



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO – PRPPG
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA

ROSANA LÉO DE SANTANA

**ISOLAMENTO, AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DE AMOSTRAS
DO VÍRUS ECTIMA CONTAGIOSO E MELHORAMENTO DE
TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO E DE CULTIVO “*IN VITRO*”**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciência Veterinária da Universidade Federal Rural de
Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de
Doutor em Ciência Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Soares de Castro

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Rita de Cássia Carvalho Maia

Co-orientadora: Dr^a Ana Lisa do Vale Gomes

RECIFE, PE

- 2012 -

Ficha catalográfica

S232i Santana, Rosana Léo de
Isolamento, avaliação do comportamento de amostras de vírus
ectima contagioso e melhoramento de técnicas de diagnóstico e de
cultivo *in vitro* / Rosana Léo de Santana. – Recife, 2012.
85 f. :il.

Orientador: Roberto Soares de Castro
Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) – Universidade
Federal Rural de Pernambuco. Departamento de Medicina
Veterinária, Recife, 2012.
Referência.

1. Ectma contagioso 2. ORF 3. PCR 4. Parapoxvírus
I. Castro, Roberto Soares de, orientador II. Título

CDD 636.089



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

**ISOLAMENTO, AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DE AMOSTRAS
DO VÍRUS ECTIMA CONTAGIOSO E MELHORAMENTO DE
TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO E DE CULTIVO “*IN VITRO*”**

Tese de Doutorado elaborada por
ROSANA LÉO DE SANTANA

Aprovada pela
BANCA EXAMINADORA

Professor Dr. Roberto Soares de Castro (Orientador)

Professora Dr. Rita de Cássia Carvalho Maia (Co-orientadora)
UFRPE

Professora Dr. Andrea Alice da Fonseca Oliveira
UFRPE

Professor Dr. Jean Ramos da Silva
UFRPE

Dr. Ana Karina Cunha Callado

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO-MAPA

Recife, 13 de fevereiro de 2012

**A Deus
A minha família esposo e filhas e
aos meus pais.**

AGRADECIMENTOS

A Deus pela sua infinita misericórdia, fidelidade, amor e por sua verdadeira presença em minha vida, que tem me tornado cada vez mais dependente do seu Amor.

Obrigada, aos meus familiares pelo incentivo e apoio, por sempre acreditar em mim dando força para concluir este trabalho, especialmente pelo carinho das minhas filhas Pamella Raysa Léo de Santana e Paula Raysa Léo de Santana.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Roberto Soares de Castro, pelo apoio, ensinamentos e dedicação, contribuindo para que esse momento especial de minha vida se realizasse e por sua verdadeira amizade.

A minha co-orientadora, uma pessoa especial, Prof^a Dr^a Rita de Cássia Carvalho Maia, pelo seu carinho, dedicação e amizade, contribuindo para o êxito deste trabalho.

Aos meus queridos amigos do laboratório, Maria Cecília Oliveira, Ana Cláudia Campos, Ana Lisa Gomes, Sérgio Alves Nascimento, Maria Inês Maria Rodrigues, Camila Braga, Luiz Cosme, Daniela Campinho, que me ajudaram na execução deste projeto.

SUMÁRIO

	Pág.
DEDICATÓRIA	iv
AGRADECIMENTOS	vi
SUMÁRIO	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	xii
RESUMO	xv
ABSTRACT	xviii
INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1 Etiologia	26
2.2 Epidemiologia	30
2.3 Patogenia e Imunidade	31
2.4 Sinais clínicos	33
2.5 Diagnóstico e Prognóstico	35
2.6 Diagnóstico Diferencial	37
2.7 Tratamento e controle	38
2.8 Imunoterapia	38
3. Referência Bibliográfica	40

CAPÍTULO 1

**ISOLAMENTO E AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DO VÍRUS DO
ECTIMA CONTAGIOSO EM LINHAGEM DE CÉLULAS DE CórNEA FETAL
CAPRINA (CorFC) E IDENTIFICAÇÃO PELA REAÇÃO EM CADEIA DA
POLIMERASE (PCR)**

Resumo	48
Abstract	49
Introdução	50
Material e Métodos	51
- Origem das amostras	51
- Identificação do ECV por PCR	52

- Isolamento e passagens em monocamadas celular	52
- Extração de DNA	52
- Reação em Cadeia da Polimerase-PCR	53
Resultados e Discussão	53
Conclusões	55
Referências Bibliográficas	56

CAPÍTULO 2

PADRONIZAÇÃO DE UMA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL (qPCR) PARA DIAGNÓSTICO DE ECTIMA CONTAGIOSO

Resumo	63
Abstract	64
Introdução	65
Material e Métodos	66
-Amostras	66
- Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR)	66
Resultados e Discussão	68
Conclusões	69
Referência Bibliográfica	72

CAPÍTULO 3

ESTUDO FILOGENÉTICO DE ORF VÍRUS EM PEQUENOS RUMINANTES DO NORDESTE DO BRASIL.

Resumo	75
Abstrat	76
Introdução	77

Material e Método	78
Resultados e Discussão	79
Conclusão	83
Referência Bibliográfica	83

Lista de Abreviaturas

LISTA DE ABREVIATURAS

- CAEV- Vírus da artrite encefalite caprina
- CorFC – Células epiteliais de córnea fetal caprina
- DNA – Ácido desoxirribonucléico
- EC – Ectima contagioso
- ECP - Efeito Citopático
- ECV – Vírus do ectima contagioso
- ELISA - Ensaio imunoenzimático
- EPB – Estomatite papular bovina
- FA – Febre Aftosa
- GIF – Fator inibidor do crescimento de macrófagos
- IDGA- Imuno Difusão em Gel de Ágar
- Kpb – Quilo pares de base
- MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
- MDBK – Madin and Darby Bovine Kidney
- MEM - Meio Essencial Mínimo
- mRNA – Ácido ribonucléico mensageiro
- ORF – Região aberta de leitura
- ORFV – Vírus da orf ou vírus do ectima contagioso
- OVINFR – Proteína de resistência ao interferon do vírus da orf
- PPV - Parapoxvírus
- PBS – Solução Tampão Salina
- PNEFA – Programa Nacional de Erradicação da Febre Aftosa
- PCR - Reação em Cadeia de Polimerase
- pb – pares de base
- PI - Pós-inoculação
- qPCR – Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
- RC – Rim caprino

- RNA – Ácido ribonucléico
- SFB – Soro fetal bovino
- SRD- Sem raça definida
- UI – Unidade Internacional
- UV – Luz ultravioleta
- VEGF-E – Fator de crescimento do endotélio vascular E
- vIL – Proteína ortóloga à interleucina

RESUMO

Ectima contagioso (EC) ou orf é uma doença infecto-contagiosa da pele causada pelo vírus do ectima contagioso (ECV) ou ORFV, que acomete principalmente ovinos e caprinos, e ocasionalmente o homem. Protótipo do gênero *Parapoxvirus* da família *Poxviridae*, está amplamente disseminado em todo mundo, inclusive no Brasil, especialmente na Região Nordeste, onde a caprinovinocultura é amplamente praticada para a produção de pele, carne e leite. Em Pernambuco, a doença ocorre de forma endêmica e pode ser confundida com enfermidades vesiculares, como a Febre Aftosa (FA), havendo a necessidade de diferenciação, sobretudo como suporte às ações do Programa Nacional de Erradicação da Febre Aftosa (PNEFA). Uma grande limitação no controle da doença é a dificuldade de replicação do vírus em cultivo celular, visando sua manipulação biotecnológica para a produção de vacinas. O objetivo deste trabalho é isolar e avaliar o comportamento de amostras de ECV em cultura primária de células de córnea fetal caprina, além de estabelecer um diagnóstico molecular eficiente para amostras de campo e avaliar o perfil filogenético das amostras de campo estudadas. Amostras de crostas de 22 ovinos e de sete caprinos que apresentavam sinais clínicos de EC, originários dos Estados de Pernambuco, Bahia, Sergipe e Paraíba, foram inoculadas em monocamadas de células epiteliais de córnea de feto caprino, durante sete passagens consecutivas, a intervalos semanais. Para realização do diagnóstico molecular foi utilizado para amplificação de um fragmento de 235pb do gene do envelope B2L o par de primers, PPP-3 e PPP-4 denominados pan-parapoxvirus. Observou-se em todas as passagens, a partir de 24 horas pós-infecção, efeito citopático (ECP) caracterizado pelo arredondamento celular, fusão com formação de pequenos sincícios, vacuolização e corpúsculos de inclusão citoplasmática, com intensidade de 25% a 100% de desprendimento da camada celular, que variou de acordo com a amostra viral. Concluiu-se que as culturas de células primárias de córnea fetal caprina mostraram-se altamente permissíveis à replicação do ECV e que as amostras virais isoladas mostraram-se adaptadas ao cultivo utilizado, com pequena variação entre as amostras virais, e que, a identificação viral através da PCR é um método aplicável ao diagnóstico diferencial de enfermidades vesiculares, sobretudo como suporte às ações do PNEFA, no qual caprinos e ovinos são considerados animais sentinelas. A análise filogenética mostrou que as seqüências de ORFV do Nordeste do Brasil estão altamente relacionadas entre si, com seqüências idênticas acima de 99%. Além de

apresentarem mais de 80% de identidade com seqüências de outros isolados de ORFV em todo mundo.

Termos para indexação: orf, *parapoxvirus*, ectima contagioso, PCR

ABSTRACT

Contagious ecthyma is a severe and proliferative viral disease affecting ovine and caprine species, and eventually men, caused by the contagious ecthyma virus (ECV) of the *Parapoxvirus* genus. The disease is spread worldwide, including in Brazil, where in the state of Pernambuco, due to its endemicity, can be mistaken by other vesicular diseases such as the Foot and mouth Disease, which requires its diagnostic differentiation. Meanwhile, the control of the infection in endemic regions is limited due to the difficulties in replicating the virus in cell cultures, for the development of vaccines. The purpose of this work is to evaluate the behavior of ECV samples in primary cultures of fetal caprine cornea cells, and also to establish an efficient molecular diagnostic method for field samples, and to analyze the phylogenetic profile of the virus samples studied. Crust samples from twenty-two sheep and seven goats from the states of Pernambuco, Bahia, Sergipe and Paraiba presenting the clinical symptoms of EC were inoculated in cell monolayers, during seven consecutive passages at weekly intervals. During all passages, starting at 24 hours post-infection was observed a cytopathic effect (CE) characterized by cell rounding, cell fusion with the formation of small syncytia, cytoplasmic inclusion and vacuolization. The intensity of cell detachment from the layers ranged from 25% to 100% which varied according to the viral sample. We concluded that the primary cultures of the fetal caprine cornea cell appeared highly permissible to replication of ECV and the isolated samples of ECV seemed to adapt to the utilized culture with a slight variation among samples, and the identification by PCR showed to be an applicable method to the differential diagnosis of vesicular diseases, especially to support the actions of PNEFA, where goats and sheep are considered sentinel animals. The phylogenetic analysis showed that ORFV sequences from the northeastern of Brazil are highly correlated showing identical sequences up to 99%. In addition, they present more than 80% sequence identity with other isolates of ORFV worldwide.

Keywords: orf, *Parapoxvirus*, contagious ecthyma, PCR

1. INTRODUÇÃO

A caprinovinocultura é uma atividade econômica explorada em todos os continentes. No entanto, somente em alguns países essa atividade apresenta expressão econômica, sendo, na maioria dos casos, desenvolvida de forma empírica e extensiva, com baixa produtividade e rentabilidade reduzida (NOGUEIRA FILHO E ALVES, 2002).

Como consequência da maior demanda de produtos de origem animal, e o aumento da capacidade zootécnica dos rebanhos, introduziu-se animais de raças européias e africanas e com estes, novos agentes infecciosos, o que gerou novos elementos na cadeia epidemiológica das doenças e permitiu algumas mudanças no comportamento de endemias, como o ectima contagioso (EC) (MAZUR, 1989).

A doença também é conhecida como dermatite pustular contagiosa de ovinos e caprinos, dermatite labial infecciosa, estomatite pustular infecciosa ou boqueira. A enfermidade acomete ovinos, caprinos, outros pequenos ruminantes, e pode ser transmitida para humanos através do contato direto com animais infectados, principalmente para criadores, tratadores e veterinários (ROBINSON & BALASSU, 1981, NANDI et al., 2011).

O vírus do ectima contagioso (ECV), também conhecido como orf vírus (ORFV) é o agente etiológico do ectima contagioso (EC) dos ovinos e caprinos, e pertence ao gênero *Parapoxivírus*, da família *Poxviridae*, caracterizado pelo tropismo por células epiteliais e pela alta resistência às condições ambientais, geralmente adversas para a maioria dos vírus, como o ressecamento (PASTORET e BROCHIER, 1990).

O ECV está estreitamente relacionado aos vírus da estomatite papular bovina, *pseudocowpox* e *parapoxvírus* que infectam cervídeos (HAIG & MERCER, 1998). A penetração do vírus se dá por meio de abrasões ou escarificações da pele, uma vez que a sua replicação ocorre nos queratinócitos basais (McKEEVER et al., 1988). O primeiro sinal clínico em animais acometidos pelo vírus é o aumento da espessura da pele na área de invasão do vírus, com formação posterior de pápulas, vesículas, pústulas e crostas. Lesões características são observadas na face, principalmente nos lábios, porém em casos mais severos podem ser vistos no úbere, tetas, membros, orelhas, mucosas, cauda e coroa do casco. O período de incubação em ovinos e caprinos varia de 24 a 72 horas. Cursando a enfermidade em 3 a 4 semanas, com desaparecimento das crostas e regeneração do tecido epitelial (ROBINSON e BALASSU, 1981; BUTTNER e RZIHA, 2002).

As lesões desenvolvidas na primeira infecção são severas, de caráter proliferativo e que tendem a se resolver espontaneamente dentro de seis semanas (HAIG & MERCER, 1998). Em casos de re-infecções, as lesões são evidentes, mas menos severas do que na infecção primária, e regridem em um período mais curto. Após a primeira infecção, a doença parece ocorrer periodicamente nesses rebanhos, provavelmente devido ao longo tempo de sobrevivência do vírus em crostas e nas pastagens (ROBINSON & BALASSU, 1981), e à imunidade, que é de curta duração (HAIG & MERCER, 1998).

O genoma do ECV consiste de uma molécula de DNA linear de fita dupla com aproximadamente 138 Kb que contém presumidamente 131 genes (DELHON et al., 2004). Os *Parapoxvírus* apresentam forma ovóide e a relação de guanina e citosina no genoma viral é alta, cerca de 64% (DELHON et al., 2004). O seu genoma está relacionado ao genoma de outros poxvírus e inclui uma região central, que contém genes essencialmente conservados em posição, espaço e orientação, e uma região terminal, que é variável e codifica os fatores que influenciam a virulência, a patogênese e a mudança de hospedeiro (NANDI et al., 2011).

Uma das características importantes do ECV é a sua capacidade de re-infectar e replicar repetidas vezes no seu hospedeiro (HAIG et al., 1996). Alguns fatores podem estar envolvidos neste evento, como o fato da infecção ser aguda e aparentemente restrita aos queratinócitos da epiderme, permitindo ao vírus uma replicação inicial anterior ao recrutamento dos mecanismos efetores da imunidade antiviral. A infecção viral pode não estimular uma resposta protetora; e o vírus pode ter desenvolvido mecanismos para subverter ou interferir com componentes do sistema imune. Dessa forma, a capacidade do ECV de re-infectar o mesmo hospedeiro, embora produzindo lesões menos intensas quando comparadas à infecção primária, pode estar relacionada a esses mecanismos (HAIG et al., 1996a).

O Ectima contagioso é considerado uma enfermidade benigna, entretanto, pode tornar-se grave, quando ocorre comprometimento com outros órgãos, além da pele, causando grandes perdas ao rebanho. A morbidade em animais jovens ou de rebanhos indenes pode ser alta, chegando a 100%, com a mortalidade geralmente baixa, mas que em certos casos, pode se elevar, como no caso de animais jovens, devido a infecções secundárias e manejo deficiente associados à infecção por cepas de alta virulência (ROBINSON e BALASSU, 1981; BUTTNER e RZIHA, 2002).

No Brasil o EC foi descrito pela primeira vez em São Paulo (GUIMARÃES, 1939) e posteriormente em Pernambuco (TORRES, 1943) onde foi considerado um dos principais problemas sanitários da exploração caprina, e em seguida no Rio Grande do Sul (GUERREIRO, 1954). Posteriormente, amostras do ECV foram isoladas de ovinos no Ceará (ARITA et al., 1986), e, na última década, de caprinos em Minas Gerais, Rio de Janeiro (MAZUR e MACHADO, 1990) e de caprinos e ovinos em Pernambuco (OLIVEIRA et al., 1998; SANTANA et al., 2008). Surto de doença epidérmica sugerindo a infecção por EC têm sido observados em muitos rebanhos de ovinos e caprinos em diferentes áreas geográficas do Brasil (MAZUR et al., 2000), merecendo atenção a Região Nordeste, onde a maioria dos rebanhos vem sendo explorada em sistemas extensivo ou semi-extensivo, relacionados à subsistência, com manejo alimentar e higiênico-sanitário inadequados, que propiciam o aparecimento de muitas enfermidades como o EC, considerada uma das doenças de maior frequência (BANDEIRA, 2005; ALENCAR, 2008).

Apesar do desenvolvimento da ovinocaprinocultura brasileira, do caráter endêmico da enfermidade e da sua importância, poucos trabalhos de pesquisa têm sido realizados com relação ao vírus EC, que possam subsidiar o controle da enfermidade, que se fundamenta, principalmente, na vacinação dos animais em áreas endêmicas (TORRES, 1943; ROBINSON e BALASSU, 1981; KILELU, 1992; PINTO JÚNIOR, 2007). Como não existem vacinas inativadas contra EC que sejam eficientes, a vacinação deve ser feita com vírus vivo. Por isto, só é recomendada em criações endêmicas, pois o uso da vacina implica obrigatoriamente na introdução do vírus no rebanho (PINTO JÚNIOR, 2007).

Dentre os entraves tecnológicos para a produção de vacinas, destaca-se a dificuldade de replicação do vírus em cultivo celular. Estudos *in vitro* utilizando amostras de ECV têm sido

realizados utilizando-se células de cultivo primário de testículo caprino (MAZUR e MACHADO, 1990, HOSAMANI et al., 2007), de rim caprino (OLIVEIRA et al., 1998), queratinócitos de tecido do prepúcio de cordeiros (SCAGLIARINI et al., 2005), células de linhagem contínua MDBK (OLIVEIRA et al., 1998), células de córnea fetal caprina (SANTANA et al. 2008), fibroblasto de embrião de pinto (MERCANTE et al., 2008) e células Vero (VIKOREN et al., 2008). Dentre essas linhagens podemos destacar a de células de córnea fetal caprina que apresentou permissividade a replicação contínua do vírus EC (SANTANA et al., 2008).

Por outro lado, em certos casos, o EC é uma doença que pode ser confundida com as enfermidades vesiculares, havendo assim a necessidade de sua diferenciação, sobretudo como suporte às ações do Programa Nacional de Erradicação da Febre Aftosa do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), no qual os caprinos e ovinos são considerados animais sentinelas. Para tal, é necessário dispor de um teste rápido e eficiente que a identifique. Embora estudos iniciais tenham demonstrado a utilidade da PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) como teste de diagnóstico (TORFASON E GUANADÓTTIR, 2002; GALLINA et al., 2006), ainda não há estudos sobre sua utilização envolvendo amostras brasileiras, que podem ser geneticamente diferentes das já estudadas, conforme previamente descrito em um estudo com análise de restrição (MAZUR et al., 2000) e filogenética (ABRAHAO et al., 2009). Portanto, o desenvolvimento de um método de diagnóstico molecular rápido poderá atender as necessidades para identificação precisa do agente etiológico e diferenciação frente a outros agentes.

Dessa forma, objetivou-se com este trabalho aperfeiçoar as técnicas de diagnóstico e de cultivo *in vitro* do vírus EC, bem como identificar o agente etiológico pela PCR e qPCR, além de avaliar o perfil filogenético das amostras de vírus isoladas.

2.1 Etiologia

Os ORF vírus pertencentes ao gênero *Parapoxírus* da família *Poxviridae* possuem genoma constituído por uma fita dupla de DNA linear com aproximadamente 138 Kb (MOSS, 2001; DELHON et al., 2004) conteúdo médio de G+C de 64% que contém presumidamente 131 genes, e replicam-se no citoplasma de células de hospedeiros vertebrados e invertebrados (DELLHON et al., 2004). Os membros desta família de vírus são classificados em duas subfamílias, *Chordopoxvirinae* e *Entomopoxvirinae*, em função da sua capacidade de replicação em células de hospedeiros vertebrados e invertebrados. Os poxvírus da subfamília *Chordopoxvirinae* se encontram classificados em oito gêneros: *Orthopoxvirus*, *Parapoxvirus*, *Capripoxvirus*, *Suipoxvirus*, *Leporipoxvirus*, *Avipoxvirus*, *Yatapoxvirus* e *Molluscipoxvirus* (Tabela 1), genética e antigenicamente relacionados, apresentando morfologia similar, e restrição de hospedeiros (MOSS, 2001). Cada gênero, exceto o *Molluscipoxvirus*, inclui espécies que causam doenças em animais domésticos e de laboratório. Existem poxvírus que até o momento não foram formalmente classificados. De fato, novos poxvírus estão sendo descobertos constantemente, incluindo vírus isolados de lagartos, rãs, cervos, cangurus, entre outros (MURPHY et al., 1999).

No gênero *Parapoxvirus* o vírus de ectima contagioso ou ORF vírus, é um dos principais representantes deste gênero. O ECV é envelopado apresentando-se com morfologia ovóide e diâmetro entre 140-170 x 200-300 nm (PASTORET e BROCHIER, 1990) (Figura 1).

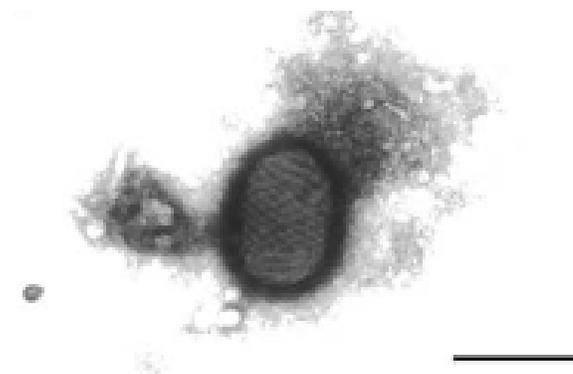


Figura 1 – Micrografia eletrônica de uma partícula de *ORF vírus* com tamanho de 100nm, ressaltando sua morfologia ovóide característica (CHAN et al., 2007).

Tabela 1 – Aspectos taxonômicos, hospedeiros e distribuição geográfica dos oito gêneros da família *Poxviridae*, subfamília *Chordopoxvirinae* (Adaptado de Fernandes, 2004)

Gênero	Espécie, abreviação e nomes alternativos	Hospedeiros	Distribuição geográfica
<i>Orthopoxvirus</i>	<i>Camelopox virus</i> (CMPV)	Camelos	África e Ásia
	<i>Cowpox virus</i> (CPXV)	Roedores, felinos, bovinos, animais de zoológico e humanos	Europa e Ásia Ocidental
	<i>Ectromelia írus</i> (ECTV) <i>Mousepox vírus</i>	Camundongos	Europa
	<i>Monkeypox virus</i> (MPXV)	Roedores, primatas, humanos	África Central e Ocidental
	<i>Raccoonpox virus</i> (RCNV)	Guaxinins	Leste dos EUA
	<i>Skunkpox virus</i> (SKPV)	Gambás	Oeste dos EUA
	<i>Taterapox virus</i>	Gerbils	África Ocidental
	<i>Uasin Gishu disease virus</i> (UGDV)	Equínos	África Central
	<i>Buffalopox virus</i> (BPVX)	Búfalos, bovinos, humanos	Índia
	<i>Rabbitpox virus</i> (RPXV)	Coelhos	EUA e Holanda
	<i>Vaccinia virus</i> (VACV)	Humanos, coelhos, bovinos, búfalos, suínos	Mundial
	<i>Cantagalo virus</i> (CTGV)	Bovinos, humanos	Brasil
	<i>Variola vírus</i> (VARV)	Humanos	Mundial (erradicada)
	<i>Volepox virus</i> (VPXV)	Ratos silvestres	Oeste dos EUA
<i>Parapoxvirus</i>	<i>Bovine papulas stomatitis vírus</i> (BPSV)	Bovinos, humanos	Mundial
	<i>Orf virus</i> (ORF), <i>Contagious pustular dermatitis virus</i> , <i>Contagious ecthyma vírus</i>	Ovinos, caprinos, bovinos, cervos, humanos	Mundial
	<i>Pseudocowpox virus</i> (PCPV), <i>Milker's nodule virus</i> , <i>Paravaccinia vírus</i>	Bovinos, humanos	Mundial
	<i>Sealpox virus</i>	Focas, humanos	Mundial
	<i>Auzduk disease virus</i> , <i>Camel contagious ecthyma vírus</i>	Camelos	África e Ásia

Tabela 1 cont.– Aspectos taxonômicos, hospedeiros e distribuição geográfica dos oito gêneros da família *Poxviridae*, subfamília *Chordopoxvirinae* (Adaptado de Fernandes, 2004)

Gênero	Espécie, abreviação e nomes alternativos	Hospedeiros	Distribuição geográfica
<i>Capripoxvirus</i>	<i>Sheeppox virus</i> (SPPV)	Ovinos	África e Ásia
	<i>Goatpox virus</i> (GTPV)	Caprinos	África e Ásia
	<i>Lumpy skin disease virus</i> (LSDV)	Bovinos	África
<i>Suipoxvirus</i>	<i>Swinepox virus</i> (SWPV)	Suínos	Mundial
<i>Avipoxvirus</i>	<i>Fowlpox virus</i> (FWPV)	Aves, humanos	Mundial
<i>Leporipoxvirus</i>	<i>Myxoma virus</i> (MYXV)	Leporinos	América do Sul
	<i>Hare fibroma virus</i> (FIBV)	Lebres	Europa
	<i>Shope fibroma virus</i> (SFV), <i>Rabbit fibroma virus</i>	Coelhos	EUA e Holanda
<i>Yatapoxvirus</i>	<i>Tanapox virus</i> (TANV)	Roedores, humanos	África Central e Oriental
	<i>Yaba monkey tumor virus</i> (YMTV)	Primatas, humanos	África Ocidental
<i>Molluscipoxvirus</i>	<i>Molluscum contagious virus</i> (MOCV)	Humanos	Mundial

O ECV apresenta tropismo por células epiteliais sendo, normalmente, adquirido por abrasões nas porções deslanadas na pele (ROBINSON e BALASSU, 1981).

O genoma dos poxvírus, incluindo o do ECV, é organizado em uma região central conservada, flanqueada por regiões terminais variáveis (MOSS, 2001; DELHON et al., 2004; MERCER et al., 2006). A região central do genoma contém genes homólogos e conservados entre os poxvírus (*ORFV009* à *ORFV111*), e os produtos desses genes participam de mecanismos básicos de replicação, estrutura e morfogênese (MOSS, 2001; DELHON et al., 2004; MERCER et al., 2006). Em contrapartida, as regiões terminais variáveis do genoma (*ORF001* à *ORFV008* e *ORFV112* à *ORFV134*) representam aproximadamente 20% do genoma e codificam produtos potencialmente envolvidos na patogênia e no sistema imune do hospedeiro (NANDI et al., 2011). É geneticamente relacionado ao Parapoxvírus causador da Estomatite Papular Bovina e do

Nódulo dos Ordenhadores em bovinos e humanos, respectivamente (DELHON et al., 2004), é imunologicamente distinto do vírus da vaccínia, e semelhante ao agente causador da pseudovariola, e antigenicamente semelhante ao vírus da varíola caprina (ROBINSON e MERCER, 1988). A cepa que apresenta um maior número de informações de sua biologia molecular é a NZ2, uma cepa isolada na Nova Zelândia. Estudos de biologia molecular concluíram que ocorre predominância de guanina e citosina no DNA viral, de 64%, e que o seu genoma apresenta um tamanho que varia de 139 a 160 quilopares de base (kpb), sendo estreitamente relacionado ao genoma de outros poxvírus (DELHON et al., 2004).

A heterogeneidade do genoma entre espécies de Parapoxvírus e até entre cepas de uma mesma espécie já foi demonstrado, e estudos recentes para análise do genoma e identificação de seus genes, construção de mutantes bem como para a geração de vírus EC recombinante têm sido realizados. O conhecimento acerca do genoma do vírus EC e a identificação dos genes de virulência devem facilitar a seleção de componentes virais indutores de reações imunes, que não sofram influência das proteínas virais de neutralização e que sejam necessários para a proteção vacinal (BUTTNER e RZIHA, 2002).

Diversos genes codificam proteínas envolvidas no mecanismo de evasão do sistema imune do hospedeiro, como a proteína de resistência ao interferon (OVINFR), o fator inibidor do crescimento de macrófagos (GIF), o fator de crescimento endotelial e vascular (VEGF-E), a proteína de ligação à heparina e citocinas, e a proteína ortóloga à interleucina-10 de mamíferos (vIL-10), são encontrados na região terminal do genoma viral (DELHON et al., 2004).

Genes da região terminal do genoma também codificam fatores com papel importante na interação entre o vírus e seus hospedeiros, determinando o espectro de hospedeiros e modulando resposta do hospedeiro para infecção, porém não essencial para o crescimento em cultivo celular (CHAN *et al.*, 2007).

O gene B2L reside no fragmento BamHI B da cepa NZ2 e codifica uma proteína do envelope viral de 42 kDa. O tamanho do gene B2L compreende 1206 pb. O gene B2L está localizado na região 011 sendo conservado em cepas diferentes. Esse gene tem sido o mais usado para detecção do ECV pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (CHAN *et al.*, 2007).

Os poxvírus constituem-se em uma exceção entre os vírus DNA, uma vez que o processo replicativo ocorre no citoplasma das células infectadas (MOSS, 2001). Os poxvírus codificam todas as enzimas necessárias para a transcrição e replicação do genoma viral, e empacotam nos

vírions as enzimas essenciais para a produção e modificação dos RNAs mensageiros (mRNA) para a síntese de suas proteínas no início do ciclo replicativo (CANAL, 2007).

2.2 Epidemiologia

O EC ocorre em caprinos e ovinos, estando mundialmente distribuído, em qualquer região onde se criem essas espécies, determinando queda na produção e perda econômica. Ocorre comumente em animais com três a seis meses de idade, embora animais com 10 a 12 dias de idade e adultos possam ser gravemente acometidos (RADOSTITS et al., 2002). Pode acidentalmente infectar humanos, bovinos e ruminantes selvagens e, raramente os cães (ESPOSITO e FENNER, 2001). O ECV é relativamente termo-estável, sendo completamente inativado a 60°C por trinta minutos (ROBINSON e BALASSU, 1981), a 37°C por sete dias e pela radiação ultravioleta (LOSOS, 1986). O congelamento não reduz o título viral, entretanto, temperaturas entre 0,5 e 36°C, por uma semana, reduzem sua infectividade. O ECV em solo sombrio retém infectividade por vários anos (NANDI et al., 2011).

Os surtos podem ocorrer em caprinos e ovinos, com taxas de morbidade que se aproximam de 100% e mortalidade de 5 a 15% (HOUSAWI et al., 1991). As mortes quando ocorrem são devido à extensão das lesões no trato respiratório, podendo alcançar 15% se os animais acometidos não receberem as medidas de manejo higiênico-sanitárias adequadas, ou se ocorrerem infecções secundárias e miíases cutâneas. As lesões primárias em animais ou humanos causam maior morbidade do que as lesões adquiridas pela re-infecção (ESPOSITO e FENNER, 2001). Os animais recuperados permanecem com imunidade sólida por dois a três anos, porém os anticorpos passivos não protegem as crias, pois os animais recém-nascidos de mães imunes são susceptíveis ao ECV (ROBINSON e BALASSU, 1981).

A disseminação em um rebanho é muito rápida e ocorre pelo contato com outros animais acometidos ou por objetos inanimados, como aplicadores de brincos e emasculadores, resultando em lesões nas caudas (RADOSTITS et al., 2002), ou por exposição a cochos contaminados (MURPHY et al., 1999). Admite-se que a infecção natural e experimental, pelo ECV se dá pela invasão do vírus através da pele lesionada, escarificada por plantas e/ou espinhos. O vírus é eliminado pelos exsudatos das pústulas e vesículas e pelas crostas já secas. O vírus pode permanecer virulento nos pastos e estábulos durante anos, devido a sua capacidade de

conservação nas crostas, especialmente durante o período seco; infecção natural do ECV entre ovinos e caprinos pode ocorrer, mas a transmissão experimental entre estas espécies pode não obter sucesso (RADOSTITS et al., 2002; NANDI et al., 2011).

Os ovinos são susceptíveis à re-infecção e a infecções crônicas. Estas características somadas à resistência viral, explicam como o ECV, uma vez introduzido em um rebanho, torna-se difícil de ser erradicado (MURPHY et al., 1999). A persistência do vírus nos rebanhos é própria e em grande parte relacionada ao caráter infeccioso persistente de vírions em crostas de feridas que caem sobre a pastagem e o solo (FENNER et al., 1988).

A estimativa da soroprevalência da infecção pelo ECV nos rebanhos é prejudicada pelo fato do vírus induzir baixos níveis de anticorpos neutralizantes, não sendo de fácil detecção em testes de soroneutralização (HAIG & MERCER, 1998). Por esse motivo, a prevalência tem sido estimada com base em relatos da ocorrência da doença em rebanhos (RIBINSON e BALASSU, 1981).

2.3 Patogenia e Imunidade

A lesão da pele é essencial para o estabelecimento da infecção pelo ECV e para o desenvolvimento de lesões típicas (ROBINSON e BALASSU, 1981). Após o desafio viral da pele com abrasões moderadas, o vírus não se estabelece na epiderme lesada, replicando-se nas células da camada epidérmica basal derivada das paredes dos folículos pilosos. A infecção dissemina-se lateral e uniformemente a partir da nova epiderme, inicialmente no estrato espinhoso mais externo e, subsequentemente, por toda a profundidade da epiderme. A reação cutânea consiste em resposta celular com necrose e esfalecimento da epiderme acometida bem como o estrato papilar subjacente da derme. Esta resposta cutânea consiste em reação de hipersensibilidade tipo tardio e influxo de células inflamatórias envolvendo neutrófilo, basófilos, e possivelmente, mastócitos. Células dendríticas de classe II também estão envolvidas e parecem formar a base de um mecanismo de defesa dérmica local altamente integrada. As lesões envolvem todos os estágios de mácula, pápula, vesícula, pústula, formação de crosta e cura. As

pústulas desenvolvem-se em poucos dias e rompem-se, resultando em úlceras, e, subsequentemente, na formação de crosta espessa, que é eliminada em três a quatro semanas, não deixando cicatriz (McKEEVER et al., 1988).

Os locais mais comuns de infecção são ao redor da boca e narinas (HAIG et al., 1997). Lesões características são frequentemente observadas na face, porém em casos mais severos, outras partes do corpo podem apresentar lesões como: úbere, tetos, membros, orelhas, mucosas, cauda e coroa do casco (BOUGHTON e HARDY, 1932; COATES e HOFF, 1990; HOUSAWI e ABU ELZEIN, 1991).

As lesões de re-infecção progridem pelos mesmos estágios clínicos, mas geralmente não são proliferativas, são menores e se resolvem mais rapidamente, usualmente em duas a três semanas, o que é indicativo do envolvimento de uma resposta imune específica no controle da replicação viral. A resposta imune específica é capaz de conter a replicação viral, mas não é eficaz por um período crítico de alguns dias pós-reinfecção durante o qual o vírus pode se replicar e se disseminar no ambiente (HAIG et al., 1997).

Os ovinos desenvolvem uma resposta imune celular, graças às células T CD4⁺ helper e humoral, com formação de anticorpos anti-ECV específicos, após a infecção (HAIG et al., 1996a, 1996b; LLOYD et al., 2000), porém esta imunidade é curta e a re-infecção pode ocorrer, com sinais clínicos discretos e que desapareceram rapidamente (HAIG e MERCER, 1998). Segundo Haig et al. (1997), o que deve ser esperado após a infecção é uma resposta inflamatória e imune anti-viral, que começa pela ativação celular mediante a liberação de citocinas, como por exemplo citocinas mRNA.

A resposta imune a re-infecção foi estudada em alguns animais por Haig et al. (1996b), visando estabelecer a dinâmica local *in vivo* das células envolvidas no processo, anticorpos e citocinas, a partir da drenagem linfática aferente e eferente de nódulos linfáticos, localizados próximos das lesões da pele; foi observado que a linfa aferente de ovinos adultos contém células T CD4⁺, T CD8⁺, células B e 5 a 15% de células apresentadoras de antígeno; a linfa eferente contém mais de 98% de linfócitos, a maioria dos quais são células T CD4⁺ e células B, as células T CD8⁺ participam com aproximadamente 10 a 20%, dos quais mais de 90% são derivados do sangue, e 10% restantes de linfócitos eferentes são derivados da linfa aferente (HAIG et al., 1997). Segundo Bujdoso et al. (1989) o primeiro pico da resposta imune, em casos de re-

infecção, seria contra um antígeno de memória do ECV, e o segundo, em resposta a replicação viral na pele, que ocorre entre três e nove dias pós-infecção.

Ha várias razões possíveis pelas quais o vírus EC pode re-infectar repetidamente ovinos e se replicar. Primeiramente, a infecção é aguda e aparentemente restrita aos queratinócitos da epiderme *in vivo*. Segundo, a infecção viral pode não estimular uma resposta protetora adequada. Finalmente, o vírus EC pode ter desenvolvido mecanismos para subverter ou interferir com os componentes da resposta imune protetora, como foi demonstrado para outros poxvirus (HAIG, 2001).

2.4 Sinais clínicos

Os sinais clínicos iniciais de ectima contagioso incluem pápulas, vesículas, pústulas cutâneas e crostas, sendo o período de incubação, de três a oito dias ou aproximadamente uma semana (BARRAVIEIRA, 2005). Formam-se rapidamente crostas amarronzadas a pretas, espessas, mais evidentes nas comissuras labiais. As lesões podem se espalhar para a cavidade oral, focinho, orelhas, pálpebras, tetos e patas. Pode ocorrer mastite em decorrência do comprometimento do sistema de defesa do úbere. Tipicamente as lesões se curam em 14 a 21 dias, porém podem persistir em animais imunodeprimidos. Cordeiros lactentes podem disseminar a infecção ao úbere de ovelhas suscetíveis. Em cordeiros, as lesões orais podem ser graves o suficiente para causar anorexia, perda de peso, desidratação e desnutrição, levando a importantes perdas econômicas (ZAMRI-SAAD, KARIM, AJEELI, 1992). As lesões que atingem a banda coronária podem provocar claudicação, ao passo que as lesões do úbere podem resultar em mastite. Raramente há o comprometimento dos sistemas respiratório e gastrointestinal. Nesses casos podem ocorrer pneumonia e diarreia. É comum a instalação de infecção bacteriana secundária (PUGH, 2005), ou por fungos, como por exemplo, o *Fusobacterium necrophorum*; podendo haver também invasão sistêmica se estendendo para o trato alimentar e traquéia ocasionando gastroenterite e broncopneumonia (RADOSTITS et al., 2002; NANDI et al., 2011).

As lesões orais envolvem a língua, gengivas, coxim dentário ou uma combinação desses locais, em alguns casos extensas lesões dolorosas e proliferativas ocorrem nas margens gengivais dos dentes incisivos e no interior da boca (RADOSTITS et al., 2002).

Na forma podal, que aparece simultânea ou independentemente da forma labial, são observadas lesões cutâneas similares na borda da falange média dos cascos, a altura da articulação do boleto e no espaço interdigital. As partes distais das extremidades ficam quentes e dolorosas, e as vesículas e crostas sofrem infecções bacterianas secundárias, transformando-se em panarícios e pododermatite necrótica (BARRAVIERA, 2005).

Na forma genital aparecem pústulas, erosões e crostas na face interna das coxas, e especialmente na época da lactação pode aparecer mamite gangrenosa. As lesões podem afetar também a pele da região inguinal, vulva, ânus e prepúcio, membros e cauda (NOBREGA et al., 2008). As lesões no úbere podem resultar no abandono da prole e lesões nos cascos podem causar claudicação transitória (NANDI et al., 2011).

Em ovinos pode ser observada uma forma maligna da doença, que se inicia com um episódio agudo, manifestado por vesículas bucais e extensão dessas lesões para o trato gastrointestinal, seguidas por lesões granulomatosas e desprendimento dos cascos. Nos carneiros as lesões do escroto podem ser acompanhadas por acúmulo de líquido no saco escrotal. Nos casos benignos, as crostas secam e caem, e a recuperação fica completa em cerca de três semanas (RADOSTISTS et al., 2002).

Em caprinos da raça Boer a infecção é manifestada de forma mais severa com dermatite proliferativa multifocal acompanhada de pneumonia crônica, artrite e moderada para severa linfadenopatia (NANDI et al., 2011).

A infecção experimental de um caprino, com um mês de idade e sem raça definida (SRD), sem histórico de EC, foi realizada por Oliveira et al. (1998) para a observação da evolução das lesões macroscópicas da enfermidade, e foi observado que 48 horas após a inoculação (p.i.), o animal desenvolveu lesões difusas na área da inoculação, como edema, múltiplos pontos arredondados, salientes e avermelhados, além do espessamento da pele. As lesões progrediram dando origem a vesículas no quarto dia pós-inoculação, que apresentavam, na superfície, pontos esbranquiçados. As pústulas foram observadas no quinto dia p.i. (pós-infecção), aumentaram de tamanho e romperam-se entre o nono e o 11º dia p.i., dando origem a exsudação serosa e emaciação da região. No 16º dia p.i., o início da formação das crostas foi observado simultaneamente com o surgimento de novas pústulas. No 23º dia p.i., lesões pustulares e crostas foram observadas na comissura labial. No 35º dia p.i., constatou-se a regressão das lesões na região de inoculação e regeneração do tecido epitelial.

2.5 Diagnóstico e Prognóstico

O diagnóstico de EC é baseado na história do paciente e nos sinais clínicos que o mesmo apresenta, sendo confirmado pelos exames laboratoriais (RADOSTITS et al., 2002).

A identificação de uma infecção ativa é realizada pela detecção de vírions característicos no material da lesão, utilizando a microscopia eletrônica, onde as partículas virais características de *parapoxvírus* apresentam forma de amora (SHATZMAYR et al., 2006). Pode ser realizado ainda, o isolamento viral em cultivo celular, imunofluorescência direta e a reação em cadeia da polimerase (PCR). Os testes sorológicos empregados são: imunodifusão em gel de agar (IDGA), soroneutralização, fixação de complemento, inibição da hemaglutinação, imunofluorescência indireta e ensaios imunoenzimáticos (ELISA e *western blotting*) (FERNANDES, 2004).

A dificuldade de cultivo celular permissível a replicação contínua do vírus EC tem levado a comercialização no Brasil de vacina obtida a partir da suspensão de crostas de animais infectados, que apresenta sério risco de disseminação de outras doenças, principalmente virais, já que a vacina não é inativada (PINTO JUNIOR, 2007).

Diversas técnicas moleculares tem sido usadas para caracterização de *parapoxvírus*, Inoshima et al. (2000), relata protocolo de PCR para diagnóstico de infecção por *parapoxvírus*; os primers foram desenhados baseados na sequência do gene B2L do ORFV da cepa NZ2 que apresenta um maior número de informações de sua biologia molecular, cepa isolada na Nova Zelândia (DELHON et al., 2004). A Reação em Cadeia da Polimerase é reconhecida como um método de diagnóstico molecular estável, rápido e sensível para a detecção de ácidos nucleicos e pode ser utilizada mesmo quando a disponibilidade de amostra é pequena. A PCR identifica animais verdadeiramente infectados e não apenas soropositivos (NITSCHKE et al., 2006).

A PCR reproduz laboratorialmente o processo de replicação natural de DNA, o que somente é possível devido à descoberta do *Thermus aquaticus*, uma espécie de bactéria que sobrevive em altas temperaturas em termas naturais. Desta bactéria extrai-se uma DNA polimerase a Taq DNA polimerase, capaz de resistir aos agressivos ciclos térmicos usados durante a realização da PCR (ANDRADE, 1993).

O prognóstico geralmente é favorável, a doença é benigna e espontaneamente curável, entretanto, há casos graves em que o prognóstico é reservado (RADOSTITS, 2002).

Na maior parte dos surtos de EC, os casos são moderados e não denotam preocupação real, entretanto, casos graves podem também ser confundidos com a língua azul, a dermatose ulcerativa, dermatite micótica, febre aftosa, eczema facial, dermatite proliferativa ou com a varíola ovina (BHANUPRAKASH et al., 2006), sendo necessária a realização do diagnóstico diferencial.

A PCR convencional utiliza como modelo fragmentos de DNA representados pelos *primers* PPP1/PPP4. Esses primers amplificam um fragmento interno do gene do envelope B2L, resultando em um produto de 594 pares de bases. Outro fragmento de DNA que pode ser utilizado é o primer PPP3, que é utilizado em conjunto com o PPP4, resultando em produto amplificado com 235 pares de bases (GALLINA *et al.*, 2006). O gene B2L é um fragmento da cepa NZ2 e codifica uma proteína do envelope viral (SULLIVAN *et al.*, 1994).

A PCR em tempo real (qPCR) é uma tecnologia baseada em fluorescência, realizada em um sistema fechado, na qual a amplificação e a detecção de DNA ocorrem em um único tubo ou poço, o qual permanece fechado durante todo o processo, minimizando o risco de contaminação. (BANKOWSKI e ANDERSON, 2004).

A PCR convencional ocorre em 3 fases: desnaturação, anelamento ou hibridização e extensão. Na desnaturação ocorre a separação da fita dupla do DNA em duas fitas únicas, promovida por elevação da temperatura. No anelamento ou hibridização, se dá a demarcação das extremidades do DNA de interesse nas duas fitas resultantes da fase anterior. A polimerase necessita de um fragmento de DNA previamente ligado na região escolhida com antecedência, iniciador ou primer. Primers são pequenos fragmentos de DNA de fita simples sintetizados *in vitro* a partir de uma sequência de oligonucleotídeos previamente conhecida. Somente haverá amplificação de DNA se houver hibridização do primer com um segmento do DNA da amostra, o que confere especificidade à reação. A extensão é iniciada quando o primer já se encontra ligado aos segmentos complementares. A polimerase liga os nucleotídeos entre si, completando a fita simples e transformando-a em dupla, promovendo sua extensão. Atualmente este procedimento é totalmente automatizado em um aparelho denominado termociclador, programado para ajustar tempo, temperatura e número de ciclos específicos para o objetivo que se pretende alcançar (ANDRADE, 1993).

A reação de qPCR, PCR quantitativa ou PCR em Tempo Real é realizada em termociclador em tempo real trabalhando através de dois sistemas de detecção de sequências: o

sistema TaqMan® (também conhecido como “ensaio para nuclease 5’ fluorescente”), que utiliza sonda fluorescente; e o sistema do corante Sybr Breen I, que utiliza o corante Sybr Green I, possuindo ligação altamente específica ao DNA de dupla fita, e utiliza o corante ROX como referência passiva. Os produtos da qPCR puderam ser detectados com a análise da curva de dissociação ou “melting”, realizada posteriormente após a corrida da PCR (BANKOWSKI e ANDERSON, 2004). Vários protocolos para otimização da qPCR poderão ser utilizados até a obtenção de resultados capazes de diagnosticar ECV em lesões de origem animal.

O desenvolvimento de uma PCR como método de diagnóstico molecular para detecção do vírus EC atende a demanda por um teste rápido e sensível para diagnóstico da doença (GALLINA et al., 2006).

2.6 Diagnóstico diferencial

Na Febre Aftosa (FA), sua transmissibilidade é extremamente alta entre os animais, como bovinos, caprinos, ovinos, suínos e outros biungulados selvagens. Os sinais clínicos são precedidos por apatia, febre, e anorexia. As lesões vesiculares podem ser observadas na cavidade oral, língua, narinas, bandas coronárias e tetas; salivação excessiva e descarga nasal são observadas, sua principal via de transmissão é através de aerossóis, ao contrário do EC que sua transmissão se dá exclusivamente através do contato direto ou indireto por fômites e, principalmente, por pastagens contaminadas (RIEDER & BRUM, 2007).

Nos casos de língua azul ocorre elevada taxa de mortalidade, reação sistêmica grave, e as lesões ocorrem no focinho, na coroa dos cascos e de forma extensa na mucosa bucal, sendo mais comum nos adultos do que nos cordeiros lactentes. Como é transmitida por vetores (insetos hematófagos), a taxa de morbidade é menor do que a observada nos casos de EC (BHANUPRAKASH *et al.*, 2006). A dermatite micótica geralmente ocorre na pele lanosa; o eczema facial é distinguido do EC pela presença de dermatite difusa bem como edema grave e lesão das orelhas. As lesões da dermatite proliferativa, também conhecida como podridão do pé em formato de morango, ocorrem apenas nas partes inferiores dos membros; já nos casos de varíola ovina, embora o quadro clínico se apresente bastante semelhante aos causados pelo ECV, as crostas formadas são típicas, duras, ocorrendo comprometimento sistêmico, acompanhado de alta taxa de mortalidade (RADOSTITS et al., 2002).

2.7 Tratamento e controle

O tratamento é paliativo, pois não há drogas específicas (SCAGLIARINI, 2006), a excisão das crostas pode acelerar o processo de resolução (SHELLEY e SHELLEY, 1983). Nos casos de lesões muito graves deve ser realizada a administração oral de fluídos e nutrientes. A aplicação de substâncias adstringentes pode acelerar a recuperação, e nos casos em que houver complicação secundária, recomenda-se tratamento com antibiótico de amplo espectro (PUGH, 2005).

Diante de um surto deve-se implementar medidas de controle imediatas, com isolamento dos animais enfermos. Entretanto, essas medidas, isoladamente, podem não ser efetivas na prevenção do EC por causa do curto período de incubação e a capacidade de sobrevivência do vírus no ambiente (PUGH, 2005). A vacinação é recomendada apenas em regiões endêmicas, nos animais susceptíveis (BERRIER, 2001).

Por ser uma zoonose altamente contagiosa, é fundamental, que pessoas que trabalhem com animais infectados adotem medidas higiênicas durante o manejo dos animais (PUGH, 2005).

2.8 Imunoterapia

A vacina contra EC utiliza microorganismos completamente virulentos (Tabela 2) sendo que esta vacina não previne a doença, diminuindo a gravidade e a duração da mesma, estando indicada na imunização ativa de ovinos e caprinos, para prevenir ou minimizar a gravidade de um surto (PINTO JÚNIOR, 2007).

Há disponibilidade de vacinas comerciais que requerem a aplicação na superfície do epitélio escarificado, da axila, virilha, região interna da coxa (exceto em ovelhas lactantes), porção ventral da cauda ou da orelha, e devem ser utilizadas de acordo com a recomendação do fabricante, pois a dose adequada é fundamental para aperfeiçoar a imunização. As vacinas são preparações de vírus vivo, provenientes diretamente de crostas virulentas ou, de vírus replicado em cultura celular (NETTLETON et al., 1996). Após a vacinação, ocorre uma reação local em cerca de 1 a 3 dias, sendo necessárias duas a três semanas para se obter uma resposta imunológica adequada (LUGINBUHL e ANDERSON, 1914). A imunidade se instala ao longo de três

semanas e pode persistir por até dois anos. Essas vacinas não são recomendadas para rebanhos livres da doença porque o vírus vacinal permanece viável no ambiente por longo período (BERRIER, 2001).

Análises filogenéticas indicam que ovelhas e cabras possuem cepas virais de ectima contagioso agrupadas em diferentes ramificações na árvore genética, razão pela qual é provável que vacinas preparadas com cepas virais de ectima contagioso isoladas de ovelhas não protegem efetivamente cabras. Estudo realizado recentemente revelou que cepas virais de ectima contagioso isoladas de cabras são mais heterogêneas que cepas virais de ovelhas, indicando a necessidade no preparo de vacinas com cepas virais isoladas de cabras para administração em cabras (MUSSER et al., 2008).

A produção da primeira vacina viva atenuada em cultivo celular realizada por Mayr (1981) foi um importante passo para a obtenção de geração de vacinas melhores definidas e seguras (BUTTNER e RZIHA, 2002). Outras vacinas têm sido desenvolvidas através de cultivo celular (NETTLETON et al., 1996).

As vacinas devem ser aplicadas com cuidado para evitar a contaminação de propriedades não infectadas e os animais vacinados devem ser isolados do lote não protegido, até a queda das crostas (AIELLO, 1998). Os animais vacinados desenvolvem lesões de aproximadamente 2 mm (BUDDLE *et al.*, 1984) características da infecção pelo vírus EC. Inicialmente é observado um intenso eritema ao longo das linhas de escarificação, seguido pelo desenvolvimento de vesículas, pústulas e crostas (NETTLETON *et al.*, 1996). Há variação entre os cordeiros e cabritos vacinados, mas geralmente, o eritema é mais evidente entre 2 e 8 dias após a vacinação, vesículas e pústulas após 9 a 14 dias e as crostas são mais proeminentes entre 15 e 24 dias (NETTLETON *et al.*, 1996).

Em rebanhos onde a doença se manifesta de forma endêmica, a vacinação de animais com dois ou três dias de idade pode minimizar a gravidade do surto, que em cordeiros podem estar associados à realização da caudectomia (PUGH, 2005). Em adição, população de animais que são protegidos pela vacinação minimizaria o risco de transmissão do ECV para o homem (BUTTNER e RZIHA, 2002).

Tabela 2 – Esquema de vacinação para o ectima contagioso em caprinos e ovinos

Categoria animal	Condições	Esquema de vacinação	Período
Cordeiros e Cabritos; Matrizes (terço final da gestação)	Rebanhos onde já surgiu a doença; ou naqueles em que ocorreu introdução de novos animais; ou quando do envio de animais a exposição	Autovacina, dose única repetindo-se nas matrizes na próxima parição	Semestralmente

Fonte: PINTO JÚNIOR (2007) adaptado de Silva et al. (2001).

A vacinação das matrizes deve ser realizada no terço final da gestação, embora não ocorra uma boa transferência de anticorpos pela placenta, e as mães vacinadas transmitem imunidade a suas crias via colostro. Por ser a imunidade passiva de curta duração, é necessário vacinar os cordeiros e cabritos nos primeiros dias de vida (LUGINBUHL e ANDERSON, 2008).

Referências Bibliográficas

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAO, J. S.; CAMPOS, R. K.; TRINDADE, G. S.; GUEDES, M. I. M.; LOBATO, Z. I. P.; MAZUR, C.; FERREIRA, P. C. P.; BONJARDIM, C. A. e KROON, E.G. Detection and phylogenetic analysis of Orf virus from sheep in Brazil: a case report. **Virology Journal**. v. 6, n. 47, 2009.

AIELLO, S. E.: Editor. Contagious ecthyma. **The Merck Veterinary Manual**. 8 edition. Merck & Company, 1998.

ALENCAR, S.P. **Aspectos sócio-econômicos e sanitários dos rebanhos caprinos e ovinos no Sertão de Pernambuco**. 2008. 121f. Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2008.

ANDRADE, L. E. C. Principios de biologia molecular e suas aplicacoes em medicina. **Revista da Associação Médica do Brasil**. v. 39, p. 175 – 186, 1993.

ARITA, G.M.M.; CAPELLARO, C.E.M.P.M.; DEAK, J. G. et al .Isolamento e identificação de poxvirus causando doença em ovinos no Estado do Ceará. **Biológico**, São Paulo, v.52, n.1/3, p.23-26, jan./nov. 1986.

BANDEIRA, D. A. **Características sanitárias e de produção da caprinocultura nas microrregiões do Cariri do Estado da Paraíba**. 2005. 117f Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2005.

BANKOWSKI, M. J. e ANDERSON, S. M. Real-time nucleic acid amplification in clinical microbiology. **Clinical Microbiology Newsletter**. v. 26, p. 9 – 15, 2004.

BARRAVIEIRA, S. R. C. S. Diseases caused by poxvirus – ORF and milker’s nodules – a review. **Journal of Venomous Animal and Toxins Including Tropical Diseases**. V. 11, n. 2, p.102 – 108, 2005.

BERRIER , R. J. Contagious ecthyma. **Veterinarian’s Corner**. V. 1, n. 5, 2001.

BHANUPRAKASH, V., INDRANI, B. K., HOSAMANI, M. e SINGH, R. K. The currente status of sheep pox disease, **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**. v. 29, p. 27 – 60, 2006.

BOUGHTON, I. B.; HARDY, W. T. Immunization of sheeps and goats against soremouth (Contagious Ecthyma). **Texas Agricultural Experiment Station**, College Station, n. 457, p.5-16, 1932.

BUDDLE, B. M.; DELLERS, R. W. e SCHURIG, G. G. Contagious ecthyma virus-vaccination failures. **American Journal of Veterinary Research**. v. 45, n. 2, p. 263 – 266, 1984.

BUJDOSO, R.; HOPKINS, J.; DUTIA, B.M.; YOUNG, P.; McCONNEL, I. Characterization of sheep afferente lymph dendritic cells and their role in antigen carriage. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 170, p. 1285-1302, 1989.

BÜTTNER. M.; RZIHA. H, J. Parapoxviruses : From the lesion to the viral genome. **J. . Vet Med.** B 49, 7-16, 2002.

CANAL, C.W. 2007. Poxviridae. In: FLORES, E.F. *Virologia Veterinária*. Santa Maria: Editora da Universidade de Santa Maria. p.489-511.

CHAN K. WEI, LIN J. WEI, LEE S. HWAE, LIAO C. JUNG, TSAI M. CHUN, HSU W. LI, WONG M. LIANG AND SHIN H. CHANG. Identification and phylogenetic analysis of orf virus from goats in Taiwan. **Journal Virus Genes**. V. 35, nº 3. December, 2007.

COATES, J. W.; HOFF, S. Contagious ecthyma: an unusual distribution of lesions in goats. **Canadian Veterinary Journal**, Canadá, v.1,p.209 – 210, Mar. 1990.

DELHON, G., TULMAN, E.R., AFONSO, C.L. LU, Z., DE LA CONCHA-BERMEJILLO, A., LEHMKUHL, H.D., PICCONE, M. E., KUTISH, G.F., ROCK, D.L. Genomes of the parapoxviruses ORF virus and bovine papular stomatis virus. **Journal of Virology**. v.78, 168-177, 2004.

ESPOSITO, J.J. e FENNER. Poxviruses. In: Knipe, D.M., Howley, P.M., Griffin, D.E., Martin, M.A., Lamb, R.A., Roizman, B., Straus, S.E. (eds.) **Fields Virology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p. 2885-2921, 2001.

FENNER, F.; HENDERSON, D.A.; ARITA, I.; JEZEK, Z.; LANY, I.D. **Smallpox and its eradication**. Geneva: WHO, 1460p,1988.

FERNANDES, A.T.S. **Isolamento e identificação por microscopia óptica e eletrônica de transmissão, de *Orthopoxvirus* em gado bovino leiteiro e em humanos no norte do estado do Rio de Janeiro**. 2004. 105p. Dissertação (Mestrado em Produção Animal). Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Rio de Janeiro.

GALLINA, L.; DAL POZZO, F.; McINNES, C. J.; CARDETI, G.; GUERCIO, A.; BATTILANI, M.; CIULLI, S. e SCAGLIARINI, A. A real time PCR assay for the detection and quantification of Orf virus **Journal of Virological Methods**. v. 134, p. 140 – 145, 2006.

GUERREIRO, M.G. Ectima contagioso dos ovinos no estado do Rio Grande do Sul. **Arquivos do Instituto de Pesquisa Veterinária Desiderio Finamor**, Rio Grande do Sul, n.1, p. 51-53, 1954.

GUIMARAES, L. M. Sobre um caso de ectima contagioso em cabras observado em Sao Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**. n. 23, p. 232 – 234, 1939.

- HAIG, D.M. e MERCER, A.A. Orf. **Veterinary Research**, v. 29, p. 311-326, 1998.
- HAIG, D. M. Subversion and piracy: DNA viruses and immune evasion. **Research in Veterinary Science**. v. 70, p. 205 – 219, 2001.
- HAIG, D. M., McINNES, C., DEANE, D., REID, H.W. E MERCER, A. The immune and inflammatory response to orf virus. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**. v.20, n.3, p.197 – 204, 1997.
- HAIG, D.M.; DEANE, D.L.; MYATT, N.; THOMSON, J.; ENTRICAN, G.; ROTHEL, J.; REID, H.W. The activation status of ovine CD45R⁺ and CD45R⁻ efferent lymph T cells after orf virus reinfection. **Journal of Comparative Pathology**, v. 115, p. 163-174, 1996a.
- HAIG, D.M.; HUTCHINSON, G.; THOMSON, J.; YIRRELL, D.; REID, H.W. Cytolytic activity and associated serine protease expression by skin and afferent lymph CD8⁺ T cells during orf virus reinfection. **Journal of General Virology**, v. 77, p. 953-961, 1996b.
- HAIG, D. M.; McINNES, C.; HUTCHINSON, G.; SEOW, H. F.; e REID, H. W. Cyclosporin A abrogates the acquired immunity to cutaneous reinfection with Parapoxvirus Orf virus **Immunology**. v. 89, p. 524 – 539, 1996.
- HOSAMANI, M.; YADAV, S.; KALLESH, D.J.; MONDAL, B.; BHANUPRAKASH, V.; SINGH, R.K. Isolations and characterization of a Indian orf virus from goats. **Zoonoses and Public Health**, v. 54, p. 204-208, 2007.
- HOUSAWI, F. M. T.; ABU ELZEIN, E. M. E. Orf infection following eat taggin in goats. **Reviu D'Elevage et de Medicine Veterinaire des pays Tropicaux**, France, v. 44, n. 3, p. 277 – 278, 1991.
- HOUSAWI, F. M. T.; ELZEIN, E.M; AMIN, M.M, AL AFALEQ, AI. Contagious pustular dermatitis (orf) infection in sheep and goats in Saudi Arabia. **Veterinary Record**, v. 128, p. 550-551, 1991.
- INOSHIMA, Y., MOROOKA, A., SENTSU, H., 2000. Detection and diagnosis of Papoxvirus by the polymerase chain reaction. **J. Virol. Methods** 84, 201-208.
- KILELU, E. S. Contagious pustular dermatitis in Kenya **Bulletin of Animal Health and Production Africa**, Nairobi, v. 40, p. 123 – 124, 1992.
- LOSOS, J.G. Infectious Tropical Diseases of Domestic Animals. **International Developmente Research Centre**. Canadá, v.1, p. 559 – 579, 1986.
- LLOYD, J.B.; GILL, H.S.; HAIG, D.M.; HUSBAND, A.J. *In vivo* T-cell depletion suggests that CD4⁺ T-cells and a humoral immune reponse are important for the elimination of orf virus from the skin of sheep. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 2000.

LUGINBUHL, J.M. e ANDERSON, K.L. Controlling sire mouth in meat goats (1914). **Animal Science Facts**. Disponível em: <<http://www.cals.ncsu.edu>>, acessado em: 05 de fevereiro de 2008.

MAYR, A.; HERLYN, M.; MAHNEL, H.; DANCO, A.; ZAC, A. e BOSTETD, H. **Zbl. Vet. Med. B.** v. 28, p. 535, 1981.

MAZUR, C. **Isolamento e identificação do vírus do ectima contagioso em caprinos no Brasil (Diagnóstico)**. 1989. 59f. Dissertação (Mestrado em Ciências área de Microbiologia). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

MAZUR, C.; MACHADO, R. D. The isolation and identification of the contagious ecthyma virus of caprines in all cultures. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 21, n. 1, p. 127-130, 1990.

MAZUR, C., FERREIRA, I. I., RANGEL FILHO, F. B. e GALLER, R. Molecular characterization of Brazilian isolates of orf vírus. **Veterinary Microbiology**. V.73, n.4, p. 253 – 259, 2000.

McKEEVER, D.J.; McEVAN, J.D.; HUTCHISON, G.; REID, H.W. Studies of the pathogenesis of orf virus infection in sheep. **Journal of Comparative Pathology**, v. 99, p. 317-328, 1988.

MERCANTE, M.T.,LELLI, R., RONCHI, G.F., FINI, A., 2008. Production and efficacy of an attenuated live vaccine against contagious ovine ecthyma. **Vet. It al.** 44, 537-542.

MOSS, B. Poxiviridae, the viruses and their replication. In:Fields.B.N.; Knipe. D. M.; HOWLEY.; CHANOCK, R.M.; MELNICK, J.L. MONATHY, T.P.; ROIZMAN. B.; STRAUS, S.E.. **Fields virology**, 4.ed. Lippincott, Williams and wilkins , Philadelphia, Pa. 2001.

MURPHY, F.A.; GIBBS, E.J.P., HORZINEK, M.C.; STUDDERT, M.J. **Veterinary Virology**. 3 ed. San Diego: Academic Press, 629p., 1999.

MUSSER, J.,M., TAYLOR, C., A., GUO, J., TIZARD, I., R., WALKER, J. W., 2008. Development of a contagious ecthyma vaccine for goats. **Am. J.Vet. Res.** 69, 1366 – 1370.

NANDI, S.; UJJWAL, K. de; CHOWDHURY, S. Current status of contagious ecthyma or Orf disease in goat and sheep – A global perspective. **Small Ruminant Research**. v. 96, p. 73 – 82, 2011.

NETTLETON, P.F.; BREBNER, J.; POW, I.; GILRAY, J.A.; BELL, G.D.; REID, H.W. Tissue culture-propagated orf virus vaccine protects lambs from orf virus challenge. **Veterinary Record**. V.138, p. 184-186, 1996.

NITSCHKE, A.; BUTTNER, M.; WILHELM, S.; PAULI, G. e MEYER, H. Real-Time PCR detection of Parapoxvirus DNA. **Clinical Chemistry**. v. 52, n. 2, p. 316 – 319, 2006.

NÓBREGA JR, J. E.; MACEDO, J. T. S. A.; ARAUJO, J. A. S.; DANTAS, A. F. M.; SOARES, M. P. e RIET-CORREA, F. Ectima contagioso em ovinos e caprinos no semi-árido da Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 28, n. 1, p. 135 – 139, 2008.

NOGUEIRA-FILHO, A.; ALVES, M.O. Potencialidades da cadeia produtiva da ovinocaprinocultura na região Nordeste do Brasil.<<[http: www.bnb.gov.br](http://www.bnb.gov.br)>>. Documento publicado em 11/04/2002. Acesso em 15/09/2007.

OLIVEIRA, D.S.C.; CASTRO, R.S.; NASCIMENTO, S.A.; MELO, W.T. Isolamento e caracterização preliminar de amostras do vírus Ectima Contagioso em caprino e ovino no estado de Pernambuco. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v. 1, n. 1, p. 33-40, 1998.

PASTORET, P. P.; BROCHIER, B. Le virus de la vaccine et ses proches parents. **Annales de Medicine Veterinaire**, Belgium, v. 134, p. 207-220, 1990.

PINTO JÚNIOR, J. **Ectima contagioso dos ovinos e caprinos: A doença e sua vacina**. 2007. 47p. Monografia (Curso de Pós-Graduação Lato Sensu em Farmacologia). Universidade Federal de Lavras, MG.

PUGH, D.G. **Clínica de Ovinos e Caprinos**. Roca, São Paulo, 2005, 513p.

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C.; HINCHCLIFF, K.W. Artrite Encefalite Caprina(AEC). **Clínica Veterinária**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,. cap. 2, p.1098-1101, 2002.

RIEDER & BRUM M.C. 2007. Picornaviridae. In: Flores E.F. **Virologia Veterinária**. Santa Maria: Editora da Universidade Santa Maria. P. 546 - 553

ROBINSON, A. J. e BALASSU, T. C. Contagious pustular dermatitis (orf). **Veterinary Bulletin**. V. 51, p.771 – 781, 1981.

ROBINSON, A. J. e MERCER, A.A. Orf virus and vaccinia virus do not cross-protect sheep. **Archives of Virology**, v. 101, n. 3-4, p. 255-259, 1988.

SANTANA, R. L. de. **Isolamento e avaliação do comportamento de amostras do vírus ectima contagioso em cultivo de células de córnea fetal caprina**. 2008. 57p. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária). Universidade Federal Rural de Pernambuco, PE.

SCAGLIARINI, A.; DAL POZZO, F., GALLINA, L.: GUERCIO, A.; DE CLERCIO, A. VACCARI, F.; BATTILANI, M.; CIULLI, S e PROSPERI, S. In vitro activity of VEGF-E produced by orf vírus strains isolated from classical and severe persistent contagious ecthyma. **Veterinary Microbiology**. v.114, n.1 – 2, p.142-147,2006.

SCAGLIARINI, A.; DAL POZZO, F., GALLINA, L.: GUERCIO, A.; DE CLERCIO, E.; SNOECK, R.; ANDREI, G. Ovine skin organotypic culture applied to the ex vivo study of orf vírus infection. **Vet. Res. Commun**. Italy, v 29 (2),p 245-327, 2005.

SHATZMAYR, O. M. B., MAJEROWICZ, S., ROMIJN, P. C., SILVA, R. C. F., COSTA, C. H. C., RAPOSO, O. J., PIRES, A. R. e SHATZMAYR, H. G. Ocorrência de parapoxvírus em rebanho ovino no estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**. Rio de Janeiro, V. 28, n.2, p. 60 – 62, 2006.

SHELLEY, WD., SHELLEY, ED. Surgical treatment of farmyard pox: orf, milker's nodule, bovine pustular stomatitis pox. **Cutis**, 1983, 31, 256 – 257.

SULLIVAN, J. T.; MERCER, A. A.; FLEMING, S. B. e ROBINSON, A. J. Identification and characterization of an Orf virus homologue of the vaccinia virus gene encoding the major envelope antigen p37k. **Virology**. v. 202, n. 2, p. 968 – 973, 1994.

TORRES, S. Sugestões para a organização de um plano de profilaxia das moléstias dos caprinos e ovinos no Nordeste. **Anais do II Congresso Brasileiro de Veterinária**, Belo Horizonte, p. 447 – 452, 1943.

TORFASON, E. G. e GUANADÓTTIR, S. Polimerase chain reaction for laboratory diagnosis of Orf virus infection. **Journal of Clinical Virology**. v. 24, p. 79 – 84, 2002.

VIKOREN, T.; LILLEHAUG, A.; AKERSTEDT, J.; BRETEN, T.; HAUGUM, M.; TRYLAND, M. A severe outbreak of contagious ecthyma (orf) in a free-ranging musk ox (*Ovibos moschatus*) population in Norway. **Veterinary Microbiology**, v. 127, p. 10-20, 2008.

ZAMRI-SAAD, M.; KARIM, S. A. AJEELI, A. L. et al., A severe outbreak of orf involving the buccal cavity of goats. **Tropical Animal Production**, México, v.24, p. 177-178, 1992.

ISOLAMENTO E AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DO VÍRUS DO ECTIMA
CONTAGIOSO EM LINHAGEM DE CÉLULAS DE CórNEA FETAL CAPRINA (CorFC) E
IDENTIFICAÇÃO PELA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Rosana Léo de Santana¹, Michele Moreira Martins de Oliveira², Sérgio Alves do Nascimento³,
Rita de Cássia Carvalho Maia⁴, Roberto Soares de Castro⁵

RESUMO - Ectima contagioso (EC) é uma virose aguda e proliferativa de ovinos e caprinos causada pelo vírus do ectima contagioso (ECV), do gênero *Parapoxvirus*. O controle da infecção em regiões endêmicas é realizado através de vacinação, no entanto ocorrem limitações na produção de vacinas devido à dificuldade de replicação do vírus em cultura celular. Este trabalho foi conduzido com o objetivo de isolar e avaliar o comportamento de amostras de ECV em uma linhagem de células de córnea fetal caprina (CorFC) naturalmente imortalizada. Amostras de crostas de vinte e dois ovinos e de sete caprinos que apresentavam sinais clínicos de EC, originários dos Estados de Pernambuco, Bahia, Sergipe e Paraíba, foram isoladas em monocamadas de células CorFC e identificadas pela reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando primers para amplificação de um fragmento de 235 pb do gene B2L do envelope do ECV. Onze amostras foram submetidas a sete passagens consecutivas, a intervalos semanais. Observou-se em todas as passagens, a partir de 24 horas pós-infecção, efeito citopático (ECP) caracterizado por arredondamento celular, fusão com formação sincicial, inclusão citoplasmática e vacuolização. Deste modo, concluiu-se que as culturas de células CorFC mostraram-se altamente permissíveis à replicação do ECV, com pequena variação entre as amostras virais. A PCR indicou ser um método eficiente para confirmação da infecção por ECV em amostras clínicas.

Termos para Indexação: Parapoxvírus, efeito citopático, PCR, ectima contagioso.

¹ Doutoranda do curso de Pós-graduação em Ciência Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n Dois Irmãos, Recife, PE, CEP – 52171-900.

² Professora da Faculdade de Imperatriz (FACIMP) Av. Prudente de Moraes, s/nº Residencial Kubitschek Imperatriz-MA CEP: 65900-000. e-mail: Michele@facimp.edu.br.

³ Biólogo do Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco. Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n Dois Irmãos, Recife, PE, CEP – 52171-900.

⁴ Professora Adjunta do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n Dois Irmãos, Recife, PE, CEP – 52171-900.

⁵ Professor Associado do Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco. Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n Dois Irmãos, Recife, PE. CEP: 52171-900.

ISOLATION AND EVALUATION OF CONTAGIOUS ECTHYMA VIRUS IN LINEAGE FETAL CAPRINE CORNEA CELL (CorFC) AND VIRAL IDENTIFICATION BY THE POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

ABSTRACT - Contagious Ecthyma (CE) is an acute viral infection that proliferates among sheep and goats and is caused by the contagious ecthyma virus (ECV), the Parapoxvirus genus. The control of the infection in endemic regions is performed with vaccines, however there are limitations in the vaccine production due to the difficulties in replicating the virus in cell cultures. This work was conducted so as to isolate and evaluate the behavior of ECV samples in fetal goat cell line cornea (CorFC) naturally immortalized. Crust samples from 22 sheep and seven goats presenting the clinical symptoms of EC from the states of Pernambuco, Bahia, Sergipe and Paraíba, were inoculated in CorFC monolayers and identified by polymerase chain reaction (PCR) using primers for amplification of a fragment of 235 bp of gene B2L envelope ECV. Eleven samples were submitted to seven consecutive passes, at weekly intervals. Cytopathic effect (CPE) was observed in all passages, after 24 hours post-infection, characterized by cell rounding, syncytial fusion with training, inclusion and cytoplasmic vacuolization. Thus, CorFC cell cultures proved highly permissible to ECV replication with small variation among viral samples. The PCR technique can be an efficient method used for confirmation of ECV infection in clinical samples.

Index terms: Parapoxvirus, cytopathic effect, PCR, contagious ecthyma.

INTRODUÇÃO

O Ectima contagioso (EC) foi descrito pela primeira vez em ovinos por Steeb, em 1787, e em caprinos em 1879 (BARRAVIEIRA, 2005). É causado por um vírus da família *Poxviridae*, gênero *Parapoxivirus*, caracterizado pelo tropismo por células epiteliais e pela alta resistência às condições ambientais, geralmente adversas para a maioria dos vírus, como o ressecamento (PASTORET e BROCHIER, 1990).

A penetração do vírus ocorre por meio de lesões cutâneas. O primeiro sintoma observado em animais acometidos pelo vírus é o aumento da espessura da pele na área de invasão do vírus, com a formação posterior de pápulas, vesículas, pústulas e crostas. Lesões características são observadas na face, principalmente nos lábios, porém em casos mais severos podem ser vistos no úbere, tetos, membros, orelhas, mucosas, cauda e coroa do casco. O período de incubação em ovinos e caprinos é de dois a três dias. Cursando a enfermidade em três a quatro semanas, com desaparecimento das crostas e regeneração do tecido epitelial (ROBINSON e BALASSU, 1981; NANDI, et al., 2011)

O Ectima contagioso é considerado uma enfermidade benigna. Entretanto, pode tornar-se grave, quando ocorre envolvimento de outros órgãos, além da pele, determinando grandes perdas ao rebanho. A morbidade em animais jovens ou de rebanhos indenes pode ser alta, chegando a 100%, com mortalidade geralmente baixa, podendo elevar-se em animais jovens, devido a infecções secundárias e manejo deficiente, associados à infecção por cepas de alta virulência (ROBINSON e BALASSU, 1981; NANDI et al., 2011).

Apesar do desenvolvimento da ovinocaprinocultura brasileira, do caráter endêmico da enfermidade e da sua importância, poucos trabalhos de pesquisa têm sido realizados com relação ao vírus EC, que possam subsidiar o controle da enfermidade, que se fundamenta, principalmente, na vacinação dos animais em áreas endêmicas (TORRES, 1943; ROBINSON e BALASSU, 1981; PINTO JÚNIOR, 2007; NANDI et al., 2011). Como não existem vacinas inativadas contra EC que sejam eficientes, a vacinação deve ser feita com vírus vivo. Por isto, só é recomendada em criações endêmicas, pois o uso da vacina implica obrigatoriamente na introdução do vírus no rebanho (PINTO JÚNIOR, 2007).

Dentre os entraves tecnológicos para a produção de vacinas, destaca-se a dificuldade de replicação do vírus em cultivo celular. Estudos *in vitro* utilizando amostras de ECV têm sido realizados utilizando-se células de cultivo primário de testículo caprino (MAZUR e MACHADO, 1990, HOSAMANI et al., 2007), de rim caprino (OLIVEIRA et al., 1998), queratinócitos de tecido do prepúcio de cordeiros (SCAGLIARINI et al., 2005), células de linhagem contínua MDBK (OLIVEIRA et al., 1998), fibroblasto de embrião de pinto (MERCANTE et al., 2008) e células Vero (VIKOREN et al., 2008). Nesses estudos tem sido relatada a dificuldade de replicação do vírus, pois nenhum dos modelos aplicados mostrou-se permissível à replicação contínua de ECV.

Baseado no exposto, este trabalho foi conduzido com o objetivo de isolar e avaliar o comportamento de amostras de ECV em uma linhagem de células de córnea fetal caprina (CorFC) naturalmente imortalizada, bem como identificar o agente etiológico pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

MATERIAL E MÉTODOS

Origem das Amostras

Foram utilizadas crostas coletadas de vinte e dois ovinos e sete caprinos com sintomatologia clínica sugestiva de EC, originários dos Estados de Pernambuco, Bahia, Sergipe e Paraíba. Os animais apresentavam lesões distribuídas principalmente nas áreas desprovidas de pêlos, como face, lábios, cavidade bucal, narinas e orelhas, com intensidade variada, chegando a quadros graves (Tabela 1). As crostas foram acondicionadas em tubos de 1,5 mL estéreis e enviadas resfriadas, em caixas isotérmicas, ao laboratório de viroses (LAVIAN-UFRPE), onde foram conservadas a -20°C até o início do processo para isolamento viral.

Cultivo celular

As monocamadas de células de córnea fetal caprina (CorFC) (NASCIMENTO, 2012) foram cultivadas em garrafas plásticas de 25 cm^2 , em meio essencial mínimo de Eagle (MEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), antibióticos (penicilina e estreptomicina) e antifúngico (anfotericina B), incubados a 37°C sob atmosfera de 5% de CO_2 até total confluência da monocamada celular, quando eram feitas novas passagens por tripsinização.

Isolamento e Passagens em Monocamada Celular

As crostas foram maceradas com areia estéril, utilizando-se graal e pistilo, re-suspensas em solução tampão salina (PBS) pH 7,6, estéril, formando uma suspensão, que foi clarificada por centrifugação 3.000g, por 20 minutos, em temperatura de 25° a 27°C. O sobrenadante coletado foi tratado com 200UI/mL de penicilina G potássica, 2mg/mL de sulfato de estreptomicina e 2 mg/mL de anfotericina B3 e mantido em tubos de 15 mL (*Corning*) a 4°C por 24 horas. Monocamadas semiconfluentes de CorFC, cultivadas em garrafas de cultivo celular de 25cm² de área, foram inoculadas com 1mL dessa suspensão e incubadas durante 1 hora. Após esse período, o inóculo foi removido e a camada celular lavada duas vezes com MEM. Em seguida, procedeu-se com a adição de 5 mL de MEM suplementado com 2% de SFB e incubação a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂. Paralelamente, foi inoculado apenas MEM suplementado com 2% SFB, seguindo o mesmo procedimento, sendo estas garrafas consideradas controle.

A cada 24 horas, as garrafas foram avaliadas para observação detalhada da monocamada celular, em microscópio de luz invertida e verificação da formação de efeito citopático (ECP), cuja intensidade foi avaliada em relação às monocamadas controles, e registrada de acordo com a seguinte classificação: + (até 25% de ECP); ++ (entre 25% e 50% de ECP); +++ (entre 50% e 75% de ECP); ++++ (75% a 100% de ECP) (OLIVEIRA et al., 1998). Todas as garrafas, que apresentaram ou não ECP, foram congeladas a -20°C, no oitavo dia pós-inoculação (p.i.). Para avaliar o comportamento dos isolados do ECV em cultivo de CorFC, onze amostras foram submetidas a sete passagens, cujo inóculo consistiu da suspensão viral obtida por três ciclos de congelamento e descongelamento das garrafas de cultivo, realizadas com intervalo de oito dias, conforme protocolo descrito por OLIVEIRA et al. (1998).

Identificação do ECV por PCR

Extração de DNA

Cerca de 25 mg das crostas dos animais afetados foram trituradas e re-suspensas em solução tampão salina (PBS) pH 7,6 na presença de antibióticos (penicilina 200U/ml, estreptomicina 2mg/ml), as culturas de células CorFC inoculadas com as amostras de campo, na primeira passagem, foram congeladas, descongeladas e usadas diretamente para extração do DNA. Os DNAs das amostras de crostas e das passadas em cultivo celular foram extraídos e purificados usando o Kit QIAamp MinElute Virus Spin (Qiagen®, Alemanha), conforme

instruções do fabricante. Após as extrações os DNAs foram armazenados a -20°C para utilização nas PCRs.

Oligonucleotídeos iniciadores (Primers)

O par de primers, PPP-3 e PPP-4 denominados pan-parapoxvirus, descritos por Inoshima et al. (2000) foi utilizado neste estudo para amplificação de um fragmento de 235pb do gene do envelope B2L, da cepa NZ2. As sequências dos primers PPP-3 e PPP-4 são: 5'-gcg agt cc gaga aga ata cg-3' e 5'-tac gtg gga agc gcc tcg ct-3', respectivamente.

PCR convencional

Para a reação de PCR convencional foram utilizados 112 ng do DNA extraído, 10 pmol de cada primer (PPP-3 e PPP-4) e o Top Taq Master Mix Kit (Qiagen®, Alemanha), segundo recomendações do fabricante. As condições de ciclagem consistiram em incubação inicial de 94°C por 3 min, seguida de 30 ciclos: desnaturação 94°C por 30 segundos, anelamento 60°C por 30 segundos, extensão 72°C por 1 min, 72°C por 10 min, com etapa final de 4°C. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% (LGC Biotecnologia, SP, BR), corados com *Blue Green loading dye I* (LGC Biotecnologia, SP, BR) em tampão TAE 1x, sob voltagem constante (80V) durante 50 min. Foi utilizado marcador molecular de 100pb DNA ladder (LGC Biotecnologia, SP, BR). O gel foi visualizado sob luz ultravioleta (UV) através do Sistema de Captura de Imagem/L-PIX-HE (Loccus-biotecnologia, Brasil).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As células CorFC inoculadas com as 29 amostras de crostas obtidas de animais clinicamente afetados apresentaram ECP caracterizado pelo arredondamento celular, fusão com formação de pequenos sincícios, vacuolização e corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos (Figura 1). Além das amostras serem originadas de casos clínicos sugestivos de EC, tais alterações celulares são compatíveis com as descrições de ECP causado pelos vírus da família *Poxviridae* (ROBINSON e BALASSU, 1981). Além disso, todas as amostras foram positivas à PCR realizadas para amplificação do gene B2L do ECV, o que confirma que os isolados são o ECV.

Dentre os entraves tecnológicos para a produção de vacinas, destaca-se a dificuldade de

replicação do vírus em cultivo celular. Estudos *in vitro* utilizando amostras de ECV têm sido realizados, utilizando-se células de cultivo primário de testículo caprino (MAZUR e MACHADO, 1990, HOSAMANI et al., 2007), de rim caprino (OLIVEIRA et al., 1998), queratinócitos de prepúcio de cordeiros (SCAGLIARINI et al., 2005), bem como células de linhagem contínua MDBK (OLIVEIRA et al., 1998) e Vero (VIKOREN et al., 2008). Nesses estudos tem sido relatada a dificuldade de replicação do vírus, pois nenhum dos modelos aplicados mostrou-se permissível à replicação contínua de ECV. A ausência de cultivo celular permissível à replicação continuada de EC tem levado a comercialização no Brasil de vacina obtida a partir de suspensão de crostas de animais infectados, que apresenta sério risco de disseminação de outras doenças, principalmente virais, já que não é inativada (PINTO JÚNIOR, 2007). O sucesso na replicação do ECV nas células CorFC poderá resolver este problema.

As 11 amostras passadas seriadamente induziram o ECP, com 25% a 100% de desprendimento da camada celular, que variou, de acordo com a amostra viral. As amostras BrPB1.02, BrBA1.01 e BrBA1.02 apresentaram ECP mais intenso que as demais em todas as passagens realizadas (Tabela 2). A amostra BrPB1.02 foi obtida de um ovino do estado da Paraíba, que apresentava sinais clínicos severos de EC, e as amostras BrBA1.01 e BrBA1.02 de caprinos do estado da Bahia (Tabela 1). As demais, todas de ovinos de distintos rebanhos apresentaram ECP com intensidades variáveis entre as passagens (Tabela 2). Esses achados sugerem variação entre as amostras, porém deve-se destacar que as passagens foram executadas com volumes fixos dos inóculos. Assim, diferenças de comportamento entre as amostras podem ocorrer devido a diferentes títulos iniciais dos inóculos. Por outro lado, não é possível estabelecer relação entre intensidade de ECP e virulência, o que só poderá ser elucidada após inoculação de animais susceptíveis. De acordo com Oliveira et al. (1998), as alterações celulares de menor intensidade foram observadas em amostras de ovinos e não de caprinos, o que não foi confirmado neste estudo, pois a maioria das amostras foi oriunda de ovinos, exceto BrSE1.01 e BrSE1.02, e apresentaram ECP máximo às 192 horas p.i. na primeira passagem, semelhantes às amostras caprinas.

O comportamento das amostras de ECV foi diferente dos achados de Oliveira et al. (1998) que, utilizando amostras de caprinos de Pernambuco e células de linhagem MDBK e de cultivo primário de rim fetal caprino, conseguiram a replicação viral apenas na primeira e segunda passagens. A intensidade da replicação viral em todas as passagens no presente estudo pode ser

um indicativo de adaptação das amostras virais às células CorFC, sistema de cultivo ainda não testado para replicação de ECV. A escolha deste sistema ocorreu por serem as células de córnea de fácil cultivo, pelos bons resultados na replicação de outros vírus, como o da artrite-encefalite caprina (CAEV) (OLIVEIRA et al., 2007) e por ser o ECV epiteliotrópico (ROBINSON e BALASSU, 1981). Adicionalmente, é conhecido que o epitélio da córnea não é irrigado diretamente pela corrente sanguínea (BURKITT et al., 1994), o que o torna menos acessível aos agentes virais. Com isto, mesmo sendo de natureza epitelial como outras células susceptíveis à infecção pelo ECV, essas células poderiam conter receptores menos favoráveis à infecção viral por não terem sido submetidas à forte pressão de seleção na interação vírus-hospedeiro. Do ponto de vista evolutivo, o contrário também é verdadeiro. Nesse caso, as células de córnea seriam mais permissíveis à infecção por ECV, o que poderia explicar, em parte, a melhor replicabilidade em culturas de células de córnea, quando em comparação com os resultados obtidos em outros estudos, que relataram o insucesso ou sucesso parcial na replicação *in vitro* de ECV em outras células (MAZUR e MACHADO, 1990; OLIVEIRA et al., 1998; SCAGLIARINI et al., 2005; HOSAMANI et al., 2007; VIKOREN et al., 2008).

Em algumas amostras foi observada que na terceira, quarta e quinta passagens, ocorreram formações de ECP de menor intensidade. Segundo Webster (1958) e Pyer (1990), isto pode ocorrer após adaptação do ECV às culturas celulares chegando, às vezes, a não ser mais observado formação de ECP, temporariamente, e que volta a ser observado com passagens sucessivas, provavelmente para seleção de amostras virais de maior poder infeccioso para a população celular exposta. Por outro lado, as variações observadas entre as amostras de ECV em cultivo celular, dependem também do nível de adaptação do vírus ao soro utilizado na suplementação do meio de cultura. É possível que as diferenças entre amostras tendam a desaparecer com passagens sucessivas (HUSSAIN e BURGER, 1988; MAZUR e MACHADO, 1990).

CONCLUSÕES

As culturas de células CorFC mostraram-se altamente permissíveis à replicação do ECV, com pequena variação entre as amostras virais.

A PCR indicou ser um método eficiente para confirmação da infecção por ECV em amostras clínicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARRAVIEIRA, S. R. C. S. Diseases caused by poxvirus – ORF and milker's nodules – a review. **Journal of Venomous Animal and Toxins Including Tropical Diseases**, Botucatu, v. 11, n.2, p. 102-108, 2005.

BURKITT, H. G.; YOUNG, B.; HEATH, J. W. **Wheater histologia funcional**. 3ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994. 409.

HOSAMANI, M. et al. Isolations and characterization of a Indian orf virus from goats. **Zoonoses and Public Health**. Berlin, n. 54, p. 204-208, 2007.

HUSSAIN, K. A.; BURGUER, D. In vivo and in vitro characteristics of contagious ecthyma virus isolats: host response mechanism. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, n. 1 v. 19, p. 37-51, 1988.

INOSHIMA, Y., MOROOKA, A., SENTSUI, H., 2000. Detection and diagnosis of Papoxvirus by the polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods* 84, 201-208.

MAZUR, C.; MACHADO, R. D. The isolation and identification of the contagious ecthyma virus of caprines in all cultures. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 21, n. 1, p. 127-130, 1990.

MERCANTE, M.T.,LELLI, R., RONCHI, G.F., FINI, A., 2008. Production and efficacy of an attenuated live vaccine against contagiou sovine ecthyma. **Vet. It al.** 44, 537-542.

NANDI, S.; UJJWAL, K. de; CHOWDHURY, S. Current status of contagious ecthyma or Orf disease in goat and sheep – A global perspective. **Small Ruminant Research**. v. 96, p. 73 – 82, 2011.

NASCIMENO, S.A. **Descrição de uma linhagem de células de córnea fetal caprina (CorFC) naturalmente imortalizada: cultivo em meios com baixo teor de soro fetal bovino e uso para produção de antígenos do vírus da artrite encefalite caprina (CAEV)**, 2012. 62p. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária). Universidade Federal Rural de Pernambuco, PE.

OLIVEIRA, D. S. C. Isolamento e caracterização preliminar de amostras do vírus Ectima Contagioso em caprino e ovino no estado de Pernambuco. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, Recife v.1, n.1, p. 33-40, 1998.

OLIVEIRA, M. M. O. et al. *Western blot* para diagnóstico de lentivírus de pequenos ruminantes (LVPR), usando protocolo simples para obtenção de antígeno. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo. 2007.

PASTORET, P. P.; BROCHIER, B. Le virus de la vaccine et ses proches parents. **Annales de Medicine Veterinaire**, Belgium, v. 134, p. 207-220, 1990.

- PINTO JÚNIOR, J. H. **Ectima contagioso dos ovinos e caprinos: a doença e sua vacina.** 2007. 50p. Monografia (Especialização em Farmacologia) – Universidade Federal de Lavras, MG.
- PYE, D. Vaccination of sheep with cell culture grown orf vírus. **Australian Veterinary Journal**, Brunswich, v. 67, n. 5, p. 182-186, 1990.
- ROBINSON, A. J.; BALASSU, T. C. Contagious pustular dermatitis (orf). **Veterinary Bulletin**, Farnham Royal n.10,v. 51, p.771-781, 1981.
- SCAGLIARINI, A.; DAL POZZO, F.; GALLINA, L. Ovine skin organotypic culture applied to the ex vivo study or orf vírus infection. **Veterinary Research Communications**. Amsterdam, v. 29, n. 2, p. 245-327, 2005.
- TORRES, S. Sugestões para a organização de um plano de profilaxia das moléstias dos caprinos e ovinos no Nordeste. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIA, 2. **Anais**. Belo Horizonte: editora [s.n.], p. 447-452, 1943.
- VIKOREN, T. et al. A severe outbreak of contagious ecthyma (orf) in a free-rangi T, Jng musk ox (*Ovibos moschatus*) population in Norway. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 127, p. 10-20, 2008.
- WEBSTER, R. G. The immunological relations of the contagious pustular dermatitis virus to the mammalian pox group. **Australian Journal of Experimento Biology and Medical Science**, Adelaide, v. 36, p. 267-274, 1958.

Tabela 1 - Amostras de crostas colhidas para isolamento do vírus ectima contagioso (ECV) de acordo com a origem, espécie e localização das lesões

Estado	Municípios	Amostras	Espécie	Localização das lesões	
Paraíba	Soledade	BrPB 1.01	Ovina	Face	
		BrPB 1.02	Ovina	Face	
		BrPB 1.03	Ovina	Face	
		BrPB 1.04	Ovina	Face	
Sergipe	Poço Verde	BrSE 1.01	Ovina	Boca	
		BrSE 1.02	Ovina	Boca	
		BrSE 1.03	Ovina	Boca	
	Itaporanga	BrSE 2.01	Ovina	Boca	
		BrSE 2.02	Ovina	Boca	
Bahia	Heliópolis	BrBA 1.01	Caprina	Boca	
		BrBA 1.02	Caprina	Boca	
Pernambuco	Floresta	BrPE 1.01	Caprina	Boca	
		BrPE 1.02	Caprina	Boca/orelha	
		BrPE 1.03	Ovina	Boca/orelha	
		BrPE 1.04	Ovina	Boca	
		BrPE 1.05	Ovina	Boca/orelha/olhos	
		Recife	BrPE 2.01	Ovina	Boca/orelha/olhos
			BrPE 2.02	Ovina	Boca
			BrPE 2.03	Caprina	Focinho/orelha
			BrPE 2.04	Caprina	Boca/orelha/olhos
			BrPE 2.05	Caprina	Boca/orelha/dorso
	Sertânia	BrPE 2.06	Ovina	Boca/orelha	
		BrPE 2.07	Ovina	Boca/orelha/olhos	
		BrPE 2.08	Ovina	Focinho	
		BrPE 2.09	Ovina	Focinho/orelha	
		BrPE 3.01	Ovina	Focinho/orelha	
	Petrolina	BrPE 3.02	Ovina	Canfro/orelha	
		BrPE 4	Ovina	Focinho	
	Ilha de Itamaracá	BrPE 5	Ovina	Focinho	

Tabela 2 - Intensidade do efeito citopático (ECP) causado pelas amostras do vírus ectima contagioso (ECV), de acordo com a passagem em linhagem de células de córnea fetal caprina (CorFC) naturalmente imortalizada, no oitavo dia pós-inoculação (p.i.)

Amostra	Passagem (semana)						
	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	5 ^a	6 ^a	7 ^a
BrPB1.02	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
BrPB 1.03	+++++	+++++	++	++	+++	+++++	+++
BrPB 1.01	+++++	+++++	+++	++	+++	+++++	+++++
BrPB 1.04	+++	+++++	+++	+++++	+++++	+++	+++
BrSE 2.01	+++++	+++++	+++	+++++	+++++	+++++	+++
BrSE 2.02	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++
BrSE 1.01	++	+++++	+++	++	+++++	+++++	+++
BrSE 1.02	+	+++++	+++++	+++++	+	+++	+++++
BrSE 1.03	+++++	+++	+++	+++++	+++++	+++++	+++
BrBA 1.01	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
BrBA 1.02	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++

ECP até 25% (+); entre 25% e 50% (++); entre 50% e 75% (+++); e entre 75% e 100% (++++).

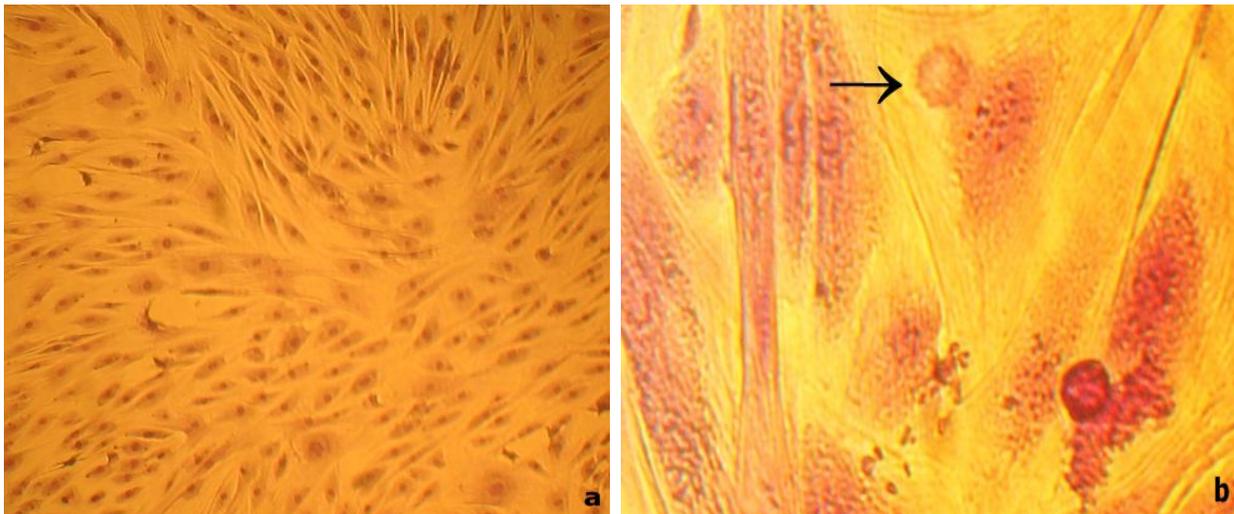


Figura 1. Cultivo primário de células de córnea fetal caprina (CorFC) observadas em microscópio óptico de luz invertida: a) monocamada não infectada corada pelo método de Giemsa no aumento de 40, e em b) inclusão intracitoplasmática causada pela replicação do ECV no citoplasma celular, aumento de 600X.

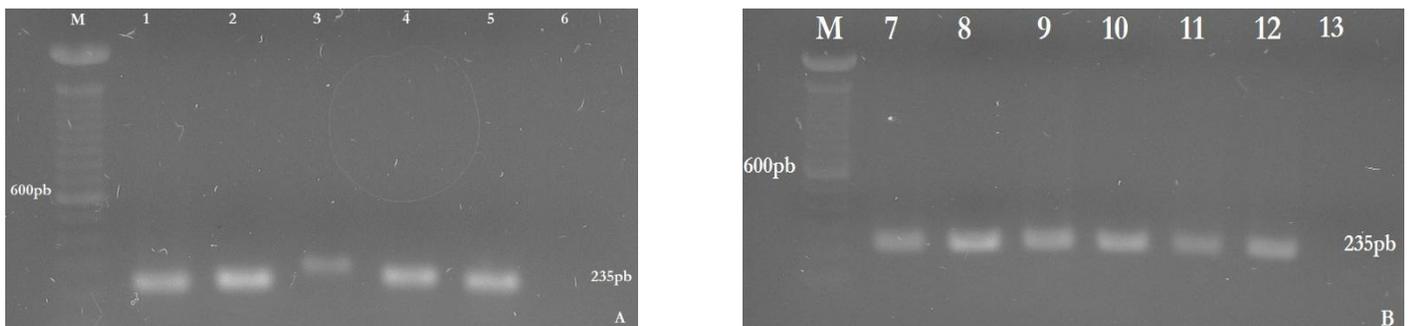


Figura 2. Gel de Agarose representando resultados da PCR de inóculos. **(A)** Linha M (marcador de peso molecular- Invitrogen); linhas 1, 2 e 3 amostras Sergipe: BrSE1.01, BrSE1.02, BrSE1.03; linhas 4 e 5: amostras Bahia: BrBA1.01, BrBA1.02 e linha 6: controle negativo. **(B)** Linha M (marcador de peso molecular- Invitrogen); linhas 7 e 8 amostras Sergipe : BrSE2.01, BrSE2.02; linhas 9, 10, 11 e 12 amostras Paraíba: BrPB1.01, BrPB1.02, BrPB1.03, BrPB1.04; linha 13: controle negativo.

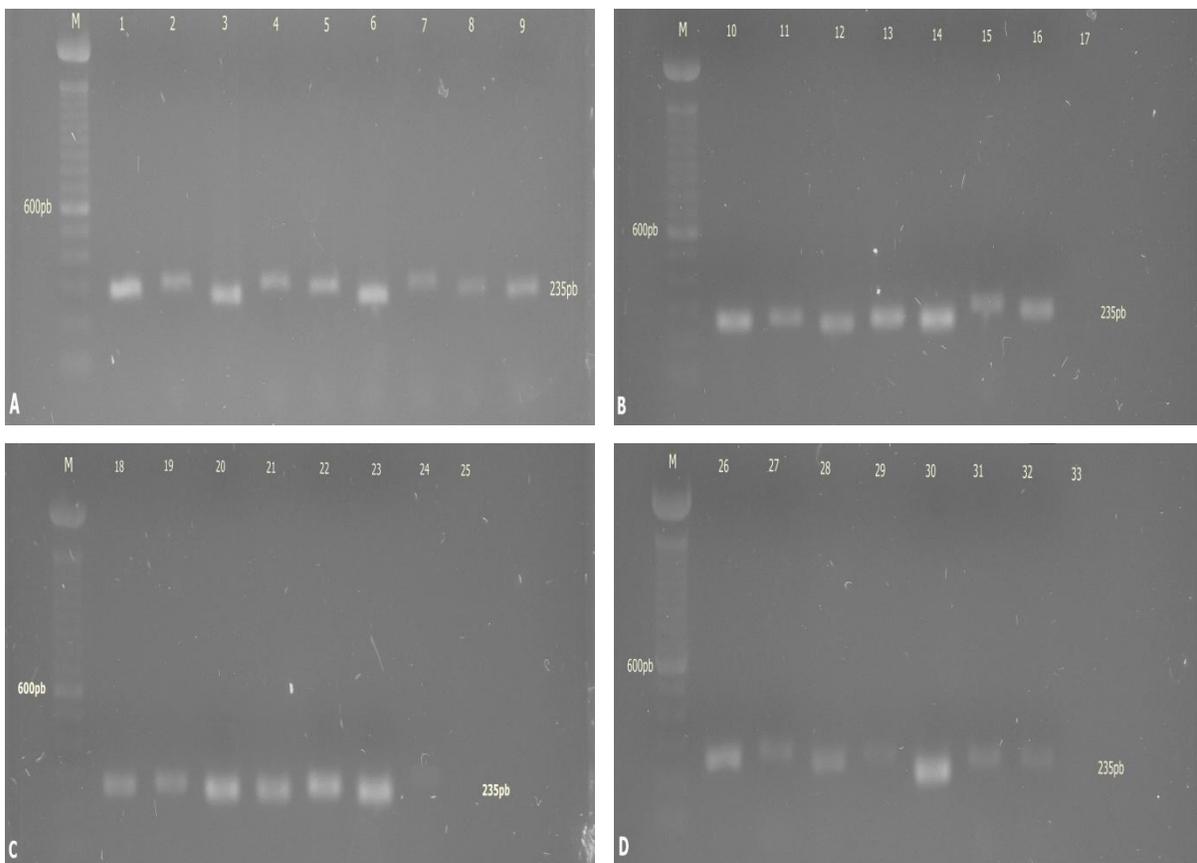


Figura 3. Gel de Agarose representando resultados da PCR tradicional de sobrenadante de cultivo de células córnea fetal caprina. **(A)** Linha M (marcador de peso molecular- Invitrogen); linhas: 1-BrSE1.01, 2-BrSE1.02, 3-BrSE1.03, 4-BrBA1.01, 5-BrBA1.02, 6-BrSE2.01, 7-BrSE2.02, 8-BrPE1.06 e 9-BrPE1.07 **(B)**, Linha M (marcador de peso molecular- Invitrogen); Linhas 10-BrPB1.03,11-BrPB1.04, 12-BrPB1.02, 13-BrPB1.01, 14-BrPE1.01,15-BrPE3.01,16-BrPE3.02, 17-controle negativo. **(C)** e **(D)**, Linha M (marcador de peso molecular – Invitrogen), linhas 18-BrPE4, 19-BrPE-2.01, 20-BrPE2.02, 21-BrPE2.03, 22-BrPE2.04, 23-BrPE2.05, 24-BrPE1.05, 25-controle negativo. 26-BrPE1.02, 27-BrPE1.08, 28-BrPE2.07, 29-BrPE2.08, 30-BrPE5, 31-BrPE2.06, 32-BrPE2.09, 33- controle negativo.

PADRONIZAÇÃO DE UMA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL (qPCR) PARA DIAGNÓSTICO DE ECTIMA CONTAGIOSO

Rosana Léo de Santana¹, Telissa Kassar², Ana Lisa Gomes³, Rita de Cássia Carvalho Maia⁴, Antonio Carlos Freitas⁵, Roberto Soares de Castro⁶

RESUMO – O vírus do ectima contagioso (ECV), também conhecido como orf vírus (ORFV), é o agente etiológico do ectima contagioso (EC) dos ovinos e caprinos, e pertence ao gênero *Parapoxvírus*, da família *Poxviridae*. Em certos casos, o EC pode ser confundido com enfermidades vesiculares, havendo assim, a necessidade de sua diferenciação, sobretudo porque, segundo as normas do Programa Nacional de Erradicação da Febre Aftosa (PNEFA), os caprinos e ovinos não são vacinados contra a Febre Aftosa (FA), atuando como animais sentinelas. Embora estudos iniciais tenham demonstrado a utilidade da reação em cadeia de polimerase (PCR) como teste diagnóstico, ainda não há estudos sobre sua utilização envolvendo amostras de campo brasileiras, que podem ser geneticamente diferentes das já estudadas. Baseado no exposto, este trabalho foi conduzido com o objetivo de padronizar uma PCR em tempo real (qPCR) utilizando o corante SYBR Green I para diagnóstico molecular de EC diretamente a partir de DNA extraído de lesões do animal afetado ou de cultivo celular inoculado com amostras de campo. Os produtos da qPCR foram detectados com a análise da curva de dissociação que mostrou um pico a 88°C, indicativo de que as amostras positivas têm apenas um produto de amplificação específico. Todas as amostras de DNA testadas (crostas de 29 animais e seus respectivos cultivos celulares) foram positivas na qPCR. A qPCR foi capaz de detectar o DNA até, no mínimo, a diluição de 10.000 vezes, correspondendo a 0,056ng do DNA. Acredita-se que com as adicionais validações a qPCR relatada neste trabalho poderá ser empregada para o diagnóstico diferencial nas ações de vigilância sanitária do PNEFA.

Termos para Indexação: Parapoxvírus, qPCR, ectima contagioso

¹Doutoranda do curso de Pós-graduação em Ciência Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n Dois Irmãos, Recife, PE, CEP – 52171-900.

² Department of Virology and Experimental Therapy, Aggeu Magalhães Research Center- CPqAM/FIOCRUZ, CEP: 50.670-420, Recife, Brazil .

³ Departament Veterinary Medicine. Laboratory of animal viroses – LAVIAN. Federal Rural University of Pernambuco (UFRPE), Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, Recife, Brazil

⁴ Professora Adjunta do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n Dois Irmãos, Recife, PE, CEP – 52171-900.

⁵ Professor Adjunto do Departamento de Genética do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE.

⁶ Professor Associado do Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco. Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n Dois Irmãos, Recife, PE. CEP: 52171-900.

STANDARDIZATION OF A POLYMERASE CHAIN REACTION IN REAL TIME (qPCR) FOR DIAGNOSIS OF CONTAGIOUS ECHTYMA

ABSTRACT - The virus of contagious ecthyma (CEV), also known as orf virus (ORFV) is the etiological agent of contagious ecthyma (CE) in sheep and goat and belongs to the *Parapoxvirus* genus, family *Poxviridae*. In some cases, CE can be confused with vesicular diseases so there is need for differentiation especially because, according to the standards of the National Program for the Eradication of FMD (PNEFA), goats and sheep are not vaccinated against Foot and Mouth Disease (FMD), acting as sentinel animals. Although initial studies have demonstrated the usefulness of the polymerase chain reaction (PCR) as a diagnostic test, there are no studies involving its use on Brazilian field samples, which may be genetically distinct from previously studied samples, as described in a study of restriction sites analysis of Brazilian CE samples. Based on this, the work was conducted with the goal of standardizing a PCR (qPCR) test using SYBR Green I dye for molecular diagnosis of EC in DNA extracted from lesions of affected animal or cell culture inoculated in field samples. The products were detected with qPCR dissociation curve analysis which showed a peak at 88 ° C indicating that positive samples have only one specific amplification product. All DNA samples tested (29 animals crusts and their cell cultures) were positive in the qPCR. The qPCR was able to detect the DNA of at least 10,000 times dilution corresponding to 0.056 ng of DNA. It is believed that with the additional qPCR validations reported in this study, it can be used for differential diagnosis in the health surveillance of PNEFA.

Index Terms: Parapoxvírus, qPCR, contagious ecthyma

INTRODUÇÃO

Ectima contagioso (EC), também conhecido como ORF, é uma virose aguda que acomete caprinos e ovinos, amplamente disseminada em todo mundo, inclusive no Brasil, onde foi descrito pela primeira vez em São Paulo (GUIMARÃES, 1939) e, posteriormente, em Pernambuco (TORRES, 1943) e Rio Grande do Sul (GUERREIRO, 1954). Tem sido descrito no Ceará (ARITA et al., 1986), Minas Gerais, Rio de Janeiro (MAZUR e MACHADO, 1990), Rio Grande do Sul (SALLES et al., 1992), São Paulo (LANGONI et al., 1995; CARTROXO et al., 2002), Pernambuco (OLIVEIRA et al., 1998) e Mato Grosso (ABRAHÃO et al., 2009). A doença pode ainda afetar o homem, sendo considerada uma doença de interesse à saúde pública (BARRAVIEIRA et al., 2005; NANDI *et. al.*, 2011).

O vírus do ectima contagioso (ECV) pertence à família *Poxviridae*, gênero *Parapoxivirus*, estreitamente relacionado aos vírus da estomatite papular bovina, *pseudocowpox* vírus e *parapoxvírus* da corça vermelha na Nova Zelândia (PVNZ) (NANDI et al., 2011). O vírus é epiteliotrópico e altamente resistente às condições ambientais, geralmente adversas para a maioria dos vírus, como o ressecamento (PASTORET e BROCHIER, 1990).

A cepa mais estudada sob o ponto de vista molecular é a NZ2, isolada na Nova Zelândia. O genoma apresenta de 139 a 160 quilopares de base (kpb) e é estreitamente relacionado ao genoma de outros poxvírus (DELHON et al., 2004). A organização do genoma do ECV exhibe o padrão geral de outros poxvírus, consistindo de uma região central, que contém genes essenciais e conservados, e terminais, que contém genes geralmente relacionados à virulência e à patogênese (NANDI et al., 2011). O gene B2L é conservado, compreende cerca de 1.206 pb, codifica uma proteína do envelope viral de 42 kDa e está situado na região central do genoma, sendo o mais usado para detecção de ECV pela reação em cadeia da polimerase (PCR) em amostras clínicas, devido sua alta conservação entre as espécies (INOSHIMA et al., 2000).

A PCR é reconhecida como um método de diagnóstico molecular estável, rápido e sensível para a detecção de ácidos nucléicos e pode ser utilizada mesmo quando a disponibilidade de amostra é pequena. A PCR identifica animais verdadeiramente infectados e não apenas soropositivos (NITSCHKE et al., 2006). Ensaios de diluição seriada e de placa já foram bastante utilizadas para quantificar o vírus. Porém são demorados e trabalhosos e, geralmente, não podem ser usados para amostras de campo de ECV que não se adaptaram ao crescimento *in vitro*. Portanto, a PCR convencional baseada na amplificação de parte do gene B2L (SULLIVAN et al.,

1994) foi desenvolvida para detectar as espécies de *parapoxvirus* conhecidas e, em conjunto com o seqüenciamento de DNA, podem ser utilizadas para diferenciação das espécies (INOSHIMA et al., 2000). Diferentes protocolos de PCR convencional foram desenvolvidos para diagnóstico rápido de infecções por ECV (TORFASON et al., 2002; ABRAHÃO ete al., 2009, INOSHIMA et al., 2000). Atualmente, além dos usos da PCR convencional, a PCR em tempo real (qPCR) tem-se revelado precisa e eficiente para quantificação de DNA, permitindo estabelecer sua correlação com o título viral, inclusive do ECV, mesmo de amostras de campo que não se repliquem *in vitro* (GALLINA et al., 2006). As qPCRs desenvolvidas para detecção do DNA do ECV usam sondas específica para região mais interna do gene B2L (NITSCHKE A. et al., 2006; GALLINA et al., 2006; BANKOWSKI et al., 2004). Embora estudos iniciais tenham demonstrado sua utilidade como teste de diagnóstico, ainda não há estudos sobre sua utilização envolvendo amostras brasileiras, que podem ser geneticamente diferentes das já estudadas, conforme previamente descrito em um estudo com análise de restrição.

Baseado no exposto, este trabalho foi conduzido com o objetivo de padronizar uma qPCR utilizando o corante SYBR Green I para diagnóstico molecular de EC em amostras clínicas e isoladas em culturas de células.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Foram utilizadas amostras de DNA extraídas de crostas de 22 ovinos e de sete caprinos com sintomatologia clínica de EC, originários dos Estados de Pernambuco, Paraíba, Bahia e Sergipe, bem como de cultivos de células CorFC inoculadas com essas amostras. A quantidade de DNA nas amostras foi determinada por espectrofotometria, de acordo com as instruções do fabricante (Qubit Fluorometer; Life Technologies, USA).

Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR)

Para a realização da qPCR foram utilizados os primers PPP-3 (5'-gcg agt cc gaga aga ata cg-3') e PPP-4 (5'-tac gtg gga agc gcc tcg ct-3'), denominados pan-parapoxvirus, descritos por Inoshima et al. (2000), que amplificam um fragmento de 235 pb do gene B2L do ECV.

A reação qPCR foi realizada no termociclador em tempo real- Line-Gene k (Hangzhou Bioer Technology Co.,Ltd – China) utilizando o corante SYBR Green I, inespecífico que se liga a qualquer DNA dupla fita (e ROX como referência passiva). Os produtos da qPCR foram detectados com a análise da curva de dissociação, realizada posteriormente à corrida da PCR, aumentando a temperatura lentamente 60-95 °C (0,5 °C/s) e através da medição da fluorescência de forma contínua. A Line- gene K-software FQD-48 foi utilizada para a análise e interpretação dos resultados. A reação incluiu 2 µL do DNA extraído, primers PPP3 –PPP4 (10 pmols de cada), 12,5 µL Quantifast SYBR Green Master Mix (Qiagen, Alemanha), água adicionada para um volume final de 25 µL.

Foram testadas algumas condições de ciclagem, onde diferentes temperaturas de anelamento, número de ciclos e tempo de extensão foram modificados. Após experimentação, os melhores resultados foram obtidos com a PCR realizada nas seguintes condições de ciclagem: uma etapa de desnaturação inicial a 95 °C por 5 min, seguido por 35 ciclos de amplificação (95 °C por 10 e 60 °C por 30 s). Controles sem o DNA alvo (no template control -NTC) foram incluídos em cada PCR, para detectar resultados falso-positivos devido à contaminação. Todos os ensaios foram realizados em duplicatas.

Sensibilidade e especificidade analíticas da qPCR

A sensibilidade analítica da qPCR foi determinada com base em uma curva de detecção, onde foram realizadas diluições seriadas (1:10, 1:100, 1:1.000, e 1:10.000) em duplicata, a partir de uma concentração inicial do DNA de 560 ng a partir da amostra BrSE1.01 considerada como controle positivo. A especificidade analítica foi avaliada com base no seqüenciamento do fragmento de DNA de 235 pb correspondente ao gene B2L do ECV de 26 amostras utilizando ABI 3100 (Applied Biosystems, EUA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi proposto aperfeiçoar uma qPCR para diagnosticar ECV diretamente a partir de DNA extraído de lesões do animal afetado ou de cultivo celular inoculado com amostras de campo. Os produtos da qPCR foram detectados com a análise da curva de dissociação. Uma vez que foi usado SYBR Green I como corante intercalante de DNA, a análise da curva de dissociação é essencial para determinar a especificidade dos resultados. A presença de pico a 88°C no gráfico mostra que as amostras positivas tem apenas um produto de amplificação específico (figura 2), e controles negativos não tem nenhum produto.

Todas as amostras de DNA testadas (crostas de 29 animais e seus respectivos cultivos celulares) foram positivas na qPCR, com base na curva de dissociação. Na Figura 2A observa-se o resultado obtido para a curva de dissociação das amostras dos Estados de Sergipe, Bahia e Paraíba; Estado de Pernambuco (Figura 2B e 2C), onde observa-se o pico gerado entre as temperaturas de 88°C resultado da amplificação de produto específico para ECV e controle negativo (NTC) sem amplificação de produtos. Essas amostras foram testadas previamente utilizando-se uma PCR convencional adaptada de Inoshima et al. (2000) e apresentaram resultado positivo.

Existem alguns estudos utilizando a qPCR para a detecção de ECV e Parapoxvirus (Gallina et al., 2006; Nitsche et al., 2006) utilizando sondas específicas para o vírus. Nossos resultados são os primeiros a utilizar o corante SYBR Green I ao invés de sondas. O SYBR Green I é a alternativa mais viável para o diagnóstico de amostras de campo em larga escala, sendo por isso, o produto selecionado para realização do presente estudo, o que torna o diagnóstico por qPCR economicamente viável. Adicionalmente, a qPCR oferece várias vantagens em relação à PCR tradicional, por se tratar de um sistema fechado, no qual a amplificação de DNA é realizada e detectada em um único tubo que permanece fechados durante a execução de todo o processo, evitando processamento pós-amplificação, como a eletroforese em gel, diminuindo o risco de contaminação (GOMES et al., 2006).

A figura 1 apresenta a curva de sensibilidade analítica da qPCR, onde foram realizadas diluições seriadas do DNA de uma amostra. A qPCR foi capaz de detectar o DNA até, no mínimo, a diluição de 10.000 vezes, correspondendo a 0,056ng do DNA. A análise das sequências demonstrou similaridade de 93% com a sequência de referência AY386263.1 e de

99% entre si, o que confirma a alta especificidade analítica da qPCR. Para se validar um teste diagnóstico, além da sensibilidade e da especificidade analíticas, deve-se determinar a sensibilidade e a especificidade diagnósticas, com base em testes de um número significativo de animais da população onde o teste será aplicado (OIE Terrestrial Manual, 2010). A qPCR apresentou resultado positivo em todas as amostras processadas a partir das crostas de animais clinicamente afetados, o que sugere ser um teste altamente sensível. Para definitiva validação da qPCR é necessário testar maior número de amostras de animais afetados e de animais de rebanhos livres de EC.

Para o diagnóstico de *parapoxvirus* exames sorológicos ou moleculares podem ser utilizados. Existem limitações nos testes sorológicos, pois se trata de uma doença geralmente de evolução aguda e devido ao fato de que membros do gênero *parapoxvirus* são intimamente relacionados antigenicamente e, muitas vezes, estes ensaios sorológicos não são eficazes para detecção de qual agente etiológico está causando a dermatite nos animais (NANDI et al., 2011).

Segundo as normas do PNEFA (Brasil, 2007) caprinos e ovinos não devem ser vacinados contra a Febre Aftosa, permanecendo como animais sentinela. Essa condição é essencial para a realização dos inquéritos sorológicos durante os processos de certificação pela OIE, bem como para detecção de circulação viral nos casos de introdução do vírus da Febre Aftosa em uma determinada região. Nesses casos deve-se dispor de um teste rápido e direto de diagnóstico, que possa ser empregado em certa escala, como a qPCR. EC é uma doença que pode ser confundida com as enfermidades vesiculares, como a Febre Aftosa. Acredita-se que com as adicionais validações a qPCR relatada neste trabalho poderá ser empregada para o diagnóstico diferencial nas ações de vigilância sanitária do PNEFA.

CONCLUSÕES

O aperfeiçoamento da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real para fins de diagnóstico de campo indicou ser um método eficiente para confirmação de infecção por ECV em amostras clínicas, demonstrando a presença de cepas de ECV circulando nos Estados de PE, SE, BA e PB. E que nossos atuais resultados são pioneiros em utilizar o corante Sybr Green I ao invés de sondas específicas, proporcionando teste diagnóstico menos oneroso para os laboratórios veterinários, uma vez que o corante Sybr Green I apresenta um custo cerca de três vezes menor que o das sondas específicas, viabilizando assim o uso desta técnica para fins diagnósticos.

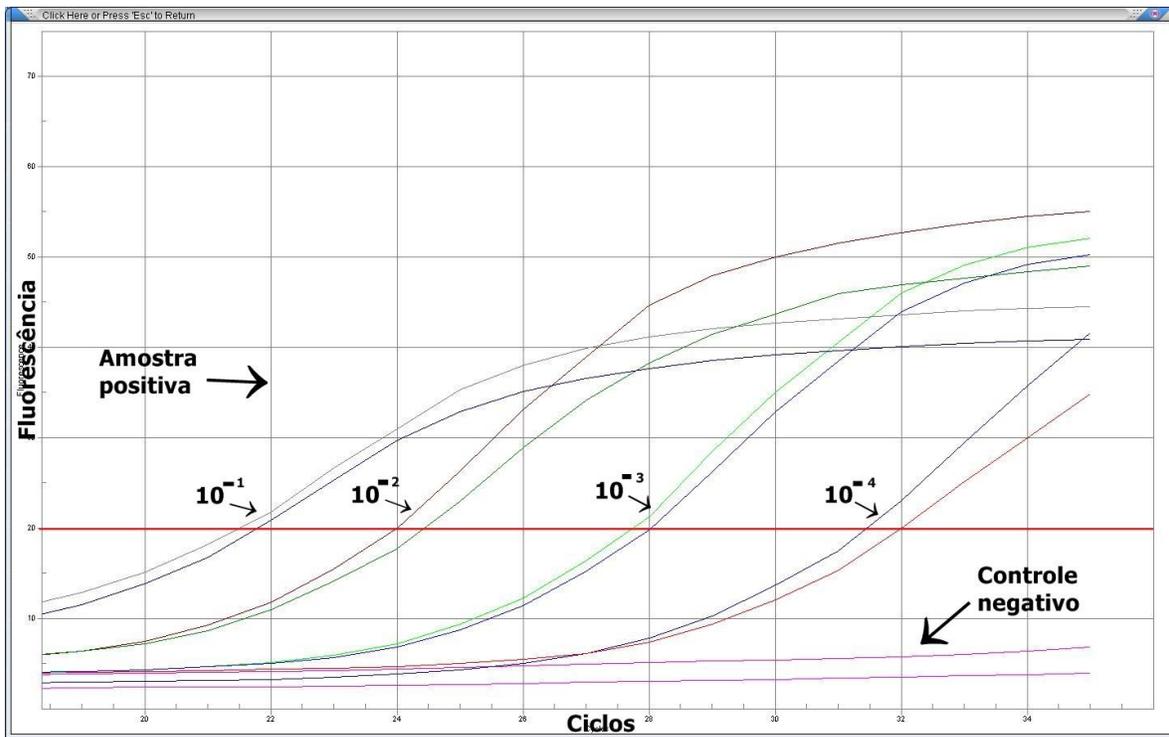


Figura 1. Curva de sensibilidade (ou detecção) utilizando diluições seriadas (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10.000) com concentração inicial do ECV de 560 ng da amostra BrSE1.0, em duplicata.

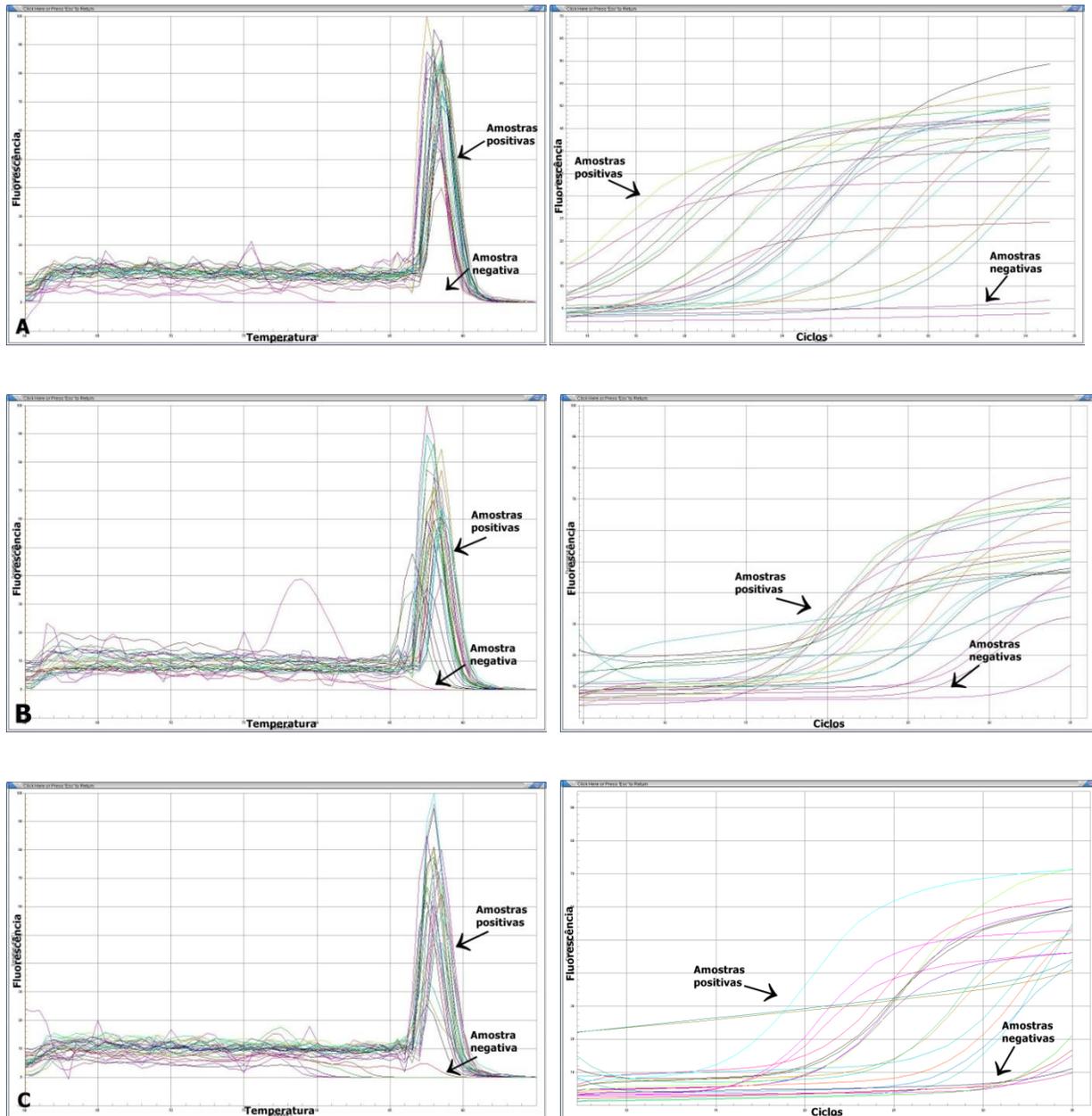


Figura 2. Curva de dissociação. (A) Amostras positivas com produto de amplificação específico para ECV dos Estados de Sergipe (BrSE1.01, BrSE1.02, BrSE1.03, BrSE2.01, BrSE2.02); Paraíba (BrPB 1.01, BrPB1.02, BrPB 1.03, BrPB 1.04) e Bahia (BrBA 1.01, BrBA 1.02) e controle negativo. (B) Amostras positivas com produtos de amplificação específico para ECV do Estado de Pernambuco (BrPE1.01, BrPE3.01, BrPE3.02, BrPE4, BrPE2.01, BrPE2.02, BrPE2.03, BrPE2.04, BrPE2.05, BrPE2.06) e controle negativo. (C) Amostras positivas com produtos de amplificação específico para ECV do Estado de Pernambuco (BrPE2.12, BrPE2.13, BrPE2.14, BrPE1.02, BrPE2.10, BrPE2.11, BrPE2.07, BrPE2.08, BrPE2.09, BrPE5) e controle negativo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAO, J. S.; CAMPOS, R. K.; TRINDADE, G. S.; GUEDES, M. I. M.; LOBATO, Z. I. P.; MAZUR, C.; FERREIRA, P. C. P.; BONJARDIM, C. A. e KROON, E.G. Detection and phylogenetic analysis of Orf virus from sheep in Brazil: a case report. **Virology Journal**. v. 6, n. 47, 2009.
- ARITA, G. M. M. et al. Isolamento e identificação de poxvirus causando doença em ovinos no Estado do Ceará. **Biológico**, São Paulo, v. 52, n. 1/3, p. 23-26, 1986.
- BANKOWSKI, M. J. e ANDERSON, S. M. Real-time nucleic acid amplification in clinical microbiology. **Clinical Microbiology Newsletter**. v. 26, p. 9 – 15, 2004.
- BARRAVIEIRA, S. R. C. S. Diseases caused by poxvirus – ORF and milker’s nodules – a review. **Journal of Venomous Animal and Toxins Including Tropical Diseases**, Botucatu, v. 11, n.2, p. 102-108, 2005.
- CARTROXO, M. H. B.; CURI, N. A.; PITUCO, E. M.; GARCIA, M.; OKUDA, L. H.; PORTO, A. C. R. e STEFANO, E. Ocorrência de ectima contagioso em ovinos criados em Itatiba, estado de Sao Paulo, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**. v. 69, supl. 37, 2002.
- DELHON, G., TULMAN, E.R., AFONSO, C.L. LU, Z., DE LA CONCHA-BERMEJILLO, A., LEHMKUHL, H.D., PICCONE, M. E., KUTISH, G.F., ROCK, D.L. Genomes of the parapoxviruses ORF virus and bovine papular stomatis virus. **Journal of Virology**. v.78, 168-177, 2004.
- GALLINA, L.; DAL POZZO, F.; McINNES, C. J.; CARDETI, G.; GUERCIO, A.; BATTILANI, M.; CIULLI, S. e SCAGLIARINI, A. A real time PCR assay for the detection and quantification of Orf virus **Journal of Virological Methods**. v. 134, p. 140 – 145, 2006.
- GOMES A. L. V., Melo F. L., Werkhauser R. P., Abath F. G. C. 2006. Development of a real time polymerase chain reaction for quantitation of Schistosoma mansoni DNA. Mem Inst Oswaldo Cruz, 101, 133-136.
- GUERREIRO, M. G. Ectima contagioso dos ovinos no estado do Rio Grande do Sul. **Arquivos do Instituto de Pesquisa Veterinária Desiderio Finamor**, Porto Alegre, v.1 n.1, p. 51-53, 1954.
- GUIMARÃES, L. M. Sobre um caso de ectima contagioso em cabras observado em São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**. São Paulo, n. 23, p. 232-234, 1939.
- INOSHIMA, Y., MOROOKA, A., SENTSU, H., 2000. Detection and diagnosis of Papoxvirus by the polymerase chain reaction. J. Virol. Methods 84, 201-208.
- LANGONI, H.; COELHO, K. I. R.; PIMENTEL, M. P.; SIQUEIRA, E. R. e SPAGO, E. N. Ectima contagioso em ovinos na região de Botucatu. **A Hora Veterinária**. v. 14, p. 60 – 62, 1995.

MAZUR, C.; MACHADO, R. D. The isolation and identification of the contagious ecthyma virus of caprines in all cultures. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 21, n. 1, p. 127-130, 1990.

NANDI, S.; UJJWAL, K. de; CHOWDHURY, S. Current status of contagious ecthyma or Orf disease in goat and sheep – A global perspective. **Small Ruminant Research**. v. 96, p. 73 –82, 2011.

NITSCHKE, A.; BUTTNER, M.; WILHELM, S.; PAULI, G. e MEYER, H. Real-Time PCR detection of Parapoxvirus DNA. **Clinical Chemistry**. v. 52, n. 2, p. 316 – 319, 2006.

OIE <http://www.oie.int/links>. PRINCIPLES AND METHODS OF VALIDATION OF DIAGNOSTIC ASSAYS FOR INFECTIOUS DISEASES. Chapter 1.1.4/5.

OLIVEIRA, D. S. C. Isolamento e caracterização preliminar de amostras do vírus Ectima Contagioso em caprino e ovino no estado de Pernambuco. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, Recife v.1, n.1, p. 33-40, 1998.

PASTORET, P. P.; BROCHIER, B. Le virus de la vaccine et ses proches parents. **Annales de Medicine Veterinaire**, Belgium, v. 134, p. 207-220, 1990.

PNEFA: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=18117>

SALLES, M. W. S.; BARROS, C. S. L.; LEMOS, R. A. A. e WEIBLEN, R. Ectima contagioso (dermatite pustular) dos ovinos. **Ciência Rural**. v. 22, n. 3, p. 319 – 324, 1992.

SULLIVAN, J. T.; MERCER, A. A.; FLEMING, S. B. e ROBINSON, A. J. Identification and characterization of an Orf virus homologue of the vaccinia virus gene encoding the major envelope antigen p37k. **Virology**. v. 202, n. 2, p. 968 – 973, 1994.

TORFASON, E. G. e GUONADOTTIR, S. Polimerase chain reaction for laboratory diagnosis of Orf virus infection. **Journal of Clinical Virology**. v. 24, p. 79 – 84, 2002.

TORRES, S. Sugestões para a organização de um plano de profilaxia das moléstias dos caprinos e ovinos no Nordeste. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIA, 2. **Anais**. Belo Horizonte: editora [s.n.], p. 447-452, 1943.

ESTUDO FILOGENÉTICO DE ORF VÍRUS EM PEQUENOS RUMINANTES DO NORDESTE DO BRASIL.

Telissa Kassar^a, Rosana Leo Santana^b, Rita de Cássia Carvalho Maia^b, Ana Lisa do Vale Gomes^b, Laura Helena Vega Gil^a, Viviane C. V. Carvalho^c, Antonio Carlos Freitas^d, Roberto Soares de Castro^{b*}.

^aDepartment of Virology and Experimental Therapy, Aggeu Magalhães Research Center-CPqAM/FIOCRUZ, CEP: 50.670-420, Recife, Brazil

^bDepartament Veterinary Medicine. Laboratory of animal viroses – LAVIAN. Federal Rural University of Pernambuco (UFRPE), Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, Recife, Brazil

^cNúcleo de Plataformas Tecnológicas - Aggeu Magalhães Research Center-CPqAM/FIOCRUZ, CEP: 50.670-420, Recife, Brazil

^dLaboratory of Molecular Studies and Experimental Therapy, Department of Genetics, Center for Biological Sciences, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil.

Corresponding author. Tel: +55 8133206428

E-mail adress: rscastro@dmv.ufrpe.br (Roberto Soares de Castro).

RESUMO

ORF virus (ORFV), é o protótipo do gênero Parapoxvirus, responsável pelo ectima contagioso em ovinos e caprinos. A enfermidade tem relevante impacto econômico para o setor pecuária, onde é considerada uma das mais importantes enfermidades virais de ovinos e caprinos. Para melhor compreender a epidemiologia do ectima contagioso, neste estudo foi realizada uma análise filogenética de 26 cepas de ORFV, obtidas de animais de diferentes estados do Nordeste brasileiro (Paraíba - PB, Pernambuco - PE, Sergipe - SE e Bahia - BA) clinicamente afetados por ORFV. Amplicons do gene B2L de ORF foram submetidos ao sequenciamento. Após alinhamento e edição, 193 pb foram analisadas utilizando o método de neighbor-joining com aplicação de conferências de valores de 1.000. As seqüências isoladas em SE, PB, BA e PE encontram-se divididas em dois grupos com grau de identidade de 64%. Baseado na sequencia do gene B2L analisada foi observado um padrão de agrupamento filogenético independente da espécie de hospedeiro, origem geográfica e tempo de isolamento.

Palavras-chave: Parapoxvirus, ORFV, Filogenia.

ABSTRACT

ORF virus (ORFV) is a prototype of the Parapoxvirus genus responsible for contagious ecthyma (CE) in sheep and goats. The disease has a significant economic impact in the livestock sector and is considered one of the most important viral diseases of sheep and goats. To better understand CE epidemiology, in this study we demonstrated a phylogenetic analysis of ORFV strains. 26 samples of lesions from CE affected animals were analyzed. Animals were from Brazilian Northeast states (PB, PE, SE and BA). The molecular targets (gene B2L) were amplified and subjected to sequencing. After alignment and editing, 193 bp were analyzed using neighbor-joining method with application of the 1000 bootstrap replicates. Sequences, isolated in SE, PB, BA and PE, are divided into two clusters with an identity degree of 64%. Based on the sequence of B2L gene analyzed, a pattern of phylogenetic grouping was observed independent of host species, geographic origin and isolation time.

Keywords: Parapoxvirus, ORFV, Phylogeny.

1 INTRODUÇÃO

Orf vírus (ORFV) é um DNA vírus linear pertencente ao gênero Parapoxvirus da subfamília *Chordopoxvirinae* e Família *Poxviridae*, apresenta vírions envelopado com forma ovóide e pode ser claramente distinguidos por microscopia eletrônica de *Orthopoxvirus* por causa da sua estrutura de superfície regular (Nitsche et al., 2006). O genoma do ORFV é de aproximadamente 135 kb de comprimento e na região central do genoma contém genes altamente conservados e essenciais para replicação viral e morfogênese do vírus.

A enfermidade causada pelo ORFV, ectima contagioso, tem relevante impacto econômico para o setor pecuária, particularmente nos países em desenvolvimento, onde é considerada como uma das mais importantes enfermidades virais de ovinos e caprinos em criações com precária infra-estrutura. A taxa de mortalidade é geralmente inferior a 1%, mas complicações secundárias pode aumentar este valor para cerca de 20-50%. ORFV afeta principalmente pequenos ruminantes. Como pode afetar o homem tem sido considerada uma doença de interesse à saúde pública (BARRAVIEIRA et al., 2005; NANDI et. al., 2011).

ORFV é epiteliotrópico, replica-se nos queratinócitos afetando principalmente a pele desprovida de pelos dos lábios, em volta das narinas, tetos e mucosa oral, progredindo de eritema para pústula e crosta (HOSAMANI et al., 2006; NANDI et. al., 2011) . As lesões ulcerativas podem ser confundidas com a Febre Aftosa (FA), particularmente em ovinos. Os métodos de diagnóstico empregados são a microscopia eletrônica, histopatologia, Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), PCR em tempo real quantitativo (qPCR) e ELISA (NANDI, 2011). No entanto, não há um teste universal padrão e nenhum é capaz de distinguir entre as cepas vacinais do vírus e do vírus selvagem. A análise filogenética é uma ferramenta valiosa que pode auxiliar no diagnóstico e diferenciação de parapoxvirus que estão intimamente relacionados antigenicamente (NITSCHKE A. et al, 2006;. HOSAMANI M. et al, 2009;. ABRAHÃO J. et al, 2009).

No presente estudo foi realizada uma análise filogenética de sequências de amostras de ORFV isoladas dos Estados de Pernambuco, Paraíba, Bahia e Sergipe, Nordeste do Brasil. A árvore filogenética mostrou que essas sequências representam dois grupos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostras

Foram utilizadas amostras de DNA extraídas de crostas de 19 ovinos e de sete caprinos com sintomatologia clínica de EC, originários dos Estados de Pernambuco (BrPE 1.01, BrPE 1.02, BrPE 2.01, BrPE 2.02, BrPE 2.03, BrPE 2.04, BrPE 2.05, BrPE 2.06, BrPE 2.07, BrPE 2.08, BrPE 2.09, BrPE 3.01, BrPE 3.02, BrPE 4 BrPE 5) Paraíba (BrPB 1.01, BrPB 1.02, BrPB 1.03, BrPB 1.04) Bahia (BrBA 1.01, BrBA 1.02) e Sergipe (BrSE 1.01, BrSE 1.02, BrSE 1.03, BrSE 2.01, BrSE 2.02). As amostras foram coletadas entre os anos de 2007 a 2011 e identificadas por PCR e qPCR.

As sequências de parte do gene B2L de ORFV foram obtidas por PCR realizada usando primers PPP-3 e PPP-4 (INOSHIMA et al., 2000). Os produtos de PCR (235 pb) foram purificados utilizando QIAquick PCR Purification Kit Protocol (Qiagen, Alemanha), seguindo as instruções do manual.

2.2 Sequenciamento e estudo filogenético

Os produtos de amplificação por PCR purificados foram sequenciados utilizando ABI 3100 (Applied Biosystems, EUA). Após alinhamento e edição, 193 pb foram analisadas utilizando método de neighbor-joining com aplicação de conferências de valores de 1.000, usando o modelo de Tamura-3 (TAMURA et al., 2007) parâmetros implementados por MEGA 5 (Arizona, EUA). À essas sequências coletadas foram acrescentadas sequências do GenBank (de diferentes localizações geográficas do mundo assim como de cronologia variadas) cujo estudo filogenético já havia sido feito (VENKATESAN et al., 2011; ABRAHÃO et al., 2009). O estudo foi desenvolvido considerando as 26 sequências e incluído 27 sequências do GenBank (número de acesso: GU139356.1, DQ263303.1, DQ263304.1, DQ263305.1 DQ263306.1, EU935106.1, EU327506.1, DQ904351.1, GQ328006.1, AY278208.1, AY424971.1, AY278209.1, AY424970.1, OVU06671, AY386264.1, AY424969.1, AY424972.1, AY424973.1, AY386265.1, AY386263.1, DQ263305.1, FJ808074.1, FJ665818.1, FJ665819.1, EU327506.1, GQ328006.1, JN61810.1).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo foram testadas 26 amostras de lesões de infecções por ORFV de quatro estados do nordeste brasileiros. Nas duas situações de análise filogenética realizadas (apenas com as 26 sequências estudadas e sequenciadas no laboratório ou com mais 27 sequência do GenBank) foi observado que as seqüências estudadas encontram-se divididas em dois grupos com grau de identidade de 64% (Figura 1). Não foi possível observar uma distribuição nesses dois grupos baseadas na cronologia (uma vez que as seqüências analisadas são do período de 2007 a 2011) ou na localização geográfica.

Ao se analisar a distribuição das amostras observa-se que houve predominância das seqüências da PB em um ramo, todas de um mesmo rebanho, assim como as seqüências do estado de SE. As duas seqüências da BA, de um mesmo rebanho, ficaram cada uma em um ramo da árvore assim como as de PE. Duas seqüências isoladas no estado de MG, dentre as seqüências do GenBank incluídas, também se posicionaram separadamente. Apesar da diferença na data de coleta das amostras, assim como a localização geográfica, as seqüências se posicionaram de forma aleatória não sendo possível identificar um critério, cronologia ou geográfica, que possa explicar a estrutura da árvore filogenética consensus gerada. Dessa forma, pode-se concluir, baseado no estudo filogenético realizado, que ORFV tem uma circulação considerada livre e endêmica entre os estados analisados no Brasil.

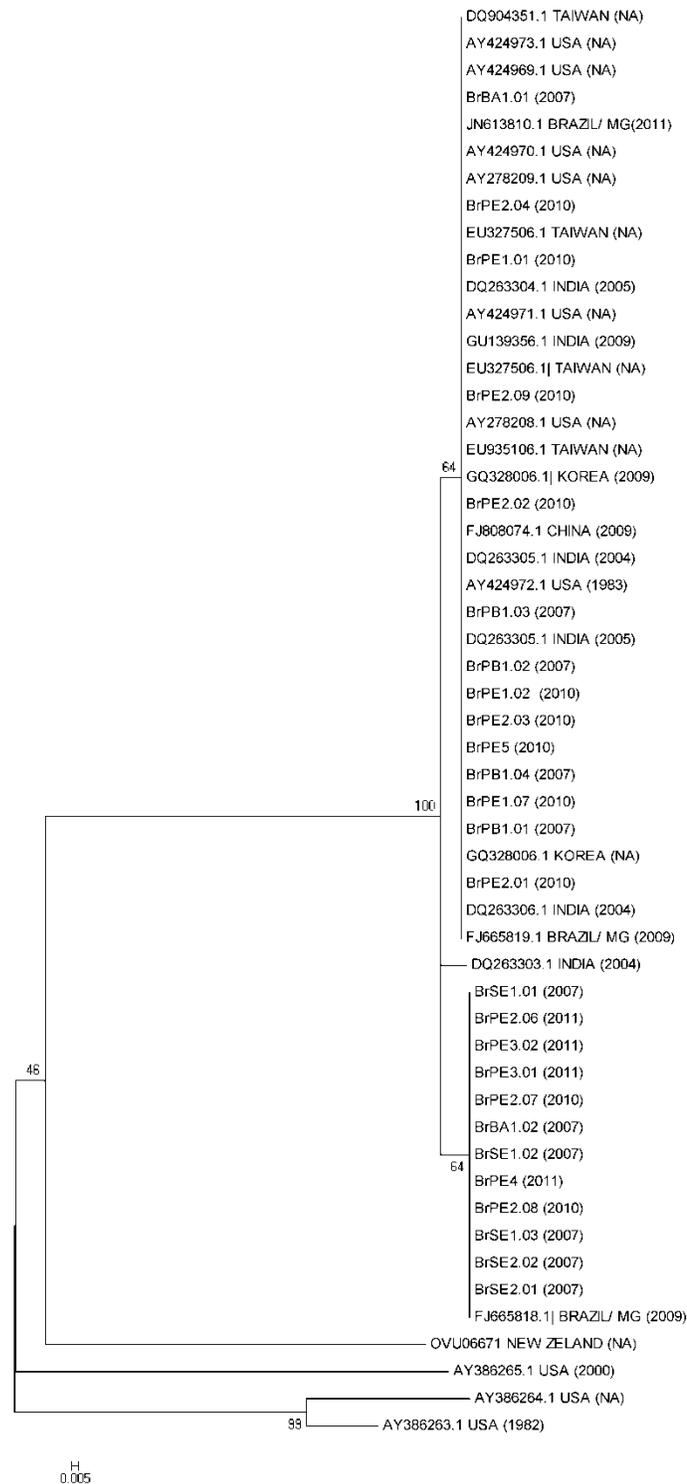


Figura 1: Análise filogenética de 53 seqüências de ORF virus. Método de análise neighbor-joining, com verificação de valores com teste bootstrap 1.000 vezes. Foram analisadas

193 pb do gene B2L do vírus. São 26 sequências identificadas no laboratório, nomeadas de acordo com o país Brasil, estado da coleta da amostra (PB - Paraíba, PE - Pernambuco, SE - Sergipe, BA - Bahia), número do rebanho seguido da amostra e entre parênteses o ano de coleta. As sequências do GenBank estão identificadas com o número de acesso e entre parênteses a data do isolamento. Em algumas situações essa informação não pode ser identificada, recebendo "No annotated"- NA.

O presente estudo foi realizado com amostras de DNA extraído diretamente de achados clínicos, o que minimiza o risco de serem analisados apenas os genótipos de alta frequência. Fato que ocorre quando a análise é feita a partir de cultivo celular, uma vez que a dinâmica das quasispécies sofre a seleção através de fitness viral e a sequência viral de melhor desempenho é a resultante (DOMINGO e HOLLAND, 1992). Dessa forma, o estudo baseado em amostras clínica é bastante representativo do genótipo viral circulante.

Foi observado um polimorfismo G/A na posição 124 entre todas as sequências analisadas (Figura 2). Na tentativa de identificar possível influência do polimorfismo na modelagem da árvore, foi analisada separadamente a influência do mesmo. No entanto, mais uma vez, não possível classificar os dois grupos baseado nesse argumento. É importante observar que dentre as 26 sequências analisadas, apenas 1 gera fator de confusão na classificação quando o foco foi o polimorfismo (BrBA1.01), sugerindo que um maior número de sequências poderia esclarecer melhor qual a relevância desse polimorfismo na classificação assim como na estrutura do vírus.

5. Conclusão

No presente artigo concluiu-se que amostras de ORFV isoladas em quatro estados do nordeste brasileiro (Paraíba, Pernambuco, Sergipe e Bahia) circulam livremente entre as divisas. Baseado no gene B2L foi observado um padrão de agrupamento filogenético independente da espécie de hospedeiro, origem geográfica e tempo de isolamento. Uma visão mais ampla, tendo por base mais regiões genômicas de ORFV é importante para a compreensão da epidemiologia do vírus de circulação, e a evolução no sentido de ampliar o nosso conhecimento na biologia do ORFV.

Agradecimentos

Agradecemos ao CNPq, CAPES e FACEPE pelo suporte financeiro e bolsas para o desenvolvimento do estudo. Ao Programa para desenvolvimento de tecnologias e ferramentas em Saúde – PDTIS pela realização das reações de sequenciamento.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ABRAHÃO J. S., CAMPOS K. R., TRINDADE G. S., GUEDES M. I., LOBATO Z. I., MAZUR C., FERREIRA P. C., BONJARDIM C. A., KROON E. G., 2009. Detection and phylogenetic analysis of Orf vírus from sheep in Brazil: a case report. *Virology Journal* 6, 47-50.
- BARRAVIEIRA, S. R. C. S. Diseases caused by poxvirus – ORF and milker’s nodules – a review. **Journal of Venomous Animal and Toxins Including Tropical Diseases**, Botucatu, v. 11, n.2, p. 102-108, 2005.
- DOMINGO, E., AND HOLLAND, J. J. 1992. Complications of RNA heterogeneity for the engineering of virus vaccines and antiviral agents. *Genet. Eng. (N Y)* 14, 13-31.
- HOSAMANI M., BHANUPRAKASH V., SCAGLIARINI A., SINGH R. K. 2006. Comparative sequence analysis of major envelope protein gene (B2L) of Indian orf viruses isolates from sheep and goats. *Veterinary Microbiology*. 116, 317-324.
- HOSAMANI M., SCAGLIARINI A., BHANUPRAKASH V., MCLNNES C., SINGH R. K. 2009. Orf: an update on current research and future perspectives. *Expert Rev. Anti Infect. Ther*, 7 (7). 879-893.
- INOSHIMA, Y., MOROOKA, A., SENTSU, H., 2000. Detection and diagnosis of Papoxvirus by the polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods* 84, 201-208.

NANDI, S.; UJJWAL, K. de; CHOWDHURY, S. Current status of contagious ecthyma or Orf disease in goat and sheep – A global perspective. **Small Ruminant Research**. v. 96, p. 73 –82, 2011.

NITSCHKE A., BUTTNER M., WILHELM S., PAULI G., MEYER H. 2006. Real-time PCR detection of Parapoxvirus DNA. *Clinical Chemistry*, 52 (2), 316-319.

TAMURA ET AL., 2007 K. TAMURA, J. DUDLEY, M. NEI AND S. KUMAR, *MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0*, *Mol. Biol. Evolut.* **24** (2007), pp. 1596–1599.

VENKATESAN G., BALAMURUNGAN V., BORA D. P., YOGISHARADHYA R., PRABHU M., BHANUPRAKASH V. 2011. Sequence and phylogenetic analyses if an Indian isolated of orf virus from sheep. *Veterinary Italiana*, 47 (3), 323-332.