Instruments. Descrição: pHmetro de bancada, faixa de pH de 0,00 a 14,00pH.

consecutivos, contados a partir do 69° d.p.i conforme descrito por Iketani e colaboradores (2002). Os animais foram acompanhados diariamente até o 81° d.p.i., sendo realizado o acompanhamento clínico e a ordenha manual.

#### **4.8.1 Coleta das amostras de leite dos animais da Fase 2**

A coleta das amostras de leite de todos os animais foi realizada diariamente, de duas formas, dependendo do dia de coleta: par ou ímpar conforme descrito nos Itens 4.6.1 e 4.6.2. Além disso, diariamente, alíquotas de leite foram submetidas a contagem de células somáticas como descrito no Item 4.7.

### **4.9 Provas Moleculares**

#### **4.9.1 Extração do DNA das amostras com o kit PROMEGA**

Todas as amostras foram submetidas à extração de DNA utilizando o kit comercial da Promega Wizard® Plus SV Minipreps (Wisconsin, EUA). Previamente, as amostras foram diluídas, conforme descrito: As amostras de leite das Fases 1 e 2 do experimento, o soro do queijo (4.6.2.1.1) e soro do leite obtido a partir da centrifugação do leite (4.6.2.1.2) foram diluídas em água para injeção estéril na proporção 1:3. Posteriormente, as amostras foram submetidas à extração. As amostras sólidas: massa do queijo (4.6.2.1.1) e do creme, obtido após a centrifugação do leite (4.6.2.1.2), foram diluídas e centrifugadas antes de serem submetidas ao processo de extração. Foi feita uma diluição prévia das amostras em PBS 1X, na proporção de 1 g para 2 mL de PBS ( $0,5 \text{ g mL}^{-1}$ ). Após, as amostras foram centrifugadas durante 5 minutos a 3000 rpm (rotor H1000B - Sorvall RT6000 B), a 4°C. O sobrenadante foi recolhido e submetido à extração. Resumidamente, 300 µL das amostras previamente diluídas como descrito acima, foram adicionadas a uma solução de lise celular, centrifugadas e descartado o sobrenadante. Após, o precipitado foi adicionado a uma solução de lise nuclear associada à solução de precipitação de proteínas e submetido à nova centrifugação. O sobrenadante foi precipitado e reidratado em 100 µL da solução de reidratação. Após, foi armazenado a - 20°C. O volume utilizado para as reações de PCR *nested* e PCR em tempo real foi de 1 µL.

#### **4.9.2 PCR *nested* para o gene *vgf***

Todas as alíquotas de leite e subprodutos foram submetidas a PCR *nested* para pesquisa do gene do fator de crescimento viral (*vgf*) do gênero OPV (Abrahão et al., 2009d). A reação para amplificação do gene *vgf* foi realizada em duas etapas, sendo o produto da primeira reação utilizado como molde para a segunda etapa (Tabela 1). Nas duas etapas de amplificação foram utilizadas as mesmas condições salinas e enzimáticas, 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, 4 pmol dos iniciadores específicos, 1µL de amostra. A albumina sérica bovina (BSA), na concentração de 500ng, foi acrescentada na primeira etapa da reação, totalizando 20µL de reação. As seguintes condições térmicas foram utilizadas para a amplificação do gene *vgf*: desnaturação inicial de 94°C por 9 minutos, seguido por 30 ciclos de 94°C por 1 minuto (desnaturação); 45 °C por 1 minuto (pareamento); 72 °C por 1 minuto (polimerização) e uma extensão final de 72 °C por 10 minutos. O volume de 1µL desta 1ª reação foi utilizado, sem diluição, como amostra na 2ª reação. Nos controles negativos, 1µL de água foi utilizado para substituir as amostras correspondentes. Os controles positivos foram utilizados  $10^5$  UFP/µL de VACV-WR, previamente purificado. Os fragmentos amplificados foram fracionados por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) 8%, sob voltagem de 100V e corados pela prata.

**Tabela 1: Iniciadores utilizados para amplificação de fragmentos do gene *vgf* – 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'		

Fonte: Abrahão et al., 2009d

#### 4.9.3 PCR em tempo real

Todas as amostras positivas na PCR*nested* gene *vgf* foram submetidas à PCR em tempo real em duplicata. Foram consideradas válidas as reações onde houve amplificação da duplicata das amostras, com valores da Temperatura de *melting* (T<sub>m</sub>) de acordo com a curva padrão previamente estabelecida. As amostras suspeitas, onde houve amplificação em somente uma das replicatas, foram submetidas novamente ao teste. Repetindo esta condição, a quantificação da amostra não foi apresentada nos resultados. Além disso, a T<sub>m</sub> (°C) foi analisada de acordo com os controles positivos, aceitando-se uma variação de ± 1 °C.

Foi utilizado o mix comercial (SYBR Green® PCR Master Mix, *Applied Biosystems*) com os iniciadores *VGFforward*/*VGFreverse* desenhados para amplificação de um fragmento com tamanho 82 pb do gene *vgf* (Alves, P.A. dados não publicados) nas concentrações de 400 µM de cada iniciador em uma reação com volume final de 10 µl. As condições de termociclagem utilizadas foram as seguintes: 95°C - 10 minutos; desnaturação: 95 °C - 15 segundos; pareamento e extensão: 60 °C - 60 segundos (40 ciclos) e curva de dissociação 60-95 °C segundo o protocolo padrão da *Applied Biosystems*. O controle negativo da reação foi feito com leite sabidamente negativo, submetido à extração prévia.

Os resultados da quantificação viral das amostras de leite das Fases 1 e 2 do experimento, do soro do queijo (4.6.2.1.1), soro do leite obtido a partir da centrifugação do leite (4.6.2.1.2) e das diluições seriadas da curva padrão (4.9.3.1) foram dados em unidades genômicas por microlitro (UG/ml). Os resultados da quantificação viral das amostras sólidas: massa do queijo (4.6.2.1.1) e do creme, obtido após a centrifugação do leite (4.6.2.1.2), foram dados em unidades genômicas por grama (UG/g).

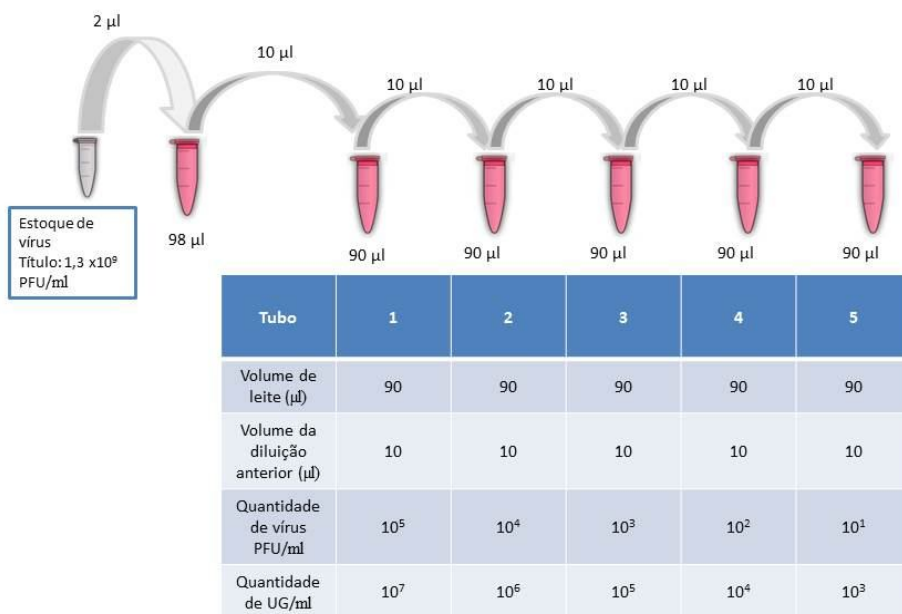
Todas as PCR em tempo real foram feitas utilizando o termociclador *StepOne®* da *Applied Biosystems* e os dados de quantificação e detecção foram coletados e analisados pelo *software StepOne®* versão 2.1 da *Applied Biosystems*.

Como normalizador da reação, foi utilizado um par de iniciadores para amplificação da β-actina bovina (ACTB), uma proteína altamente conservada e responsável pela integridade celular (Ontsuka et al., 2004).

##### 4.9.3.1 Determinação da curva padrão do VACV gene *vgf* da PCR em tempo real

Para avaliar a sensibilidade e eficiência da PCR em tempo real em amostras clínicas e determinar uma curva padrão foi feito um experimento de contaminação artificial de amostra de leite UHT com o vírus VACV GP2 com o título de 1,3 x 10<sup>9</sup> UFP/ml. O resultado das diluições

seriadas da curva padrão foi dado em unidades genômicas por mililitro (UG/ml), considerando que a cada para cada 1 UFP existem cerca de 100 UG (Fenner et al., 1989). Dois microlitros do estoque do vírus foram submetidos à extração conforme o Item 5.8.1 e, posteriormente, realizadas as diluições seriadas na base 10 em água estéril para injeção. A concentração final de Unidades Genômicas (UG) variou de  $10^7$  a  $10^3$  por mililitro (UG/ml), sendo de 100  $\mu$ l o volume de cada diluição, de acordo com a Figura 14.



**Figura 14: Diluição seriada do estoque de VACV-GP2 de título  $1,3 \times 10^9$  UFP ml em leite.** Quantidade de partículas virais em PFU/ml e de DNA em UG/ml em cada diluição, considerando o volume final de cada diluição de 100  $\mu$ l.

Foram feitas reações utilizando o mix comercial nas mesmas condições acima descritas (Item 4.9.3). A partir deste teste foi possível determinar uma curva padrão para correlacioná-la com a amplificação das amostras clínicas e estabelecer a quantificação das mesmas. Foi possível também estabelecer a sensibilidade do teste. Esta curva padrão foi reproduzida em todas as placas. Foi considerada aceitável a curva padrão que apresentou amplificação específica além das seguintes condições mínimas: eficiência: 90-110% o que corresponde ao valor do *slope* entre -3,1 e -3,6 e coeficiente  $R^2$  entre 0,998 e 1 (Bustin, S.A., 2009).

#### 4.10 Pesquisa de partículas virais viáveis

##### 4.10.1 Cultivo de células BSC-40

Monocamadas de células BSC-40, linhagem contínua de rim de macaco verde africano *Cercopithecus aethiops*, foram utilizadas para a pesquisa de partículas virais viáveis nas amostras positivas para o gene *vgfna* reação de PCR *nested*. As células foram obtidas da “American Type Culture Collection” (ATCC), catálogo número CRL-2761 (Maryland, EUA), semeadas em meio mínimo essencial (MEM) (GIBCO™) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB), gentamicina (50  $\mu$ g/mL), penicilina potássica (500 U/mL) e anfotericina B (2,5  $\mu$ g/mL) e incubadas a 37 °C, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

#### 4.10.2 Isolamento viral

Apenas as amostras positivas para o gene *vgf* na *PCRnested* foram submetidas à pesquisa de partículas virais viáveis foi realizada em monocamada de células BSC-40. Após dois dias de incubação em estufa de CO<sub>2</sub> a 5%, o meio foi desprezado, as células raspadas e aliqüotadas em tubos tipo *ependorf*. Após três ciclos de congelamento e descongelamento, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante utilizado como inóculo de uma nova placa de 6 poços com monocamada de células BSC-40. Após dois dias, as células foram novamente raspadas, aliqüotadas, submetidas aos três ciclos de congelamento e descongelamento e finalmente serviram de inóculo para uma placa de 96 poços contendo monocamada de células BSC-40. Após dois dias de incubação, a placa foi submetida à técnica de imunoperoxidase em monocamada de células (IPMC), o qual identifica a partir da coloração vermelho-cobre as proteínas tardias de construção do vírus.

#### 4.10.3 Imunoperoxidase em monocamada celular (IPMC)

Após a terceira inoculação em cultivo de BSC-40, as amostras submetidas ao isolamento (Item 5.8.5.2) foram inoculadas em placas de 96 poços (Greiner Bio-one; Cellstar, Alemanha) contendo monocamada de células BSC-40. Após, a monocamada celular foi fixada com solução de acetona: metanol (1:1) e realizado o bloqueio de reações inespecíficas com albumina bovina a 1,5%. Em seguida, soro hiperimune previamente titulado, obtido a partir de coelhos inoculados com VACV-GP2, foi diluído 1:1250 juntamente com a solução de bloqueio e incubado durante 60 minutos, à 37 °C sob agitação de 240 rpm (Ika KS 130 basic, Estados Unidos). Posteriormente, foi realizada uma lavagem com solução contendo Tween-20 e NaCl nas concentrações 0,5% e 0,85%, respectivamente, seguida da adição de proteína G conjugada com peroxidase diluída na proporção 1:600 e incubação nas condições acima descritas. Após nova lavagem, foi acrescentada a solução reveladora contendo cromógeno 3-amino-9-etil-carbazol (AEC) por um período de até 10 minutos à temperatura ambiente. A leitura da reação de IPMC foi realizada em microscópio óptico de luz invertida (Leitz® Diavert, Alemanha), o qual identifica a partir da coloração vermelho-cobre as proteínas tardias de construção do vírus (Gerber et. al., 2012).

#### 4.11 Comitê de Ética em Experimentação Animal – CETEA

O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), número do protocolo: 167/09.

#### 4.12 Análise Estatística

Os dados coletados foram tabulados e submetidos a análises uni- e bi-variadas com o auxílio do *softwareSPSS (Statistical Package for the Social Science)*. O teste não-paramétrico McNemar foi utilizado para comparar a frequência de detecção do DNA de VACV entre as amostras de leite dos TI e TC. O teste de Wilcoxon foi utilizado para avaliar a existência de possíveis diferenças entre dois grupos dependentes como: frequência de detecção do DNA de VACV nas amostras de leite dos TI comparadas aos TC; Média do Log de CCS dos TI comparados aos TC; Tempo médio para detecção do DNA VACV nos TC comparados aos TI; Peso do leite dos TC comparado ao peso do leite dos TI. Estes testes foram aplicados na Fase 1 e na Fase 2, sendo escolhidos em decorrência do pequeno tamanho da amostra e da não normalidade dos testes segundo o teste de Shapiro-Wilk.

O teste não paramétrico de Mann-Whitney foi utilizado para comparar dois grupos independentes, como: comparação entre as médias do Log de CCS entre as amostras de leite dos TI e TC que foram positivas na PCR; comparação entre a detecção de DNA de VACV nos TI e TC de acordo com o tipo de coleta; comparação entre a quantificação do DNA de VACV por

período. O teste Exato de Fisher foi utilizado para comparar a frequência de amostras positivas nos TC e TI de acordo com o tipo de coleta do leite, através de ordenha manual ou por sonda.

A Fase 1 foi dividida em períodos, de acordo com a frequência de amostras positivas para o DNA de VACV. A avaliação da frequência de amostras positivas para o DNA de VACV na PCR nos diferentes períodos foi feita através do teste de Poisson. A comparação entre a quantificação do DNA de VACV entre os períodos foi feita através do teste de Kruskal-Wallis.

A correlação não paramétrica de Spearman foi utilizada avaliar se existe associação entre a detecção do DNA de VACV nas amostras de leite dos TI e TC e a elevação da CCS em período pré-definidos.

Para determinar se as diferenças e associações encontradas são estatisticamente significativas, utilizou-se o nível de significância de 5%. Assim consideraram-se como significativas, as diferenças ou associações cuja probabilidade de significância do teste, *p*-valor, é menor ou igual a 0,05 (*p*-valor < 0,05).

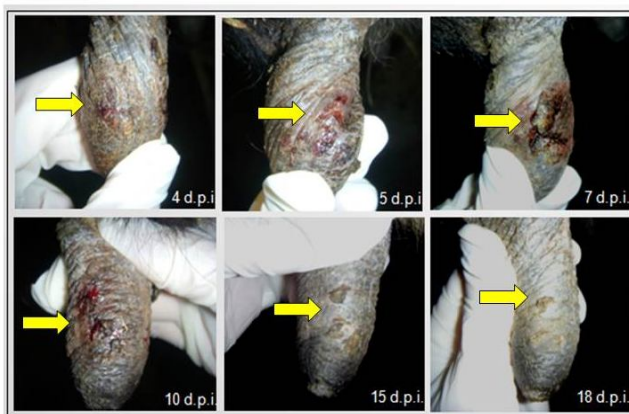
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Reprodução da VB

Todos os animais apresentaram lesões típicas da VB nos tetos inoculados, sendo as lesões limitadas ao local de escarificação com lixa (Fig. 15). Em nenhuma vaca, os TPEs (TC) apresentaram lesões típicas causadas pelo VACV. As lesões evoluíram como o esperado para a VB. A partir do 2º d.p.i foi observada a presença de eritema limitada à área escarificada e inoculada. Até o 5º d.p.i o eritema evoluiu para vesícula e pápula em pelo menos um teto inoculado. No 5º d.p.i. todos os animais apresentaram lesões ulcerativas em pelo menos um dos tetos inoculados. No 10º d.p.i., todos os animais apresentaram crostas em pelo menos um dos tetos inoculados sendo que no 18º d.p.i., todos os animais, com exceção de uma vaca, entraram no estágio de cicatrização (Rehfeld, 2011). Três dos oito animais inoculados apresentaram úlceras bem delimitadas na mucosa oral, sendo que dois animais manifestaram no 9º d.p.i. e outro no 11º d.p.i. Através da PCR<sub>nested</sub>, o VACV foi confirmado como sendo o agente etiológico destas lesões (Rehfeld, 2011).

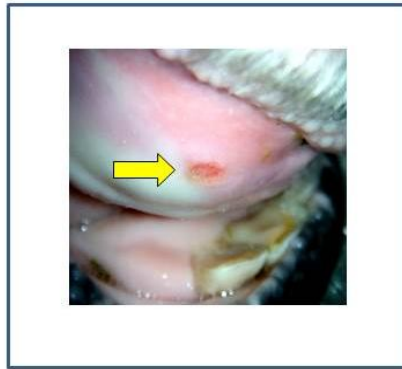
No 69º d.p.i. os animais 2,4,5 e 6 foram submetidos a tratamento imunodepressor, conforme descrito no Item 4.8. A imunodepressão foi comprovada através do leucograma que revelou leucocitose acentuada associada à neutrofilia a partir do 10º d.p.i. (Rehfeld et al., 2013).

Os animais imunodeprimidos (Fase 2) não desenvolveram lesões nos tetos. No entanto, duas vacas apresentaram lesões ulceradas na mucosa oral confirmadas pela PCR como sendo o VACV-GP2 o agente etiológico (Fig. 16). Além disso, foi possível observar alterações significativas na quantidade e no aspecto do leite ordenhado. A redução na sua produção veio associada à mudança no aspecto, que passou de branco para amarelado e pastoso, voltando à normalidade após o 9º dia após o início do tratamento com imunodepressor (Rehfeld, 2011).



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

Fonte: Rehfeld, 2011



**Figura 16: Lesão ulcerada na mucosa oral de uma vaca lactante experimentalmente inoculada com VACV-GP2 no 7ºd.p.i. (seta)**

Fonte: Rehfeld et al, 2012

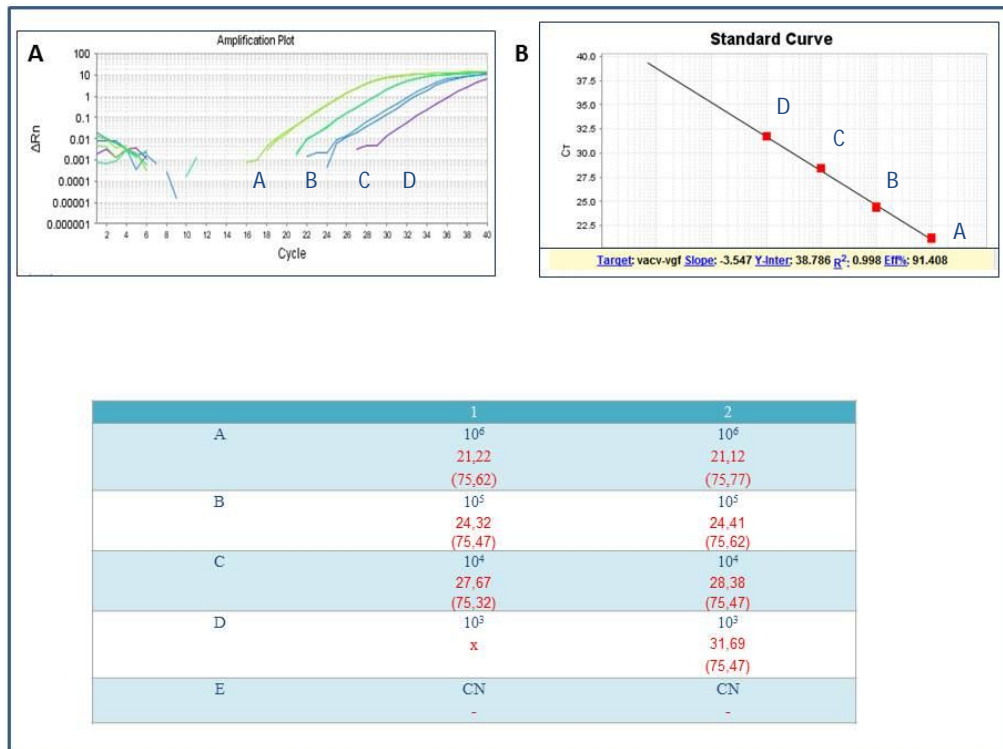
## **5.2 Resultados da Fase 1**

### **5.2.2 Resultados da avaliação dos parâmetros de qualidade da PCR em tempo real para detecção do VACV gene *vgf***

Todas as amostras positivas na PCR *nested* para detecção do VACV gene *vgf* foram submetidas a PCR em tempo real. Destas, apenas cinco amostras não apresentaram amplificação adequada na duplicata ou não atenderam aos requisitos mínimos de qualidade estabelecidos (Item 4.9.3). Nestas situações, a quantificação de DNA não foi apresentada no trabalho.

A Figura 20 apresenta a curva padrão obtida a partir da diluição seriada do estoque do vírus partindo de  $10^6$  UG/ml até  $10^3$  UG/ml, não sendo observada a amplificação da diluição do vírus contendo  $10^2$  UG/ml. A sensibilidade do teste foi de  $10^3$  UG/ml. A curva foi repetida em todas as placas e, atendidas as condições mínimas, a curva foi correlacionada com a amplificação das amostras de leite e estabelecida a quantificação das mesmas. O valor da  $T_m$  variou entre 75,32 a 75,77 °C. A curva padrão apresentou os seguintes parâmetros: Inclinação: -3,547;  $R^2$ : 0,998 e Eficiência: 91,408. Não houve amplificação nos poços do controle negativo.





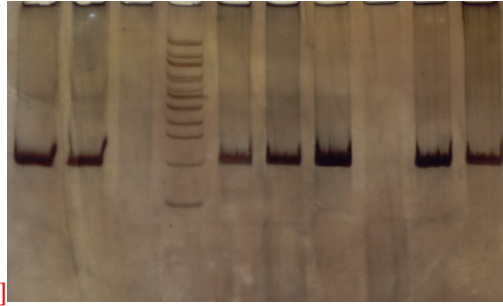
**Figura 17: Curva padrão e resultado da sensibilidade da PCR em tempo real para detecção do VACV gene *vgf*.** A) Curvas de amplificação da diluição seriado do estoque purificado do VACV-GP2 em escala logarítmica. Curva D (10<sup>6</sup> UG/ ml); Curva C (10<sup>5</sup> UG/ ml); Curva B (10<sup>4</sup> UG/ ml); Curva A (10<sup>3</sup> UG/ ml). Não ocorreu amplificação na diluição com 10<sup>2</sup> UG/ml e no CN. B) Curva padrão obtida com a utilização das diluições seriadas partindo de 10<sup>6</sup>UG/ml até 10<sup>3</sup>UG/ml. Parâmetros: Inclinação: -3,547; R<sup>2</sup>: 0,998; Eficiência: 91,408; Interseção (eixo y): 38,786. Parte inferior: Quadro com o Ct correspondente a cada amostra e o respectivo valor de Tm (°C) entre parênteses. Os valores em azul indicam a concentração de UG/ml. CN: Controle negativo.

A partir da PCR para amplificação da  $\beta$ -actina bovina (ACTB), utilizada como normalizador da reação foi possível amplificar um fragmento de 130pb, com C<sub>T</sub> (Threshold Cycle) entre 15 e 16 e o T<sub>m</sub> entre 76 a 77 °C em todas as amostras, demonstrando a boa qualidade do DNA extraído e a ausência de inibidores da PCR.

### 5.2.1 Resultados da *PCRnested* da PCR em tempo real para detecção do VACV gene *vgf* nas amostras de leite da Fase 1

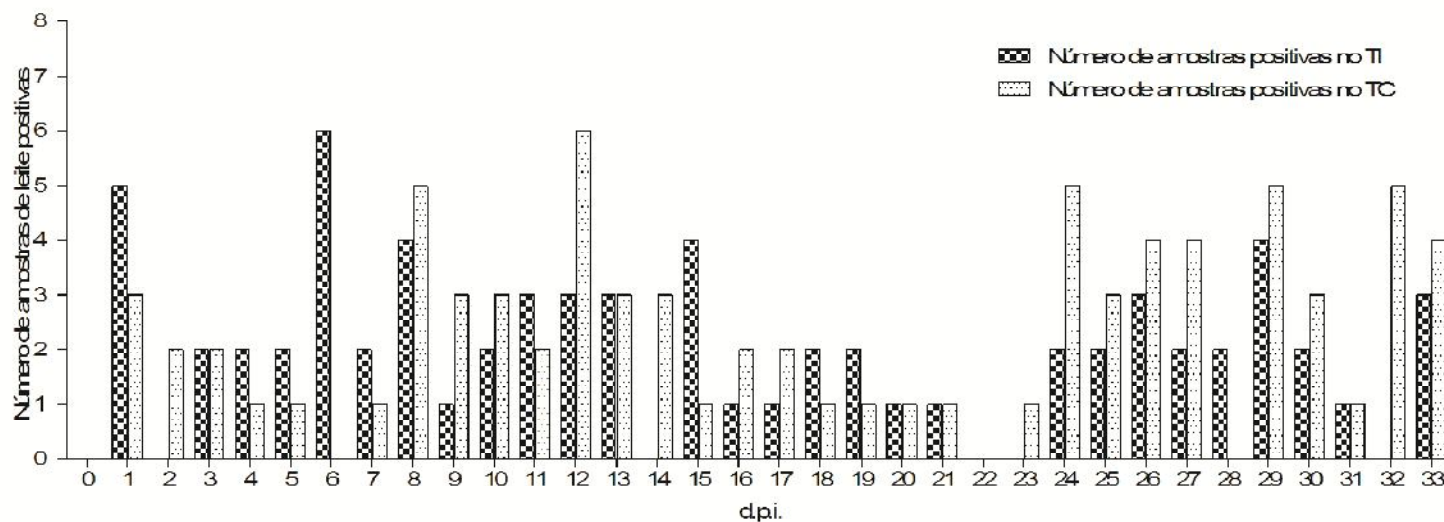
Todas as amostras de leite coletadas na Fase 1 foram submetidas a *PCRnested* para detectar o VACV gene *vgf*, totalizando 544 amostras, sendo 144 amostras positivas (Fig. 17 A).

C+ 1 2 TM 3 4 5 C- 67



**Figura 17 A: Amplificação de DNA do VACV gene *vgf* pela *PCR* nested nas amostras de leite.** Os amplicons foram fracionados em gel de acrilamida:bisacrilamida (29:2:0,8) (PAGE) 8% sob voltagem de 100 V e corados com prata. TM: tamanho molecular; C+: controle positivo; C-: Controle negativo; Amostras de leite: 1,3,4,5,6 e 7 positivas para o DNA do VACV gene *vgf*. Amostra de leite 2 negativa para o DNA do VACV gene *vgf*.

A partir do 1º d.p.i., foi possível detectar a presença de DNA do VACV no leite das vacas de ambos os grupos. Todos os animais, em algum momento do experimento, foram positivos para o DNA do VACV no leite, tanto nos TI quanto no TC. A detecção do DNA foi intermitente e persistiu até o 33º d.p.i. (último dia de coleta da fase 1) (Fig. 18). Diariamente, foram obtidas 8 amostras de leite dos TC e 8 amostras dos TI, correspondente ao pool dos TI de cada vaca. A Figura 18 apresenta a distribuição das amostras de leite positivas para o DNA do VACV no leite dos TC e TI durante os 33 dias de avaliação.

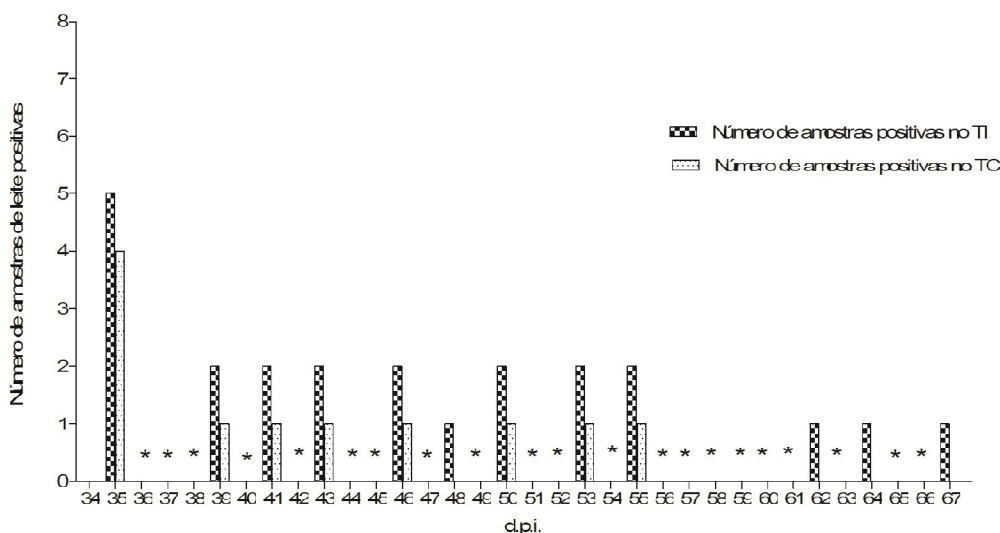


dpi	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33
TC	0	3	2	3	1	1	0	1	5	3	3	2	6	3	3	1	2	2	1	1	1	1	1	5	3	4	0	0	5	3	1	5	4
TI	0	5	0	2	2	2	6	2	4	1	2	3	3	3	0	4	1	1	2	2	1	1	0	3	3	3	0	2	4	2	1	0	3

**Figura 18: Número de amostras positivas nos TC e TI para o DNA do VACV durante a Fase 1.** Foi possível detectar o DNA do VACV a partir do 1º d.p.i. até o 33º d.p.i. Somente no 22º d.p.i. não foi possível detectar o DNA de VACV nas amostras de leite. Nos demais dias, foi possível detectar o DNA do VACV em pelo menos um teto, controle ou infectado.

O número de amostras positivas para o DNA do VACV gene *v<sub>g</sub>f* nos TC e TI durante todo o período avaliado, foi 76 e 68, respectivamente, não sendo observada diferença significativa no número de amostras positivas na PCR entre o TC e o TI.

Mesmo após o fim da Fase 1, na qual diariamente eram coletadas amostras de leite dos TC e TI das 8 vacas que participaram desta fase, as amostras continuaram sendo coletadas em dias alternados até o 68º d.p.i. No 69º d.p.i. deu-se início a Fase 2. A Figura 19 apresenta a distribuição de amostras positivas nos TC e TI das 4 vacas 2,4,5,6 que participaram da Fase 1 e, posteriormente da Fase 2. Foi possível detectar o DNA do VACV até o 43º d.p.i. nos quatro animais, em pelo menos um dia, nos TC ou TI (Fig. 19).



**Figura 19: Amostras de leite positivas para o DNA do VACV gene *v<sub>g</sub>f* entre as Fases 1 e 2. O (\*) representa os dias que não houve coleta entre o 34º e 67º d.p.i.;**

Entre as Fases 1 e 2, pode-se observar que o DNA do VACV foi detectado no sangue nos dias 50, 56 e 60, não sendo observada correspondência com a detecção do DNA do VACV no leite que ocorreu no 35º, 39º, 41º e 43º d.p.i.

A distribuição das amostras de leite segundo a presença e ausência do DNA de VACV, tipo de ordenha e teta, controle ou infectado, está apresentada na Tabela 2. Foi possível detectar o DNA de VACV gene *v<sub>g</sub>f* em 41 amostras de leite dos TC obtidas a partir da sondagem e 35 amostras de leite obtidas a partir da ordenha manual. A partir do teste Exato de Fisher foi possível concluir que não existe diferença significativa entre as formas de obtenção do leite, ordenha manual ou através de sonda, considerando os tetos que não foram inoculados (TC) ( $p\text{-valor} > 0,05$ ). Nas amostras de leite dos TI, 37 amostras obtidas a partir da ordenha manual foram positivas para o DNA de VACV contra 31 amostras obtidas a partir da sondagem, não existindo diferença significativa neste caso também ( $p\text{-valor} > 0,05$ ) (Tab. 2). Estes resultados apontam que independente da forma de obtenção do leite, ordenha manual ou sonda, é possível detectar o DNA de VACV.

**Tabela 2: Distribuição das amostras de leite positivas para o DNA do VACV na PCRnesteed gene *v<sub>g</sub>f* nos TC e TI de acordo com o tipo de coleta (manual ou sonda)**

	Coleta	PCR		Total (%)	[n]	P- valor*
		Negativo (%)	[n] Positivo (%)			
<b>Teto controle</b>	Manual	101 (53,7)	35 (46,1)	136 (51,5)	0,279	
	Sonda	87 (46,3)	41 (53,9)	128 (48,5)		
<b>Teto infectado</b>	Manual	99 (50,5)	37 (54,4)	136 (51,5)	0,673	
	Sonda	97 (49,5)	31 (45,6)	128 (48,5)		

\*Teste Exato de Fisher.

A quantificação do DNA do VACV nas amostras de leite dos TI e TC revelou uma variação na quantificação do DNA viral que vai desde 3000 UG/ml até 18331000 UG/ml. No entanto, considerando a sensibilidade do teste que foi de  $10^3$  UG/ml, não foram consideradas válidas as amostras que apresentaram a quantificação de DNA abaixo deste nível. A Figura 20 apresenta a média da quantificação do DNA do VACV nos TC e TI durante a Fase 1.

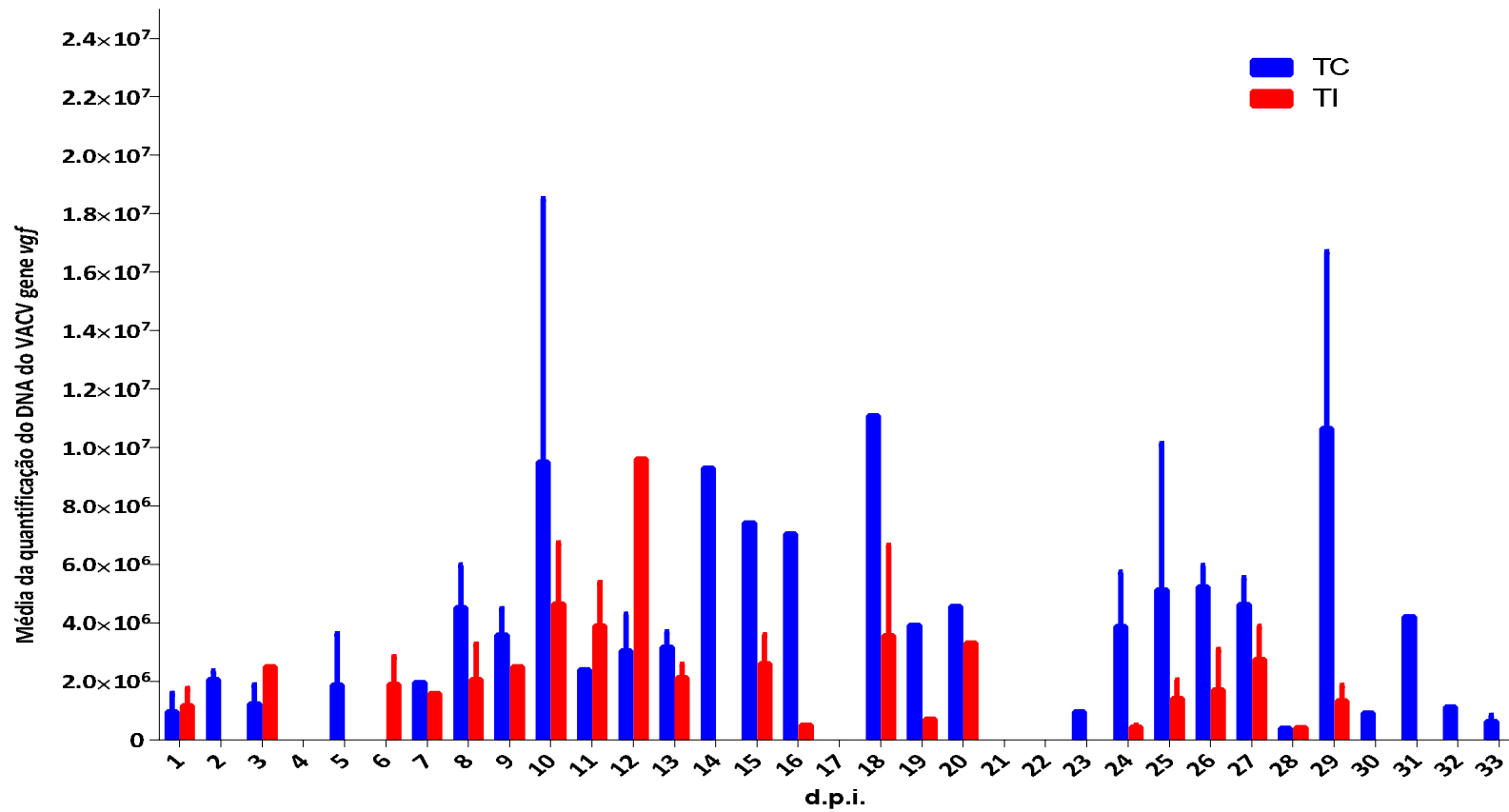


Figura 20: Média da quantificação do DNA do VACV gene *vgf* nas amostras de leite dos TI e TC pela PCR em tempo real durante a Fase 1. As barras verticais indicam o desvio padrão.

As maiores quantificações do DNA do VACV foram detectadas nos TC dos seguintes dias pós infecção: 10°, 18° e 29°. A Tabela 3 compara a média da quantificação do DNA do VACV nos TC e TI.

**Tabela 3: Comparação entre a média da quantificação do DNA do VACV nos TI e TC.**

	Média	Mediana	Desvio Padrão	P-valor
TC	4,6 x 10 <sup>6</sup> UG/ml	2,6 x 10 <sup>6</sup> UG/ml	5,0 x 10 <sup>6</sup> UG/ml	0,100
TI	3,2 x 10 <sup>6</sup> UG/ml	2,3 x 10 <sup>6</sup> UG/ml	2,9 x 10 <sup>6</sup> UG/ml	

De acordo com a Tabela 3 foi possível observar que os TC apresentaram média de quantificação superior aos TI. No entanto, esta diferença não foi significativa tendo em vista a probabilidade de significância do teste de comparação de dois grupos dependentes de Wilcoxon, cujo p-valor foi maior que 0,05.

Com o objetivo de avaliar se existe algum dos períodos em que o número de amostras positivas é mais frequente, a Fase 1 foi dividida 4 períodos, da seguinte forma: Período 1 (1° d.p.i. ao 8° d.p.i), Período 2 (9° ao 16° d.p.i), Período 3 (17° ao 24° d.p.i) e o Período 4 (25° ao 33° d.p.i).

A Tabela 4 apresenta a comparação entre a frequência de amostras positivas na PCR *nested* para detecção do DNA do VACV em cada período. No período 3, pode-se observar a menor frequência de ocorrências, sendo esta muito inferior à observada nos demais períodos. Esta diferença foi significativa de acordo com o teste de Poisson (p valor < 0,05). Os períodos 1, 2 e 3 apresentaram frequências de amostras positivas muito similares, não havendo diferença significativa entre eles (p valor > 0,05).

**Tabela 4: Frequência de amostras positivas na PCR *nested* para detecção do gene *vgf* do VACV nas amostras de leite da Fase 1 considerando 4 períodos.**

Grupo	Freq.	Taxa	P-valor
Período 1 (1° ao 8° d.p.i)	39	0,61 <sup>b</sup>	< 0,05
Período 2 (9° ao 16° dpi)	40	0,63 <sup>b</sup>	
Período 3 (17° ao 24° dpi)	22	0,34 <sup>a</sup>	
Período 4 (25° ao 33° dpi)	44	0,69 <sup>b</sup>	

\* Sobrescritos diferentes indicam diferença significativa (p < 0,05).

A comparação da quantificação do DNA do VACV nos mesmos períodos avaliados na Tabela 5, revelou maior quantificação viral nos períodos 2 e 4 (Tabela 5). Pode-se observar diferença significativa entre o período 2 se comparado aos períodos 1 e 3, sendo a média de DNA viral encontrada no período 2 significativamente superior ao do 1 e 3. No entanto, no período 2 a quantificação média do DNA do VACV não foi diferente do período 4.

**Tabela 5: Comparação da quantificação do DNA de VACV (gene *vgf*) através da PCR em tempo real nas amostras de leite da Fase 1 considerando quatro períodos.**

Grupo	Média	Mediana	Desvio Padrão	P-valor
-------	-------	---------	---------------	---------

Período 1 (1° ao 8° d.p.i)	3,5 x 10 <sup>3</sup> UG/ml <sup>a</sup>	2,2 x 10 <sup>3</sup> UG/ml	4,6 x 10 <sup>3</sup> UG/ml	0,028
Período 2 (9° ao 16° dpi)	7,1 x 10 <sup>3</sup> UG/ml <sup>b</sup>	7,2 x 10 <sup>3</sup> UG/ml	5,1 x 10 <sup>3</sup> UG/ml	
Período 3 (17° ao 24° dpi)	3,6 x 10 <sup>3</sup> UG/ml <sup>a</sup>	2,0 x 10 <sup>3</sup> UG/ml	4,2 x 10 <sup>3</sup> UG/ml	
Período 4 (25° ao 33° dpi)	6,4 x 10 <sup>3</sup> UG/ml <sup>a,b</sup>	2,2 x 10 <sup>3</sup> UG/ml	1,0 x 10 <sup>3</sup> UG/ml	

\* Teste de Kruskal-Wallis;\*\* Sobrescritos diferentes indicam diferença significativa (p<0,05) de acordo com o teste de Mann-Whitney.

Rivetti e colaboradores (2013), detectaram a DNAemia e viremia de forma intermitente e durante todo o período avaliado (33 dias), nestas mesmas vacas nas quais foram feitas as pesquisas de DNA do VACV no leite. A detecção do DNA do VACV no sangue iniciou no 2° d.p.i. sendo a concentração do número de animais com DNAemia ocorrendo entre o 9° e 15° d.p.i. A Tabela 5 chama a atenção para o Período 2, no qual foi observado maior quantificação do DNA do VACV nas amostras de leite. Neste período, observou-se também a maior concentração de DNAemia, sugerindo haver uma correlação entre a detecção do DNA do VACV no leite e o suprimento sanguíneo na glândula mamária (Rivetti et al., 2013). A detecção do DNA do VACV no sangue aponta para a disseminação sistêmica do VACV, sendo esta característica comum a outros OPV, como o VARV, MPXV e o ECMV (Fenner, 1948; Zaucha et al., 2013). A íntima relação existente entre a formação do leite no interior das células epiteliais secretoras que revestem os alvéolos mamários e o suprimento sanguíneo pelas arteríolas que os envolvem (Cunningham e Klein, 2008), pode ter contribuído com a eliminação do DNA do VACV no leite. Normalmente, o leite produzido na glândula mamária de animais saudáveis não contém bactérias ou vírus patogênicos aos humanos. No entanto, se o animal apresentar uma infecção sistêmica, como ocorre no caso da infecção pelo VACV e outros OPV, pode ocorrer a eliminação do vírus juntamente com o leite no momento da ordenha (LeJeune e Rajala-Schultz, 2009). O aumento do número de amostras positivas no leite mesmo após a resolução das lesões que ocorreu no 22° d.p.i. (Fig. 18) reforça a hipótese de que a presença do DNA do VACV no leite não está associada à presença de lesões nos tetos. Outra evidência que reforça esta hipótese é a detecção do DNA de VACV nas amostras de leite obtidas a partir de sonda (Tabela 2). A partir da sondagem, foi possível obter o leite sem que ele tivesse contato com as lesões presentes no epitélio do teto, local onde foram feitas as escarificações e inoculação com VACV-GP2. Este resultado aponta que o vírus não está presente somente nas lesões ulceradas dos TI. Até então, acreditava-se que os movimentos de ordenha manual favoreciam o desprendimento de partículas virais causando, consequentemente, a contaminação do leite (Abrahão et al., 2009c).

A detecção do DNA do VACV no leite até o 33° d.p.i. chama a atenção para a presença do DNA do VACV no leite mesmo após a resolução das lesões nos tetos, que ocorreu no 22° d.p.i. Em trabalho realizado pelo nosso grupo, Rivetti (2011), detectou imunomarcações para o VACV em vacas experimentalmente inoculadas com o VACV nos tetos e submetidas à necropsia. No 82° d.p.i., foi possível detectar o VACV nas células do intestino delgado, linfonodo mesentérico e placa de Peyer, através da técnica de IHQ. Após o 82° d.p.i não foi possível detectar imunomarcações nos tetos e glândulas mamárias, apontando que o VACV não permanece no sítio primário de infecção. A imunomarcação positiva para o VACV nas células do intestino delgado e a presença de DNA viral nas fezes até o 67° d.p.i. chamam a atenção para a infecção prolongada causada pelo VACV. Portanto, a manutenção do VACV mesmo após a resolução das lesões típicas localizadas nos tetos inoculados, é garantida pela sua multiplicação em órgãos distantes do sítio primário de infecção, principalmente em órgãos linfóides (Rivetti et al.,



2013).Após, via linfo hematogênica, o VACV pode chegar até a glândula mamária, sendo eliminado juntamente com o leite.

Comparando a detecção do DNA do VACV no leite e no sangue, pode-se observar que não existiu correlação direta entre a detecção do DNA do VACV no leite e no sangue nos períodos 3 e 4 ( $p > 0,05$ ), apontando para a possibilidade de existência de outros fatores que possam estar envolvidos na eliminação do VACV no leite que vão além da participação do suprimento sanguíneo na glândula mamária e a sua relação com a produção do leite no interior dos alvéolos. Também, não foi observada correspondência entre a detecção do DNA do VACV no leite e no sangue nos dias que antecederam o início da Fase 2 (34° d.p.i até o 68° d.p.i.) (Fig. 19), reforçando a hipótese da participação de outros fatores envolvidos na eliminação do VACV no leite.

Além da circulação sanguínea, a linfática representa um importante papel na disseminação de alguns OPV como o Monkeypox virus e o ECMV (Zaucha et al., 2001; Ma et al., 2013).Ma e colaboradores, (2013) em infecção experimental em camundongos com o ECMV, observaram que após penetrar no epitélio das patas de roedores, o vírus alcança o linfonodo poplíteo através da via linfática e, posteriormente o fígado, onde ocorre a sua multiplicação, culminando na morte do hospedeiro (Ma et al., 2013).

A disseminação dos OPV do local de infecção inicial até o alcançarem os linfonodos, via circulação linfática, é favorecida principalmente pelas células do sistema fagocítico. As células de Langerhans, por exemplo, são sabidamente susceptíveis à infecção pelo VACV e, após uma exposição cutânea ao vírus, podem migrar até os linfonodos regionais atuando como apresentadoras de antígenos às células T (Nagao e Inaba, 1976). Além das células de Langerhans, outras células do sistema fagocítico parecem estar envolvidas na disseminação do vírus através da via linfática. Zaucha e colaboradores (2011), numa infecção experimental em macacos com o Monkeypox virus, um OPV, sugeriram que além do sistema mononuclear fagocitário, as células dendríticas podem alcançar o seio subcapsular dos linfonodos através dos vasos linfáticos aferentes. A infecção pode progredir ao longo das células reticulares, macrófagos e células dendríticas localizadas nas regiões mais profundas do córtex daqueles linfonodos mais severamente afetados. A partir daí, o antígeno viral associado principalmente aos monócitos, pode sair do linfonodo via vasos linfáticos eferentes. Portanto, além da evidência de disseminação destes OPV através da circulação linfática, ocorre também a multiplicação viral em linfonodos regionais. Fenner e colaboradores (1948) propuseram um modelo de patogênese para os OPV, considerando uma infecção experimental em um camundongo com o ECMV. Ficou evidente a presença de duas fases na infecção, sendo a primeira caracterizada pela multiplicação viral no sítio de infecção e a segunda pela viremia. A infecção dá-se início após a introdução do ECMV através de lesões de continuidade na pele ou através da inoculação experimental. Após cerca de oito horas, o vírus alcança os linfonodos regionais, onde ocorre a multiplicação viral. A necrose das células do linfonodo favorece a liberação de partículas virais. Após, estas partículas virais alcançam a corrente sanguínea, mas são prontamente fagocitadas por macrófagos no fígado, baço e, possivelmente, medula óssea. Nestes órgãos ocorre a multiplicação viral, dando início à segunda fase da infecção, sendo denominada viremia secundária, por volta do 4° d.p.i. Esta viremia é favorecida pela liberação de partículas virais no sangue após a multiplicação viral nas células destes órgãos e posterior a necrose celular, ocorrendo disseminação viral. Embora este modelo de patogênese tenha sido proposto para o ECMV, alguns estudos do nosso grupo apontam para a presença do VACV em linfonodos retromamários e para a sua associação às células de defesa de forma similar àquela observada.

Refeld (2011) observou através da imunohistoquímica (IHQ), a imunomarcagem positiva para o VACV nos linfonodos retromamários (LRM) e glândulas mamárias de dois animais inoculados com o VACV-GP2 nos tetos e necropsiados no 4° e 9° d.p.i. Além disso, foi possível identificar

imunomarcações positivas para o VACV em macrófagos localizados na região perivascular da derme. Estes dados reforçam a hipótese de que o VACV pode ser transportado através da circulação linfática associado às células de defesa. Nas vacas em lactação, o fluxo da linfa proveniente dos ductos mamários é muito mais elevado quando comparado ao fluxo nas vacas secas (Reece, 2006) aumentando, portanto, as chances de ocorrência da disseminação viral através desta via, até alcançar os LRM, onde ocorre a multiplicação do VACV. A via linfática, portanto, pode somar-se à circulação sanguínea favorecendo a disseminação do vírus e a sua eliminação no leite.

A detecção do DNA do VACV no leite pode ser observada a partir do 1º d.p.i. tanto em TC quanto TI em 8 das 16 amostras avaliadas. Este resultado chama a atenção para a detecção precoce do DNA do VACV no leite, antecedendo a detecção do DNA viral no sangue, que ocorreu a partir do 2º d.p.i. nestes mesmos animais nos quais foram pesquisados a presença do DNA viral no leite (Rivetti et al, 2013). Além disso, a detecção do DNA do VACV nas fezes destes mesmos animais também foi precoce, sendo possível detectar tanto o DNA do VACV quanto partículas virais infecciosas a partir do 1º d.p.i. (Rivetti et al, 2013). Estes resultados reforçam a hipótese de uma possível participação da via linfática na disseminação do VACV. Rivetti (2001), propôs um modelo de patogênese para o VACV em vacas em lactação, considerando os resultados obtidos a partir da infecção experimental do VACV-GP2 e os resultados obtidos a partir do acompanhamento clínico, sorológico e pesquisa de partículas virais no sangue, fezes e leite destes animais realizados pelo nosso grupo. Foi proposto que após a infecção intradérmica do VACV, ocorre multiplicação primária com formação de lesões vesiculares e exantemáticas (pápulas, vesículas e úlceras) nos tetos. Após a replicação no 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 retromamários. Com o acometimento desses linfonodos, através da infecção de macrófagos e linfócitos, o vírus seria disseminado para os linfonodos mesentéricos e linfonodulares ileais (placas de Peyer), células epiteliais e caliciformes localizadas no íleo. A partir da infecção destes linfonodos, iniciaria 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. Portanto, a via linfática, pode somar-se à circulação sanguínea na disseminação do VACV.

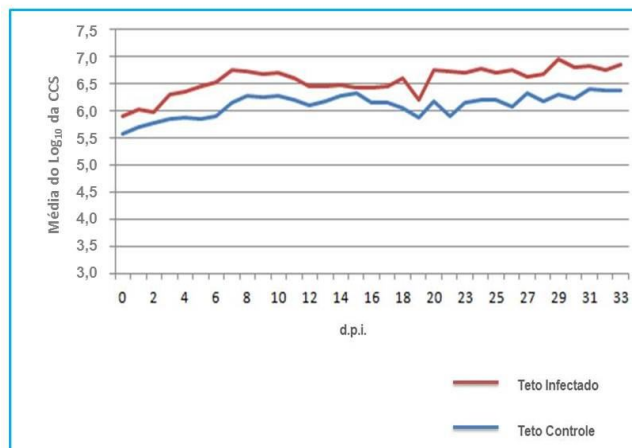
Além do VACV, outros vírus que infectam homens e animais são eliminados pela via lactogênica. O HIV-1, Citomegalovírus, Herpes simplex tipo 1, HTLV-1 que infecta linfócitos T e o Coxsackie vírus B4, podem infectar humanos, sendo eliminados através do leite. O herpes vírus bovino 1, vírus da aftosa e herpes vírus bovino 4 já foram detectados em amostras de leite de bovinos (Moore et al., 1996; Welsh et al., 1979; Wellenberg et al., 2001; Wellenberg et al., 2002b). O herpes vírus bovino 4 possui tropismo pelos leucócito sanguíneos. A migração de células de defesa e, portanto, de leucócitos para a glândula mamária na ocorrência de mastite favorece a sua eliminação através do leite (Wellenberg et al., 2001; Wellenberg et al., 2002b).

De acordo com a frequência de animais positivos para o DNA do VACV no leite (Tabela4) em cada período avaliado, observou-se que não existe diferença significativa entre os períodos 1,2 e 4. No entanto, no período 3, ocorreu menor frequência de amostras positivas quando comparado aos demais períodos. Este resultado pode estar relacionado com o pico de IgG total que ocorreu a partir do 16º d.p.i. Além do IgG total, neste mesmo período (a partir do 16º d.p.i.) pode-se observar o início da detecção de anticorpos-neutralizantes (AN) anti-VACV em todos os animais deste experimento (Matos, 2010). A presença de AN anti-VACV associado ao pico de IgG total podem ter favorecido a redução de partículas virais livres circulantes e, conseqüentemente da detecção do DNA do VACV no leite. Esta hipótese pode ser reforçada pela redução no número de animais positivos para o DNA do VACV no sangue a partir do 16º d.p.i. (Rivetti et al., 2013).

#### 5.2.4 Resultados das avaliações dos parâmetros de qualidade do leite: CCS e peso

Dentre os animais do experimento, apenas três não apresentavam mastite subclínica ao iniciarem o experimento (0 d.p.i.). As demais vacas iniciaram o experimento apresentando CCS elevada, porém, nenhuma apresentava sintomatologia clínica característica das mastites clínicas. Embora os animais já tenham iniciado o experimento com a média de CCS elevada nos TC e TI, houve um aumento progressivo da CCS, alcançando médias muito superiores às aquelas recomendadas pela Instrução Normativa n. 62 (IN 62), do MAPA, que considera aceitável o limite de  $6 \times 10^5$  células somáticas por mililitro (CS/mL) (Brasil, 2011). Além disso, pode-se observar um discreto aumento na média da CCS dos tetos infectados quando comparado à média da CCS nos tetos controle durante todo o período avaliado (Fig. 22).

A partir da análise da Figura 21 foi possível observar o aumento progressivo da média do  $\text{Log}_{10}$  da CCS ao longo do tempo, tanto nas amostras de leite dos TC quanto dos TI. As amostras de leite coletadas nos tetos infectados apresentaram resultados médios de CCS superiores aos observados para as amostras de leite dos tetos controle, em todos os dias de avaliação.



**Figura 21: Média do logaritmo na base 10 ( $\text{Log}_{10}$ ) da contagem de células somáticas (CCS) das oito vacas inoculadas com VACV-GP2, considerando os tetos controle e infectados durante a Fase 1.**

A Tabela 6, descrita a seguir, apresenta as médias do  $\text{Log}_{10}$  da CCS e a comparação entre os tetos controle e infectados. A partir da análise da Tabela 5 é possível observar que a média do  $\text{Log}_{10}$  da CCS para o grupo infectado (6,56) é superior ao valor observado para o grupo controle (6,12), sendo que a diferença entre as medianas dos grupos é ainda maior. A partir do teste não paramétrico de comparação de dois grupos dependentes de Wilcoxon foi possível concluir que esta diferença é estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 6: Comparação da média do  $\text{Log}_{10}$  da CCS nos TC e TI na Fase 1.**

	Média	Mediana	Desvio Padrão	P-valor
Teto controle	6,12	6,23	0,60	< 0,001
Teto infectado	6,56	6,69	0,49	

A presença de lesões nos TI pode explicar o porquê eles apresentaram as maiores médias de Log de CCS quando comparados aos TC. As lesões de continuidade nos tetos e, em alguns casos, nos ductos papilares pelo VACV, rompem os mecanismos de defesa naturais das glândulas mamárias favorecendo o desenvolvimento de mastites (Wellenberg et al., 2002a).

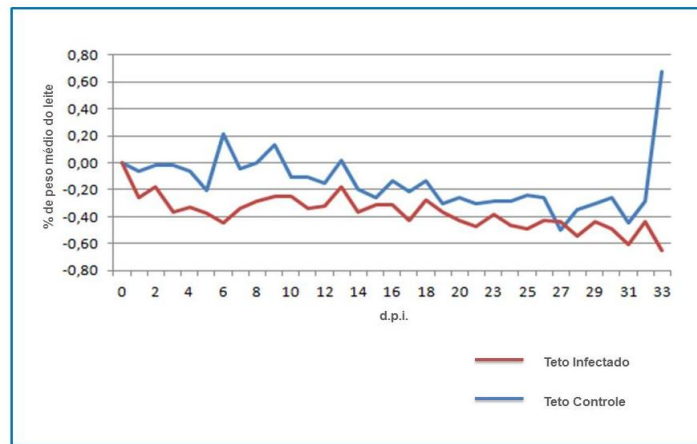
O VACV assim como outros vírus que causam lesões nos tetos das vacas: cowpox, pseudocowpox, vírus da estomatite vesicular (VSV), herpesvirus bovino tipo 2 e aftosa, podem influenciar indiretamente o desenvolvimento das mastites clínicas e subclínicas, principalmente pelas suas propriedades imunossupressoras (Wellenberg et al., 2002b). Easterday e colaboradores (1959) em um experimento com vacas experimentalmente inoculadas com VACV (amostra IHD) intramamário, observaram o aumento progressivo da CCS, chegando a ficar superior a  $5 \times 10^5$  células somáticas/ml (CS/ml). Além da predisposição ao desenvolvimento das mastites causadas pelas lesões nos tetos, o VACV também favorece a retenção de leite nas glândulas mamárias, causado principalmente pela dor durante a ordenha (Madureira, 2009). Este aumento do volume de leite residual nos ductos e ácinos glandulares favorecem a inflamação do tecido epitelial de revestimento interno da mama e o consequente desenvolvimento de infecções bacterianas.

De acordo com Tronco (2010), o leite de vacas sadias raramente contém acima de  $5 \times 10^5$  CS/ml e o aumento progressivo da CCS pode vir acompanhado pelas alterações físicas nos tetos que vão desde a inflamação leve até o surgimento dos sinais flogísticos nas mamas além de outros sinais clínicos sistêmicos, compatíveis com a mastite clínica. Durante um surto de *Cowpox virus*, um vírus membro do gênero *Orthopoxvirus*, vacas e búfalas em lactação foram acometidas, desenvolvendo lesões características nos tetos (Sambyal et al., 1983). Alguns animais desenvolveram mastite, sendo possível isolar do leite *S. aureus* e *Klebsiella* spp. Embora não tenha sido feita uma relação direta entre a presença da mastite e a infecção causada pelo *Cowpox virus*, as lesões nos tetos induzidas pelo vírus poderiam ter favorecido o desenvolvimento da mastite bacteriana secundária.

Em estudo realizado por Herlekar e colaboradores (2013), foi pesquisada a possível associação entre a detecção do DNA dos seguintes vírus: Herpes vírus bovino 1,2 e 4 e o vírus da diarreia viral bovina através da PCR em tempo real e o aumento da CCS. A partir do estudo, foi possível concluir que a mastite bacteriana é a principal responsável pelo aumento da CCS, tendo a etiologia viral pequena influência na mastite. Diferentemente do VACV, os vírus avaliados neste estudo (Herpes vírus bovino 1 e 4 e o vírus da diarreia viral bovina), não causam lesões nos tetos. Considerando a infecção causada pelo VACV, as lesões de continuidade nos tetos e, em alguns casos, nos ductos papilares, podem ter favorecido o desenvolvimento da infecção bacteriana secundária, elevando a quantificação da CCS principalmente nos tetos infectados.

Durante todo o experimento, alguns animais foram submetidos ao teste de mastite através do teste *California Mastitis Test* (CMT). O animal que apresentava viscosidade no leite a partir de uma cruz (+) foi tratado com doses de antibiótico intramamário com os seguintes princípios ativos: ampicilina (1,5%) e cloxacilina (4 %). No entanto, mesmo após o fim do tratamento com antibiótico intramamário, os animais apresentavam recidivas. Todas as medidas de controle das mastites foram adotadas durante o experimento, incluindo o pré e pós *dipping* com soluções de iodo no óstio mamário, limpeza frequente das baias, utilização de luvas de procedimentos para a realização da ordenha além de acompanhamento clínico diário e tratamento das vacas que desenvolviam mastite clínica.

Considerando a evolução do peso do leite durante a Fase 1, pôde-se observar que as amostras de leite dos TC apresentaram percentual de peso médio em relação ao peso inicial, superior aos observados para as amostras de leite dos TI em praticamente todos os dias (Fig. 22).



**Figura 22: Evolução do percentual do peso do leite em relação ao peso inicial no dia 0, considerando TC e TI durante a Fase 1.**

Pode-se observar a tendência de decréscimo do peso do leite com o passar dos dias, tanto para as amostras de leite dos TC quanto dos TI. A Tabela 7, descrita a seguir apresenta e compara as médias do peso do leite nos TI e TC. Esta tendência de decréscimo no peso do leite ocorreu ao longo do período analisado, sendo mais acentuado para as amostras de leite dos TI. Pode-se observar que os TC apresentaram média do peso do leite (1,21) superior à média dos TI (0,77), sendo que as medianas seguiram a mesma tendência. Esta diferença é significativa, de acordo com a probabilidade de significância do teste não paramétrico de comparação de dois grupos dependentes de Wilcoxon (p-valor).

**Tabela 7: Média do peso do leite nos tetos controle e tetos infectados durante a Fase 1.**

	<b>Média</b>	<b>Mediana</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>P-valor</b>
Teto controle	1,23 kg	1,25 kg	0,61 kg	< 0,001
Teto infectado	0,76 kg	0,83 kg	0,33 kg	

As mastites clínicas e subclínicas são responsáveis por perdas econômicas significativas na produção leiteira (Akers e Nickerson, 2011). Dentre os prejuízos, pode-se citar a redução na produção do leite, aumento dos gastos com medicamentos para tratamento dos animais, descarte do leite, assistência veterinária e mudanças significativas no aspecto e composição do leite (Mungube et al., 2005; Seegers et al., 2003; Dijkhuizen e Renkema, 1978). A redução na produção do leite é um dos principais prejuízos relacionados à mastite, podendo alcançar até dois terços do total de perdas econômicas (Akers e Nickerson, 2011).

Neste trabalho, a redução na produção do leite foi mais significativa nos TI, que também apresentaram maior contagem de células somáticas quando comparados aos TC. Estudos prévios realizados por Dijkhuizen e Renkema, 1978 (revisado por Schepers e Dijkhuizen, 1991) revelaram que a redução na produção do leite está diretamente relacionada com a elevação da CCS. Além disso, os autores concluíram que quanto mais elevada a CCS, mais significativa a perda econômica relacionada à produção do leite, sendo alcançada redução de cerca de 20 % na produção de leite nos tetos com CCS elevada e um acréscimo de 10 % de perda para aqueles tetos que apresentavam mastite clínica. A redução na capacidade de sintetizar e secretar o leite

nas vacas acometidas por mastite está relacionada principalmente à redução do epitélio alveolar e aumento das áreas interalveolares nas glândulas mamárias (Akers e Nickerson, 2011). Associado à mudança da composição da glândula mamária, nas vacas com mastite ocorre a migração exacerbada principalmente de neutrófilos e macrófagos para as glândulas mamárias, elevando, conseqüentemente, a contagem de células somáticas.

### 5.2.5 Resultados dos queijos produzidos a partir do leite dos TI das vacas experimentalmente inoculadas com o VACV-GP2

Foram produzidos ao todo 26 queijos, sendo 14 do grupo 1 e 12 do grupo 2. As alíquotas de soro foram recolhidas durante o processo de enformagem do queijo, quando o soro separou-se completamente da massa. Todas as amostras foram processadas e submetidas à realização da PCR separadamente. Foi considerada positiva a amostra (de massa ou soro) que apresentou pelo menos uma alíquota positiva na PCR *nested* para detectar o VACV (Tabela 8). No 3°, 19°, 23°, 25°, 29° e 31° d.p.i., não foi possível produzir os queijos. As alterações físico-químicas e microbiológicas do leite de vacas com mastite podem ter comprometido a coagulação do leite, uma vez que a reação inflamatória que ocorre na glândula mamária, provoca alterações na composição do leite que influenciam tanto a sua composição quanto a coagulação do comprometendo, portanto, a produção do queijo (Seegers, 2003). Além das proteínas inflamatórias e do plasma (proteínas *não coaguláveis*) estarem aumentadas nas vacas com mastite, a atividade proteolítica do leite também encontra-se aumentada (Auld et al, 1996). Barbano e colaboradores (1991), concluíram que qualquer aumento de CCS do leite acima de 100.000 células/ml impactam negativamente sobre a eficiência de produção de queijo.

Dos 26 queijos produzidos, 24 (96%) foram positivos para o DNA VACV em pelo menos uma das amostras (soro ou massa) sendo 17 (68%) positivos para a presença do DNA VACV na massa e no soro, 6 (24%) somente na massa e 1 (2,5%) positivo para o DNA VACV somente soro. No dia 33° d.p.i. não foi produzido queijo.

**Tabela 8: Detecções de DNA do VACV pela PCR *nested* gene *vgf* nas amostras de queijo e no soro dos Grupos 1 e 2 produzidos durante a Fase 1.**

		d.p.i.															
		1	3	5	7	9	11	13	15	17	19	21	23	25	27	29	31
G1	massa	-	nc	+	+	+	+	+	-	+	nc	+	+	+	+	+	-
	soro	-	nc	+	+	-	+	+	+	+	nc	-	-	+	-	+	-
G2	massa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	nc	nc	+	nc	nc
	soro	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	nc	nc	+	nc	nc

**Obs.:** Foi considerada positiva a massa ou o soro que apresentou pelo menos uma alíquota positiva na PCR. (nc) Não coagulou (+) positivo para o DNA do VACV gene *vgf* (-) negativo para o DNA do VACV gene *vgf*

Estudos prévios do nosso grupo, já haviam evidenciado a presença de partículas virais viáveis tanto na massa quanto no soro do queijo produzido a partir de leite experimentalmente

inoculado e, mesmo após o armazenamento em geladeira durante 12 horas, foi possível recuperar na massa do queijo mais de 80% das partículas virais infecciosas inicialmente inoculadas no leite (Oliveira et al., 2010). No mesmo trabalho, no soro do queijo, foi possível recuperar apenas 61% das partículas virais inicialmente inoculadas.

Tanto a presença de gordura quanto de proteínas presentes no queijo pode ter favorecido a proteção das partículas virais e, portanto favorecido a detecção do DNA viral nas amostras analisadas. No queijo Minas Artesanal do Serro a concentração média de proteínas e gorduras é de 17g/100g e 29,22g/100g, respectivamente (Machado et al., 2004). Blackwell e Hyde (1976), avaliando a viabilidade do vírus da aftosa no creme de leite obtido a partir de leite integral e desnatado, concluíram que a gordura presente no leite integral protegeu o vírus da ação do calor. *Ectromelia virus*, um OPV, permaneceu viável após suspenso em Soro Fetal Bovino (SFB) quando comparado a suspensão do vírus em solução de PBS e glicerol. Em manchas secas de SFB+vírus, o vírus permaneceu infeccioso por até cinco dias, tempo de permanência superior aquele do vírus associado com PBS ou PBS + glicerol (Bratt e Jacoby, 1987). Essbauer e colaboradores (2007) também observaram a influência da presença de proteína na viabilidade do VACV. O vírus permaneceu viável por um período superior a 166 dias na água de chuva suplementada com SFB, um meio rico em proteínas, e armazenada a 4,5 °C. Já na água de chuva sem a adição de soro fetal bovino, o vírus permaneceu viável por apenas 56 dias. Nos experimentos citados, a presença de SFB, rico em proteínas, prolongou a viabilidade viral quando comparada as amostras sem SFB.

O pH ácido também podem ter favorecido a manutenção do vírus na massa do queijo. De acordo com Machado e colaboradores (2004) o pH médio do queijo Minas Artesanal do Serro foi 4,98. Essbauer e colaboradores (2007) avaliaram a persistência da viabilidade do VACV em água de chuva com pH levemente ácido (pH 4,5-5,7). O título viral permaneceu o mesmo por até 56 dias quando as amostras foram incubadas a 4,5 °C.

A quantificação das amostras de massa e soro do queijo estão apresentadas nas Figuras 23 e 24. Nem todas as amostras apresentaram quantificação adequada, não obedecendo aos critérios mínimos de qualidade propostos no item 4.9.3 e, portanto, não foram apresentados nas Figuras 23 e 24. Pode-se observar redução progressiva na quantificação do DNA do VACV nas amostras de queijo e soro ao longo do tempo. As maiores médias de quantificação do DNA do VACV foram observadas no 7º e 9º d.p.i., na massa e no soro, respectivamente.

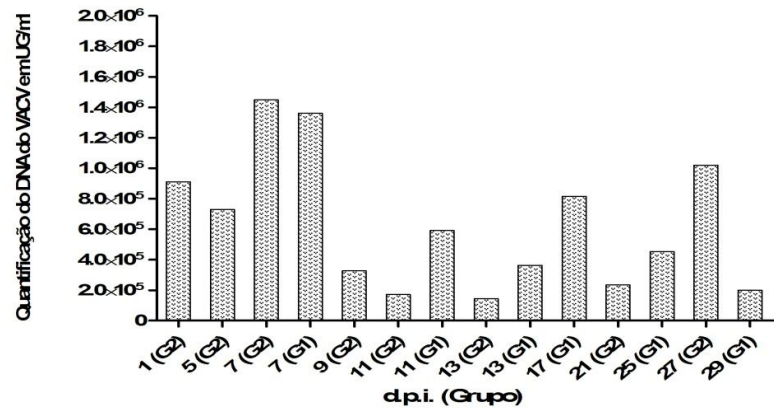


Figura 23: Quantificação absoluta em UG/ml nas amostras de soro do queijo da Fase 1.

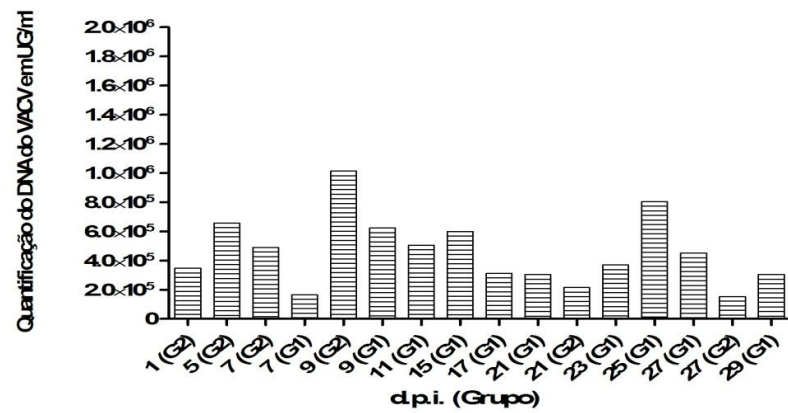


Figura 24: Quantificação absoluta em UG/g nas amostras da massa do queijo da Fase 1.



A Tabela 9 apresenta a média da quantificação do DNA do VACV nas amostras de massa e soro dos queijos produzidos durante a Fase 1. Não houve diferença entre a quantificação do DNA do VACV nas amostras do G1 quando comparada ao G2 ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 9: Média da quantificação do DNA do VACV gene *vgfem* UG/g nas amostras de massa e em UG/ml soro dos G1 e G2 durante a Fase 1.**

		Media	Mediana	Desvio Padrão
G1	soro	$5,9 \times 10^5$ UG/ml	$5,2 \times 10^5$ UG/ml	$4,5 \times 10^5$ UG/ml
	massa	$4,4 \times 10^5$ UG/ml	$4,1 \times 10^5$ UG/ml	$1,9 \times 10^5$ UG/ml
G2	soro	$6,9 \times 10^5$ UG/ml	$7,2 \times 10^5$ UG/ml	$4,7 \times 10^5$ UG/ml
	massa	$4,7 \times 10^5$ UG/ml	$4,1 \times 10^5$ UG/ml	$3,1 \times 10^5$ UG/ml

#### 5.2.5.1 Resultado do isolamento das amostras de queijo e soro previamente positivas na PCR *nested* para detectar o VACV gene *vgf*

Dentre as amostras de queijo positivas para o DNA do VACV, 10 foram submetidas à tentativa de isolamento viral em monocamada de células BSC-40 (Item 4.10.2) e, posteriormente, submetidas à IPMC (Item 4.10.3). Destas 10 amostras, sete (70%) apresentaram efeito citopático (ECP) e foram positivas na IPMC, sendo o ECP observado na duplicata das amostras. Não foram feitas tentativas de isolamento nas amostras de soro do queijo.

Os seguintes d.p.i. foram avaliados quanto a presença do DNA do VACV: 5°, 9°, 11°, 13°, 17°, 19°, 21°, 23°, 25°, 27°. As amostras dos dias: 9°, 13°, 17°, 19°, 23°, 25° são do G1 e as amostras dos dias: 5°, 11°, 21°, e 27° foram do G2.

Trabalhos prévios do nosso grupo detectaram a presença de partículas de VACV amostra-GP2 viáveis no queijo produzido a partir de leite experimentalmente inoculado (Oliveira et al., 2010). A comparação do título viral antes e após o processamento para produção do queijo foi realizada a partir da titulação das amostras de massa inoculadas com o vírus antes da enformagem e incubação em geladeira comparada com o título viral das massas enformadas e deixadas aproximadamente 12 horas na geladeira. Após a produção de queijo a partir do leite experimentalmente inoculado, foi possível recuperar partículas virais infecciosas tanto na massa quanto no soro do queijo. Na massa do queijo, após o armazenamento em geladeira durante 12 horas, ocorreu redução do título viral de aproximadamente  $\log_{10} 0,8$  quando comparado ao título inicial do vírus.

A persistência da viabilidade viral na massa do queijo pode ser atribuída tanto a presença de proteínas quanto gorduras, ambos componentes importantes na manutenção da proteção da viabilidade do vírus no leite (Callis et al., 1975). A concentração média de proteínas e gorduras na massa do queijo Minas artesanal é de 17g/100g e 29,22g/100g, respectivamente (Machado et al., 2004).

Blackwell e Hyde (1976) avaliando a viabilidade do vírus da aftosa no creme de leite obtido a partir de leite integral e desnatado, concluíram que a gordura presente no leite integral protegeu o vírus da ação do calor. No entanto, neste experimento, também foi possível atribuir a presença de gorduras e proteínas presentes a capacidade de proteção das partículas virais.

Alguns autores destacaram a manutenção do VACV em ambientes ricos em proteínas. O Ectromelia vírus, um OPV, permaneceu viável após suspenso em SFB quando comparado a suspensão do vírus em solução de PBS e glicerol. Em manchas secas de SFB+vírus, o vírus permaneceu infeccioso por até cinco dias, tempo de permanência superior aquele do vírus associado com PBS ou PBS + glicerol (Bratt e Jacoby, 1987). Essbauer et al. (2007), também observaram a influência da presença de proteína na viabilidade do VACV. O vírus permaneceu viável por um período superior a 166 dias na água de chuva suplementada com SFB, um meio rico em proteínas, e armazenada a 4,5° C. Já na água de chuva sem a adição de soro fetal bovino, o vírus permaneceu viável por apenas 56 dias. Nos experimentos citados, a presença de SFB, rico em proteínas, prolongou a viabilidade viral quando comparada as amostras sem SFB. Adicionalmente, no último experimento, a presença de proteínas associado ao pH ligeiramente ácido, favorecerem a manutenção do vírus.

O pH ácido também podem ter favorecido a manutenção do vírus na massa do queijo. De acordo com Machado et al., (2004), o pH médio do queijo Minas artesanal foi 4,98. Essbauer et al. (2007), avaliaram a persistência da viabilidade do VACV em água de chuva com pH levemente ácido (pH 4,5-5,7). O título viral permaneceu o mesmo por até 56 dias quando as amostras foram incubadas a 4,5° C.

O vírus da aftosa permaneceu viável nos queijos tipo Camembert (pH=5) e Cheddar produzido a partir de leite aquecido a 63° C durante 6 segundos. O leite cru utilizado para a produção de queijos e derivados representa risco potencial de disseminação de doenças provenientes tanto de microorganismos excretados pelo leite quanto daqueles adquiridos a partir da utilização de utensílios contaminados no momento da ordenha (Oliver et al., 2005; Bona et al.,2005).

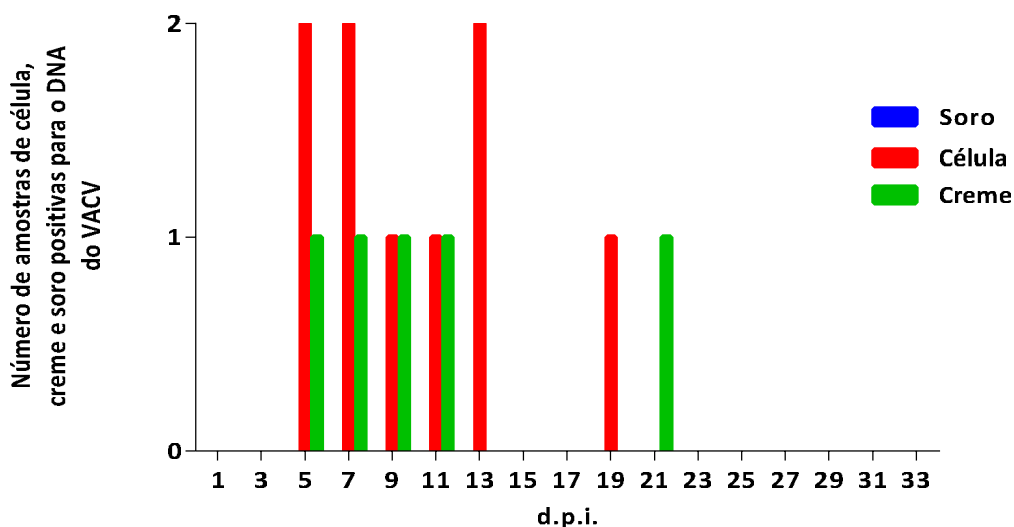
Em Minas Gerais, a Lei Estadual nº 14.185 de 31/01/2002 determina que o início do processamento do queijo Minas artesanal deve ocorrer em até 90 minutos após o começo da ordenha, utilizando-se culturas lácticas naturais como “pingo”, soro fermentado ou soro-fermento, coalho e sal e sem que ocorra qualquer tipo de tratamento térmico prévio com o leite (Minas Gerais, 2002). Em focos da doença, a utilização do leite cru para a produção de queijo, pode oferecer risco tanto para o queijeiro que normalmente manipula a massa sem nenhum tipo de proteção (como luvas), quanto para as pessoas que consomem estes produtos, caracterizando um risco à Saúde Pública.

Embora o VACV permaneça viável tanto no leite após tratamentos térmicos quanto após o processamento para produção de queijo, ainda não se sabe a respeito da transmissão do vírus através da ingestão de produtos contendo o vírus. No entanto, adoção de medidas que visem o controle da disseminação da doença no rebanho bem como não consumir leite cru ou produtos produzidos sem prévio tratamento, são importantes, haja vista o risco potencial de consumo de leite cru para a Saúde Pública.

#### **5.2.6 Resultados das fases do leite obtidas a partir da centrifugação do leite dos TI das vacas experimentalmente inoculadas com o VACV-GP2**

A partir do 1° d.p.i. até o 33° d.p.i. (dias ímpares), uma amostra de leite de cada grupo: G1 e G2 foram submetidas à centrifugação. Após a centrifugação do leite, foi possível observar a formação de três fases: uma superior, composta principalmente por um creme branco formado pela gordura, uma intermediária, ou soro, observada como um líquido translúcido que ocupou a maior parte do tubo e uma composta principalmente por componentes de maior densidade, como células somáticas e epiteliais, dentre outras, formando um precipitado denso no fundo do tubo. As fases do leite foram identificadas da seguinte forma: creme, soro e célula. Portanto, a cada dia ímpar, foram obtidas duas amostras de creme, duas de soro e duas de célula, sendo uma amostra de cada grupo (G1 e G2). A Figura 25 apresenta as amostras de creme e célula que positivas na PCR *nested* para detectar o DNA do VACV gene *vgf*, enquanto nas amostras de

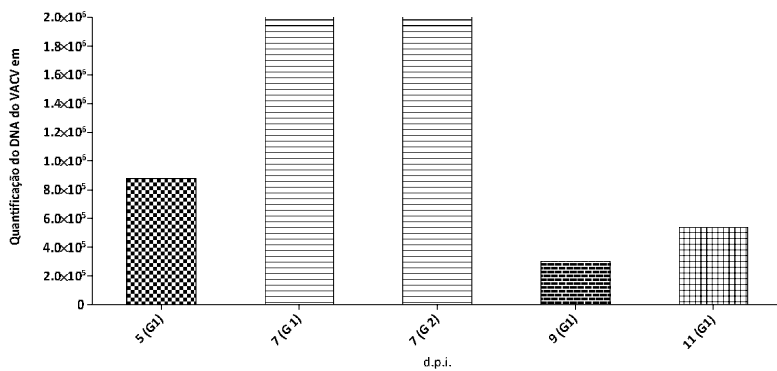
soro, não foi detectado o DNA viral. Foram positivas para o VACV na PCR: 9 (33,3%) amostras de célula e 5 (15,15% ) amostras de creme (Fig. 25).



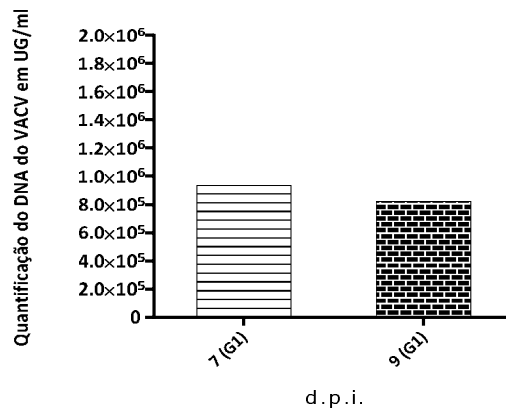
d.p.i.	5	7	9	11	13	19	21
Amostras positivas para o DNA do VACV	célula G1	célula G1	célula G1	célula G1	célula G1	célula G2	creme G2
	célula G2	célula G2	creme G1	creme G2	célula G2		
	creme G2	creme G1					

**Figura 25: Amostras de creme e células positivas na PCR *nested* para detectar o DNA do VACV gene *vgl* durante a Fase 1. As amostras foram obtidas a partir da centrifugação das amostras de leite do G1 e G2.**

Todas as amostras positivas na *PCR nested* foram submetidas à PCR em tempo real para quantificação do DNA viral (Fig. 26 e Fig. 27). No entanto, em alguns casos, algumas amostras não apresentaram amplificação adequada em ambas as amostras da duplicata ou não atenderam aos requisitos mínimos de qualidade estabelecidos (item 4.9.3). Nestas situações, a quantificação de DNA não foi apresentada no trabalho. As amostras de creme (G1) do 5º, creme (G1) e célula (G2) do 11º e creme (G2) do 21º d.p.i. não foram apresentadas nas Figuras 26 e 27, uma vez que os valores de quantificação do DNA do VACV foram inferiores àquele definido no teste de sensibilidade da PCR em tempo real (item 4.9.3).



**Figura 26: Quantificação do DNA do VACV gene *vgfnas* amostras de célula, obtidas a partir da centrifugação do leite, Fase 1.**



**Figura 27: Quantificação do DNA do VACV gene *vgf* nas amostras de creme, obtidas a partir da centrifugação do leite, Fase 1.**

A maior concentração de DNA em UG/ml pôde ser observada no 7º d.p.i. nas amostras de creme e célula (Fig. 26 e Fig. 27). Os resultados obtidos sugerem que o VACV esteja associado às células presentes no leite, hipótese reforçada tanto pelo número de amostras de células positivas para o DNA de VACV quanto pela maior concentração de DNA de VACV nestas amostras. O fato de todas as amostras de soro terem sido negativas reforça a hipótese de que o vírus não esteja livre, mas sim, associado às células presentes no leite. O Herpesvirus bovino tipo 4 (BoHV-4), um vírus capaz de causar infecções persistentes em tecidos linfóides de bovinos, também foi identificado associado às células do leite após ter sido submetido ao

processo de centrifugação (Donofrio et al., 2000). Neste experimento, também não foi possível detectar DNA viral no soro do leite.

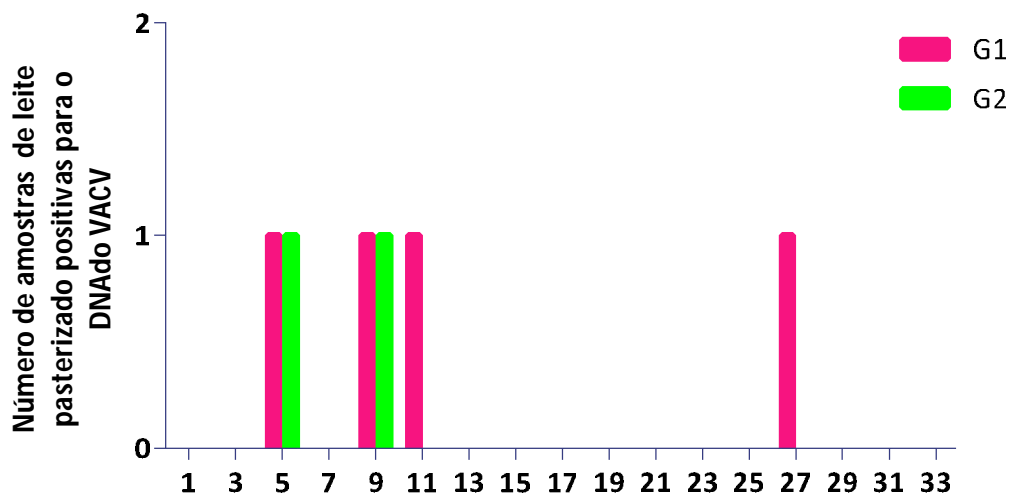
Associada à multiplicação viral dentro das células de defesa, evidenciada pelas imunomarcações positivas para o VACV através da técnica de imunohistoquímica (IHQ) em macrófagos localizados na região perivascular da derme e linfócitos de linfonodos retromamários de vacas experimentalmente inoculadas com VACV-GP2, como discutido anteriormente (Rivetti et al., 2013), deve-se considerar a possibilidade de veiculação destas células através do leite. Sabe-se que as CS são comumente encontradas no leite, no entanto, quando ocorre uma infecção ou injúria tecidual a CCS encontra-se aumentada. As CS são constituídas principalmente por leucócitos (75%), como: neutrófilos, macrófagos e linfócitos e 25% de células epiteliais (Sharma et al., 2011). As células epiteliais são originárias da descamação do revestimento interno da glândula mamária e, durante a mastite, elas estimulam a produção de inúmeros mediadores da cascata inflamatória, como citocinas, quimiocinas, peptídeos de defesa do hospedeiro e metabólitos do ácido aracônico (Sharma et al., 2011). Estes mediadores estimulam também a migração de neutrófilos e outros leucócitos que participarão ativamente tanto da defesa quanto da reparação do tecido danificado na glândula mamária, contribuindo com o aumento da CCS no leite (Akers e Nickerson, 2011). O aumento progressivo da CCS observada durante o experimento (Fig. 22) está associado, portanto, à migração exacerbada das células de defesa para a glândula mamária. Por sua vez, o desenvolvimento da mastite pode ter sido favorecido pela presença de lesões de continuidade presentes nos tetos e pela multiplicação do VACV, como discutido anteriormente (Item 5.2.4). Estes resultados reforçam as evidências de possível associação do VACV aos macrófagos e conseqüente a sua eliminação no leite.

Além do VACV, existem evidências de que o MPXV, um OPV, também esteja associado às células brancas. Zaucha e colaboradores (2001), em uma infecção experimental com o MPXV, um OPV, em macacos, observaram a replicação viral em macrófagos localizados nos linfonodos mediastinais através da microscopia eletrônica. Neste estudo, a via linfática foi apontada como a principal responsável pela disseminação do MPXV. Após a infecção dos linfonodos, o MPXV alcança a via hematogênica, sendo a viremia secundária à infecção pelo MPXV, conhecida como *viremia associada a leucócito* (Cho e Wenner, 1973, revisado por Zaucha et al 2001).

A presença de DNA viral no creme de algumas amostras pode ser justificada pela suspensão de células somáticas (CS) que eventualmente tenham ficado presas nesta fase do leite. No 5º, 7º e 9º d.p.i, foi possível detectar o DNA viral tanto nas células quanto no creme das amostras avaliadas. Sendo possível observar maior quantificação do DNA viral na fase celular.

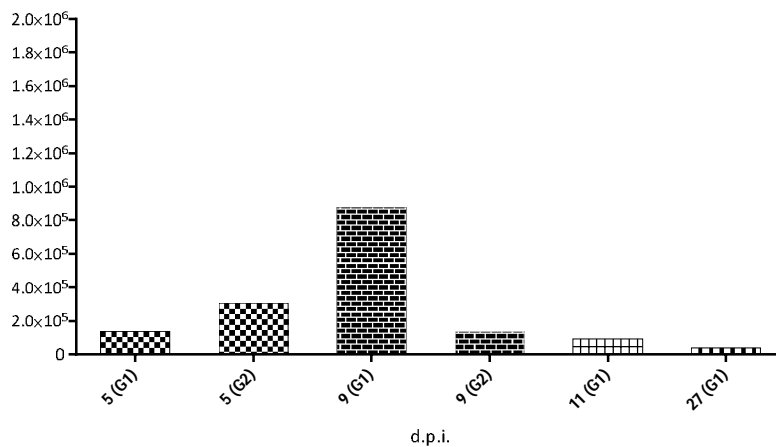
### **5.2.7 Resultados das amostras de leite obtidas a partir dos TI das vacas experimentalmente inoculadas com o VACV-GP2 e submetidas à pasteurização**

Das 33 amostras de leite submetidas à pasteurização lenta, 6 (18,18%) foram positivas para o DNA de VACV (Fig. 28). A detecção do DNA viral no leite pasteurizado foi intermitente, assim como ocorreu com a detecção no leite sem prévio tratamento térmico, sendo possível detectar o DNA do VACV até o 27º d.p.i. Além disso, a detecção do DNA do VACV no leite se estendeu além do período de resolução das lesões, que ocorreu em média, no 22º d.p.i. Não foi observada diferença significativa entre o número de amostras positivas nos Grupos 1 e 2.



**Figura 28: Amostras de leite submetidas à pasteurização lenta e positivas para o DNA do VACV gene *vgf* nos G1 e G2 durante a Fase 1.**

A quantificação do DNA viral das amostras positivas na PCR em tempo real está apresentada na Figura 29. Foi possível observar um aumento progressivo da concentração do DNA viral nas amostras de leite pasteurizado, sendo alcançada a maior quantificação no 9º d.p.i na amostra do Grupo I (Fig. 29).



**Figura 29: Quantificação do DNA do VACV gene *vgf* nas amostras de leite submetidas à pasteurização lenta durante a Fase 1.**

A resistência do VACV ao calor foi avaliada por Sauerbrei e Wutzler (2009). O VACV foi avaliado quanto à sua resistência ao calor seco utilizando um instrumento capaz de emitir calor,

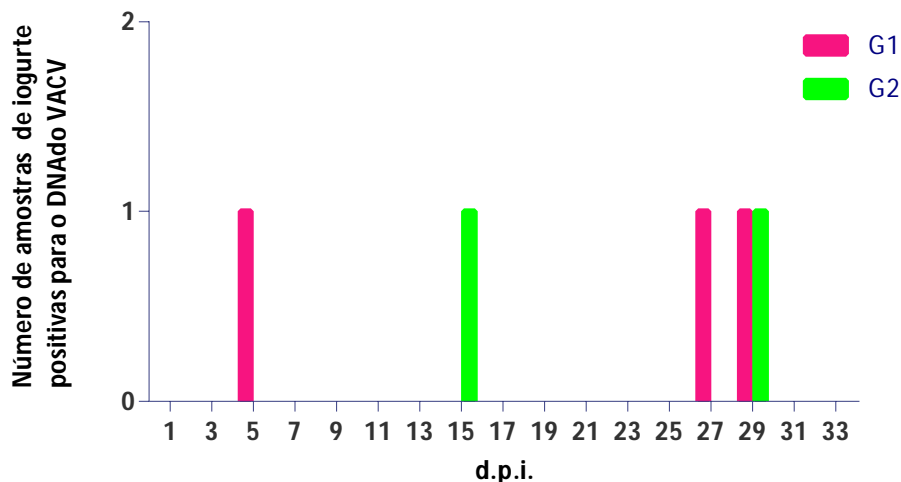
o *Keredusy*. O VACV foi resistente ao calor quando exposto durante uma hora às temperaturas 40 °C, 75 °C, 85 °C e 95 °C. A redução significativa do título viral (redução de pelo menos 4 log<sub>10</sub> o título inicial do vírus) foi observada somente quando exposto à temperatura de 95 °C durante duas horas. Nas demais temperaturas, o VACV não sofreu redução do título viral, sendo, portanto, resistente às temperaturas testadas.

Em estudos prévios, foi possível recuperar partículas viáveis de VACV-GP2 permaneceu no leite experimentalmente inoculado mesmo após ter sido submetido às temperaturas de 56° e 65 °C durante 30 minutos (Oliveira et al, 2010). De acordo com a instrução normativa numero 51 do MAPA (Brasil, 2002), a pasteurização lenta (*Low Temperature Long Time* equivalente à expressão Baixa Temperatura /Longo Tempo) pode ser adotada em laticínios de pequeno porte para o abastecimento público ou para a produção de derivados lácteos. No entanto, a manutenção de DNA e partículas virais viáveis no leite, mesmo após a pasteurização lenta, chama a atenção para a possibilidade da sua veiculação oferecendo risco à Saúde Pública. A pasteurização tem como objetivo eliminar microorganismos patogênicos como *Mycobacterium tuberculosis* e *Coxiella Burnetti*. No entanto, a sua efetividade na inativação de vírus de importância para a Saúde Pública também deve ser considerado (Bona et al., 2005).

### 5.2.8 Resultados das amostras de leite obtidas a partir dos TI das vacas experimentalmente inoculadas com o VACV-GP2 e submetidas à esterilização e produção de iogurte.

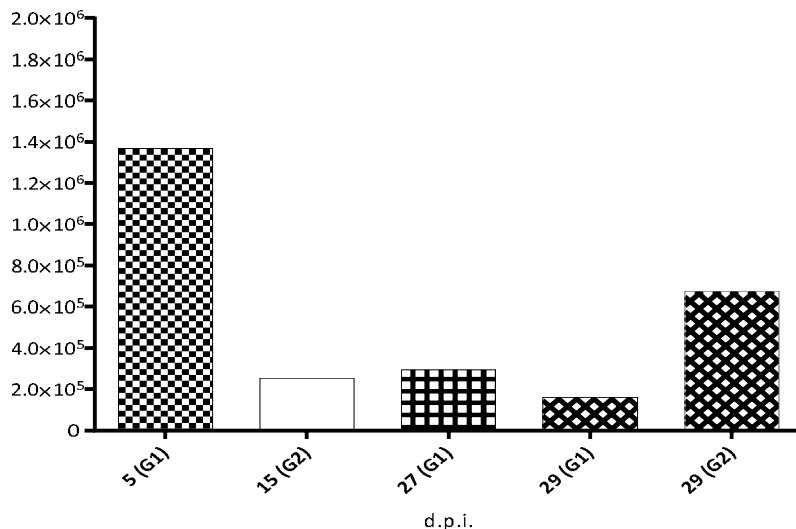
Das amostras de iogurte, 5 amostras (14,7% ) foram positivas na PCR *nested* para o VACV (Fig. 30). No 29° d.p.i ambos os grupos (1 e 2) foram positivos para o DNA de VACV.

A detecção do DNA viral pode ser explicada pela sua característica de resistência às altas temperaturas, como explicado anteriormente. Além disso, o pH ácido também pode ter favorecido a manutenção do vírus no iogurte. Durante todo o experimento, o pH do iogurte foi mensurado, chegando a alcançar o valor entre 4,6 – 4,4 em todas as amostras ao final do processamento do iogurte. Essbauer e colaboradores (2007), avaliaram a persistência da viabilidade do VACV em água de chuva com pH levemente ácido (pH 4,5-5,7). O título viral permaneceu o mesmo por até 56 dias quando as amostras foram incubadas a 4,5 °C. Embora não tenha sido testada a viabilidade viral em cultivo de células para as amostras positivas na PCR *nested* , foi possível observar que associada a resistência do vírus às altas temperaturas, a acidez pode ter contribuído para manutenção do DNA do VACV no iogurte.



**Figura 30: Amostras de leite submetidas à esterilização e posteriormente à produção de iogurte e positivas para o DNA do VACV gene *vgf* nos G1 e G2 durante a Fase 1.**

A quantificação viral das amostras de iogurte revela a maior concentração de DNA viral no 5º d.p.i. (Fig. 31).



**Figura 31: Quantificação do DNA do VACV gene *vgf* nas amostras de leite submetidas à esterilização e posterior produção de iogurte durante a Fase 1.**

Em trabalhos prévios do nosso grupo, não foi possível detectar partículas virais viáveis no leite experimentalmente inoculado e processado para a produção de leite fermentado (Oliveira, 2009). O leite fermentado sem diluição prévia destruiu a monocamada celular em todas as amostras impedindo a visualização das placas de lise na monocamada causadas pelo vírus.

### 5.2.9 Resultado do isolamento das amostras de leite da Fase 1

Dentre as amostras positivas para o DNA do VACV no leite durante a Fase 1, 29 foram submetidas à tentativa de isolamento viral em monocamada de células BSC-40 (Item 4.10.2) e, posteriormente, submetidas à IPMC (Item 4.10.3). Foram selecionadas algumas amostras que apresentaram as maiores quantificações do DNA do VACV. Nenhuma amostra apresentou efeito citopático característico do VACV. Serão necessários novos testes, a fim de testar amostras que não participaram desta tentativa de isolamento.

## 5.3 Resultados da Fase 2: Animais previamente inoculados com o VACV-GP2 e posteriormente submetidos à tratamento imunodepressor

### 5.3.1 Resultados da PCR<sub>nested</sub> para detecção do VACV-GP2 gene *vgf* no leite

A Fase 2, iniciou no 69º d.p.i., correspondendo ao 0 d.p.im. A imunodepressão foi comprovada através da avaliação dos níveis de linfócitos, observada a queda no número de linfócitos a partir



do 1º dia pós imunodepressão (d.p.im). A partir do 5º d.p.im. pôde-se observar linfopenia em todos os animais do experimento (Rehfeld, 2011). Foi possível detectar o DNA do VACV a partir do dia 0 d.p.im. (dia pós imunodepressão).

Foi possível detectar DNA viral nas amostras de leite de todos os animais submetidos ao tratamento com imunodepressor, em pelo menos um dia de avaliação. A detecção do DNA viral ocorreu de forma intermitente, assim como ocorreu na Fase 1 (Fig. 32). O teto posterior esquerdo de cada vaca continuou sendo chamado de TC e os TAD, TPD e TAE continuaram com a denominação de TI.

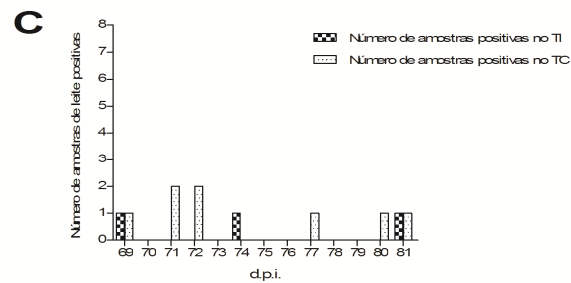
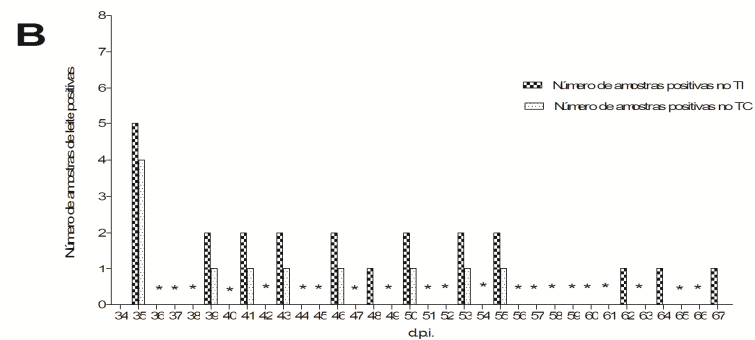
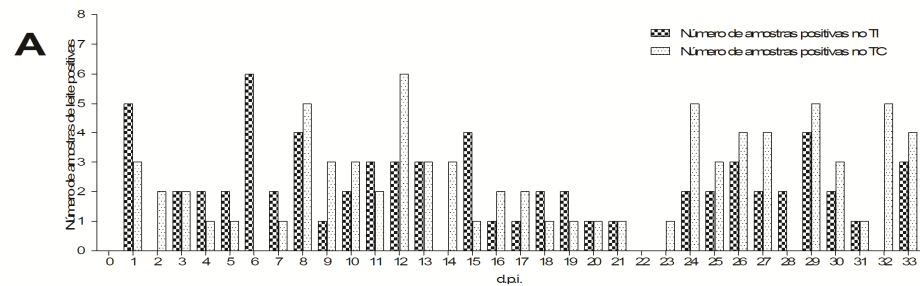
A detecção do DNA do VACV no leite destes animais, antes mesmo do início da queda da linfopenia, que ocorreu a partir do 5º d.p.mi. chamam a atenção para a eliminação do VACV no leite antes mesmo do início da imunodepressão. Quando comparado o número de amostras positivas para o DNA do VACV no leite nos dias que antecedem o tratamento com imunodepressores (46º d.p.i a 68 d.p.i.), pode-se observar aumento significativo no número de amostras positivas após o tratamento com imunodepressor (69 d.p.i.) (Fig. 32). Portanto, pode-se concluir que ocorreu aumento da frequência de amostras positivas para o DNA do VACV no leite após o início do tratamento com imunodepressor.

Todas as amostras de leite coletadas na Fase 2 foram submetidas a PCR<sub>nested</sub> para detectar o VACV gene *vgf*, totalizando 104 amostras, sendo 11 (11,44%) amostras positivas. A distribuição das amostras de leite segundo a presença e ausência do DNA de VACV, tipo de ordenha e teto, controle ou infectado, está apresentado na Tabela 10.

**Tabela 10: Distribuição das amostras de leite positivas para o DNA do VACV na PCR<sub>nested</sub> gene *vgf* nos TC e TI de acordo com o tipo de coleta (manual ou sonda) durante a Fase 2.**

	Coleta	PCR		Total [n (%)]	[n P- valor*
		Negativo (%)	[n Positivo (%)		
Teto controle	Manual	23 (46,9)	1 (33,3)	24 (46,2)	1,000
	Sonda	26 (53,1)	2 (66,7)	28 (53,8)	
Teto infectado	Manual	21 (47,7)	3 (37,5)	24 (46,2)	0,711
	Sonda	23 (52,3)	5 (62,5)	28 (53,8)	

\* Teste Exato de Fisher.

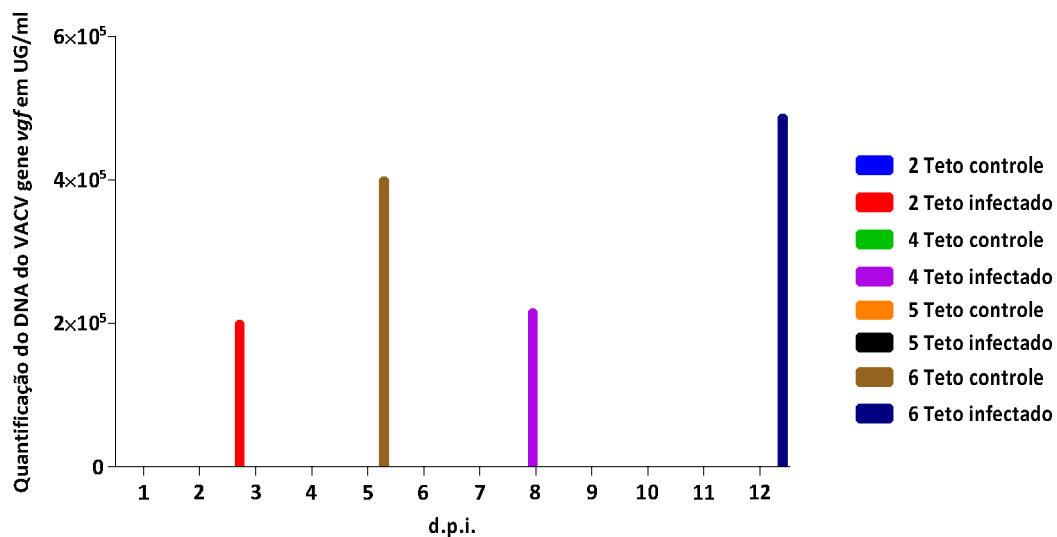


**Figura 32:** Número de amostras de leite positivas para o DNA do VACV gene *vgf* nos TI e TC pela PCR *nested* por dia de experimento (A) Fase 1 (1° d.p.i. até 33° d.p.i.); (B) entre as fases 1 e 2 (34° ao 67° d.p.i.) O (\*) representa os dias que não houve coleta entre o 34° e 67° d.p.i.; (C) na Fase 2 (69° ao 81 d.p.i.).

Foi possível detectar o DNA de VACV gene *vgf* em 2 amostras de leite dos TC obtidas a partir da sondagem e 1 amostra de leite obtida a partir da ordenha manual. A partir do teste Exato de Fisher foi possível concluir que não existe diferença significativa entre as formas de obtenção do leite, ordenha manual ou através de sonda, considerando os tetos que não foram inoculados (TC) ( $p\text{-valor} > 0,05$ ). Nas amostras de leite dos TI, 3 amostras obtidas a partir da ordenha manual foram positivas para o DNA de VACV contra 5 amostras obtidas a partir da sondagem, não existindo diferença significativa neste caso também ( $p\text{-valor} > 0,05$ ) (Tab. 10). Estes resultados apontam que independente da forma de obtenção do leite, ordenha manual ou sonda, é possível detectar o DNA de VACV tanto nos TI quanto nos TC, nos animais submetidos a tratamento com imunodepressor.

### **5.3.2 Resultado da PCR em tempo real para detecção do VACV gene *vgf* nas amostras de leite da Fase 2**

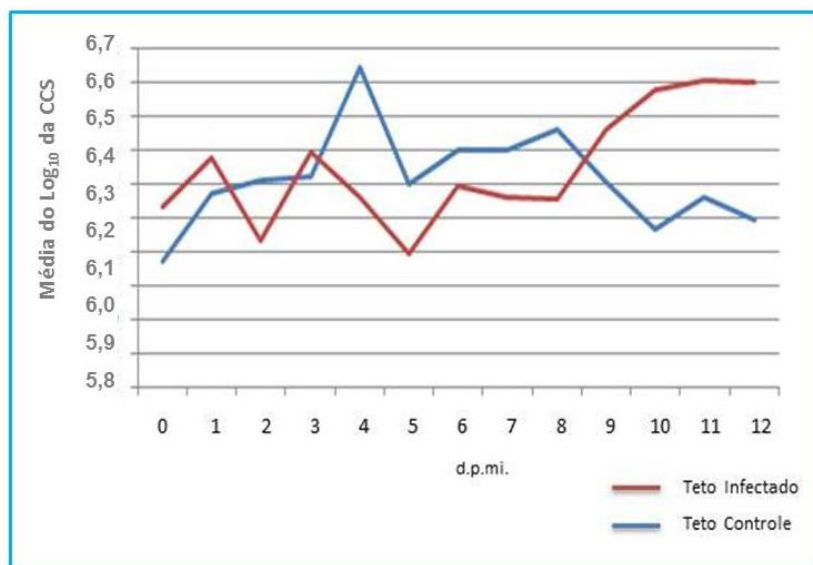
A Figura 33 apresenta a quantificação do DNA do VACV nas amostras de leite da Fase 2. Foi possível quantificar as amostras dos dias 3, 5, 8 e 12° d.p.im dos tetos infectados e do 2° d.p.im. do teto controle. A quantificação média do DNA do VACV gene *vgf* durante a Fase 2 foi inferior à Fase 1. Enquanto na Fase 1 a média da quantificação do DNA viral foi de 3200000UG/ml, na Fase 2, o valor médio foi 454000UG/ml.



**Figura 32: Quantificação do DNA do VACV gene vgf nas amostras de leite dos TC e TI durante a Fase 2.**

#### 5.3.4 Resultados das avaliações dos parâmetros de qualidade do leite: CCS e peso

Todos os animais do experimento apresentavam mastite subclínica no dia 0 d.p.im. Embora tenha sido observado um discreto aumento na CCS nos primeiros dias pós imunodepressão, não pode ser observado um aumento progressivo da CCS ao longo do tempo, como ocorreu na Fase 1 do experimento (Fig. 34).



**Figura 33: Média do Logaritmo na base 10 (Log10) da contagem de células somáticas (CCS) das 4 vacas submetidas à imunodepressão, considerando os tetos controle e infectados.**

Apartir da Tabela 11, foi possível observar que durante a Fase 2 a média do Log<sub>10</sub> da CCS para os TI (3,45) está muito próxima do valor observado para os TC (3,42). A partir do teste não paramétrico de comparação de dois grupos dependentes de Wilcoxon, foi possível concluir que não existe diferença significativa entre a CCS nos TC e TI ( $p$ -valor > 0,05). Este resultado difere na Fase 1, na qual a média do Log<sub>10</sub> da CCS nos TI foi superior aos TC ( $p$ -valor > 0,05). A presença das lesões nos TI na Fase 1, pode ter favorecido o aumento de CCS, já na imunodepressão, como não ocorreu o desenvolvimento de lesões nos tetos, a CCS não alterou significativamente ao longo do tempo. Este resultado reforça a hipótese de que a presença de lesões nos tetos, observada durante a infecção pelo VACV, favorecem o aumento da CCS.

**Tabela 11: Comparação da média do Log<sub>10</sub> da CCS nos TC e TI na Fase 2.**

Grupo	Média	Mediana	Desvio Padrão	P-valor
Controle	6,42	6,40	0,40	0,771
Infectado	6,45	6,56	0,39	

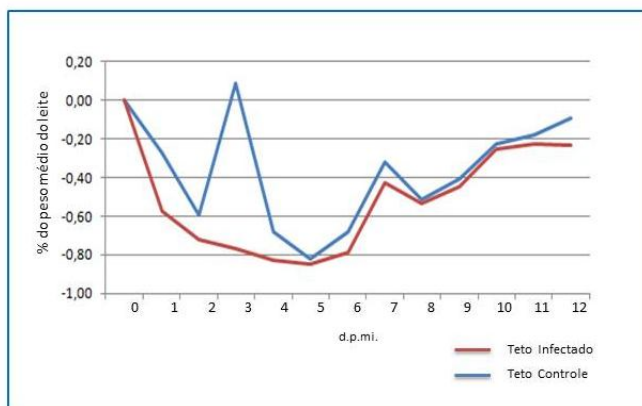
A fim de avaliar a possível relação entre a presença do DNA viral e a quantificação da média do Log<sub>10</sub> da CCS, foi feita uma comparação entre a quantificação da CCS entre as amostras de leite positivas para o DNA do VACV e as amostras negativas (Tab. 12). Pode-se observar que tanto as amostras de leite dos TI quanto dos TC que foram positivas para o DNA do VACV na PCR *nested* apresentaram resultados médios e medianos de Log de CCS similares às amostras de leite que foram negativas para o VACV. De acordo com o teste não paramétrico de comparação

de grupos independentes de Mann-Whitney, não existe correlação entre a amostra de leite ser positiva para o DNA do VACV e a quantificação da CCS.

**Tabela 12: Comparação da média do  $\text{Log}_{10}$  da CCS nos tetos controle e infectados de acordo com a detecção do DNA do VACV gene *vgfp* pela PCR *nested* durante a Fase 2.**

	PCR	Média	Mediana	Desvio Padrão	P-valor
Teto Controle	Negativo	3,41	3,39	0,40	0,503
	Positivo	3,58	3,47	0,34	
Teto Infectado	Negativo	3,44	3,55	0,40	0,775
	Positivo	3,51	3,58	0,30	

Considerando a evolução do peso do leite durante a Fase 2, pôde-se observar que as amostras de leite dos TC apresentaram percentual de peso médio em relação ao peso inicial, superior aos observados para as amostras de leite dos TI em praticamente todos os dias (Fig. 35).



**Figura 34: Evolução do percentual do peso do leite em relação ao peso inicial no dia 0, considerando TC e TI durante a Fase 2.**

A partir do dia 0 até o 5º d.p.mi, pode-se observar a redução do peso do leite, tanto para as amostras de leite dos TC quanto dos TI. A partir do 6º d.p.mi, ocorre aumento progressivo do peso do leite nos TC e TI, no entanto, o peso do leite nos TI permanece superior ao peso do leite dos TC. A Tabela 13, descrita a seguir apresenta e compara as médias do peso do leite nos TI e TC. Esta tendência de decréscimo no peso do leite ocorreu ao longo do período analisado, sendo mais acentuado para as amostras de leite dos tetos infectados. Pode-se observar que os TC apresentaram média do peso do leite (0,88) superior à média dos TI (0,48), sendo que as medianas seguem a mesma tendência. Esta diferença é significativa, de acordo com a probabilidade de significância do teste não paramétrico de comparação de dois grupos dependentes de Wilcoxon (p-valor). O peso médio do leite tanto nos TC quanto nos TI foi

inferior àquele observado durante a Fase 1. Além da redução na produção do leite, foi observada mudança no aspecto do leite, que passou de branco para amarelado e pastoso, voltando à normalidade após o 9º dia após o início do tratamento com imunodepressor (Rehfeld, 2011).

**Tabela 13: Média do peso do leite nos tetos controle e tetos infectados durante a Fase 2.**

<b>Grupo</b>	<b>Média</b>	<b>Mediana</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>P-valor</b>
Controle	0,88	1,00	0,71	< 0,001
Infectado	0,48	0,46	0,31	

Além da presença do DNA no leite, outro trabalho do nosso grupo, identificou a DNAemia e excreção do vírus nas fezes durante o período da imunodepressão (Rivetti, et al., 2013). A partir da titulação dos anticorpos neutralizantes (AN) anti-VACV e de IgG total anti-VACV após a imunodepressão, foi construída uma curva de anticorpos. A partir dela, pode-se observar uma correlação positiva entre o aumento do título de IgG total anti-VACV e o retorno da DNAemia (Rivetti, et al., 2013; Matos, 2012). Além disso, a presença de lesões ulceradas na mucosa oral de duas vacas, no 5º e 8º d.p.im, sendo positivas para o DNA do VACV através da PCR *nested*, reforçam a hipótese de uma nova circulação viral.

A presença do DNA do VACV no leite assim como nas fezes e no sangue dos animais submetidos à imunodepressão, indicam que o VACV permaneceu nos tecidos dos animais previamente inoculados. Após terem sido submetidos a tratamento com imunodepressores, pode-se observar o retorno da DNAemia assim como o aumento da frequência de amostras positivas para o DNA do VACV no leite e nas fezes, indicando um retorno da replicação viral. Após a replicação viral, em órgãos distantes do sítio inicial de infecção, o vírus pode alcançar via linfo hematogênica às glândulas mamárias, sendo excretado juntamente com o leite. Além disso, a eliminação viral no leite, fezes e a presença do DNA do VACV no sangue, foram indiferentes à presença de AN nos animais submetidos a tratamento imunodepressor, uma vez que, com exceção de um animal, todos apresentavam AN assim como IgG total anti-VACV antes do início do tratamento com imunodepressor.

Existem evidências de que além do VACV outro vírus da família *Poxviridae*, o Parapoxvirus, que causa lesões similares ao VACV, pode causar infecções prolongadas em bovinos. O Parapoxvirus foi isolado a partir do sangue periférico de uma vaca que não apresentava sinais clínicos da doença. Neste estudo, Sentsui e colaboradores (1999), concluíram que os Parapoxvirus são capazes de causar infecção prolongada em bovinos. Quando os animais são submetidos a condições de estresse, a doença pode ser reativada, podendo o vírus ser detectado no sangue destes animais.

### **5.3.5 Resultado do isolamento viral das amostras de leite dos animais submetidos à imunodepressão**

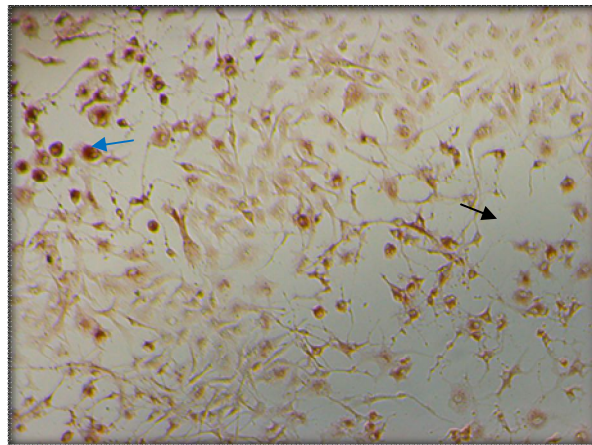
Dentre as amostras positivas para o DNA do VACV, 65 foram submetidas à tentativa de isolamento viral em monocamada de células BSC-40 (Item 4.10.2) e, posteriormente, submetidas à IPMC (Item 4.10.3). Destas 65 amostras, 6 apresentaram efeito citopático (ECP) e foram positivas na IPMC. A Figura 36 apresenta o efeito citopático com formação de placas de

lise e imunomarcção positiva para o VACV através da IPMC em monocamada de BSC-40 previamente inoculadas com amostra de leite de uma vaca no 5° d.p.mi.

A presença de partículas virais viáveis no leite nos seguintes d.p.im.: 0°, 4°, 5°, 8° e 10° chama a atenção para o retorno da detecção do DNA do VACV em animais que não apresentavam lesões nos tetos. Esses resultados associados a estudos prévios do nosso grupo que evidenciaram o retorno da DNAemia e viremia nestes mesmos animais submetidos à imunodepressão (Rivetti et al., 2012), reforça a hipótese de infecção prolongada e de retorno na replicação viral em locais distintos daquela da inoculação inicial.

Relatos de infecções prolongadas já foram descritas para outros poxvírus. Os Parapoxvirus, por exemplo, membros da família Poxviridae, foram identificados como sendo responsáveis por causar infecção prolongadas em bovinos. Fatores de stress que induzem mudanças nas respostas imunes podem favorecer a replicação viral e a retomada da infecção (Sentsui, 1999). O CPXV também foi identificado num nódulo após exérese de um linfonodo de uma paciente jovem dois anos depois do início de uma celulite facial causada por um cowpox vírus (Pahlitzsch, 2006).

Easterday et al. (1959), isolou o VACV (amostra IHD) no leite de quatro das oito vacas experimentalmente inoculadas com o mesmo vírus. Os animais foram inoculados nas glândulas mamárias através dos ductos papilares, sendo observado o surgimento de sinais clínicos sistêmicos como elevação da temperatura corporal e sinais flogísticos no úbere além das lesões características nos tetos de todos os animais inoculados.



**Figura 35: Efeito citopático com formação de placas de lise (seta preta) e imunomarcção evidenciada pela cor vermelho-cobre (seta azul) identificando a presença do VACV pela IPMC em monocamada de BSC-40 previamente inoculadas com amostra de leite do 5° d.p.mi.**



## CONCLUSÕES

- O DNA do VACV pode ser detectado no leite de forma intermitente em vacas experimentalmente infectadas a partir do 1º d.p.i. até o 33º d.p.i indicando que o VACV continua sendo eliminado no leite mesmo após a resolução das lesões, que ocorreu no 22º d.p.i.
- O VACV pôde ser detectado(tanto DNA quanto partículas virais viáveis) no queijo produzido a partir de leite de vacas experimentalmente infectadas.
- A detecção do DNA do VACV apenas nas frações do creme e da célula do leite, sugerem que o vírus não fica livre e sim associado a células no leite.
- Foi possível detectar DNA viral em amostras leite de vacas experimentalmente infectadas e posteriormente, submetidas a processo de pasteurização e após a produção de iogurte.
- Foi possível isolar partículas virais viáveis de VACV no leite de vacas imunodeprimidas reforçando a hipótese de nova replicação viral em locais distintos daquele da inoculação inicial após tratamento com imunodepressor.
- Ocorreu a redução na produção do leite assim como aumento da CCS no leite de vacas experimentalmente inoculadas com VACV-GP2.
- A redução na produção do leite e o aumento da CCS foram mais significativos nos tetos que foram inoculados com o VACV-GP2 quando comparados aos tetos que serviram de controle e, portanto não foram inoculados com o vírus, reforçando a hipótese de associação entre a presença do vírus no teto e o comprometimento da qualidade do leite.

## BIBLIOGRAFIA

1. 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.
2. 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.
3. ABRAHÃO, J.S. ; TRINDADE, G.S.; FERREIRA, J.M.S et al. Long-lasting stability of Vaccinia virus strains in murine feces: implications for virus circulation and environmental maintenance. Arch. Virol., v.155, p. 1200-1222, 2009a.
4. ABRAHÃO, J.S. e OLIVEIRA, T.M.L.O. et al. Bovine Vaccinia outbreaks: detection and isolation of Vaccinia virus in milk samples. Foodborne and Pathogens Disease, v.6, n.9, p. 1141-1146, 2009c.
5. ABRAHÃO, J.S.; DRUMOND, B. P.; TRINDADE, G. S.; SILVA-FERNANDES, A. T. et al. Rapid detection of Orthopoxvirus by Semi-Nested PCR Directly From Clinical Specimens: A Useful Alternative for Routine Laboratories. Journal of Medical Virology 82:692–699, 2010b.
6. 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, 2009d.
7. 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, 2010a.
8. ASSIS, F; ABRAHÃO, J.S. et al., Caracterização sorológica e molecular de amostras de VACV isoladas durante um surto de VB no estado do Maranhão. Sociedade Brasileira de Virologia, Congresso, 2009.
9. BARDANO, DM; RASMUSSEN, RR; LYNCH, JM. Influence of milk somatic cell count and milk age on cheese yield. Journal of Dairy Science V.74, p. 369-388, 1991.
10. BAXBY, D.; SHACKLETON, W.B. et al., Comparison of cowpox-like viroses isolated from European zoos. Brief report. Arch Virol. 1979.
11. BLACKWELL, J. H.; HYDE, J. L. Effect of heat on foot-and-mouth disease virus (FMDV) in the components of milk from FMDV-infected cows. Journal of Hygiene, v. 77(1), p. 77–83. 1976.
12. BONA, C., DEWALS, B., WIGGERS, L. et al. Pasteurization of milk abolishes bovine herpesvirus 4 infectivity: short communication. Journal of Dairy Science, v.88, n.9, p.3079-3083, 2005.
13. BRASIL Ministério da Agricultura. Decreto nº 30.691 de 29 de março de 1952. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – Riispoa.

Disponível em :<<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/servlet/VisualizarAnexo?id=14013>>. Acessado em: 02 de abril de 2009.

14. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002. Aprova os regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite tipo A, do leite tipo B, do leite tipo C, do leite pasteurizado e do leite cru refrigerado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru refrigerado e seu transporte a granel. *Diário Oficial da União*, Brasília, [Brasília, DF], 20 de setembro de 2002. Seção 1, p. 13.
15. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002. Aprova os regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite tipo A, do leite tipo B, do leite tipo C, do leite pasteurizado e do leite cru refrigerado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru refrigerado e seu transporte a granel. *Diário Oficial da União*, Brasília, [Brasília, DF], 20 de setembro de 2002. Seção 1, p. 13.
16. BRASIL. Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa n. 62, de 29 de dezembro de 2011. *Diário Oficial da União*, 30 dez. 2011. Disponível em: <<http://www.in.gov.br/visualiza/index.jsp?data=30/12/2011&jornal=1&pagina=6&totalArquivos=160>>. Acesso em: 27 jan. 2012.
17. BRATT P. N.; JACOBY, R. O. Stability of ectromelia virus strain NIH-79 under various laboratory conditions. *Laboratory Animal Science*, v.37, n.1, p.33-35, 1987.
18. BRATT P. N.; JACOBY, R. O. Stability of ectromelia virus strain NIH-79 under various laboratory conditions. *Laboratory Animal Science*, v.37, n.1, p.33-35, 1987.
19. BRUM, M.C.S.; DOS ANJOS, B.L.; NOGUEIRA, C.E.W; AMARAL, L.A; RUDI, W; FLORES, E.F. Na outbreak of orthopoxvirus-associated disease in horses in Southern Brazil. *J Vet Diagn Invest*, v. 22, p. 143-147, 2010.
20. BULLER, R. M. L.; PALUMBO, G. J. Poxvirus pathogenesis. *Microbiological Reviews*, v.55, n.1, p.80-122, 1991
21. 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, 1998.
22. BUSTIN, S. A. et al., The MIQE Guidelines: Minimum information for publication of quantitative real time PCR experiments. *Clinical Chemistry* v.55, p. 11-612, 2009
23. CALLIS, J. J; HYDE, J. L.; BLACKWELL, J. H.; CUNLIFE, H. R. Survival of foot-and-mouth disease virus in milk and milk products. *Bulletin de l'Office International des Epizooties*, v.83, n.3-4, p.183-191, 1975.
24. CAMPOS, M. A. S.; KROON, E. G. Critical period for irreversible block of Vaccinia virus replication. *Reviews of Microbiology*, v.24, n.2, p.104-110, 1993.
25. CAMPOS, R.K.; BRUM, M.C.S.; NOGUEIRA, C.E.W. 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.

26. 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.192199, 2012.
27. CORAS, B.; ESSBAUER, S.; PFEFFER, M. Cowpox and a cat. *Lancet*. v. 362, p. 446, 2005.
28. CYRKLAKK, M.; RISCO, C. et al., Cryo-electron tomography of Vaccinia virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005
29. D'ANUNCIACÃO, L.; GUEDES, M.I.; OLIVEIRA, T.M.L. et al., Filling one more gap: Experimental evidence of horizontal transmission of Vaccinia virus between bovines and rodents. *Vector Borne Zoonotic Disease*. 2011.
30. 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.
31. 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.
32. DAMON, I. Orthopoxvirus: Vaccinia (Smallpox Vaccine), Variola (Smallpox), Monkeypox and Cowpox. In: MANDELL, GL; BENNETT, JE; DOLIN, R. Principles and Practices of Infectious Diseases, 7 ed., Churchill Livingstone Elsevier, Philadelphia, 2010.
33. 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.
34. DIRKSEN, G.; GRUNDER, H. D.; Stöber, M. In: **Rosenberger: Exame clínico dos bovinos**. 3ªed. Rio de Janeiro: *Guanabara Koogan S.A*. 1993, 419p.
35. 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.
36. 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.
37. DONOFRIO, G. et al., Detection of bovine herpesvirus 4 (BoVH-4) DNA in the cell fraction of milk of dairy cattle with history of BoVH-4 infection. *Journal of Clinical Microbiology* v. 38, p. 4668-4671, 2000
38. 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 and Infection*, v.10, n.2, p.185-197, 2008.
39. 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.

40. DUBOCHET, J.; ADRIAN, M. et al., Structure of Intracellular Mature Vaccinia virus observed by Cryoelectron microscopy. *Journal of Virology*. 1993.
41. DURAFFOUR. S.; MEYER, H.; ANDREI, G. Camelpox virus. *Antiviral Res.* v.92, n.2, p.167-86, 2011.
42. EASTERDAY, B. C.; HANSON, R. P.; SIMON, J. Experimental viral bovine mastitis. *American Journal Veterinary Research*, v.20, n.78, p.819-824, 1959.
43. 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.
44. ESSBAUER, S.; MEYER, H.; PORSCHE-OZCURUMEZ, M.; PFEFFER, M. Long-lasting stability of VACV (OPV) in food and environmental samples. *Zoonoses and Public Health*, v.54, n.3-4, p.118-124, 2007.
45. ESSBAUER, S.; PFEFFER, M.; MEYER, H. Zoonotic poxviruses. *Vet. Microbiol.* v.140, p. 229-236, 2010.
46. FENNER F; WITTEK, R. DUMBELL, KR. *The Orthopoxviruses*. Academic Press, San Diego, CA, 1989.
47. FENNER, F. *The epizootic behavior of mouse-pox (infectious Ectromelia)*, 1947.
48. FENNER, F. The pathogenesis and frequency of viral infections of man. *Pharmac. Ther.* V. 4, p. 57--80, 1979.
49. FENNER, F. The pathogenesis of the acute exanthems na interpretation based on experimental investigations with mouse-pox (infectious Ectromeliaof mice), 1948.
50. FENNER, F.; HENDERSON, D. A., ARITA, I. et al. Smallpox and its eradication. Geneva: World Health Organization, 1988. p.230-243. Disponível em: <<http://whglibdoc.who.int/smallpox/9241561106.pdf>>. Acessado em: 22/01/2009.
51. 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.
52. 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, 2008a.
53. FERREIRA, J. M. S.; ABRAHÃO, J. S.; DRUMOND, B. P. et al., Vaccinia virus: shedding and horizontal transmission in a murine model. *Journal of General Virology*, v.89, pt.12, 2986-2991, 2008b.
54. FLINT, SJ; ENQUIST,LW; RACANIELLO, VR; SKALKKA, AM. *Principles of virology*. Washington, D.C., ASM Press. 2004.
55. 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.

56. GERBER, P. F.; MATOS, A. C. D.; GUEDES, M. I. M. C. Validation of an immunoperoxidase monolayer assay for total anti-vaccinia virus antibody titration. *J. Vet. Diag. Investig.*, 2012, trabalho aceito.
57. GUIDE F : environmental control smallpox virus - response plan. [s.l.]: CDC, 2003. Disponível em: <<http://www.bt.cdc.gov/agent/smallpox/response-plan/files/guide-f.doc>>. Acessado em: 2 de agosto de 2007
58. HARRIS, N. ROSALES, R; MOSS B. Transcription initiation factor activity of vaccinia virus capping enzyme is independent of mRNA guanylation. *Proc. Nat Acad Sci USA*, v.90, p. 2860-2864, 1993.
59. HERLEKAR, DA; SHASHIKANT, CS; GURJAR, AA; JAYARAO, BM. Presence of viral and bacterial organisms in milk and their association with somatic cell counts. *J. Dairy Sci.* V. 96(10), p. 6336-46. 2013.
60. HUQ, F. Effect of temperature and relative humidity on variola virus in crusts. *Bulletin of the World Health Organization*, v. 54, n.6, p. 710-712, 1976.
61. IBGE Indicadores IBGE. Estatística da Produção Pecuária. Junho de 2013. Disponível em: <[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos\\_201301\\_publicacao\\_completa.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201301_publicacao_completa.pdf)>. Acessado em 14/01/2014.
62. IKETANI, Y.; Inoshima, Y.; Asano, A. et al. Persistence of parapoxvirus infection in cattle. *Microb. Immunol.*, v.46, n.4, p.285-291, 2002.
63. JAYARÃO, B. M., DONALDSON, S. C.; STRALEY, B. A. et al. A survey of foodborne pathogens in bulk tank milk and raw milk consumption among farm families in Pennsylvania. *Journal Dairy Science*, v. 89, n.7, p. 2451-2458, 2006.
64. JAYARÃO, B. M.; HENNING, D. R. Prevalence of foodborne pathogens in bulk tank milk. *Journal Dairy Science*, v.84, n.10, p. 2157-2162, 2001.
65. KURTH, A.; STRAUBE, M. et al. Cowpox virus outbreak in banded mongooses (*Mungo mungo*) and jaguarundis with a time-delayed infection to humans. *PLoS One*. 2009
66. LANNA, M.C. (1980) Propriedades biológicas dos poxvírus 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.
67. LEARNED, L.A. REYNOLDS, M.G. et al., Extended interhuman transmission of monkeypox in a hospital community in the Republic of the Congo, 2003. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2005.
68. LEDERMAN, E.R.; REYNOLDS, M.G. et al., Extended interhuman transmission of monkeypox in a hospital community in the Republic of the Congo: evidence for Monkeypox virus exposure. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2007.
69. LEEDOM, J. M. Milk of nonhuman origin and infectious diseases in humans. *Clinical Infectious Diseases*, v.43, n.5, p. 610-615, 2006.

70. LEITE J.A.; DRUMOND B.P.; TRINDADE G.S.; Passatempo virus, a vacciniavirus strain, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* v. 12, p. 1935-1938, 2005.
71. LEJEUNE, J. T.; RAJALA-SCHULTZ, P. J. Unpasteurized milk: a continued public health threat. *Clinical Infection Diseases*, v.48, n.1, p.93-100, 2009.
72. LOBATO, Z. I. P.; TRINDADE, M. C. M.; FROIS, E. B. T. et al. Surto de varíola bovina causada pelo vírus Vaccinia na região da Zona da Mata Mineira. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.57, n.4, p.423-429, 2005
73. 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.
74. MA, X; XU, RH; ROSCOE, F; WHITBECK, JC et al., The mature virion of ectromelia virus, a pathogenic poxvirus, is capable of intrahepatic spread and can serve as a target for delayed therapy. *Journal of virology*. V. 87(12), 7046-53, 2013.
75. MACHADO, E. C.; FERREIRA, C. L. L.; FONSECA, L. M. et al. Características físico-químicas e sensoriais do queijo minas artesanal produzido na região do Serro, Minas Gerais. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.24, n.4, p.516-521, 2004.
76. MADUREIRA, M. C. Vaccinia bovina no Estado de Minas Gerais, 2005-2007. 2009, 146f. *Tese de doutorado*, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte/MG.
77. MAHNEL, H.; OTTIS, K.; MERLYN, M. Stability in drinking and surface water of nine virus species of different genera. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene*, v.164, n.1-2, p. 64-84, 1977.
78. MAIBOROBA, A. D. Experimental infection of Norwegian rats (*Rattus norvegicus*) with ratpox vírus. *Acta Virologica*, v.26, n.4, p.288-291, 1982.
79. MARENKOVA, S.S.; SELUHINA, E.M. et al.. Poxviruses isolated from clinically ill and asymptotically infected monkeys and a chimpanzee. *Bull World Health Organ.* 1972.
1. MATOS, A. C. D. Vaccinia virus: PADRONIZAÇÃO DE TÉCNICA PARA 6 IMUNODIAGNÓSTICO E ESTUDO DA RESPOSTA 7 IMUNE HUMORAL DE BOVINOS INFECTADOS 8 2012. nf. Tese (Mestrado) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG
80. MCFADDEN, G. Poxvírus tropism. *Nat Rev Microbiol*, v3, n3, p. 201-213, 2005
81. MCLENNAN A.G. Decapitation: poxvirus makes RNA lose its head. *Trends Biochem Sci.* 2007.
82. 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.
83. MEGID, J.; APPOLINÁRIO, C. M.; LANGONI, H. et al.: Vaccinia virus in humans and cattle in southwest region of São Paulo State, Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 79, n.5, p. 647-651, 2008

84. MEYER, H.; SCHAY, C. et al., Characterization of orthopoxviruses isolated from man and animals in Germany. *Arch Virol.* 1998.
85. MINAS GERAIS. Lei Estadual nº 14.185 de 31 de janeiro de 2002. Dispõe sobre o processo de produção do queijo Minas artesanal e da outras providências. Minas Gerais Diário do Executivo, de 01 de fevereiro de 2002, p.3, col. 1. Disponível em: <[http://imanet.ima.mg.gov.br/nova/gec/outros\\_documentos/14185.pdf](http://imanet.ima.mg.gov.br/nova/gec/outros_documentos/14185.pdf)>.
86. MOORE EC et al. Thermal Inactivation of Bovine Immunodeficiency Virus. *Applied and Environmental Microbiology*, V. 62 , p. 4280–4283, 1996.
87. MOSS, B. Poxviridae: The Viruses and Their Replication. In: Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.), *Fields Virology*, 5 ed. Lippincot Williams & Wilkins, p. 2905–2945, 2007
88. MUNGUBE, E. O. et al., Reduced milk production in udder quarters with subclinical mastites and associated economic losses in crossbreed dairy cows in Ethiopia. *Tropical Animal Health and Production*, v. 37, p. 503-512, 2005.
89. MURINDA, S. E.; NGUYEN, L. T.; IVEY, S. J. et al. Prevalence and molecular characterization of *Escherichia coli* O157:H7 in bulk tank milk and fecal samples from cull cows: a 12-months survey of dairy farms in east Tennessee. *Journal of Food Protection*. v.65, n.5, p.752-759, 2002
90. NAGAO, S.; INABA, S.; IJIMA, S. Langerhans cells at the sites of vaccinia virus inoculation. *Arch Dermatol Res*. V.26;256(1), p. 23-31, 1976.
91. 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.
92. OLIVEIRA, T.M.L.O.; RHEFELD, I.S.; FERREIRA J. M. S. et al. Vaccinia Virus Is Not Inactivated After Thermal Treatment and Cheese Production Using Experimentally Contaminated Milk. *Foodborne and Pathogens Disease*, v.7, n.12, 2010
93. OLIVER, S. P.; JAYARÃO, B. M; ALMEIDA, R. A. Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: food safety and public health implications *Foodborne Pathogens and Diseases*, v. 2, n. 2, p. 115-129, 2005.
94. ONTSUKA, EC; KORCZAK, B, HAMMON, HM; BLUM, JW. Real-time PCR quantification of bovine lactase mRNA: Localization in the gastrointestinal tract of milk-fed calves. *J Dairy Sci*, V. 87, p.4230-4237, 2004.
95. 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.
96. PASTORET, P. P.; VANDERPLASSCHEN, A. Poxvirus as vaccine vectors. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, v.26, n.5-6, p.343-355, 2003.
97. PELKONEN, P.M.; TARVANEIN, K. et al., Cowpox with severe generalized eruption, Finland. *Emerg. Infect. Dis.* 2003.



Pharmac. Ther. Vol. 4, p. 57--80, 1979.

98. QUIXABEIRA-SANTOS J.C. et al., Animal Movement and Establishment of Vaccinia Virus Cantagalo Strain in Amazon Biome, Brazil. *Emerging infectious diseases* 1 V. 17, P.726 - 729, 2011
99. 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
100. REHFELD, I.S. et al., Clinical, hematological and biochemical parameters of dairy cows experimentally infected with Vaccinia virus. *Research in Veterinary Science*, v. 95, p. 752-757, 2013.
101. RIVETTI, A. V. Bovina vaccinia, a systemic infection: Evidence of fecal shedding, viremia and detection in lymphoid organs. *Vet. Microbiol.* 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.09.005>.
102. RIVETTI, A.V.Jr. Patogenia do Vaccinia virus GP2 em bovinos. 2012 nf. Tese (Doutorado) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
103. ROBERTS, K.L.; SMITH, J.C. Vaccinia virus morphogenesis and dissemination. *Cell press: trends in microbiology*, v.33, n.10, p.472-479, 2008.
104. ROHRBACH, B. W., DRAUGHON, F. A.; DAVIDSON, P. M. Prevalence of *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica*, and *Salmonella* in bulk tank milk: risk factors and risk of human exposure. *Journal of Food Protection*, v. 55, p.93-97, 1992.
105. SAMBYAL D. S.; VERMA, B.B.; BAXI, K.K. A note on an outbreak of cowpox at Taran Taran, Amritsar (Punjab). *Indian Vet. J.*, 60, p. 327-328, 1983.
106. SARKAR, J. K., MITRA, A. C.; MUKHERJEE, M. K.; et al. Virus excretion in smallpox. 1. Excretion in the throat, urine, and conjunctiva of patients. *Bulletin of the World Health Organization*, v. 48, n 5, p 523-527, 1973a.
107. SARKAR, JK; MITRA, AC, MUKHERJEE MK; DE, SK ; De, S K. Virus excretion in smallpox. 2. Excretion in the throats of household contacts. *Bulletin of the World Health Organization*, V.48(5), p.523-7, 1973b.
108. SAUERBREI, A.; WUTZLER, P. Testing thermal resistance of virus. *Archives of Virology*, v.154, n.1, p.115-119, 2009.
109. 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.
110. 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.

111. SCHEPERS, J.A.; DIJKHUIZEN, A.A. The economics of mastitis and mastitis control in dairy cattle: a critical analysis of estimates published since 1970. *Preventive Veterinary Medicine*, V. 10, p.213-224, 1991.
112. SEEGERS, H. et al., Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. *Vet. Res.* V. 34, p. 475–491, 2003.
113. SELLERS, R. F. Inactivation of foot-and-mouth disease virus in milk. *British Veterinary Journal*, v.125, n.4, p.163-167, 1969.
114. SENTSU, H.; MURAKAMI, K.; INOSHIMA, Y et al. Isolation of parapoxvirus from a cow treated with interferon-gamma. *Vet Microbiol.* v.70, p.143-152, 1999.
115. SHARMA, N. et. al. Relationship of somatic cell count and mastitis: an overview. *Asian – Aust. J. Anim. Sci.*, v. 24, n.3, p.429-438, 2011.
116. SHCHELKUNOV S.N.; TOTMENIN, A.V. et al., Multiple genetic differences between the monkeypox and varíola viroses. *Dokl Biophys.* 2002.
117. SILVA, A. C.; REIS, B. B.; JUNIOR, J. E. R. R. et al.. Infecção em humanos por varíola bovina na microrregião de Itajubá, Estado de Minas Gerais: relato de caso. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* v. 41, n.5, p.507-511, 2008.
118. SILVA-FERNANDES, A. T. ; TRAVASSOS, C. E. P. F.; FERREIRA, J. M. S. F. et al. Natural human infections with Vaccinia virus during bovine vaccinia outbreaks. *Journal of Clinical Virology*, v. 44, n. 4, p. 308-313, 2009.
119. SINGH, R.K; HOSAMANI, M. et al., Buffalopox: na emerging and re-emerging zoonosis. *Anim. Health Res. Rev.* 2007.
120. SMITH, G. L.; MURPHY, B. J., LAW, M. Vaccinia virus motility. *Annual Review of Microbiology*, v. 28, n 3, p. 149-185. 2002b
121. SMITH, G.L. AND MCFADDEN, G. Smallpox: anything to declare?. *Nat. Ver. Immun.* 2002a.
122. TOMASULA, P. M.; KONSTANCE, R.P. The survival of foot-and-mouth disease virus in raw and pasteurized milk and milk products. *Journal of Dairy Science*, v.87, n.4, p.1115-112, 2004.
123. TRINDADE, G. S. Isolamento, identificação e caracterização molecular de poxvírus circulantes no Brasil. Tese de Doutorado. Belo Horizonte, UFMG, 2003a.
124. TRINDADE, G. S., DRUMOND, B. P., GUEDES, M. I. et al. Zoonotic vaccinia virus infection in Brazil: clinical description and implications for health professionals. *Journal of Clinical Microbiology*, v.45, n.4, p.1370-1372, 2007a.
125. TRINDADE, G. S.; DRUMOND, B. P.; GUEDES, M. I. M. C. et al. Zoonotic vaccinia virus: clinical and immunological characteristics in a naturally infected patient. *Clinical Infectious Diseases*, v.48, n.3, p.37–40, 2009.

126. TRINDADE, G. S.; FONSECA, F. G.; MARQUES, J. T. et al. Aracatuba virus: a vaccinia like virus associated with infection in humans and cattle. *Emerging Infectious Diseases*, v.9, n.2, p.155-160, 2003b.
127. TRINDADE, G. S.; GINNY EMERSON; DARIN, S. et al., Brazilian Vaccinia virus and their origins. *Emerging Infectious Disease*, v.13, n. 7, p. 965-972, 2007b.
128. 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. *American Journal on Tropical Medicine Hygiene*, v.75, n.3, p.486–90, 2006.
129. TRINDADE, G.d.S., 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, n.1-2, p.63-71, 2008
130. TRONCO, V.M. Manual de Inspeção para Qualidade do Leite. 4ª Ed. – Santa Maria : Ed. UFSM, 2010
131. VAN KESSEL, J. A.; KARNS, J. S.; GORSKI, L. Prevalence of Salmonellae, Listeria monocytogenes and fecal coliforms in bulk tank milk on U.S. dairies. *Journal of Dairy Science*, v.87, n.9, p.2822-2830, 2004
132. VENEABLES, C.; LYSONS, R.; HORIGAN, M. et al. Bovine immunodeficiency-like virus: inactivation in milk by pasteurization. *Veterinary Record*, v.140, n.11, p.275, 1997.
133. VIRGIN, HW. Pathogenesis of viral infection, In KNIPE, DM; HOWLEY, PM; GRIFFIN, DE; LAMB, RA; MARTIN, MA; ROIZMAN, B; STRAUS, SE (ed). *Fields virology*. 5 ed, vol 1. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA. 2007.
134. VOS J.C; SASKER, M. STUNNENBERG H.G. Vaccinia virus capping enzyme is a transcription initiation fator. *EMBO J.* v. 10, p. 2553-2558, 1991.
135. 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.
136. WELLENBERG, G. J.; VAN DER POEL, W. H. M; VAN OIRSCHOT, J. T. Viral infections and bovine mastitis: a review *Veterinary Microbiology*, v.88, n.1, p.27-45, 2002a.
137. WELLENBERG, G.J. et al., Simultaneous intramammary and intranasal inoculation of lactating cows with bovine herpesvirus 4 induce subclinical mastitis. *Veterinary Microbiolgy*, v. 86, n. 1-2, p. 115-129, 2002b
138. WELLENBERG, GJ; VERSTRATEN, ERAM; BELA, S; VERSCHUREN, SBE et al., Detection of bovine herpesvirus 4 glycoprotein B and thymidine kinase DNA by PCR assays in bovine milk. *Journal of Virological Methods*. V. 97, p. 101–112, 2001.
139. WELSH, JK; ARSENAKIS, RJ. Effect of antiviral lipids, heat, and freezing on the activity of viruses in human milk. *J. Infect. Dis.* 140:322–328, 1979.

140. YANG, Z.S.E; MARTENS, C.A.; BRUNO, D.P.; PORCELLA, S.F.; MOSS B. Expression profiling of intermediate and late stages of poxvirus replication. *Journal of Virology*, v. 85, p. 9899-9908, 2011.
141. YODER, J.D; CHEN, T. E et al., Sequence-independent acylation of the vaccinia virus A-type inclusion protein. *Biochemistry*, 2004.
142. 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.