

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE
MESQUITA FILHO
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E
ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU**

**ASSOCIAÇÃO DA OCORRÊNCIA DO ECTIMA
CONTAGIOSO (*ORF VÍRUS*) EM OVINOS COM SEUS
CUIDADORES**

BRUNA LAPENNA SANCHES FERREIRA

Orientador: Professor Titular José Rafael Modolo

Coorientadora: Pesquisadora Científica VI Edviges Maristela Pituco

BOTUCATU – SP

Julho de 2015

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE
MESQUITA FILHO
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E
ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU**

**ASSOCIAÇÃO DA OCORRÊNCIA DO ECTIMA
CONTAGIOSO (*ORF VÍRUS*) EM OVINOS COM SEUS
CUIDADORES**

BRUNA LAPENNA SANCHES FERREIRA

Orientador: Professor Titular José Rafael Modolo

Coorientadora: Pesquisadora Científica VI Edviges Maristela Pituco

Tese apresentada junto ao programa
de Pós-graduação em Medicina
Veterinária para obtenção do título de
Doutor.

BOTUCATU – SP

Julho de 2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Ferreira, Bruna Lapenna Sanches.

Associação da ocorrência do Ectima Contagioso (Orf vírus) em ovinos com seus cuidadores / Bruna Lapenna Sanches Ferreira. - Botucatu, 2015

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: José Rafael Modolo

Coorientador: Edvirges Maristela Pituco

Capes: 50502000

1. Ovino - Doenças. 2. Pele - Doenças. 3. Doenças transmissíveis. 4. Dermatite de contato - Diagnóstico. 5. Zoonoses. 6. Reação em cadeia de polimerase.

Palavras-chave: Associação; Diagnósticos; Humanos; Orf vírus; Ovinos.

Bruna Lapenna Sanches Ferreira. Associação da ocorrência do Ectima Contagioso (*Orf vírus*) em ovinos com seus cuidadores. Defesa: 20/07/2015. Local: FMVZ/UNESP- Campus de Botucatu/SP.

Comissão examinadora

Dr. José Rafael Modolo

Professor/ Orientador

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública (DHVSP)

UNESP- FMVZ- Botucatu/SP.

Dr. Cassiano Victoria

Professor/ Membro Titular

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública (DHVSP)

UNESP- FMVZ- Botucatu/SP.

Dra. Simone Baldini Lucheis

Pesquisadora VI/ Membro Titular

Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA)

Secretaria da Agricultura e Abastecimento (SAA/SP)

Dra. Liria Hiromi Okuda

Pesquisadora V/ Membro Titular

Laboratório de Víroses de Bovídeos (LVB)

Instituto Biológico de São Paulo (IB)

Dra. Claudia Del Fava

Pesquisadora VI/ Membro Titular

Laboratório de Anatomia Patológica (LAP)

Instituto Biológico de São Paulo (IB)

TÍTULO- Associação da ocorrência do Ectima Contagioso (*Orf vírus*) em ovinos com seus cuidadores.

Bruna Lapenna Sanches Ferreira – Médica Veterinária, Doutoranda da FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Campus Botucatu, Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública.

José Rafael Modolo – Coordenador do Projeto em Pesquisa e Professor Titular da FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Campus Botucatu, Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública.

Edviges Maristela Pituco – Coorientadora do Projeto em Pesquisa, Pesquisadora Científica VI do INSTITUTO BIOLÓGICO DE SÃO PAULO, Responsável Técnica do Laboratório de Víruses de Bovídeos.

Equipe:

Adriana Hellmeister de Campos Nogueira – Médica Veterinária, Pesquisadora Científica III do INSTITUTO BIOLÓGICO DE SÃO PAULO, Laboratório de Víruses de Bovídeos.

Carlos Roberto Padovani – Professor Titular do INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Campus Botucatu, Departamento de Bioestatística.

Cassiano Victoria – Médico Veterinário, Professor Assistente da FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Campus Botucatu, Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública.

Claudia Del Fava – Médica Veterinária, Pesquisadora científica nível VI do INSTITUTO BIOLÓGICO DE SÃO PAULO, Laboratório de Anatomia Patológica.

Claudia Pestana Ribeiro – Médica Veterinária, Assistente Técnico de Pesquisa Científica e Tecnológica do INSTITUTO BIOLÓGICO DE SÃO PAULO, Laboratório de Víruses de Bovídeos.

Denise Theodoro da Silva – Médica Veterinária, Mestre pela FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Campus Botucatu, Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública.

Eliana De Stefano – Bióloga, Pesquisadora Científica IV Médica Veterinária, do INSTITUTO BIOLÓGICO DE SÃO PAULO, Laboratório de Víruses de Bovídeos.

José Carlos de Figueiredo Pantoja - Médico Veterinário, Professor Assistente da FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Campus Botucatu, Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública.

Liria Hiromi Okuda – Médica Veterinária, Pesquisadora Científica V do INSTITUTO BIOLÓGICO DE SÃO PAULO, Laboratório de Víruses de Bovídeos.

Márcia Mayumi – Bióloga, Mestre pelo INSTITUTO BIOLÓGICO DE SÃO PAULO, Laboratório de Víruses de Bovídeos.

Maira de Souza Nunes Martins – Bióloga, Mestre pelo INSTITUTO BIOLÓGICO DE SÃO PAULO, Laboratório de Víruses de Bovídeos.

Silvio Alencar Marques – Professor Titular da FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Campus Botucatu, Departamento de Dermatologia e Radioterapia, Laboratório de Dermatologia Infeciosa, Psoríase e Oncologia.

DEDICATÓRIA

Dedico o presente trabalho:

À minha mãe Adriana Sanches que sempre foi meu ponto de apoio e inspiração; meu irmão Guilherme Sanches que teve muita compreensão; meu noivo Alexandre Abilio que esteve ao meu lado em todos os momentos me ajudando e tendo muita paciência.

À minha avó Aparecida Sanches e aos meus padrinhos Ruth Covelo e Sérgio Covelo que sempre estiveram disponíveis, me incentivando, apoiando e ajudando em tudo que precisei, tornando possível este meu sonho.

Aos meus tios Marsal Sanches e Sônia Sanches e ao meu primo Gustavo Sanches por acreditarem em mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus.

Ao Prof. Dr. José Rafael Modolo, pela orientação, grandes ensinamentos e confiança em mim depositada. Percorreu todo o caminho do doutorado me auxiliando em cada passo e decisão a ser tomada.

À Prof.^a Dr.^a Maristela Edvirges Pituco, pela coorientação, atenção e paciência. Permitiu a realização de nossa pesquisa em uma instituição mundialmente reconhecida como é o Instituto Biológico de São Paulo.

Ao CNPq pela bolsa de doutorado concedida durante a realização deste estudo.

Ao Prof. Dr. José Carlos de Figueiredo Pantoja, por acreditar no trabalho, auxiliar na finalização estatística desta tese.

Ao Prof. Dr. Silvio Alencar, desde nosso primeiro contato se prontificou e ajudou em nossa pesquisa. Realizou no ambulatório de dermatologia da Faculdade de Medicina de Botucatu a biópsia da cuidadora de ovinos que apresentou sinal clínico característico da doença no decorrer do trabalho e cuidou de sua recuperação.

À Dr.^a Simone Fernandes e ao Prof. Dr. Edson Ramos de Siqueira que me apresentaram o mundo das pesquisas e me fizeram acreditar em meu sonho.

Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Padovani que me ajudou estatisticamente a iniciar este projeto montando o delineamento experimental.

Ao Prof. Cassiano Victória, que sempre me ajudou com ideias e todas as vezes que tive os mais diversificados problemas de informática.

À nossa técnica em laboratório Tânia Martins que foi ímpar durante todo meu doutorado. Não mediu esforços durante todo tempo e sempre esteve disposta a me ajudar.

À Adriana Vieira e Fernando José Paganini Listoni, pela atenção e dedicação que sempre me receberam, sem medir esforços para me auxiliar e ajudar.

Aos funcionários do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública que sempre me receberam com atenção.

MSc. Denise Theodoro da Silva pela ajuda nas colheitas das amostras, participação em todas as atividades ligadas ao projeto de estudo, amizade, dedicação e companheirismo durante toda sua residência e mestrado.

MSc. Jéssica Gouveia, Nicolý Pereira, Arthur Pombo, Luciane Fernandes que sempre foram muito atenciosos e companheiros.

Às pesquisadoras do Instituto Biológico de São Paulo, Adriana, Cláudia Del Fava, Eliana, Líria, Maira, Márcia e em especial Cláudia Pestana, que tornaram possível o desenvolvimento deste trabalho realizando os testes diagnósticos.

À Luzinalva Tristão, auxiliar de enfermagem, pois sem ela não poderíamos ter realizado as colheitas de sangue humano, além de toda dedicação e empenho durante toda parte experimental em campo.

Às amigas que também foram estagiárias, Mariana Frasson e Karina Oliveira, pela ajuda e esforço.

A Dr.^a Renata Pereira Marques que foi fundamental durante todo meu mestrado e doutorado, me ensinando, tendo muita paciência, me ajudando e sendo uma amiga para todas as horas.

Aos demais docentes do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública que me acompanharam nas disciplinas e nas dúvidas durante toda pós-graduação.

A minha família, Adriana Sanches, minha mãe, que é o meu exemplo de vida e a pessoa por quem consegui tudo o que sou hoje; meu irmão Guilherme Sanches, por apoiar e me incentivar; meu noivo Alexandre Abilio por entender as viagens, as preocupações, as horas “infinitas” em frente ao computador pesquisando e me apoiar todos os dias; minha avó Aparecida Sanches que sempre esteve ao meu lado e me ajudou em tudo sempre; meus tios e padrinhos Ruth e Sérgio Covelo que me apoiaram, ajudaram e sempre estiveram muito presentes em todos esses anos; meus tios Sônia e Marsal Sanches e ao meu primo Gustavo Sanches por vibrarem com minhas conquistas e ficarem ao meu lado. Todos entenderam o meu sonho, me ajudaram e cada um de sua maneira não medindo esforços para que ele se tornasse realidade.

Aos meus sogros João Abilio e Walquiria Abilio pela compreensão e paciência.

À minha cunhada Fernanda Abilio pelo apoio sem medir esforços.

Às amigas Dr.^a Camila Abrahão, Dr.^a Aurélia Araújo, MSc. Fabiana Denipote, Dr.^a Bruna Rafacho, MSc. Fernanda Fontes, Taís Anselmo, pelo apoio e companheirismo. Sem elas com certeza tudo teria sido muito mais difícil.

Ao assessor administrativo do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Wanderley que sempre esteve disposto a me ajudar.

Aos produtores rurais que abriram as porteiras de sua casa permitindo que esse estudo se concretizasse.

Aos ovinos que participaram, pois sem eles, nada disso seria possível.

A Casa da Agricultura de Itatinga que tão bem nos recebeu e divulgou em toda região nossa pesquisa, além de reunir produtores de ovinos para uma palestra abordando o tema da pesquisa.

A todas as pessoas que trabalham com ovinos e foram em nossas palestras por todo o Estado de São Paulo.

A todos os funcionários da FMVZ que de alguma forma cooperaram e me incentivaram nos momentos difíceis.

E a todas aquelas pessoas não citadas, mas tidas com muito carinho na memória.

“Os que se encantam com a prática sem a ciência são como os timoneiros que entram no navio sem timão nem bússola, nunca tendo certeza do seu destino.”

(Leonardo da Vinci)

SUMÁRIO

| | Página |
|--|---------------|
| LISTA DE FIGURAS | xiii |
| LISTA DE QUADROS | xv |
| LISTA DE TABELAS | xvi |
| RESUMO | 1 |
| ABSTRACT | 3 |
| 1 – INTRODUÇÃO | 5 |
| 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 7 |
| 2.1 - Importância da ovinocultura | 7 |
| 2.2 – Etiologia | 7 |
| 2.3 - Genoma do <i>Orf vírus</i> | 8 |
| 2.4 - Ciclo replicativo do <i>Orf vírus</i> | 10 |
| 2.5 – Patogênese | 11 |
| 2.6 – Imunopatogenia | 13 |
| 2.7 – Epidemiologia..... | 16 |
| 2.7.1 - Ocorrência e importância econômica..... | 16 |
| 2.7.2 - Morbidade, mortalidade e transmissão | 17 |
| 2.7.3 - Importância zoonótica | 19 |
| 2.8 - Achados clínicos | 20 |
| 2.9 - Detecção viral e imunodiagnóstico | 21 |
| 2.10 – Tratamento..... | 23 |
| 2.11 - Controle e prevenção..... | 24 |
| 3 - JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS | 25 |
| 4 - MATERIAL E MÉTODOS..... | 26 |
| 4.1 - Seleção das propriedades e dos animais | 26 |
| 4.2 - Colheitas de amostras nos animais e humanos..... | 27 |

| | |
|---|----|
| 4.2.1 - Nos ovinos | 27 |
| 4.2.2 - Nos cuidadores dos ovinos | 28 |
| 4.3 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido | 28 |
| 4.4 – Análise laboratorial..... | 29 |
| 4.4.1 – Virusneutralização..... | 29 |
| 4.4.2 – PCR..... | 32 |
| 4.4.3- Anatomia Patológica | 39 |
| 4.5 - Análise estatística | 42 |
| 5- RESULTADOS E DISCUSSÃO | 44 |
| 5.1- Cidades das propriedades estudadas..... | 44 |
| 5.2- Amostragens dos ovinos e seus cuidadores..... | 46 |
| 5.3- Frequências das amostras..... | 47 |
| 5.4- Reações de virusneutralização | 49 |
| 5.5 – PCR..... | 53 |
| 5.5.1- PCR do sangue..... | 53 |
| 5.5.2- PCR das crostas | 53 |
| 5.7 - Resultados histopatológicos | 60 |
| 5.8- Análises das crostas | 63 |
| 5.7 - Mediana dos títulos de anticorpos por VN | 67 |
| 5.8- Mediana dos títulos de anticorpos dos ovinos com crosta submetidas à PCR. | 68 |
| 6 – CONCLUSÃO | 69 |
| 7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 70 |
| ANEXOS | 83 |

LISTA DE FIGURAS

| | Página |
|---|---------------|
| FIGURA 1- Esquema ilustrativo de uma lesão por <i>Poxvírus</i> no decorrer do tempo. Fonte: Patologia Veterinária - McGavin, et al. (2009). | 22 |
| FIGURA 2- (a) Colheita de sangue em ovino. (b) Biópsia de ovino com suspeita clínica para Ectima Contagioso. Botucatu, SP- 2015..... | 27 |
| FIGURA 3- (a) Colheita de sangue nos humanos. (b) Biópsia de cuidadora de ovinos com suspeita clínica de Ectima Contagioso. Botucatu, SP- 2015..... | 28 |
| FIGURA 4- Distribuição e frequência das amostras de ovinos e seus cuidadores suspeitas para Ectima Contagioso em colhidas por propriedade nas diferentes cidades do Estado de São Paulo. Botucatu, SP - 2015..... | 45 |
| FIGURA 5- Frequência da colheita de amostras de ovinos e seus cuidadores suspeitas para <i>Orf vírus</i> nas propriedades. Botucatu, SP - 2015..... | 46 |
| FIGURA 6- Frequência da colheita de amostras de crosta de ovinos e seus cuidadores suspeitas para Ectima Contagioso (<i>Orf vírus</i>) nas propriedades. Botucatu, SP - 2015. | 47 |
| FIGURA 7- Frequência da colheita de crostas de ovinos e seus cuidadores suspeitas para Ectima Contagioso (<i>Orf vírus</i>) na realização do teste diagnóstico histopatológico. Botucatu, SP - 2015. | 48 |
| FIGURA 8- Frequência da colheita de crostas de ovinos e seus cuidadores suspeitas para Ectima Contagioso (<i>Orf vírus</i>) na realização do teste diagnóstico PCR. Botucatu, SP - 2015. | 48 |
| FIGURA 9- Prevalência de anticorpos <i>anti-Orf vírus</i> pela técnica de virusneutralização em ovinos e seus cuidadores. Botucatu, SP - 2015. | 50 |
| FIGURA 10- Distribuição em conjunto dos títulos de anticorpos expressos em \log_{10} , obtidos pelo teste diagnóstico de virusneutralização no soro dos ovinos e de seus cuidadores para Ectima Contagioso (<i>Orf vírus</i>). Botucatu, SP - 2015. | 52 |
| FIGURA 11- (A) Controle negativo – célula Vero 40x; (B) Efeito citopático padrão (ECP) - <i>Orf vírus</i> em células Vero 40x. Botucatu, SP - 2015. | 53 |
| FIGURA 12- Detecção de <i>Orf vírus</i> em amostras de crosta ovina pela técnica de PCR. Botucatu, SP- 2015..... | 55 |

| | |
|--|----|
| FIGURA 13- Árvore filogenética baseada nas sequências nucleotídicas do gene B2L..... | 56 |
| FIGURA 14- Percentual de identidade entre <i>Orf vírus</i> baseado nas sequências de aminoácidos do gene B2L. Botucatu, SP- 2015..... | 58 |
| FIGURA 15- Percentual de identidade entre <i>Orf vírus</i> , baseado nas sequências parciais de nucleotídeos do gene B2L. Botucatu, SP- 2015. | 59 |
| FIGURA 16- Biópsia do plano nasolabial de ovino com diagnóstico histopatológico sugestivo de Ectima Contagioso (<i>Orf vírus</i>) - degeneração balonosa (seta branca) e inclusão intracitoplasmática eosinofílica (seta azul) nos queratinócitos localizados no estrato espinhoso da epiderme (Coloração hematoxilina eosina, aumento 630x). Botucatu, SP- 2015..... | 60 |
| FIGURA 17- Biópsia do plano nasolabial de ovino com diagnóstico histopatológico sugestivo de Ectima Contagioso (<i>Orf vírus</i>) - vesícula localizada no estrato espinhoso de epiderme (seta branca). Ainda observam-se algumas inclusões intranucleares eosinofílicas no citoplasma do queratinócito do estrato espinhoso superficial (seta azul) (coloração hematoxilina eosina, aumento 630x). Botucatu, SP- 2015. | 61 |
| FIGURA 18- Biópsia do plano nasolabial de ovino com diagnóstico histopatológico sugestivo de Ectima Contagioso (<i>Orf vírus</i>)- pústula localizada no estrato espinhoso da epiderme. Intenso infiltrado neutrofílico (coloração hematoxilina eosina, aumento 400x). Botucatu, SP- 2015..... | 62 |
| FIGURA 19- Biópsia do plano nasolabial de ovino com diagnóstico histopatológico sugestivo de Ectima Contagioso (<i>Orf vírus</i>) - crosta formada por tecido necrosado intensamente infiltrado por neutrófilos e exsudato (coloração hematoxilina eosina, aumento 400x). Botucatu, SP- 2015..... | 62 |
| FIGURA 20- (a) Animal com sinal clínico de Ectima Contagioso nos lábios; (b) Animal com sinal clínico de Ectima Contagioso na gengiva; (c) Animal com sinal clínico nos tetos; (d) Animal com sinal clínico de Ectima Contagioso no focinho. Botucatu, SP- 2015..... | 65 |
| FIGURA 21- Cuidadora de ovinos com sinais clínicos sugestivos de Ectima Contagioso (<i>Orf vírus</i>). Botucatu, SP- 2015..... | 66 |

LISTA DE QUADROS

Página

| | |
|--|----|
| QUADRO 1- Descrição dos <i>primers</i> utilizados nas reações de <i>hemi-nested</i> PCR para <i>Orthopoxvirus</i> | 33 |
| QUADRO 2- Ciclo de amplificação da <i>hemi-nested</i> PCR para <i>Parapoxvirus</i> . . | 37 |
| QUADRO 3- Preparo da mistura de reagentes para a reação de sequenciamento..... | 38 |
| QUADRO 4- Ciclo de amplificação da reação de sequenciamento. | 39 |
| QUADRO 5- Etapas e reagentes do protocolo de desidratação, diafanização e embebição de tecidos, modificado de Prophet (1995). | 40 |
| QUADRO 6- Protocolo de desparafinização, hidratação, coloração, desidratação e diafanização de fragmentos de tecidos cortados em micrótomo, modificado de Allen (1995). | 41 |

LISTA DE TABELAS**Página**

| | |
|--|----|
| TABELA 1- Prevalência do teste de virusneutralização no soro dos ovinos e de seus cuidadores para Ectima Contagioso (<i>Orf vírus</i>). Botucatu, SP- 2015..... | 49 |
| TABELA 2- Distribuição dos títulos de anticorpos expressos em log ₁₀ , obtidos pelo teste diagnóstico de virusneutralização no soro de ovinos e de seus cuidadores para Ectima Contagioso (<i>Orf vírus</i>). Botucatu, SP - 2015. | 51 |
| TABELA 3- Comparação dos resultados do teste diagnóstico histopatológicos entre ovinos e seus cuidadores com suspeita de Ectima Contagioso (<i>Orf vírus</i>). Botucatu, SP - 2015. | 64 |
| TABELA 4- Comparação das crostas de ovinos com lesões características produzidas por <i>Orf vírus</i> e resultados positivos ao teste diagnóstico da PCR. Botucatu, SP- 2015. | 66 |
| TABELA 5- Mediana dos títulos de anticorpos no teste diagnóstico de virusneutralização para Ectima Contagioso (<i>Orf vírus</i>) em ovinos. Botucatu, SP - 2015. | 67 |
| TABELA 6- Mediana dos títulos de anticorpos no teste diagnóstico de virusneutralização para Ectima Contagioso (<i>Orf vírus</i>) nos cuidadores dos ovinos. Botucatu, SP - 2015. | 68 |
| TABELA 7- Mediana dos títulos de anticorpos dos ovinos com suspeita de Ectima Contagioso (<i>Orf vírus</i>) que apresentaram crostas e foram submetidas ao teste diagnostico da PCR. Botucatu, SP - 2015. | 68 |

Bruna Lapenna Sanches Ferreira. Associação da ocorrência do Ectima Contagioso (*Orf vírus*) em ovinos com seus cuidadores. Botucatu, SP. 2015, 91 p. Doutorado. Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu.

RESUMO

Responsável por perdas econômicas significativas nos rebanhos afetados, o Ectima Contagioso é uma enfermidade causada pelo *Orf vírus* pertencente ao gênero *Parapoxvirus*, epiteliotrófico, da família *Poxviridae* e subfamília *Chordopoxvirinae*. Pode ser transmitida a humanos que manipulam e trabalham com ovinos infectados, causando lesões crostosas e proliferativas na pele e nas junções mucocutâneas, tanto em animais como em humanos. O estudo evidenciou a difusão da enfermidade no Estado de São Paulo. Foram amostrados 42 (8,64%) cuidadores de animais e 444 (91,36%) ovinos (n=486). Dentre estes, 453 (93,21%) não apresentaram sinais clínicos, enquanto que 33 (6,79%) casos suspeitos da doença (32 ovinos e um cuidador) que foram biopsiados e realizados os testes histopatológicos e de PCR. Deste total amostrado (n= 486), foram sugestivos para Ectima Contagioso 6,38% e 0,41% sugestivos para outras lesões de pele no exame histopatológico. No exame de PCR dentre os 486 amostrados, 4,32% foram positivas, enquanto 2,47% apresentaram resultado negativo. A prevalência de reagentes por virusneutralização foi de 67% nos ovinos e em seus cuidadores de 76% (p= 0,22). A distribuição dos títulos teve diferença estatística significativa entre as espécies com p = 0,0048. Todas as 486 amostras pesquisadas, foram negativas no exame de PCR do sangue. A prevalência de animais com crosta resultou em 7,2% e em seus cuidadores 2,4%. As análises estatísticas foram realizadas com o programa SAS (SAS Institute, 2011) em nível de significância de 0,05.

Concluiu-se teste de virusneutralização no soro entre as espécies foi significativo estatisticamente (p = 0,048), com isso, sugere-se que quanto maior a convivência dos ovinos com seus cuidadores; a concordância entre

os métodos diagnósticos de virusneutralização, PCR e histopatológico são importantes associações para o diagnóstico conclusivo da doença; a enfermidade está difundida no Estado de São Paulo e a distribuição geográfica não influenciou a semelhança genética do vírus.

Palavras-chave: *Orf vírus*, diagnósticos, ovinos, humanos, associação.

Bruna Lapenna Sanches Ferreira. Occurrence of the Association of Ecthyma Contagious (*Orf virus*) in sheep and their caregivers. Botucatu, SP. 2015, 91 p. PhD. Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho" Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Botucatu.

ABSTRACT

Responsible for significant economic losses in affected flocks, the Contagious Ecthyma is a disease caused by *Orf virus* belonging to the genus *Parapoxvirus*, epitheliotropic, the *Poxviridae* family and subfamily *Chordopoxvirinae*. It could be transmitted to humans who handle and work with infected sheep, causing crusted lesions and proliferative skin and the mucocutaneous junction, both in animals and in humans. The study showed the disease diffusion in São Paulo. They sampled 42 (8.64%) Animal caregivers and 444 (91.36%) sheep (n = 486). Of these, 453 (93.21%) showed no clinical signs, while 33 (6.79%) suspected cases of the disease (32 sheep and a caregiver) that were biopsied and performed histopathological and PCR tests. This all samples (n = 486) were suggestive of Ecthyma Contagious 6.38% and 0.41% suggestive of other skin lesions on histopathological examination. In examining PCR among 486 sampled, 4.32% were positive, while 2.47% were negative. The prevalence of reagents for virus neutralization was 67% in sheep and their caregivers 76% (p = 0.22). The distribution of titles had statistically significant differences between species with p = 0.0048. All surveyed 486 samples were negative in PCR test blood. The prevalence of animals with crust resulted in 7.2% and 2.4% their caregivers. Statistical analyzes were performed with SAS software (SAS Institute, 2011) at 0.05 significance level.

Virus neutralization test in conclusion serum between species was statistically significant (p = 0.048), therefore, it is suggested that the higher the coexistence of sheep with their caregivers; the correlation between the diagnostic methods of virus neutralization, PCR and histopathology are important associations for the conclusive diagnosis of the disease; the

disease is widespread in São Paulo and the geographical distribution did not influence the genetic similarity of the virus.

Keywords: *Orf virus*, diagnostics, sheep, humans, association.

1 – INTRODUÇÃO

Os ovinos foram a primeira espécie a ser domesticada e desde então acompanha o homem. A ovinocultura é uma das atividades que proporciona maior fonte de alternativas para subsistência, pois fornece pele e lã para vestuários, além de leite e carne para alimentação (FERNANDES, 1989).

Há mais de 150 zoonoses descritas nas diferentes espécies de animais na América Latina e Caribe, pela Organização Pan-americana de Saúde (RADOSTITS et al., 2012). Nos ovinos, a doença Ectima Contagioso, causada pelo *Orf vírus* merece destaque (BARROS, 2007; RADOSTITS et al., 2012) por causar uma enfermidade zoonótica de carácter ocupacional, acometendo mais comumente os cuidadores dos ovinos (NOURANI e MALEKI, 2006). As infecções acidentais além de poderem acometer os humanos (KURODA et al., 1999), também podem infectar bovinos, caninos (BARROS, 2007), felinos e animais silvestres (AL-SALAM et al., 2008).

Está mundialmente distribuída (RADOSTITS et al., 2012). O primeiro caso do *Orf vírus* em ovelhas foi descrito por Steeb em 1787 e em humanos foi registrado por Newson e Cross em 1934 por Barravieira (2005).

É uma enfermidade viral que causa lesões crostosas e proliferativas na pele e nas junções mucocutâneas (HAIG e MERCER, 1998; PUGH, 2005). A doença ocorre causando atraso de desenvolvimento e graus variados de dor, além de perdas econômicas. Embora comum em cordeiros com três a seis meses de idade, os animais de 10 a 12 dias de idade (RADOSTITS et al., 2012) são mais vulneráveis, ocasionando lesões inflamatórias proliferativas ao redor da boca e das narinas (HAIG, 2006), as quais são progressivas e debilitantes, reduzindo a capacidade de alimentação dos animais (HAIG, 2006; FLEMING; MERCER 2007). Quando a infecção é introduzida pela primeira vez no rebanho, os animais adultos também podem se infectar (BARROS, 2007).

Os surtos em ovinos ocorrem a qualquer tempo, porém são mais comuns em condições secas nos animais de pasto (RADOSTITS et al., 2012). A disseminação é muito rápida e ocorre pelo contato com outros animais acometidos ou por fômites, resultando em um surto (PUGH, 2005;

RADOSTITS, 2012). O vírus penetra na pele lesada, evoluindo para pápulas, vesículas, pústulas e crostas diminuindo a lucratividade do produtor (ROBINSON e BALASSU, 1981).

Em humanos a infecção pelo *Orf vírus* é similar em aparência e proporciona fatores de risco para infecções potencialmente fatais como o antraz cutâneo, tularemia, inoculação primária de tuberculose, cancro sífilítico, esporotricose, granuloma piogênico, neoplasia (GEERNICK et al., 2001). Desta forma, tanto a infecção pelo *Orf vírus*, como pelo antraz, são adquiridas naturalmente por humanos que têm exposição junto aos ovinos e cabras (UZEL et al., 2005). Assim como nos animais, não há tratamento específico em humanos para essa enfermidade (RADOSTITS et al., 2012). A relação entre a vacinação de ovinos e caprinos para *Orf vírus* e a infecção pelo *Orf vírus* em humano, subsequente, deve ser considerada em futuras investigações de saúde pública (GILRAY et al., 1998).

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 - Importância da ovinocultura

Mudanças significativas para a consolidação da cadeia produtiva da ovinocultura no Brasil vêm acontecendo, a começar pelo despertar da atenção dos governantes, técnicos e produtores, o que levou ao desenvolvimento de alguns segmentos, devido à modernização e o aumento de pesquisas ligadas a produção animal; a melhoria e crescimento organizacional dos produtores; o aumento da assimilação das novas tecnologias; a maior facilidade para financiamentos, facilitando assim o acesso ao crédito e, o aumento da demanda por produtos derivados dos ovinos (BEBER et al, 2005).

A ovinocultura é uma atividade econômica explorada em todos os continentes, variando as raças de acordo com as condições climáticas e territoriais, necessidades de exploração e de mercado. O Brasil tem grande potencial de mercado, pois, tem bom espaço territorial, possui uma grande lacuna a ser preenchida quanto ao consumo interno de carne ovina e têm atributos necessários para também ser um grande exportador. Aproximadamente 50% da carne ovina consumida oficialmente no país são importadas de outros países como Uruguai, Argentina e Nova Zelândia (SIMPLÍCIO, 2001; ASPACO, 2003; 2004).

2.2 – Etiologia

O Ectima Contagioso é causado pelo *Orf vírus*, um vírus DNA, pertencente ao gênero *Parapoxvirus* epiteliotrófico, da família Poxviridae e pertencente à subfamília Chordopoxvirinae (ICTV, 2014). Pode ser transmitido aos humanos que trabalham com ovinos infectados ou pessoas que manipulam algum material contaminado pelo vírus (RADOSTITS et al., 2012; PUGH, 2005; HOSMARINI et al. 2009). O *Parapoxvirus ovino* está em estreita relação com dois outros *Parapoxvirus* bovinos (ROLLE, et al., 2006) de importância veterinária e incluem o vírus da pseudovaríola e o da estomatite papular bovina que produzem lesões cutâneas em bovinos (HAIG, 2006). Dentre os membros

do gênero *Parapoxvirus*, o *Orf vírus* é responsável pelos problemas mais graves em animais de interesse econômico, principalmente em casos complicados por infecções bacterianas secundárias e miíases (BUTTNER e RZIHA, 2002).

Segundo Santana (2008), são os maiores e mais complexos vírus conhecidos. Replicam-se no citoplasma de células de hospedeiros vertebrados e invertebrados. É um vírus envelopado, apresentando-se com morfologia ovoide. Barravieira (2005) o descreve com diâmetro entre 140-170x 200-300nm e com cadeia dupla de DNA de 70,2 a 148,5kb, que se tem demonstrado zona com uma extensa hibridação cruzada entre amostras de diferentes membros do gênero, assim como, amplas sequências de divergências que não coincidem com a reação imunológica cruzada observada entre os mesmos. Sua sequência genômica revela que muitos dos genes que induzem a virulência e imunogenicidade estão concentrados nas regiões terminais (BARRAVIEIRA, 2005).

As lesões causadas pelo *Orf vírus* são geralmente restritas aos sítios de entrada do vírus, incluindo o epitélio dos lábios, narinas e mucosa oral. Após penetrar por abrasões na pele, na junção mucocutâneas dos lábios ou na mucosa oral (FLEMING e MERCER, 2007), o vírus replica em queratinócitos da epiderme (HAIG et al., 1999).

2.3 - Genoma do *Orf vírus*

O genoma do *Orf vírus* consiste em uma molécula de DNA linear de fita dupla com aproximadamente 138 kb e contém presumidamente 131 genes (DELHON et al., 2004; MERCER et al., 2006) sem extremidades livres e os *Poxvírus* são os maiores vírus dos animais. As duas cadeias de DNA que compõem o genoma são unidas por *loops* em *hairpin* (MOSS, 2007). As cadeias têm forma retangular ou ovoide, sistema complexo. Semelhante aos outros *Poxvírus*, o genoma do *Orf vírus* é composto por uma área codificante central flanqueada por duas regiões de sequências repetidas invertidas (ITRs), que são idênticas, mas opostamente orientadas nas duas extremidades do genoma (MOSS, 2007; DELHON et al., 2004). As ITRs do genoma dos

Poxvírus incluem: as regiões em *loop*, ricas em A + T e não complementares entre si; uma área de 100pb altamente conservada que contém sequências requeridas para a resolução das formas concateméricas de replicação do genoma; variável número de sequências repetidas em *tandem*; e até sete regiões abertas de leitura (*Orfs*) (MOSS, 2007). As ITRs do *Orf vírus* contêm 3,9 kb e apenas um gene (*Orf vírus001*) é completamente localizado nas ITRs, enquanto que o gene *Orf vírus002* inicia na região central única e termina nas ITRs (DELHON et al., 2004).

O genoma do *Orf vírus* é organizado em uma região central conservada, flanqueada por zonas terminais variáveis (MOSS, 2007), enquanto em outros *Poxvírus* ele atinge variações de regiões terminais (MOSS, 2007; DELHON et al., 2004; MERCER et al., 2006). A região central do genoma contém genes homólogos e conservados entre os *Poxvírus* (*Orf vírus009 a Orf vírus111*), e os produtos desses genes participam de mecanismos básicos de replicação, estrutura e morfogênese (MOSS, 2007). Já as regiões terminais variáveis do genoma (*Orf vírus001 a Orf vírus008 e Orf vírus112 a Orf vírus134*) representam aproximadamente 20% dele e codificam produtos parcialmente envolvidos na patogênese. Estes incluem genes com potencial papel na determinação do espectro de hospedeiros (proteínas com sequências repetidas de ankirina: *Orf vírus008, Orf vírus123, Orf vírus126, Orf vírus128 e Orf vírus129*), evasão (*Orf vírus127*) e modulação da resposta imune (*Orf vírus117*), resposta antiapoptótica (*Orf vírus125*) e virulência (*Orf vírus132*) (FLEMING et al., 1997; DEANE et al., 2000; DELHON et al., 2004; MERCER et al., 2006; WESTPHAL et al., 2007).

O genoma do *Orf vírus* codifica 15 genes localizados principalmente nas regiões terminais variáveis do genoma, que não possuem homologia com genes de outra origem celular ou viral. Dentre estes, 13 genes (*Orf vírus001, Orf vírus005, Orf vírus012, Orf vírus013, Orf vírus024, Orf vírus073, Orf vírus113, Orf vírus115, Orf vírus116, Orf vírus119, Orf vírus120, Orf vírus121 e Orf vírus124*) são também encontrados no genoma de outro membro do gênero *Parapoxvirus*, o vírus da estomatite papular bovina, com identidade de aminoácidos variando de 29% a 64%, enquanto os outros dois genes (*Orf vírus002 e Orf vírus118*) estão presentes no genoma do *Orf vírus*. A função

desses genes únicos dos *Parapoxvirus* ainda não foi determinada (DELHON et al., 2004).

2.4 - Ciclo replicativo do *Orf vírus*

Os *Poxvirus* são uma exceção entre os vírus DNA, pois o processo replicativo ocorre no citoplasma das células infectadas (MOSS, 2007; SCHRAMM e LOCKER, 2005). Eles têm sua própria maquinaria de síntese de RNA e DNA, codificam todas as enzimas necessárias para a transcrição e replicação do genoma viral. Os *Poxvirus* empacotam nos vírions as enzimas essenciais para a produção e modificação dos RNA mensageiros (RNAm) para a síntese de suas proteínas no início do ciclo replicativo e ainda são dependentes de vários fatores auxiliares da célula hospedeira (CANAL, 2007). A expressão gênica dos *Poxvirus* é caracterizada pela transcrição temporal de três classes de genes: *early*, *intermediate* e *late* (MOSS, 2007; CANAL, 2007). A transcrição de cada classe de genes requer a presença de fatores de transcrição específicos, que são produzidos pela expressão dos genes da classe precedente (CANAL, 2007).

Após a fusão do envelope do vírion com a membrana plasmática ou após a endocitose, o núcleo viral é liberado no citoplasma e a expressão gênica é iniciada com a transcrição dos genes da classe *early* ainda no interior do núcleo viral (MOSS, 2007). Os RNAm transcritos no interior do núcleo viral são liberados no citoplasma para serem traduzidos. A maioria dos genes transcritos nesta fase participa dos processos de desnudamento e replicação do DNA, virulência, evasão do sistema imune e na transcrição dos genes das classes *intermediate* e *late* (SCHARAMM e LOCKER, 2005; ASSARSSON et al., 2008). Mas grande parte dos genes pertencentes às classes *intermediate* e *late* codificam proteínas que são empacotadas no vírion como componentes do núcleo ou do envelope viral (ASSARSSON et al., 2008).

A replicação do genoma dos *Poxvirus* ocorre em locais específicos do citoplasma, denominados viroplasmas ou fábricas virais, que são acopladas ao retículo endoplasmático rugoso, e com a progressão do ciclo tornam-se dispersas pelo citoplasma (MOSS, 2007; CANAL, 2007; KATSAFANAS e

MOSS, 2007). Além de servirem como sítio de replicação do genoma e montagem dos vírions, os viroplasmas também suportam a transcrição de genes das classes *intermediate* e *late* e ainda atuam como local de tradução de proteínas virais (KATSAFANAS e MOSS, 2007).

Após o início da replicação, ocorre uma alteração na expressão gênica, quando os produtos dos genes *early* atuam como fatores de transcrição para os genes *intermediate* e *late*. Assim, esses são transcritos e traduzidos originando as proteínas que participam da morfogênese, assim como os fatores de transcrição dos genes *early* que são empacotados com o vírion para atuarem no próximo ciclo de infecção (MOSS, 2007; CANAL, 2007).

Replicação citoplasmática: 1 - fixação das proteínas virais para aminoglicosídeos por endocitose do vírus na célula hospedeira. 2 - fusão com a membrana plasmática para liberar o núcleo no citoplasma da célula. 3 - fase inicial: genes precoces são transcritos no citoplasma pelo RNA polimerase viral. 4 - O núcleo é completamente revestido com a expressão final, o genoma viral fica livre no citoplasma. 5 - fase intermediária: genes intermediários são expressos provocando a replicação do DNA genômico, cerca de 100 minutos após a infecção. 6 - fase tardia: genes tardios são expressos a partir de 140 minutos a 48 horas após a infecção. Ocorre a produção de todas as proteínas estruturais. 7 - Montagem de vírus descendentes começa pelos fatores citoplasmáticos virais, produzindo uma partícula esférica imatura. Esta partícula do vírus amadurece em formato de tijolo por vírus intracelular maduro. 8 - Os vírus intracelulares maduros podem ser liberados após a lise celular, ou podem adquirir uma segunda membrana do complexo de Golgi e germinar como vírus externo envelopado (CANAL, 2007).

2.5 – Patogênese

O vírus penetra por meio de abrasões ou escarificações da pele, uma vez que a sua replicação ocorre nos queratinócitos basais. Por isso, a condição para a instalação da infecção viral não é a destruição da epiderme em si, mas a replicação nos queratinócitos associadas ao processo de reparação da derme lesada (McKEEVER et al., 1988). Esse mecanismo de infecção explica o fato

de o vírus não causar lesões na pele íntegra, ou após injeção intradérmica, intravenosa ou subcutânea (BOUGHTON e HARDY, 1934).

As lesões de pele apresentam graus variáveis, podendo ser imperceptíveis ou graves. A doença se inicia com a formação de pápulas, vesículas e pústulas, seguidas de crostas. As primeiras lesões são observadas na junção mucocutânea oral, frequentemente nas comissuras labiais, disseminando-se posteriormente para região periorbital, perinasal e fossas nasais. Em casos mais graves as lesões penetram nas gengivas, almofadinha dental, palato, língua e esôfago. Estas lesões podem afetar também a pele da região inguinal, vulva e ânus, prepúcio, membros, orelhas e cauda (BARROS, 2007; RADOSTITS et al., 2012). Em casos graves, causa úlceras no esôfago e estômago, contribuindo para inanição (ROLLE, M. et al; 2006).

Na maioria dos casos, as lesões são agudas, restringindo-se à comissura labial, narinas e tetos dos animais (BOUGHTON e HARDY, 1934; NÓBREGA JUNIOR. et al., 2008). Apesar de essas lesões serem geralmente autolimitantes (KESHAN et al., 2010), já foram descritos casos de infecção crônica em caprinos (de la CONCHA-BERMEJILLO et al., 2003), lesões verrucosas atípicas na face e na pele dos membros de ovinos (YERUHAM et al., 2000), lesões vesiculares na mucosa oral (McELROY e BASSETT, 2007) e proliferativas e crostosas na pele da cabeça, pescoço e flanco de caprinos (COATES e HOFF, 1990).

Após o rompimento das vesículas, inicia-se a formação das crostas. A recuperação pode ser rápida, se não ocorrerem infecções secundárias. As lesões no interior da boca dificultam ou podem até impedir que o animal consiga se alimentar corretamente. Ao ingerir a saliva com o vírus, pode acontecer a disseminação da doença para o estômago, intestino e até pulmões, podendo o animal vir a óbito. (NÓBREGA JUNIOR. et al., 2008).

A maioria dos animais se recupera espontaneamente ou com tratamentos tópicos, com antissépticos, após um curso clínico de uma a seis semanas, ao passo que, em reinfecções, a resolução é mais rápida (HAIG, 2006; FLEMING, MERCER, 2007). Não existem evidências de disseminação sistêmica desse vírus (HAIG; 2006).

2.6 – Imunopatogenia

Os *Poxvirus* são conhecidos por expor vários aspectos das defesas antivirais dos hospedeiros. Estes vírus codificam diversos fatores imunomodulatórios que agem em diferentes vias de sinalização celular, como regulação nas vias de sinalização da célula-alvo. Os *Poxvirus* incluem uma via dos interferons, interleucina-1 β (IL-1 β), IL-18, IL-10, fator de necrose tumorais (TNF), quemoquinas, serpinas, complemento, semaforinas, apoptose e a via de sinalização do fator de transcrição nuclear-kappa B (NF- κ B) (ALCAMI, 2003).

A via de sinalização do NF- κ B é composta por uma família de fatores de transcrição que participam da regulação de diversos processos biológicos, incluindo a resposta imune inata e inflamatória, ciclo celular, proliferação e diferenciação celular e apoptose (LI e VERMA, 2002). A função do NF- κ B é regulada por proteínas inibidoras, conhecidas como inibidores-kappa B (I κ B) (BALDWIN, 1996), que atuam bloqueando a translocação nuclear dos NF- κ Bs e a sua ligação ao DNA (SUN e XIAO, 2003). A via do NF- κ B pode ser ativada por uma grande variedade de estímulos, incluindo citocinas inflamatórias, fatores de crescimento, agentes que causam dano ao DNA celular, componentes bacterianos e proteínas virais (PAHL, 1999). Um passo fundamental na ativação do NF- κ B é a fosforilação e degradação do I κ B, resultando na liberação do NF- κ B no citoplasma e sua subsequente translocação para o núcleo onde irá ativar transcrição dos genes-alvo (SUN e XIAO, 2003).

Os *Poxvirus* desenvolveram várias estratégias para regular a via do NF- κ B (MOHAMED e McFADDEN, 2009) e inibidores do NF- κ B já foram identificados em *Poxvirus* dos gêneros *Orthopoxvirus*, *Leporipoxvirus*, *Yatapoxvirus* e *Molluscipoxvirus*, com vírus de espécie geralmente codificando múltiplos inibidores (MOHAMED e McFADDEN, 2009). Um exemplo, o vírus vaccinia (VACV), Protótipo da família *Poxviridae*, codifica pelo menos sete inibidores do NF- κ B (A52R, A46R, B14, N1L, M2L,1L e E3L) (BOWIE et al, 2000;. DiPERNA et al, 2004; GEDEY et al., 2006; CHEN et al., 2008; MYSKIW et al., 2009), o que sugere que a inibição desta via é importante para o estabelecimento das infecções pelos *Poxvirus*. Com uma exceção de um

homólogo do gene *E3L* do VACV, os *Parapoxvírus* não codificam nenhum inibidor de NF-Kb identificado em outros *Poxvírus*, sugerindo que estes vírus desenvolveram novas estratégias (proteínas e/ou mecanismos de ação) para modular a via de sinalização do NF-kB. Diel (2010) relata que a análise da expressão gênica de células primárias de ovino em resposta à infecção com o *Orf vírus* cepa IA82 ou seis vírus mutantes contendo deleções de genes únicos dos *Parapoxvírus*, utilizando-se a técnica de *Microarray*, permitiu a identificação de três genes, *Orf vírus024*, *Orf vírus002* e *Orf vírus121*, que inibem a transcrição mediada pelo NF-kB.

A resposta imune da infecção e reinfeção pelo *Orf vírus* tem sido muito estudada, mas essa interação complexa vírus-hospedeiro ainda não é totalmente conhecida. A imunidade que protege da infecção é de curta duração e o vírus consegue reinfestar seus hospedeiros, dificultando assim o entendimento da resposta no sistema imune (FLEMING e MERCER, 2007). Buddle e Pulford (1984); McKeever et al. (1988) e Mercer et al. (1994) sugerem que os anticorpos não têm papel importante na proteção contra a infecção. Mas Lloyd et. al (2000) demonstraram uma correlação entre os níveis de IgG2 e a resolução das lesões, sugerindo que anticorpos do isótopo IgG2 podem ter papel importante na defesa contra o vírus.

Lloyd et al. (2000) realizaram um estudo com a depleção de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ em ovinos, observando que existe uma correlação entre os títulos de anticorpos e a resolução das lesões, concluindo que os anticorpos conferem proteção parcial contra a infecção pelo *Orf vírus*. Em estudo realizado por Mercer et al. (1994), relatam que a transferência de imunidade passiva não protege cordeiros da infecção.

Segundo Chagas e Veríssimo (2008), após a ocorrência de um surto, o rebanho fica naturalmente imunizado, por cerca de seis anos, entretanto, esse resultado se difere do descrito em Radostits et al. (2012) os quais citam que nos animais recuperados a imunidade permanece por dois a três anos. Em alguns rebanhos a doença tem caráter enzoótica e se manifestando todos os anos.

As infecções primárias podem ser graves, frequentemente com grandes lesões e normalmente se resolvem dentro de seis a oito semanas, já as lesões

de reinfecção são menores e se resolvem mais rapidamente, geralmente dentro de três semanas (HAIG e McINNES, 2002).

Segundo Fleming e Mercer (2007), a imunidade celular desempenha um papel mais importante na proteção contra a infecção pelo *Orf vírus*.

Estudos imuno-histológicos realizados em biópsias da pele após uma infecção primária ou uma reinfecção demonstram que há um acúmulo de neutrófilos, linfócitos T ($CD4^+$ e $CD8^+$), linfócitos B e células dendríticas nas áreas adjacentes às células da epiderme infectada pelo vírus (LLOYD et al., 2000; ANDERSON et al., 2001). Linfócitos T $CD4^+$ e células dendríticas são predominantes nas lesões (JEKINSON et al., 1990; ANDERSON et al., 2001). Nas infecções primárias, linfócitos T $CD8^+$ e linfócitos B acumulam mais lentamente quando comparados com linfócitos T $CD4^+$. A infecção primária é marcada pela replicação viral, espessamento da epiderme e neovascularização. Em uma reinfecção, a replicação viral não é tão pronunciada e as lesões cessam mais rapidamente (HAIG e McINNES, 2002).

Haig et al. (1996b,c) demonstraram que na reinfecção pelo *Orf vírus* ocorre uma resposta celular bifásica envolvendo células T $CD4^+$, T $CD8^+$, B e células dendríticas. Assim como a análise da resposta imune no sítio de infecção, esses estudos demonstraram também que os linfócitos T $CD4^+$ constituem a população celular mais abundante na linfa que drena a região da infecção, com picos no 4.º e 12.º dias após a infecção primária e a reinfecção, respectivamente (HAIG et al., 1996a). Fleming e Mercer (2007) demonstraram resultados que indicam que linfócitos T $CD4^+$, IFN- γ e, em menor proporção, linfócitos T $CD8^+$ desempenham um papel importante na proteção contra a infecção do *Orf vírus*.

Embora a resposta imune à infecção do *Orf vírus* seja do tipo Th1, tipicamente antiviral, um fato marcante é a habilidade do vírus em reinfetar repetidamente seu hospedeiro (HAIG e FLEMING, 1999). Dentre as possíveis explicações, destacam-se que o vírus pode ter desenvolvido mecanismos para subverter ou interferir com componentes do sistema imune, conforme acontece com outros *Poxvírus* (HAIG et al., 1996a).

Os *Poxvírus* modulam vários aspectos de defesas antivirais do seu hospedeiro. Codificam diversos fatores imunomodulatórios que agem em

diferentes vias de sinalização celular. As vias de sinalização celular alvo de regulação pelos *Poxvírus* incluem a via dos interferons, interleucina-1 β (1L-1 β), IL-18, IL-10, fator de necrose tumoral (TNF), quemoquinas, serpinas, complemento, semaforinas, apoptose e a via de sinalização do fator de transcrição nuclear-kappa B (NF- κ B) (ALCAMI, 2003). Os fatores imunomodulatórios codificados pelos *Poxvírus* são em maior parte de estudos realizados com *Orthopoxvirus*. Em contrapartida, pouco se sabe a respeito destes fatores codificados pelos *Parapoxvirus*, que possuem *Orf vírus* como protótipo. Dentre o arsenal de genes codificados pelo *Orf vírus* vários exercem, presumidamente, um papel importante na determinação do espectro de hospedeiros, ou como fatores imunomodulatórios (DELHON et al., 2004).

Fleming e Mercer (2007) descrevem que alguns fatores imunomodulatórios que estão potencialmente envolvidos na virulência têm sido identificados no genoma do *Orf vírus*, incluindo genes que codificam um homólogo da IL-10 (OV-IL-10), proteína de ligação a quemoquinas (CBP), inibidor do fator de crescimento monocítico e fagocitário (GM-CSF) e interleucina 2 (IL-2) (GIF), fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), proteína de resistência ao interferon (OVIFNR) e inibidor da apoptose (*Orf vírus*125).

2.7 – Epidemiologia

2.7.1 - Ocorrência e importância econômica

A infecção pelo *Orf vírus* possui distribuição mundial, sendo endêmica na maioria dos países onde existem criações comerciais de ovinos (ROBINSON e BALASSU, 1981) e está amplamente difundida nos rebanhos de ovinos e caprinos do Brasil.

Segundo Salles et al. (1992); Barros (2001; 2007) e Radostits et al. (2012), as infecções pelo *Orf vírus* levam a importantes perdas econômicas nos rebanhos afetados, devido à sua alta morbidade. Os cordeiros são os animais mais afetados, justamente pela ausência de imunidade ao vírus. Nesses animais, as lesões se localizam ao redor da boca e narinas que, além

de predispor a infecções oportunistas, limitam a ingestão de alimentos, reduzindo o ganho de peso (GUMBRELL e MCGREGOR, 1997; HAIG e MERCER, 1998). Em animais adultos, as lesões são encontradas principalmente ao redor dos tetos, o que pode favorecer os quadros de mastite, aumentando as perdas econômicas (MAVROGIANNI et al., 2006; ROLLE, M. et al., 2006).

As perdas econômicas estão relacionadas com a perda de peso, miíases secundárias, atraso do crescimento dos animais doentes, mão de obra e custo com medicamentos para realização de tratamento dos sintomas (NÓBREGA JUNIOR. et al., 2008). Causando não somente prejuízos econômicos, mas também um considerável efeito negativo para a saúde do animal. Os animais infectados ficam vulneráveis a outros agentes e não conseguem ter um bom desenvolvimento (GALLINA et al., 2006).

Sabe-se que o valor da pele é cerca de 20% do valor do animal. Em consequência, ela compõe parte significativa na renda do produtor, ou seja, o conhecimento de doenças que acometem a pele e alteram a qualidade desta matéria-prima é fundamental para ovinocultura (NOGUEIRA FILHO, 2005).

2.7.2 - Morbidade, mortalidade e transmissão

Em ovinos, a morbidade é geralmente alta, podendo atingir 100% em alguns casos, embora apresente baixa mortalidade, de aproximadamente 1% em animais adultos e de 5% a 15% em animais jovens. Contudo, se houver a ocorrência de infecções secundárias ou miíases a mortalidade pode ser elevada em até 50% (SALLES et al. 1992, BARROS, 2007). Porém em casos de surtos, a mortalidade pode chegar de 20 a 50% nos cordeiros (ROLLE, et al., 2006).

Após a introdução da doença nos rebanhos a enfermidade se torna endêmica, por consequência de animais com infecções persistentes e devido à longa persistência do vírus no ambiente (SMITH e SHERMAM 1994).

A disseminação da doença tem como principais formas de contágio o direto ou indireto com utensílios ou pastagens contaminadas. Outra importante causa é o agrupamento dos animais. As crostas das feridas e pedaços de

lesões permanecem infectantes durante meses, podendo chegar a anos se estiver em condições favoráveis ao vírus. O vírus pode continuar viável e infectante de um ano para o outro nos utensílios, nas pastagens e nos cochos, o que favorece o surgimento de surtos, além de animais que são portadores crônicos da doença e a disseminam (RADOSTITS et al., 2012; CHAGAS e VERÍSSIMO, 2008).

Animais lactentes podem transmitir o vírus para os tetos e úberes de suas mães durante a amamentação, acarretando o desenvolvimento de lesões mamárias e, da mesma forma, animais que possuem lesões nos tetos podem transmitir o vírus para os cordeiros que estão sendo amamentados (FLEMING e MERCER, 2007).

Não existe evidência da disseminação sistêmica do vírus (HAIG, 2006). As lesões desenvolvidas na primeira infecção são severas, de caráter proliferativo e tendem a se resolver espontaneamente dentro de seis semanas (HAIG e MERCER, 1998). Em casos de reinfecções, 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 (LIVINGSTON e HARDY, 1960).

Robinson e Balassu (1981) citam que o período de incubação da doença varia de 24 a 72 horas; entretanto, hoje já se provou que esse período de incubação pode se estender até seis dias. Inicialmente são observadas hiperemia leve e máculas, evoluindo para pápulas que, com o passar dos dias, se transformam em vesículas, pústulas e crostas (ROBINSON e BALASSU, 1981; HAIG, 2006; CANAL, 2007; FLEMING e MERCER, 2007).

O curso clínico inicia com hiperemia e edema em torno do sítio de infecção e desenvolvimento de pequenas vesículas em aproximadamente 48 a 72 horas. As vesículas progridem para fases de pápulas e pústulas. Lesões adjacentes podem coalescer e com a progressão da doença culminam com a formação de crostas (BUTTNER e RZIHA, 2002; CANAL, 2007; FLEMING e MERCER, 2007).

2.7.3 - Importância zoonótica

Em humanos a doença é de caráter ocupacional (NOURANI e MALEKI, 2006) com o desenvolvimento de lesões na pele, manifestando-se como uma erupção cutânea crônica, circunscrita, muito irritante, com tendência à hiperplasia (GILRAY et al., 1998; SCHATZMAYR et al., 2000). A lesão principal involui sem deixar sequela cicatricial, de três (CUCÉ e NETO, 2001) a cinco semanas (AZULAY e AZULAY, 2008).

Ela pode ser transmitida ao homem quando em contato com animais infectados, ou vacinados recentemente, e/ou fômites em conjunto, bem como, pela inoculação direta das lesões infectadas, ou por contato com objetos contaminados com o vírus, como cercas e tosquias (CUCÉ e NETO, 2001; GILRAY et al., 1998). Concordando com Mercer et al. (1997) que citam que animais recentemente vacinados com as vacinas de vírus vivo, atenuado, liofilizado do *Orf vírus*, representam um risco ocupacional para os seres humanos. Segundo Barravieira (2005), a transmissão homem para homem é rara.

Dessa forma, infecção pelo *Orf vírus* humano é uma consequência comum, ainda evitável, de contato com ovinos e caprinos. Pessoas que são mais susceptíveis à exposição ao *Orf vírus* (por exemplo, os trabalhadores rurais) podem estar familiarizados com a infecção e, portanto, podem não procurar um médico. Como resultado, essa doença não pertence ao cotidiano dos médicos, levando a um atraso no diagnóstico e uso de antibióticos desnecessários. A infecção pelo *Orf vírus* é similar em aparência e fatores de risco para infecções potencialmente fatais como o antraz cutâneo e o trauma da pele é um fator predisponente à infecção. Além disso, em pacientes imunocomprometidos pode ser progressivo, causar lesões destrutivas que necessitem de intervenções médicas, tais como a terapia antiviral (GEERNICK, et al, 2001) e debridamento cirúrgico (SHELLEY e SHELLEY, 1983).

Lopes e Macedo (2008) citam que a cura pode acontecer em, no máximo, oito semanas, por vezes deixando uma discreta cicatriz. Os locais de preferência são quirodáticos, mãos, punhos e face. O período de incubação situa-se entre cinco ou seis dias, após o qual surge pápula firme (SAMPAIO e

RIVITTI, 2008), pequena, de tonalidade vermelho-azulada. A seguir, a lesão evolui para vesícula hemorrágica ou pústulas e, mais tardiamente, crosta com parte central deprimida, medindo de 2 a 5 cm de diâmetro, contornada por halo eritematoso. Pode haver prurido e sensação dolorosa. Ocasionalmente, observa-se linfangite, linfadenite e febre baixa. Em alguns pacientes, transitoriamente desenvolve-se erupção maculopapular no tronco ou lesões eritematosas nos membros (CUCÉ e NETO, 2001; AZULAY e AZULAY, 2008). No entanto, segundo estudo de Macêdo et al., (2008) e Nóbrega Junior et al. (2008), em humanos, as lesões foram restritas aos dedos das mãos do tratador dos animais.

Assim como nos ovinos, as lesões em humanos são autolimitantes e tendem a se resolver dentro de poucas semanas, caso não tenham infecção secundária (HAIG e MERCER, 1998). Tanto a infecção pelo *Orf vírus* como pelo antraz são adquiridas naturalmente por humanos que têm exposição junto aos ovinos e caprinos. Um simples relato de contato do paciente com esses animais na anamnese não é suficiente para indicar etiologia, necessitando avaliação laboratorial para a confirmação da doença. As características histopatológicas, que incluem balão intraepitelial e inclusões intracitoplasmáticas são sugestivas, porém, também não são conclusivos (UZEL et al., 2005).

2.8 - Achados clínicos

Vários relatos têm sido publicados, alguns citando comprometimento humano (SALLES et al. 1992; NÓBREGA JUNIOR. et al., 2008; JOSEPH, R.H., 2014). Houve relatos de surtos em rebanhos de ovinos no Rio Grande do Sul (SALLES, et al., 1992), em São Paulo (LANGONI, et al. 1995; CATROXO et al. 2002) e na Paraíba, onde houve envolvimento de ovinos, caprinos e humanos (NÓBREGA JUNIOR. et al., 2008). Na década de 30, esta doença era um dos principais problemas sanitários para a caprinocultura no Nordeste, atingindo cerca de 60% das criações (TORRES, 1939).

No Brasil já foram descritos casos de *Orf vírus* em ovinos e caprinos. Um surto da doença envolvendo ovinos no Rio Grande do Sul esteve relacionado

ao modo de alimentação desses animais. Neste estudo, a fonte de infecção não foi determinada, mas a infecção e a disseminação da doença parecem ter sido facilitadas pelo hábito de os animais mastigarem a planta caraguatá (*Tillandsia usneoides*) que teria promovido abrasões e escarificações ao redor da boca e narinas dos ovinos, favorecendo a penetração do vírus. (SALLES et al., 1992).

Na região do semiárido da Paraíba foram acompanhados diversos surtos de *Orf vírus* em ovinos e caprinos, com casos de lesões em humanos. Os animais jovens foram os mais afetados, apresentando lesões crostosas principalmente na comissura labial e plano nasolabial. Animais adultos apresentaram sinais especialmente na região do úbere (MACÊDO et al., 2008; NÓBREGA JUNIOR. et al., 2008).

Nos Estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro, o vírus foi isolado a partir de crostas de caprinos naturalmente infectados (MAZUR e MACHADO, 1990). Estudos brasileiros mais recentes no estado do Mato Grosso relatam a presença do vírus em ovelhas. Neste estudo também foi realizada a análise filogenética, demonstrando a diversidade de cepas que circulam no Brasil (ABRAHÃO et al., 2009).

2.9 - Detecção viral e imunodiagnóstico

Métodos para detecção direta e indireta de agentes virais emergiram nas últimas décadas como importantes ferramentas da medicina, contribuindo de forma efetiva na determinação do patógeno, por meio de técnicas moleculares (Reação em Cadeia de Polimerase- PCR), isolamento viral e por imunodiagnóstico, permitindo assim um direcionamento de forma mais precisa do tratamento da doença (SAMPAIO e RIVITTI 2008). Embora a infecção pelo *Orf vírus* seja autolimitante em hospedeiros com sistemas imunitários normais, ela pode se assemelhar a lesões cutâneas associadas potencialmente fatais como as seguintes infecções zoonóticas: tularemia (*Francisella tularensis*), antraz cutâneo (*Bacillus anthracis*), e erisipeloide (*Erysipelothrix rhusiopathiae*). Portanto, um diagnóstico rápido e definitivo torna-se imprescindível nesses casos (CDC, 1973).

As alterações histológicas encontradas em surtos de *Orf vírus* em ovinos e caprinos são caracterizadas por dermatite proliferativa, degeneração balonosa, acantose, vesículas e pústulas subcorneais, além de inclusões intracitoplasmáticas eosinofílicas em queratinócitos (CHAN et al., 2007; NÓBREGA JUNIOR. et al., 2008). Histologicamente ocorre tumefação celular aguda e degeneração hidrópica dos queratinócitos das camadas superiores do estrato espinhoso e hiperplasia da epiderme com projeções pseudo-epiteliomatosas para a derme. Observam-se corpúsculos de inclusão eosinofílicos intracitoplasmáticos nas células do epitélio de revestimento (BARROS, 2007; McGAVIN et al., 2009).

O exame histológico das lesões em casos de infecção natural e experimental com *Orf vírus* revela uma lesão marcadamente proliferativa na epiderme, caracterizada por vacuolização e edema de queratinócitos do estrato espinhoso, degeneração reticular, acúmulo de crostas e presença de micro abscessos (HAIG et al., 1997). A derme apresenta lesões como edema, dilatação capilar pronunciada e infiltração de células inflamatórias. Além disso, lesões papilomatosas que consistem de hiperplasia pseudoepitélio sarcoma e formação de granulomas são frequentemente observadas e, em alguns casos, podem ser extensas (FLEMING e MERCER, 2007) (FIGURA 1).

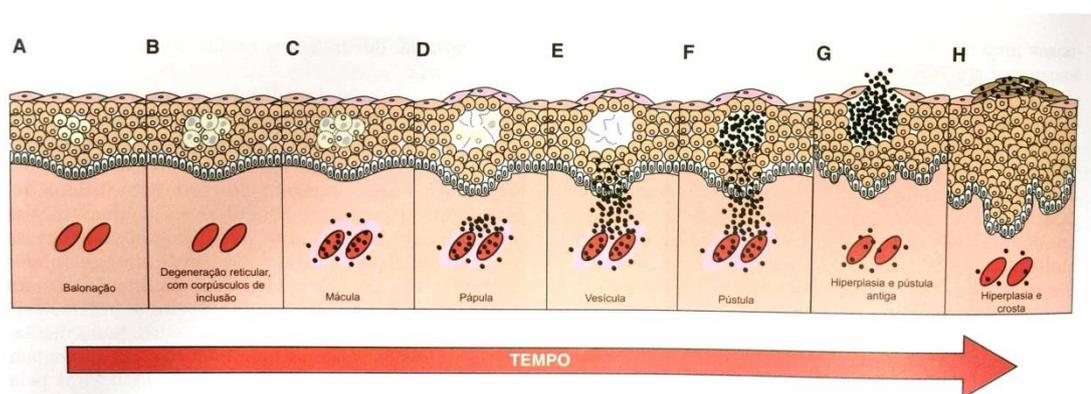


FIGURA 1- Esquema ilustrativo de uma lesão por *Poxvírus* no decorrer do tempo. Fonte: Patologia Veterinária - McGavin, et al. (2009).

Legenda: A- A balonação e B- a degeneração reticular, com corpúsculos de inclusão nos queratinócitos, são estágios subclínicos. C- Congestão, edema dérmico, marginalização e migração de leucócitos (pontos pretos) formam o estágio macular. D- A degeneração reticular epidérmica continuada, a

hiperplasia epidérmica (acantose), o edema dérmico e a inflamação perivascular formam o estágio papular. E- O estágio vesicular se desenvolve pela coalescência das áreas de degeneração reticular (ruptura dos queratinócitos aumentados). F- As células inflamatórias migram dos vasos da derme para as vesículas e ali se acumulam para formar o estágio pústula. G- A epiderme começa a proliferar e se torna mais acantótica e a antiga pústula se move em direção à superfície da epiderme. H- A hiperplasia epidérmica progride com a formação de interdigitações epidermo-dérmicas alongadas e a antiga pústula se rompe para formar a crosta. As pústulas maiores podem ser umbilicadas, envolver a derme e resultar em escaras.

Assim, o diagnóstico em animais é realizado com base nos sinais clínicos, epidemiológicos, exames histológicos e microscopia eletrônica (SMITH e SHERMAM, 1994; RADOSTITS, 2002; BARROS, 2007). Porém, apenas os testes moleculares podem identificar definitivamente um *Parapoxvírus* como *Orf vírus* (TORAFSON e GUNADOTTIR, 2002).

A caracterização molecular dos isolados de campo empregando o sequenciamento do DNA viral e análise filogenética permite determinar a estirpe isolada com bastante sucesso (TRINDADE et al., 2003).

2.10 – Tratamento

Não existe nenhum tratamento específico. As lesões nos animais infectados devem ser cuidadas com solução de permanganato de potássio a 3% ou solução de iodo a 10% acrescido de glicerina, na proporção de uma parte da solução de iodo para uma de glicerina. Nos locais mais sensíveis, como por exemplo, o úbere, elas devem ser tratadas com iodo/glicerina na proporção de 1:3 ou solução de ácido fênico a 3%, mais glicerina. É eficaz o uso associado de antibióticos (oxitetraciclina) quando se têm uma infecção secundária e o violeta de genciana também pode ajudar a melhorar as lesões (CHAGAS e VERÍSSIMO, 2008; SILVA et al., 2001).

O tratamento das lesões é feito à base de antissépticos, principalmente para combater infecções secundárias, embora existam fármacos capazes de

controlar a replicação deste vírus, como os ésteres derivados de fosfatos de nucleosídeos acíclicos (DAL POZZO et al., 2007).

2.11 - Controle e prevenção

Para prevenção e controle da doença, deve-se realizar a quarentena de duas a três semanas para os animais adquiridos; as instalações precisam sempre estar limpas e descontaminadas; os filhotes devem mamar colostro; todos os animais doentes necessitam ser separados e tratados; vacinar os demais no início do surto. Caso mais de 40% do rebanho fique doente, não é necessário fazer a vacinação, ela não é recomendada em locais onde a doença ainda não aconteceu (CHAGAS e VERÍSSIMO, 2008).

Quando a doença é endêmica nos rebanhos, recomenda-se vacinação anual apenas dos animais jovens (ROBINSON e BALASSU, 1981). A imunização dos animais é realizada pela utilização de vacinas vivas, sendo obtida a partir de crostas de ovinos inoculados. Por essa razão, a vacinação coincide com a introdução do vírus no rebanho, o que pode ocasionar surtos da doença (HAIG e MERCER, 1998).

Manejo de rebanhos infectados ou vacinados deve ser realizado com uso de EPI (Equipamentos de proteção individual), máscaras, luvas, macacão, e outras medidas como higiene adequada das mãos para a prevenção da infecção pelo *Orf vírus* nos seres humanos (GILRAY et al., 1998).

3 - JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Considerando que a criação de ovinos encontra-se em expansão no Estado de São Paulo, é de esperar um aumento dos casos de *Orf vírus* nesses animais e seus cuidadores. Tendo em vista a escassez de informações sobre esta enfermidade, são objetivos desta pesquisa:

Objetivo Geral:

Estudar a associação da ocorrência do Ectima Contagioso (*Orf vírus*) com ovinos com os cuidadores destes animais.

Objetivos Específicos:

- Primário: analisar a associação da resposta imune humoral ao *Orf vírus* entre os animais, e destes com seus cuidadores, por meio do teste de virusneutralização (VN).
- Secundário: no desenvolvimento do plano experimental, caso seja encontrado algum animal e/ou humano com lesões sugestivas às do *Orf vírus* realizar biópsias em ambas as espécies e proceder a realização dos seguintes testes: Histopatológico, Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) objetivando descrever as respostas encontradas comparativamente a encontrada no teste de virusneutralização.

4 - MATERIAL E MÉTODOS

Para seleção das propriedades, houve envolvimento da Associação Paulista de Criadores de Ovinos, Coordenadoria de Assistência Técnica Integral/Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo (CATI) e Casa da Agricultura; foram realizadas palestras, encontros com produtores e contato por telefone para fomentar a adesão ao projeto.

Com isso foi possível identificar propriedades que tiveram relatos de caso da doença anterior ou nos meses de desenvolvimento da pesquisa para que pudesse ser encontradas amostras para detecção de anticorpos contra o *Orf vírus* e pesquisa direta agente no rebanho e/ou cuidador acometido. Foram utilizadas amostras de animais que não receberam nenhum tipo de tratamento até o momento da visita e nem foram vacinados contra Ectima Contagioso.

4.1 - Seleção das propriedades e dos animais

A seleção das propriedades foi realizada levando-se em consideração presença de ovinos com manifestação clínica, ou histórico prévio da doença nos animais relatados pelo cuidador. Foram selecionadas 21 propriedades distribuídas no Estado de São Paulo (Bauru, Bento de Abreu, Botucatu, Buri, Cachoeira Paulista, Cravinhos, Garça, Itapetininga, Itapira, Itatinga, Lençóis Paulista, Mogi Mirim, Monte Mor, Paraguaçu Paulista, Pardinho, Paranapanema, Pirapozinho, Potirendaba, Sertãozinho, Taquaritinga e Valparaíso) e colhido material clínico de no mínimo 20 animais em cada uma delas.

Os animais foram selecionados de acordo com o relato do cuidador sobre o aparecimento anterior de sinais clínicos, a percepção destes sinais durante a visita nas propriedades e locais com relatos anteriores de surtos. Porém, se no momento da visita, não havia animais clinicamente doentes foram escolhidos de forma aleatória animais que já estiveram doentes e/ou ficaram em contato direto (mesmo lote) com os doentes. Não sendo considerado, em ambos os casos, idade e sexo no processo de amostragem.

4.2 - Colheitas de amostras nos animais e humanos

4.2.1 - Nos ovinos

Dos ovinos selecionados para o experimento (n=444) foram colhidos 10 ml de sangue, por venopunção jugular, diretamente em dois frascos tipo *Vacutainer*®. Posteriormente, foram armazenados em caixas isotérmicas com gelo para serem transportados. No laboratório, um dos frascos de sangue foi centrifugado, e o soro acondicionado em tubos tipo *Eppendorf*® devidamente identificados, congelados a -20°C, outro com sangue total permaneceu refrigerado na geladeira e no dia seguinte a colheita todo material era transportado ao Laboratório de Vírus de Bovídeos no Instituto Biológico de São Paulo (LVB/IB) para a realização das análises.

No caso de animais encontrados com lesões visíveis e compatíveis ao Ectima Contagioso, foram realizadas biópsias das lesões com a utilização de *punch*® estéril descartável (4 mm). O material biopsiado foi acondicionado em frascos estéreis, parte com formalina 10% tamponada (PROPHET, 1995) para análise histopatológica, e a outra parte foi encaminhada, em solução fisiológica estéril, todos devidamente identificados, resfriados a 4°C e encaminhados ao Instituto Biológico em São Paulo, onde foram realizadas análises laboratoriais.



FIGURA 2- (a) Colheita de sangue em ovino. (b) Biópsia de ovino com suspeita clínica para Ectima Contagioso. Botucatu, SP- 2015.

4.2.2 - Nos cuidadores dos ovinos

De todos os cuidadores dos ovinos (n= 42) das propriedades selecionadas, foi colhido sangue e nos que apresentaram lesão realizou-se também a biópsia não levando em conta idade e sexo.

O procedimento de colheita do material nos cuidadores foi realizado por uma auxiliar de enfermagem habilitada e credenciada junto ao Conselho Regional de Enfermagem (COREN), sempre acompanhada da médica veterinária responsável pelo projeto.

Os cuidadores com lesões suspeitas da enfermidade foram encaminhados ao Departamento de Dermatologia Humana da Faculdade de Medicina do Campus Botucatu - SP aos cuidados da equipe do professor Silvio Alencar Marques para exame clínico, procedimentos de biópsia da lesão e colheita de sangue para confirmação do diagnóstico.

Uma vez obtidas, as amostras humanas foram encaminhadas e processadas no LVB/IB.



FIGURA 3- (a) Colheita de sangue nos humanos. (b) Biópsia de cuidadora de ovinos com suspeita clínica de Ectima Contagioso. Botucatu, SP- 2015.

4.3 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Em todas as propriedades foram assinados dois Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, um identificando o número de animais utilizados, Anexo 1, e no Anexo 2 o termo destinado aos cuidadores que contribuíram com a pesquisa.

4.4 – Análise laboratorial

4.4.1 – Virusneutralização

4.4.1.1 - Cultivo Celular

Foi utilizada a linhagem VERO CCL 80 (rim de macaco verde africano), proveniente da “American Type Culture Collection” (ATCC) Manassas, EUA, para titulação viral e testes de virusneutralização. O estoque de células foi mantido em nitrogênio líquido no LVB/IB, que foram descongeladas periodicamente para uso no máximo 20 passagens após o descongelamento.

As células foram cultivadas em Meio Essencial Mínimo (MEM – Cultilab, Campinas, Brasil), acrescido de 0,2% de bicarbonato de sódio (Merck, Darmstadt, Alemanha), tamponado com 25 mM de ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazineetanossulfônico (HEPES – Biosolve, Westford, EUA) e suplementado com 5% de soro fetal bovino certificado (SFB – Cultilab, Campinas, Brasil). Para a manutenção, as células foram cultivadas em frascos de poliestireno, com 150 cm² de área (Corning, New York, EUA) e mantidas em estufa à temperatura de 37°C.

Os subcultivos foram realizados a cada 72 horas, utilizando uma solução Tripsina-Versene (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) para a desagregação das células. A concentração utilizada foi de 2×10^5 células/ml e a contagem feita em câmara de Neubauer (Optik Labor, Friedrichshofen, Alemanha).

4.4.1.2 - Estirpes Virais

O vírus utilizado foi *Orf vírus*: origem ATCC, adquirido pelo LVB/IB em 30/08/2007 (ATCC VR - 1548).

4.4.1.3 - Replicação Viral

Para a replicação dos vírus, as garrafas com 24 horas de monocamada celular pré-formada foram infectadas com títulos ($10^{4,7}$ DICC₅₀/ml - doses

infectantes em cultivo de células 50%/ por ml), acrescidas de 55 ml de MEM com 5% de SFB e 1% de antibióticos: penicilina G Potássica 11.200 UI/ml; Estreptomicina 0,01 g/ml; Gentamicina 0,01 g/ml; L-Glutamina 0,029 g/ml e Anfotericina B 0,5 mg/ml (Cultilab, Campinas, Brasil) e permaneceram a 37°C.

O cultivo foi observado diariamente e após 90% de destruição da monocamada celular, a suspensão viral foi recolhida, centrifugada a 600 x g, por 15 minutos a +4°C (IEC, International Centrifuge, modelo PR-2, Needham, EUA) e as alíquotas feitas em tubos de criogenia (TPP, Techno Plastic Products AG, Switzerland) que foram armazenadas em ultrafreezer (Thermo Electron Corporation, Waltham, EUA) a -86°C e nitrogênio líquido -196° C até o momento do uso.

4.4.1.4 - Titulação Viral

As estirpes foram tituladas em placas de microtitulação de poliestireno, de fundo chato com 96 cavidades (Corning, New York, EUA), em diluições seriadas na base 10 (10^{-1} a 10^{-9}), sendo diluídas em meio MEM com 1% de antibióticos, 100µL por cavidade, em oito repetições. As duas últimas colunas foram utilizadas como controle de células, não recebendo inóculo viral. Imediatamente em seguida, 50µL de uma suspensão de 3×10^5 células/ml, preparada em meio MEM contendo 5% de SFB, foi adicionada em cada uma das cavidades. As placas foram incubadas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ (Thermo Electron Corporation, Waltham, EUA) por cinco a sete dias. A leitura foi realizada em microscópio invertido. O título viral foi calculado utilizando-se o método de Reed e Muench (1938).

4.4.1.5 - Teste de virusneutralização

O teste de virusneutralização (VN) foi utilizado para quantificar os anticorpos neutralizantes presentes no soro dos ovinos e humanos estudados frente ao *Orf virus*.

Foram utilizadas placas de microtitulação com 96 cavidades, de fundo chato. A coluna um da placa teste foi destinada para o controle de células, a

coluna dois, para controle da toxicidade de cada soro e nas colunas três até 12 as amostras foram diluídas em série, na base logarítmica dois a partir da diluição 1:2 até 1:1.024, utilizando-se meio MEM. Para validação da prova foi incluído soro padrão negativo, fraco positivo e positivo com títulos de anticorpos. Feita a diluição das amostras, foi adicionada à placa 1000 DICC₅₀/ml do vírus, exceto no controle de células e de soro.

Na placa controle de doses, nas colunas um a 10 receberam o controle de DICC₅₀/ml (1,95 a 1000 DICC₅₀/ml), e as colunas 11 e 12 serviram como controle negativo, recebendo somente meio MEM.

Para o controle da titulação viral, a placa recebeu diluições seriadas na base 10 do vírus (10^{-2} a 10^{-8}), e as colunas 11 e 12 serviram como controle negativo, recebendo somente meio MEM.

As placas foram incubadas por uma hora em estufa a 37°C com 5% de CO₂, após esse período receberam 50µL de suspensão de células VERO na concentração de 3×10^5 células/ml em cada cavidade. A infectividade foi indicada pelo efeito citopático visível na monocamada celular em placas, em microscópio invertido, após cinco a sete dias de incubação a +37°C e 5% de CO₂. O título de anticorpos foi expresso como a maior diluição do soro que inibiu completamente a infectividade em ambas as cavidades de cada diluição, sendo a menor diluição detectada pela prova 1:2, cujo título foi calculado e expresso em log₁₀, meio MEM foi utilizado como diluente. Foram consideradas reagentes as amostras com título igual ou superior a 0,6 log₁₀. O teste foi validado quando as células das cavidades destinadas ao controle de células permaneceram intactas, as células da cavidade para controle de toxidez dos soros também permaneceram inalteradas, ou seja, não apresentaram efeito tóxico, e os soros controle negativo, fraco positivo e positivo apresentaram os resultados esperados. Com relação ao controle de doses, a prova foi validada quando a dose infectante ficou entre 300 e 3000 DICC₅₀/mL e se na retitulação viral o título obtido apresentou variação de apenas $\pm 0,3 \log_{10}$ quando comparado com o título da solução estoque, calculado conforme o método de Reed e Muench (1938).

4.4.1.6 - Soro Controle positivo, fraco positivo e negativo

As amostras de soros controle foram selecionadas pelo LVB-IB, a partir de amostras de animais positivos e negativos, recebidas na rotina de análises nos últimos 30 anos. Dentre estas se utilizou soros pareados de animais que apresentaram lesões causadas por Ectima Contagioso, com diagnóstico confirmado por PCR. As amostras foram validadas como padrão, após no mínimo três repetições por soro na virusneutralização, em no mínimo quaduplicata, e em três dias alternados, comprovando a repetibilidade e reprodutibilidade do resultado.

4.4.2 – PCR

4.4.2.1 - Preparo das amostras de epitélio para isolamento viral e *hemi-nested* PCR

As amostras foram preparadas em suspensão a 20% (proporção 1:5) em meio essencial mínimo de Eagle (MEM) sem Ca^{++} e Mg^{++} com 1% de solução de antibióticos, trituradas em areia esterilizada e mantidas sob refrigeração por uma hora para ação do antibiótico e, após este período, congeladas a 80°C negativos. Para a realização das análises, as amostras foram descongeladas, centrifugadas a $2.000 \times g$ por 10 minutos e o sobrenadante recolhido e transferido para novos frascos destinados ao isolamento viral e para a PCR.

4.4.2.2 - Isolamento viral em cultura de células

Para o isolamento viral foi utilizado placa para cultura de células de 24 cavidades contendo monocamada de células da linhagem VERO CCL 81 e MDBK (Madin Darby Bovine Kidney), na concentração de 2×10^5 cél/ml e com 24 horas de crescimento. O meio de crescimento foi retirado, a monocamada lavada de duas a três vezes, com meio MEM e inoculadas com 1 ml da suspensão de epitélio, previamente preparada (item 4.4.2.1). Após um período de incubação de uma hora a 37°C , o inóculo foi descartado, a monocamada foi

lavada com meio MEM e adicionado 10 ml do meio de manutenção (meio MEM contendo 2% de soro fetal bovino e 1% de solução de antibióticos). A monocamada foi observada diariamente em microscópio óptico invertido para acompanhamento de efeito citopático durante sete dias. O resultado foi considerado negativo até três passagens cegas, com intervalo de sete dias cada.

4.4.2.4 - *Hemi-nested* PCR

A *hemi-nested* PCR para identificação e caracterização de *Parapoxvirus* foi realizada segundo Inoshima et al. (2000).

Como padrão positivo da reação para *Parapoxvirus* foi utilizada a estirpe padrão NZ2 (ATCC VR-1548), caracterizada como vírus *Orf*. Como controle negativo das reações foi utilizado a linhagem celular VERO CCL 81.

A escolha dos “*primers*” baseou-se no gene B2L que codificam proteínas altamente conservadas de todas as espécies do gênero *Parapoxvirus* (Quadro 1).

QUADRO 1- Descrição dos *primers* utilizados nas reações de *hemi-nested* PCR para *Orthopoxvirus*.

| Gênero | Gene Codificador | <i>Primers</i> (orientação) | Sequência |
|---------------------|------------------|-----------------------------|---|
| <i>Parapoxvirus</i> | B2L | PPV1 (sense) | 5' GTC GTC CAC GAT GAG CAG CT 3' |
| | | PPV4 (anti-sense) | 5' TAC GTG GGA AGC GCC TCG CT 3' |
| | | PPV3 (sense) | 5' GCG AGT CCG AGA AGA ATA CG 3' |

Fonte: Inoshima et al. (2000)

4.4.2.4.1 - Extração do DNA

4.4.2.4.1.2 – Sangue

A extração de DNA das amostras de sangue com EDTA e das inoculadas em cultivo celular foi realizada segundo CHOMKZYNSKI (1993), conforme descrição abaixo:

1. Adicionaram-se 250 μ L de amostra (suspensão do epitélio ou sobrenadante de cultivo celular) em um tubo tipo eppendorf.
2. Acrescentaram-se à preparação anterior 750 μ L de Trizol LS (Invitrogen®), pulsaram-se por cinco segundos em vórtex para lisar e incubaram-se por cinco minutos em temperatura ambiente.
3. Adicionaram-se à preparação 200 μ L de clorofórmio, homogeneizou-se por inversão e incubou-se por cinco minutos em temperatura ambiente.
4. Centrifugaram-se por 15 minutos a 12.000 x g para separação das fases aquosa, interfase e fase orgânica.
5. Desprezou-se a fase aquosa e adicionou-se 300 μ L de etanol a 100%, homogeneizou-se por inversão e incubou-se por três minutos à temperatura ambiente.
6. Foi repetida a etapa quatro.
7. Desprezou-se o sobrenadante e acrescentou-se 01 mL de solução a 0.1M de citrato de sódio diluído em etanol 10% (pH 8.5) e homogeneizou-se por inversão.
8. Incubou-se à temperatura ambiente por 15 minutos. Durante esse processo, ocasionalmente, homogeneizou-se a mistura por inversão.
9. Centrifugou-se por cinco minutos a 4°C a 2.000 x g para precipitação do DNA.
10. Descartou-se o sobrenadante cuidadosamente com ajuda de uma pipeta para que o pellet não fosse desprendido do tubo.
11. Foram repetidas as etapas sete a 10.
12. Acrescentou-se 1 mL de etanol 75% e homogeneizou-se por inversão.
13. Incubou-se à temperatura ambiente por 15 minutos. Durante esse processo, cuidadosamente, homogeneizou-se a mistura por inversão.

14. Repetiu-se a etapa nove.
15. Descartou-se o sobrenadante, inverteu-se o tubo sobre papel absorvente para secagem do pellet, em temperatura ambiente, por 10 minutos.
16. Ressuspendeu-se o DNA em 150 μ L de 8 mM NaOH.
17. Centrifugou-se a 4° C, 12.000 x g por 10 minutos para remover qualquer substância insolúvel.
18. Transferiu-se todo o sobrenadante para um novo tubo eppendorf de 1,5 mL.
19. Foi adicionado 50 μ L do tampão HEPES para ajustar o pH entre sete a oito.
20. Mediu-se no espectrofotômetro o grau de pureza do DNA extraído. Para uma extração válida, a razão entre as absorbâncias 260/280, de acordo com o fabricante do Trizol LS, deveria estar entre 1.6 a 1.8.
21. As amostras foram armazenadas em freezer a 20°C negativos até a etapa de amplificação.

4.4.2.4.1.3 – Epitélio

Antes da extração de ácidos nucleicos, amostras de tecido foram maceradas com Trizol® Reagent conforme descrição abaixo:

1. Com auxílio de tesoura e pinça, 20 mg da crosta foi colocado em graal e adicionou-se 800 μ L de Trizol® Reagent
2. Com auxílio de um pistilo macerou-se o tecido;
3. Transferiu-se todo o conteúdo para microtubo de polipropileno;
4. Mediu-se o volume e acrescentou-se com Trizol até completar 1 mL;
5. Homogeneizou-se em vórtex;
6. Incubou-se por 10 minutos em temperatura ambiente;
7. Adicionaram-se 200 μ L de clorofórmio e novamente homogeneizou-se em vórtex por 15 segundos;
8. Incubou-se por cinco minutos em temperatura ambiente;
9. Centrifugaram-se 12.000 x g por 15 minutos a 2°C a 8°C;

10. Acrescentaram-se 300 μ L de Etanol P.A. para precipitação do DNA e homogeneizar por inversão;
11. Incubou-se à temperatura ambiente por dois a três minutos;
12. Centrifugaram-se a 2.000 x g por cinco minutos a 4°C, para precipitação do DNA;
13. Descartou-se o sobrenadante utilizando ponteira de 1 mL primeiramente e pipetando vagorosamente. Retirou-se o volume final com pipeta de 100 ou 200 μ L vagorosamente. Tomou-se cuidado para não aspirar e desprezar o *pellet*;
14. Acrescentou-se 1 mL da solução de 0,1 M Citrato de Sódio em 10% Etanol (pH 8.5) e homogeneizou-se por inversão;
15. Incubou-se à temperatura ambiente por 30 minutos. Durante incubação pelo menos três vezes o tubo foi homogeneizado por inversão;
16. Centrifugaram-se a 2.000 x g por cinco minutos a 4°C e desprezou-se o sobrenadante.
17. Novamente, repetiram-se os passos 15, 13, 17 e 18.
18. Acrescentou-se 1 mL de Etanol 75% e homogeneizou-se por inversão;
19. Incubou-se à temperatura ambiente por 10 a 15 minutos. Durante esse processo, cuidadosamente, foi misturado por inversão;
20. Centrifugaram-se a 2.000 x g por cinco minutos a 4°C e desprezou-se o sobrenadante seguindo procedimento item 14;
21. Deixou-se o tubo aberto à temperatura ambiente por 5 minutos até secagem do etanol. Tomou-se o cuidado de não deixar o *pellet* secar totalmente;
22. Ressuspendeu-se o DNA em 150 μ L de 8 mM NaOH;
23. Centrifugaram-se 12.000 x g por 10 minutos a 4°C
24. Transferiu-se todo o sobrenadante para um novo tubo de polipropileno de 1,5 mL devidamente identificado com o número do LVB/IB correspondente e a data de extração.
25. Adicionaram-se 50 μ L de tampão HEPES;
26. Ao final da extração, as amostras foram estocadas em freezer a -20°C até o momento da análise.

4.4.2.4.1.4 - Amplificação do DNA

Para amplificação do DNA viral as amostras extraídas foram preparadas conforme protocolo a seguir: Para 1.^a amplificação, o volume total de reação foi de 25 μ L. Para tanto, a mistura de reagentes era composta de 100 mg do DNA da amostra extraída (5 μ L), 12.5 μ L do tampão do kit comercial PCR Master Mix™ Promega® e 0,5 μ M de cada *primer* PPV1 e PPV4 (10pmol/ μ L). Para a hemi-nested PCR, utilizou-se a mesma concentração de reagentes, mas usando o conjunto de *primers* PPV3 e PPV4 (10pmol/ μ L). Os ciclos de amplificação podem ser visualizadas no quadro 2.

QUADRO 2- Ciclo de amplificação da *hemi-nested* PCR para *Parapoxvirus*.

| Nº de ciclos | Temperatura (°C) | Tempo |
|--------------|------------------|----------|
| 1 ciclo | 95 | 5 min |
| 5 ciclos | 95 | 1 min |
| | 50 | 1 min |
| | 72 | 1 min |
| 25 ciclos | 94 | 1 min |
| | 55 | 1 min |
| | 72 | 1 min |
| 1 ciclo | 72 | 5 min |
| Hold | 4 | Infinito |

Fonte: Inoshima et al. (2000).

4.4.2.4.1.5 - Eletroforese em gel de agarose

O produto de cada amplificação foi aplicado em gel de agarose a 1,5%, preparado em tampão TBE 1X (Invitrogen®) e submetido à eletroforese com uma voltagem constante de 100 V por uma hora. A presença de *amplicons* foi evidenciada após coloração com GelRed (Biotium®) e visualização em luz

ultravioleta. O tamanho dos fragmentos de DNA foi comparado com um padrão de peso molecular de 100 pb (DNA *ladder* de 100 pb – FERMENTAS®).

O tamanho dos amplicons gerados na hemi-nested PCR é, respectivamente, de 529 pb (1.^a amplificação) e 235 pb (2.^a amplificação).

4.4.2.4.1.6 – Sequenciamento

Para o sequenciamento foram selecionadas três amostras. O produto da PCR foi purificado usando o kit Wizard DNA and PCR Clean-up da Promega® seguindo instruções do fabricante.

Os *primers* utilizados para a reação de sequenciamento foram PPV1 e PPV4 (INOSHIMA et al., 2000).

Para volume total de 10 µL de reação de sequenciamento utilizou-se o kit BigDye 3.1 Xterminator kit® (Applied Biosystems), conforme demonstrado no Quadro 3.

QUADRO 3- Preparo da mistura de reagentes para a reação de sequenciamento.

| REAGENTE | 1 Amostra (µl) |
|-----------------------------|----------------|
| Big Dye v. 3.1 | 2 |
| Sequencing Buffer 5 x | 2 |
| <i>Primer</i> (3.2 pmol/µl) | 1,5 |
| DNA purificado | 4,5 |
| TOTAL | 10 |

Para a reação de sequenciamento adotou-se o ciclo demonstrado no quadro 4. Em seguida, a precipitação foi realizada usando kit CENTRISEP (Princeton®), conforme instruções do fabricante. As etapas consistiram primeiramente na hidratação da resina com água livre de nucleases, aplicação do produto da reação de PCR de sequenciamento (10µL) intercaladas com etapas de centrifugação a 750xg por 2 minutos. O produto purificado foi submetido à secagem a vácuo por aproximadamente 40 minutos

e sem aquecimento. Em seguida, foi ressuspenso em 10 μ L de formamida Hi-DI, transferido para a placa de sequenciamento, submetido à desnaturação a 95°C por 2 minutos e colocado no sequenciador 3500XL Genetic Analyzer.

Para avaliar a qualidade das sequências empregou-se o software Sequence Analyzer (Applied Biosystems™) e a análise utilizou-se o programa BioEdit versão 7.1.11(HALL, 1999), Blast e ClustalW. Para construção da árvore filogenética e distância utilizou-se o programa MEGA versão 6.0 (TAMURA et al., 2011).

QUADRO 4- Ciclo de amplificação da reação de sequenciamento.

| Nº de ciclos | Temperatura (°C) | Tempo |
|--------------|------------------|----------|
| 1 ciclo | 95 | 1 min |
| 35 ciclos | 95 | 30 seg |
| | 50 | 15 seg |
| | 60 | 4 min |
| Hold | 4 | Infinito |

4.4.3- Anatomia Patológica

Após a fixação das biópsias de tecido (crostas, pele, vesículas) em formalina 10% tamponada por 48 horas, foram cortadas em fragmentos menores e colocadas em cassetes histológicos identificados por Impressora de Cassetes Leica® IPC. Os cassetes histológicos com as amostras foram colocados no Processador Automático de Tecidos Leica® TP1020 e submetidos a um protocolo modificado de Prophet (1995), para desidratação em soluções de álcool etílico em concentrações crescentes, diafanização pelo xilol e embebição em parafina (Quadro 5). Por fim, os fragmentos foram emblocados em parafina nos cassetes histológicos utilizando a Central de Inclusão de Parafina Leica® EG1160.

QUADRO 5- Etapas e reagentes do protocolo de desidratação, diafanização e embebição de tecidos, modificado de Prophet (1995).

| Etapas e reagentes | Tempo |
|-----------------------------|--------------|
| 1. Formol 10% tamponado | 2 horas |
| 2. Álcool etílico 70% | 30 minutos |
| 3. Álcool etílico 80% | 30 minutos |
| 4. Álcool etílico 95% | 15 minutos |
| 5. Álcool etílico 95%* | 15 minutos |
| 6. Álcool etílico absoluto | 30 minutos |
| 7. Álcool etílico absoluto | 30 minutos |
| 8. Xilol | 1 hora |
| 9. Xilol* | 1 hora |
| 10. Xilol* | 1 hora |
| 11. Parafina líquida a 63°C | 1 hora |
| 12. Parafina líquida a 63°C | 1,5 hora |

* Trocar solução a cada hora.

As amostras emblocadas nos cassetes foram cortadas em Micrótomo Automático Leica® RM2255 (5 µm de espessura); os fragmentos de tecido foram estendidos em Banho-maria Histológico OMA® BM 0328 na temperatura de 63°C e colocados em lâminas de microscopia previamente tratadas com albumina. As lâminas de microscopia com os cortes histológicos foram colocadas em forno-estufa sob ventilação forçada Heratherm OMH100 da Thermo Scientific®, na temperatura de 63°C. Posteriormente, segundo o protocolo modificado de Allen (1995), as lâminas foram colocadas em suporte tipo berço e mergulhadas em cubas de vidro seguindo as etapas, reagentes e tempos descritos no Quadro 6, para desparafinização (xilol), hidratação (concentrações decrescentes de álcool etílico), coloração pela hematoxilina e eosina, desidratação (concentrações crescentes de álcool etílico) e diafanização (xilol). Depois do processo de coloração foi feita a montagem de lâmina e lamínula com resina sintética Entellan (Merck®). Por fim, as lâminas foram analisadas em microscópio óptico trinocular comum (Leica® modelo DM

2000), as imagens capturadas por Câmera Leica® DFC 295, editadas e salvas em módulo LAS Leica®.

QUADRO 6- Protocolo de desparafinização, hidratação, coloração, desidratação e diafanização de fragmentos de tecidos cortados em micrótomo, modificado de Allen (1995).

| Etapas e reagentes | Tempo |
|------------------------------|-----------------------------------|
| 1. Xilol | 5 minutos |
| 2. Xilol* | 5 minutos |
| 3. Álcool etílico absoluto | 2 minutos |
| 4. Álcool etílico 95% | 2 minutos |
| 5. Álcool etílico 80% | 2 minutos |
| 6. Água corrente | Imergir rapidamente |
| 7. Hematoxilina | 30 segundos |
| 8. Água corrente | Lavar 15 minutos em água corrente |
| 9. Eosina | 2 Minutos |
| 10. Água corrente | Imergir rapidamente |
| 11. Álcool etílico 70% | Imergir rapidamente |
| 12. Álcool etílico 80% | 1 minuto |
| 13. Álcool etílico 90% | 1 minuto |
| 14. Álcool etílico absoluto | 5 minutos |
| 15. Álcool etílico absoluto* | 5 minutos |
| 16. Xilol | 5 minutos |
| 17. Xilol* | 5 minutos |

* Trocar solução a cada repetição.

Esse processo foi realizado para desparafinização (xilol), hidratação (concentrações decrescentes de álcool etílico), coloração pela hematoxilina e eosina, desidratação (concentrações crescentes de álcool etílico) e diafanização (xilol).

Depois do processo de coloração foi feita a montagem de lâmina e lamínula com resina sintética Entellan (Merck®). Por fim, as lâminas foram

analisadas em microscópio óptico trinocular comum (Leica® modelo DM 2000), as imagens capturadas por Câmera Leica® DFC 295, editadas e salvas em módulo LAS Leica®.

4.5 - Análise estatística

Inicialmente, as distribuições de frequência das variáveis categóricas foram produzidas para caracterizar as amostras do estudo. Desta forma, as prevalências de positividade sorológica e lesões físicas foram estimadas com respectivos intervalos de confiança de 95% na população estudada de ovinos e seus cuidadores. As distribuições de frequências dos títulos dos ovinos e de seus cuidadores foram produzida para descrever a intensidade das reações sorológicas e as tabulações cruzadas foram realizadas para estimar a concordância entre os indivíduos com manifestação clínica e o diagnóstico histopatológico ou detecção do agente por PCR para ovinos e seus cuidadores. Dentre os ovinos e seus cuidadores que apresentaram lesões físicas (crostas), foram realizadas tabulações cruzadas para estimar a concordância entre os testes de PCR e histopatológico.

O teste de Qui-quadrado e teste de Fisher foram utilizados para: 1) comparar a prevalência de soropositividade entre ovinos e seus cuidadores; 2) comparar a distribuição dos títulos entre ovinos e seus cuidadores; 3) comparar a prevalência de crostas entre ovinos e seus cuidadores e 4) testar a associação entre os resultados de PCR e histopatológico para os ovinos que apresentavam crostas. Para os ovinos incluídos no estudo, o teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para comparar o título sorológico mediano entre: 1) animais com e sem crosta e 2) animais sem crosta, com crosta e PCR-positivos, e animais com crosta e PCR-negativos. A análise estatística foi realizada pelo programa SAS (SAS Institute, 2011) em nível de significância de 0,05.

O presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), UNESP, Campus Botucatu, sob o protocolo n.º 37/2013-CEUA. Aprovado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

(CONCEA), sob o protocolo (CEUA) n.º 1033-2013. Aprovado pelo Ministério da Saúde, sob o CAAE n.º 19071013.7.0000.5411.

5- RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1- Cidades das propriedades estudadas

A Figura 4 identifica todas as cidades que fizeram parte da pesquisa, qual o número exato de colheitas realizadas e suas porcentagens.

O mapa demonstra a difusão da enfermidade por todo o Estado de São Paulo.

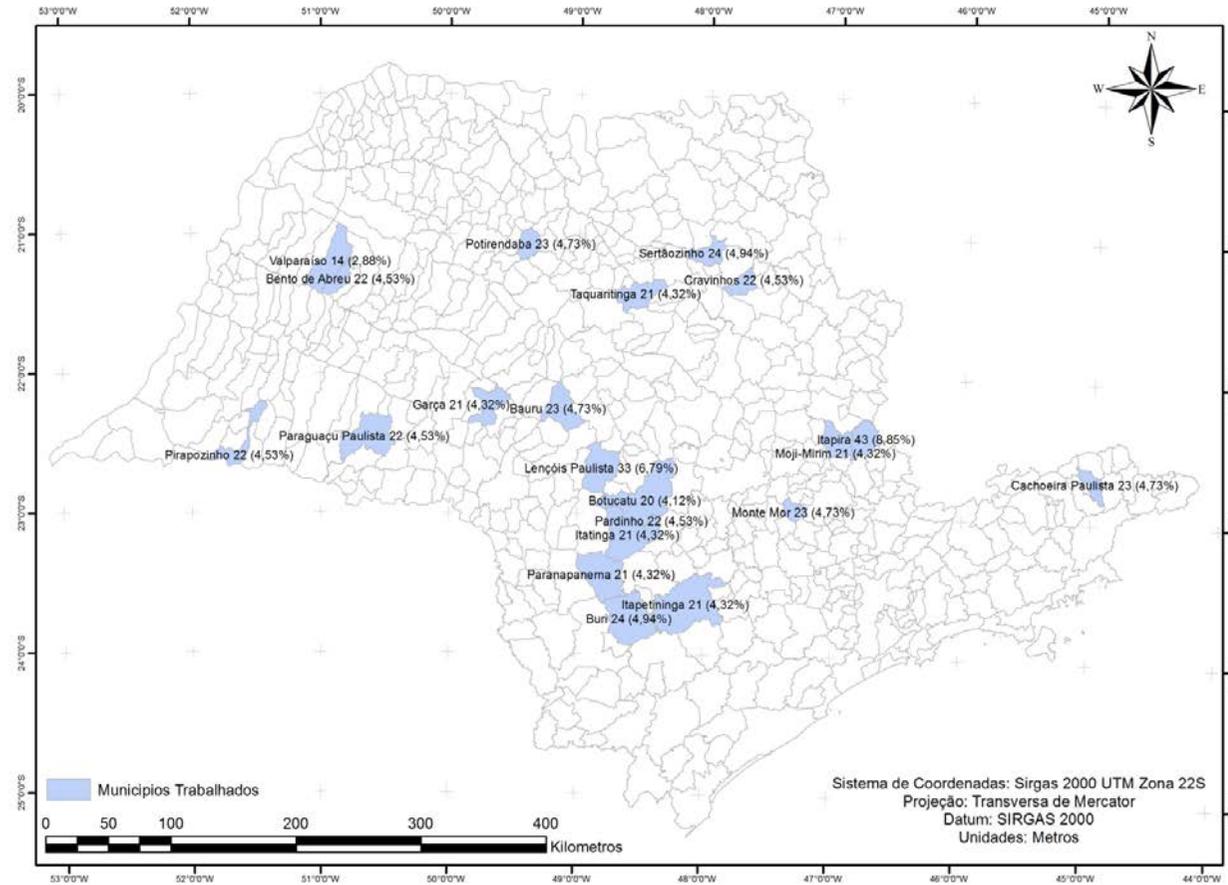


FIGURA 4- Distribuição e frequência das amostras de ovinos e seus cuidadores suspeitas para Ectima Contagiosa em colhidas por propriedade nas diferentes cidades do Estado de São Paulo. Botucatu, SP - 2015.

5.2- Amostragens dos ovinos e seus cuidadores

Foram amostrados 42 (8,64%) cuidadores de animais e 444 (91,36%) ovinos durante os anos de 2012 a 2015 no Estado de São Paulo, conforme demonstra a Figura 5.

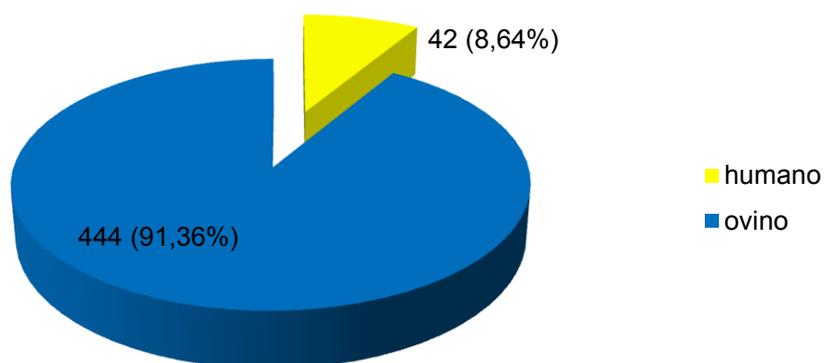


FIGURA 5- Frequência da colheita de amostras de ovinos e seus cuidadores suspeitas para *Orf vírus* nas propriedades. Botucatu, SP - 2015.

A amostragem por propriedade variou de acordo com o número de cuidadores de ovinos de cada criação, sendo colhido material biológico de todas as pessoas que estavam diretamente envolvidas com os animais, independente do tempo que trabalharam no local.

Dentre os animais selecionados, existiam animais com sinais clínicos característicos do Ectima Contagioso, animais que conviviam em lotes onde pelo menos um animal já apresentou sinais da enfermidade, animais que iam mensalmente para exposições e animais que em algum período de sua vida já foram diagnosticados com a enfermidade; por este motivo o número de animais amostrados nas propriedades não foi sempre o mesmo (mínimo de 20 animais).

5.3- Frequências das amostras

O estudo compreendeu um total de 486 amostras, dentre 444 ovinos e 42 cuidadores. Destas, 453 (93,21%) não apresentaram sinais clínicos, enquanto 33 (6,79%) casos suspeitos da doença (32 ovinos e um cuidador) foram biopsiados (Figura 6) e realizados os testes histopatológicos e de PCR.

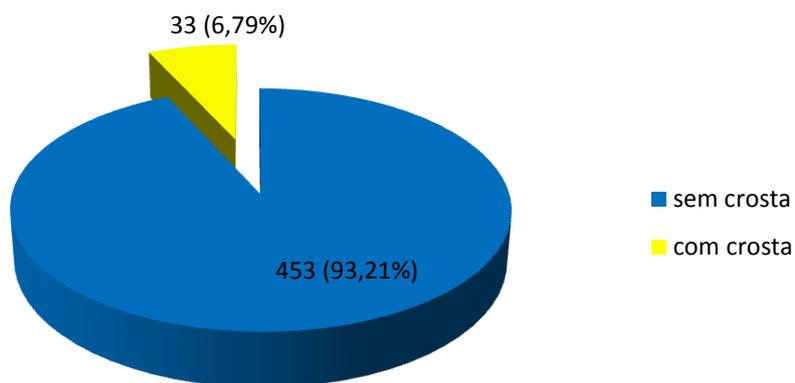


FIGURA 6- Frequência da colheita de amostras de crosta de ovinos e seus cuidadores suspeitos para Ectima Contagioso (*Orf vírus*) nas propriedades. Botucatu, SP - 2015.

Deste total amostrado (n= 486), foram sugestivos para Ectima Contagioso 31 (6,38%) e dois (0,41%) sugestivos para outras lesões de pele no exame histopatológico, conforme demonstra a Figura 7, e na PCR, 21 (4,32%) foram positivas, enquanto 12 (2,47%) apresentaram resultado negativo (Figura 8).

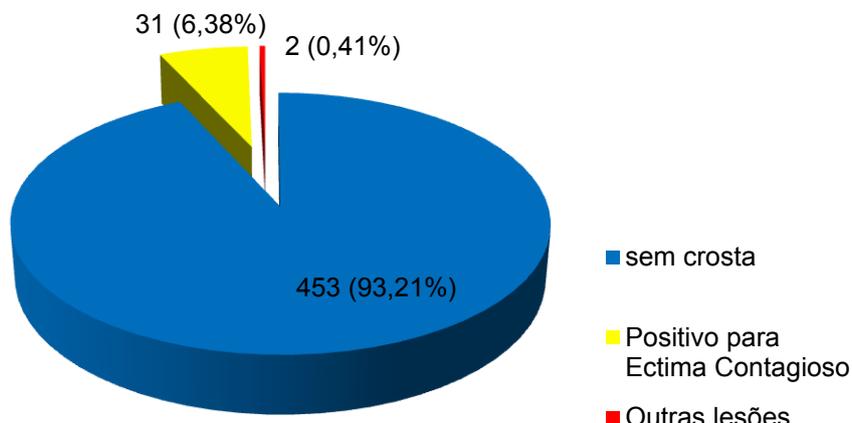


FIGURA 7- Frequência da colheita de crostas de ovinos e seus cuidadores suspeitas para Ectima Contagioso (*Orf vírus*) na realização do teste diagnóstico histopatológico. Botucatu, SP - 2015.

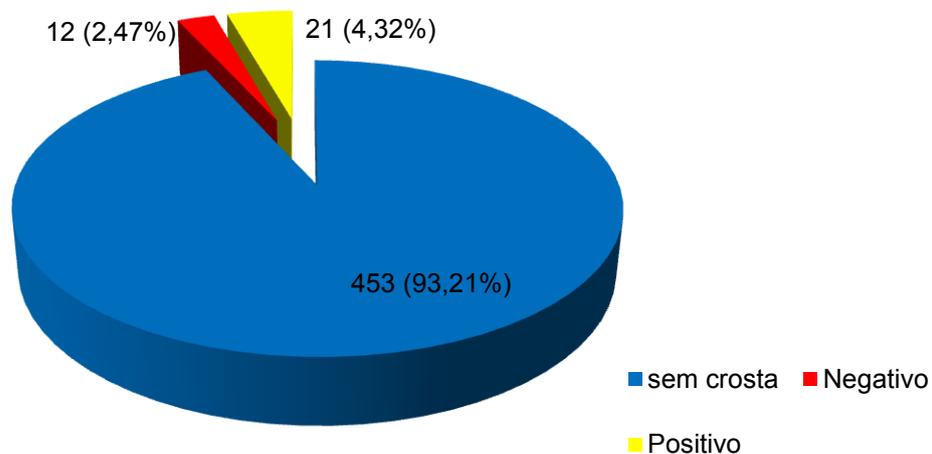


FIGURA 8- Frequência da colheita de crostas de ovinos e seus cuidadores suspeitas para Ectima Contagioso (*Orf vírus*) na realização do teste diagnóstico PCR. Botucatu, SP - 2015.

5.4- Reações de virusneutralização

A prevalência de reagentes por virusneutralização foi de 67% (IC95%=62-71%) nos ovinos e em seus cuidadores de 76% (IC95%=63-89%), sendo $p=0,22$, ou seja, não houve diferença estatística significativa entre as espécies, conforme demonstra a Tabela 1.

TABELA 1- Prevalência do teste de virusneutralização no soro dos ovinos e de seus cuidadores para Ectima Contagioso (*Orf vírus*). Botucatu, SP- 2015.

| Espécie | Virusneutralização para Ectima Contagioso | | | Total |
|-----------------------|---|---------------------------|--------------------------|-------|
| | Não Reagente (NR) | Reagente* | Índice de Confiança (IC) | |
| Cuidadores dos ovinos | 10 (23,81%) | 32 (76,19%) ^a | 0,63 - 0,89 | 42 |
| Ovinos | 147 (33,11%) | 297 (66,89%) ^a | 0,62 - 0,71 | 444 |
| Total | 157 (32,3%) | 329 (67,7%) | | 486 |

^a Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística ($p<0,05$) entre as prevalências.

Neste estudo, 67,7% das amostras foram reagentes ao *Orf vírus* nos ovinos e 76,19% nos cuidadores (Tabela 1). Resultado que difere de Haig e Mercer (1998), que afirmam que a estimativa da soroprevalência da infecção pelo *Orf vírus* nos rebanhos é prejudicada pelo fato do vírus induzir baixos níveis de anticorpos neutralizantes, não sendo possível a detecção em testes de soroneutralização.

Na Figura 9, pode-se visualizar a prevalência de anticorpos *anti-Orf vírus* pela técnica de virusneutralização tanto nos ovinos quanto em seus cuidadores, quando apenas 32,3% das amostras foram não reagentes no teste. Resultados estes diferentes de outros estudos que afirmam que devido à soroprevalência nos rebanhos ser baixa, a prevalência da doença pode ser

estimada com base em relatos da ocorrência da doença clínica (ROBINSON, 1983; GOKCE et al., 2005).

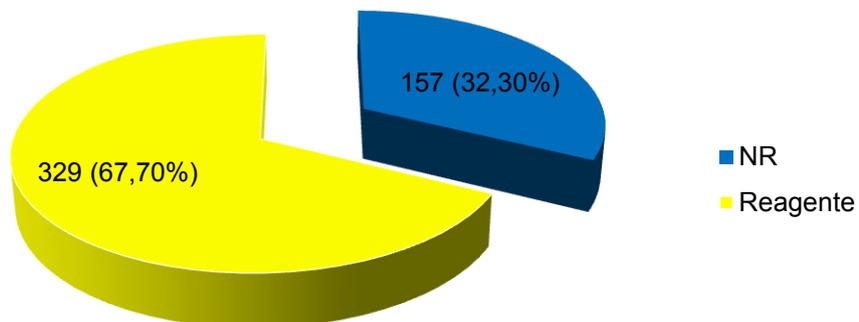


FIGURA 9- Prevalência de anticorpos *anti-Orf vírus* pela técnica de virusneutralização em ovinos e seus cuidadores. Botucatu, SP - 2015.

A distribuição dos títulos apresentou diferença estatística significativa entre as espécies com $p = 0,0048$. As variações de titulação foram de 0,6 a 2,1, tanto nos ovinos quanto nos seus cuidadores. Essas variações estão demonstradas detalhadamente na Tabela 2 e ilustradas na Figura 10.

TABELA 2- Distribuição dos títulos de anticorpos expressos em \log_{10} , obtidos pelo teste diagnóstico de virusneutralização no soro de ovinos e de seus cuidadores para Ectima Contagioso (*Orf virus*). Botucatu, SP - 2015.

| Espécie | Virusneutralização para Ectima Contagioso | | | | | | | TOTAL | |
|----------|--|-----------|------------|-----------|-------------|-------------|-------------|-------------|-----|
| | Título de anticorpos* (log ₁₀) | 0,6 | 0,9 | 1 | 1,2 | 1,5 | 1,8 | | 2,1 |
| Cuidador | | 1 (3,13) | 1 (3,13%) | 0 | 2 (6,25%) | 1 (3,13%) | 13 (40,63%) | 14 (43,75%) | 32 |
| Ovino | | 41(13,8%) | 41 (13,8%) | 1 (0,34%) | 35 (11,78%) | 44 (14,81%) | 70 (23,57%) | 65 (21,89%) | 297 |
| Total | | 42 | 42 | 1 | 37 | 45 | 83 | 79 | 329 |

* A distribuição dos títulos foi diferente estatisticamente entre as espécies (teste de Qui-quadrado, $p= 0,0048$).

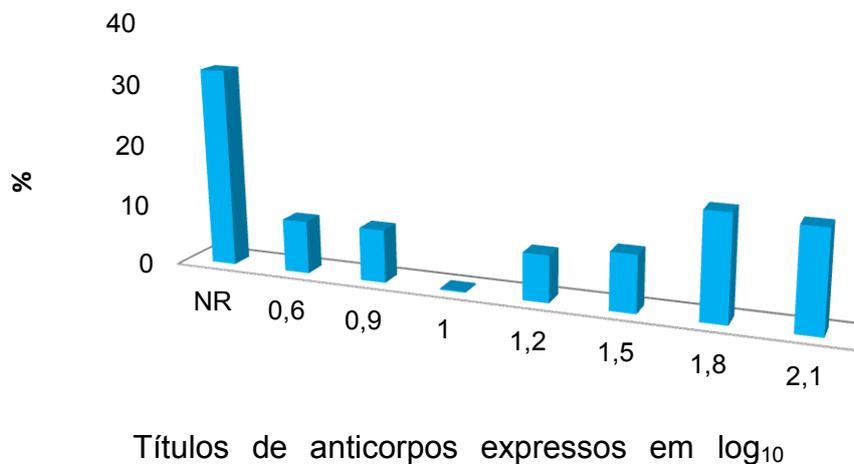


FIGURA 10- Distribuição em conjunto dos títulos de anticorpos expressos em log₁₀, obtidos pelo teste diagnóstico de virusneutralização no soro dos ovinos e de seus cuidadores para Ectima Contagioso (*Orf vírus*). Botucatu, SP - 2015.

Dentre os 42 cuidadores de ovinos participantes do estudo, 32 apresentaram títulos de anticorpos expressos por log₁₀ acima de 0,6. Assim, pode-se inferir que, quanto mais estreita a convivência dos cuidadores com os ovinos, maior foi o título de anticorpos observado.

Segundo Haig e McInnes (2002), a variação dos títulos de anticorpos pode ser explicada, por exemplo, pela capacidade do indivíduo basear sua resposta imune eficaz, ou seja, se ele já teve contato prévio, seus títulos serão mais altos conseguindo responder a infecção viral, não deixando a doença evoluir, ou então sendo mais branda.

Altos níveis na titulação de anticorpos significam que o organismo está produzindo anticorpos para combater à infecção. Dependendo do momento da colheita da amostra (pré ou pós-viremia) a concentração (título) de anticorpos poderá ser então influenciada. Uma titulação alta de anticorpos não significa, necessariamente, que o indivíduo já teve um contato anterior com o vírus, uma vez que já no primeiro contato pode ter ocorrido alta produção de anticorpos (TIZARD, 2009).

A Figura 11 ilustra como foi observado microscopicamente o controle negativo para *Orf vírus* em células Vero e o efeito citopático padrão (ECP) deste vírus também em células Vero.

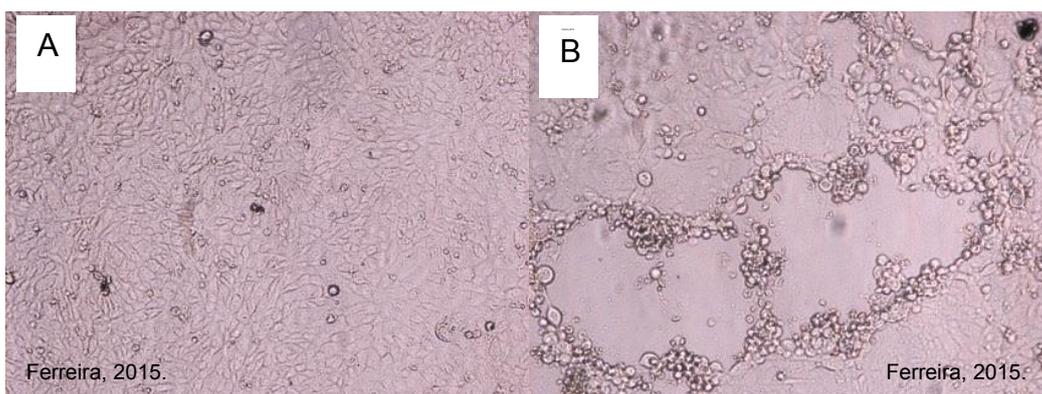


FIGURA 11- (A) Controle negativo – célula Vero 40x; (B) Efeito citopático padrão (ECP) - *Orf vírus* em células Vero 40x. Botucatu, SP - 2015.

5.5 – PCR

5.5.1- PCR do sangue

Todas as 486 amostras pesquisadas, sendo 444 de ovinos e 42 de seus cuidadores, foram negativos ao exame de PCR do sangue. Isto pode indicar que os animais não apresentavam infecção sistêmica no momento da colheita. Estes dados corroboram com Robinson e Lytle (1992) e Haig, (2006), os quais afirmam haver poucas evidências que o *Orf vírus* se dissemina pelo sangue.

5.5.2- PCR das crostas

Como anteriormente demonstrado na Figura 8, 453 (93,21%) não apresentaram sinais clínicos, enquanto 33 (6,79%) casos suspeitos da doença foram biopsiados, 21 (4,32%) foram positivas ao teste de PCR e 12 (2,47%) foram negativas.

Dentre as crostas submetidas ao PCR que tiveram resultados negativos, e exame histopatológico sugestivo para Ectima Contagioso, o exame clínico dos animais e cuidador também precisaram ser considerados. Acredita-se que parte da biópsia encaminhada para esta análise não apresentou a carga viral suficiente e por isso não apresentou resultado positivo na PCR. Este fato pode se justificar pelo tempo da lesão no animal e/ou parte coletada do material.

A colheita das crostas foi realizada por meio de biópsia, assim como afirma Kottaridi et al. (2006), que realizaram um estudo na Grécia com diferentes comparações de protocolos de PCR, dentre os animais utilizados, 11 eram ovinos, concluindo que o melhor método para detecção pela PCR é através de biópsia.

O presente estudo foi distribuído por todo Estado de São Paulo, o que além de revelar difusão da doença, demonstrou um elevado grau de semelhança genética do vírus, independente da área geográfica de origem. Corroborando com estudos realizados por Schmidt et al. (2013), com crostas de ovinos naturalmente infectados pelo *Orf vírus* nos Estados do Rio Grande do Sul e da Paraíba e em cabras de Pernambuco e na Bahia, as quais revelaram um elevado grau de semelhança genética do vírus independente da área geográfica de origem. Tal fato difere de Billinis et al. (2012), que sugerem que, independente das linhagens do vírus ectima no mundo, os sinais clínicos são semelhantes; entretanto, é necessário avaliar se existem estirpes mais virulentas ou ainda se existem fatores que contribuam para maior risco na transmissão da doença, como suscetibilidade genética, forma de exposição ou imunidade individual.

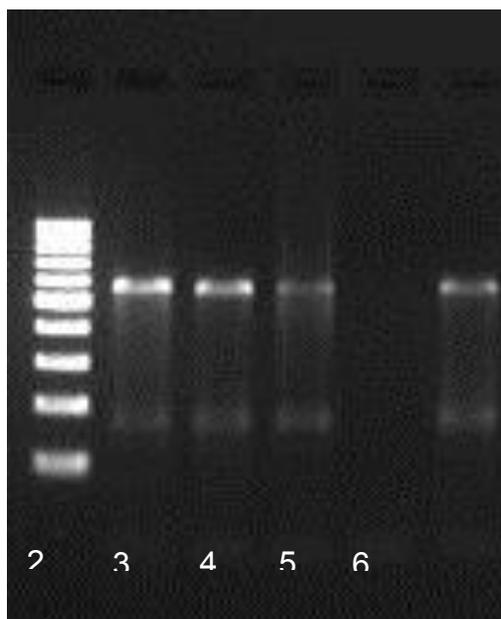


FIGURA 12- Detecção de *Orf vírus* em amostras de crosta ovina pela técnica de PCR. Botucatu, SP- 2015.

Legenda: canaletas 1 = marcador 100 pb; Canaletas 2, 3 e 4 = amostras positivas; Canaleta 5 = controle negativo; Canaletas 6 = Controle positivo (*Orf – ATCC*).

A Figura 12 ilustra como foi realizada a detecção de *Orf vírus* nas amostras de crostas ao exame do PCR.

5.6 - Análise do sequenciamento viral

Para o sequenciamento foram analisadas apenas três amostras. A análise filogenética foi construída usando o programa MEGA versão 6.0 (TAMURA et al., 2011), conforme demonstrado na Figura 13, empregando o método de máxima verossimilhança, parâmetro Kimura 2 com valores de *bootstrap* baseados em 1000 replicatas. Somente valores acima de 50% foram aceitos. Foram incluídos para compor a filogenia, isolados de *Orf vírus* da América Latina (Brasil e Argentina), Europa e Ásia bem como outras espécies de *Parapoxvirus* como o vírus da estomatite papular bovina, pseudovaríola bovina, de cervídeos e leão marinho.

O resultado do sequenciamento das amostras da presente pesquisa, a partir do gene B2L, revelou identidade das amostras (99%) com *Orf vírus*

brasileiros (Mato Grosso e Rio Grande do Sul) e também de outros países como Grécia, China, Croácia, Alasca e Argentina depositadas no GenBank (Figura 13).

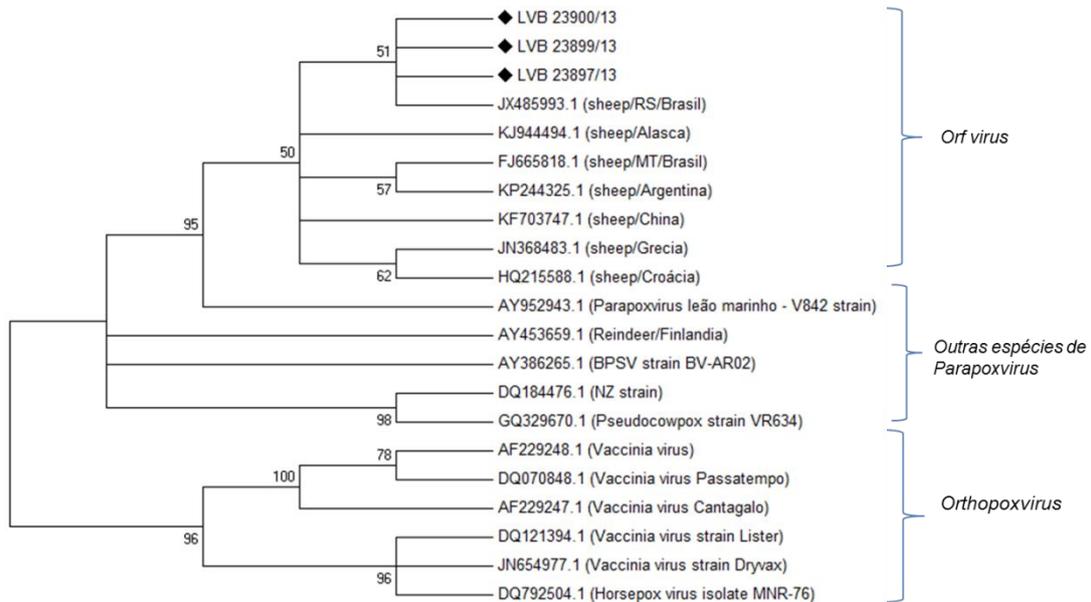


FIGURA 13- Árvore filogenética baseada nas sequências nucleotídicas do gene B2L.

Fonte: FERREIRA, B.L.S.

Legenda: as sequências nucleotídicas obtidas no presente estudo foram alinhadas com as sequências de outros *Orf vírus* disponíveis no GenBank, e utilizadas para a construção das árvores filogenéticas, pelo método de máxima verossimilhança, parâmetro Kimura 2 nei com valor de bootstrap de 1000 replicatas (MEGA 6.0). Em destaque (losangos pretos) as amostras de *Orf vírus* analisadas no presente trabalho.

Nenhuma amostra apresentou similaridade com outros vírus do gênero *Parapoxvirus* (vírus da estomatite papular bovina/BPV, pseudovaríola bovina, *Parapoxvirus* de leão marinho) bem como com estirpes do vírus vaccínia demonstrando, portanto que não houve reação cruzada na análise do sequenciamento realizada.

As técnicas moleculares utilizadas no presente estudo foram fundamentais para identificação de *Orf vírus* nos animais e em humanos, a

partir das lesões de epitélio. É importante destacar que são poucos os grupos de pesquisa de *Parapoxvirus* no Brasil e no mundo.

A análise do sequenciamento utilizando o gene codificador B2L revelou que as amostras caracterizadas como *Orf vírus* (Figura 14 e 15) apresentaram homologia com os isolados no Rio Grande do Sul como em outros países da América Latina, Europa e Ásia (TIKKANEN et al., 2004; SCHMIDT et al, 2013). O resultado do alinhamento das sequências de nucleotídeos revelou diferença com a estirpe NZ, caracterizada como *vírus Orf*, depositada no Genbank sob número DQ 184476.1 e registrada no American Type Cell Culture (ATCC) como VR-634, referência para *Orf vírus*.

Ao analisar a filogenia quanto à origem observou-se que as amostras apresentaram similaridade com os isolados de ectima em ovinos do estado do Rio Grande do Sul. Considerando que esse é tradicionalmente polo criador de ovinos e o estado de São Paulo vem avançando na ovinocultura, principalmente na região noroeste, o risco de importação de animais portadores do vírus do ectima deve ser considerado.

Inoshima et al. (2000) indicaram que existe similaridade de 40% com o vírus vaccínia, o que poderia indicar reação cruzada com os isolados de vaccínia brasileiros. Entretanto, as amostras do presente estudo ficaram agrupadas somente com o grupo de *Orf vírus*.

| | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80 | 90 | 100 |
|---------------------------------|---------------------------|-----------|--------|-------------|---------|-----|-------------------|----------|-------------|------|
| JX485993.1 (sheep/RS/Brasil) | PPYKKPKG-STQPKKAK-XAWDYGK | --- | EGGGQK | --PFTPKRGAE | --XCRGK | --- | XALLR-XVVYKPTKRTS | YKSTXSGX | AYSSRTRRSAX | |
| LVB 23897/13 | X.X.X. | P | | HK-X | * | X | | | X | |
| LVB 23900/13 | --- | RK | XX | XP | XI | --- | HK-X | * | YGGK | X |
| LVB 23899/13 | XX.X.X. | P | | HK-X | * | X | | | X | |
| FJ665818.1 (sheep/MT/Brasil) | | P | | | LS | | | | | |
| JN368483.1 (sheep/Grecia) | --- | X | P | | S | | | | | |
| KF703747.1 (sheep/China) | | P | | | S | | | I | | |
| KJ944494.1 (sheep/Alasca) | | P | | | S | | | | | |
| HQ215588.1 (sheep/Croácia) | --- | X | P | | S | | | | | Q |
| AY453659.1 (Reindeer/Finlandia) | X.G.GRX-WKLVA.G | TTA | --- | A | RER | --- | SA | H.V | --- | C.GK |
| KP244325.1 (sheep/Argentina) | | P | | | S | | | | | |
| DQ184476.1 (NE strain) | RERD.RG | XX | PQ | AR | --- | LX | --- | REKQGVG | G | --- |
| GQ329670.1 (Pseudocowpox strai) | RERE.RGC | YKSPQ | AR | --- | LE | --- | KEMQASG | G | --- | DRSR |
| AY386265.1 (BPSV strain BV-AR0) | RT.TDA | DGL | RELGR | XVVRT | --- | XG | L | K | --- | XR* |
| AY952943.1 (Parapoxvirus leão) | ..L | X | XC | P | --- | V | --- | X | --- | |
| AF229248.1 (Vaccinia virus) | XTTLLKECKWYKE | ..IPLFF*X | --- | LK | XRRLVF* | --- | XY | KD | KYLK | XTLK |
| AF229247.1 (Vaccinia virus Can) | XTTLLKECKWYKE | ..IPLFF*X | --- | LK | XRRLVF* | --- | XY | KD | KYLK | XTLK |
| DQ070848.1 (Vaccinia virus Pas) | XTTLLKECKWYKE | ..IPLFF*X | --- | LK | XRRLVF* | --- | XY | KD | KYLK | XTLK |
| JN654977.1 (Vaccinia virus str) | XTFLEKANGGNIV | ..VHFFNSW | --- | PE | XRSI | --- | PY | --- | XPISD | NRVX |
| DQ121394.1 (Vaccinia virus str) | XTFLEKANGGNIV | ..VHFFNSW | --- | PE | XRSI | --- | PY | --- | XPISD | NRVX |
| DQ792504.1 (Horsepox virus iso) | XTFLEKANGGNIV | ..VHFFNSW | --- | PE | XRSI | --- | PY | --- | XPISD | NRVX |

FIGURA 14- Percentual de identidade entre *Orf virus* baseado nas sequências de aminoácidos do gene B2L. Botucatu, SP-2015.

Fonte: FERREIRA, B.L.S.

Legenda: as sequências do presente estudo foram comparadas com as sequências de outros OPV (isolados brasileiros e vacinais), utilizando o programa MEGA 6.0

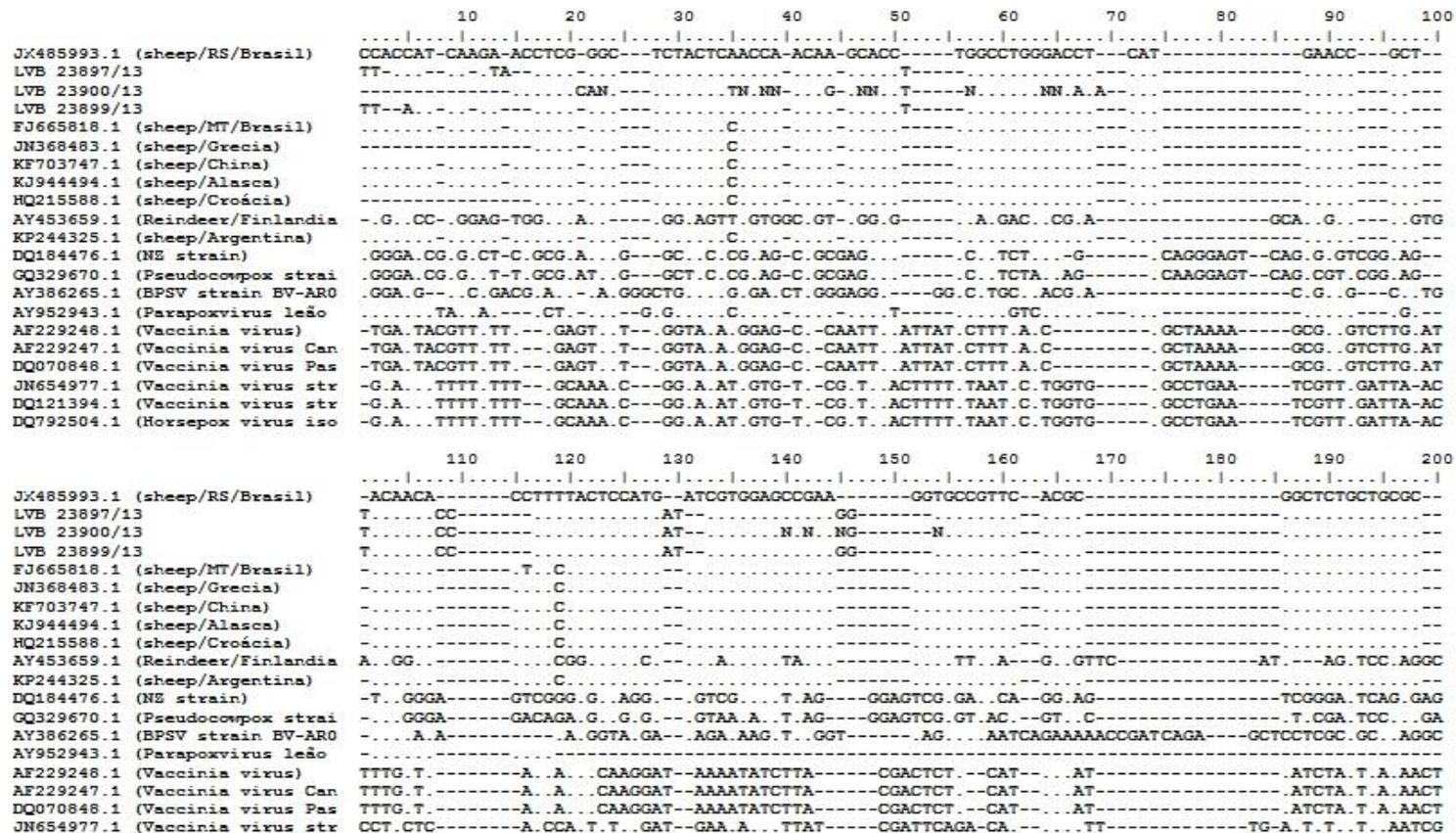


FIGURA 15- Percentual de identidade entre *Orf vírus*, baseado nas sequências parciais de nucleotídeos do gene B2L. Botucatu, SP- 2015.

Fonte: Ferreira, B.L.S.

Legenda: as sequências nucleotídicas obtidas no presente estudo foram comparadas com as sequências de outros Parapoxvirus, utilizando o programa MEGA 6.0

5.7 - Resultados histopatológicos

Das 486 amostras biológicas que foram colhidas, entre ovinos e seus cuidadores, 453 (93,21%) não apresentavam sinais clínicos, enquanto 33 (6,79%) foram biopsiados. Dentre as biópsias, foram realizados exames histopatológicos e 31 (6,38%) apresentaram resultados sugestivos para Ectima Contagioso.

As Figuras 16, 17, 18 e 19 ilustram as diferentes fases de lesões causadas por *Orf vírus*.

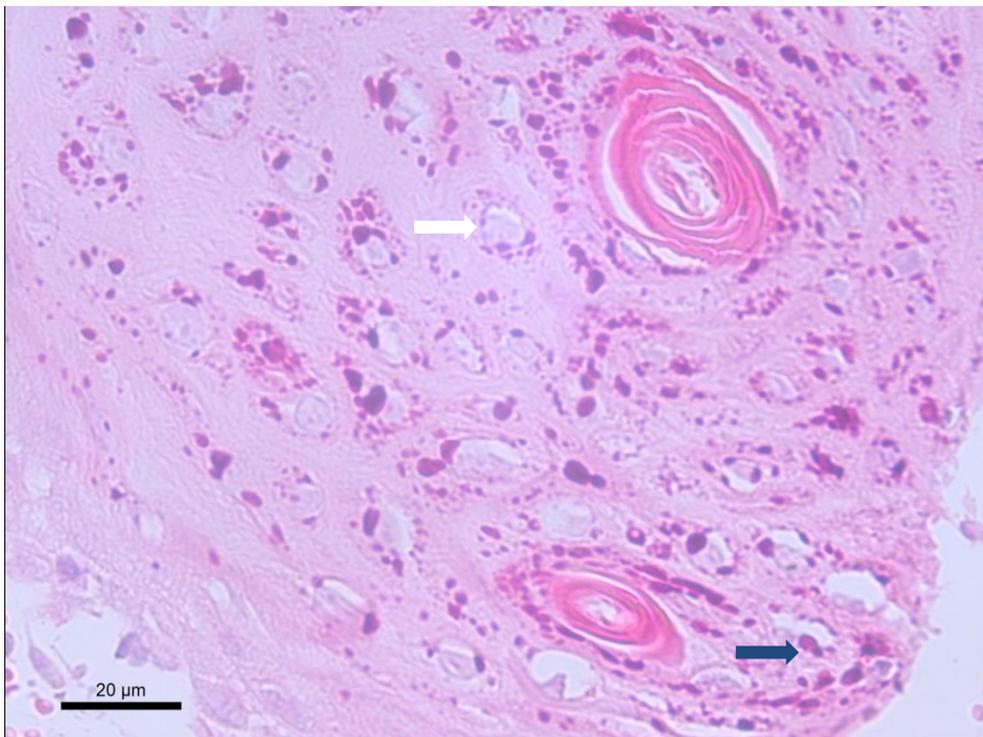


FIGURA 16- Biópsia do plano nasolabial de ovino com diagnóstico histopatológico sugestivo de Ectima Contagioso (*Orf vírus*) - degeneração balonosa (seta branca) e inclusão intracitoplasmática eosinofílica (seta azul) nos queratinócitos localizados no estrato espinhoso da epiderme (Coloração hematoxilina eosina, aumento 630x). Botucatu, SP- 2015.

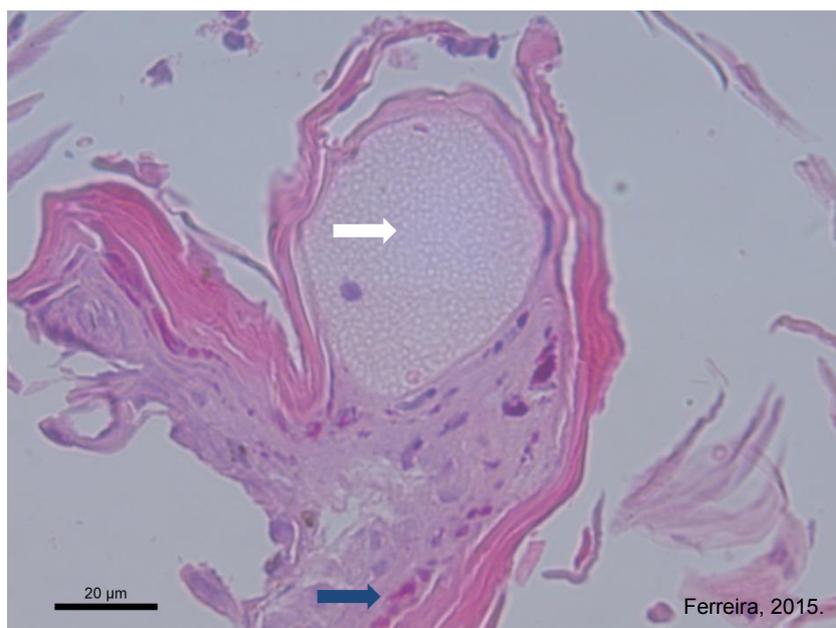


FIGURA 17- Biópsia do plano nasolabial de ovino com diagnóstico histopatológico sugestivo de Ectima Contagioso (*Orf vírus*) - vesícula localizada no estrato espinhoso de epiderme (seta branca). Ainda observam-se algumas inclusões intranucleares eosinofílicas no citoplasma do queratinócito do estrato espinhoso superficial (seta azul) (coloração hematoxilina eosina, aumento 630x). Botucatu, SP- 2015.

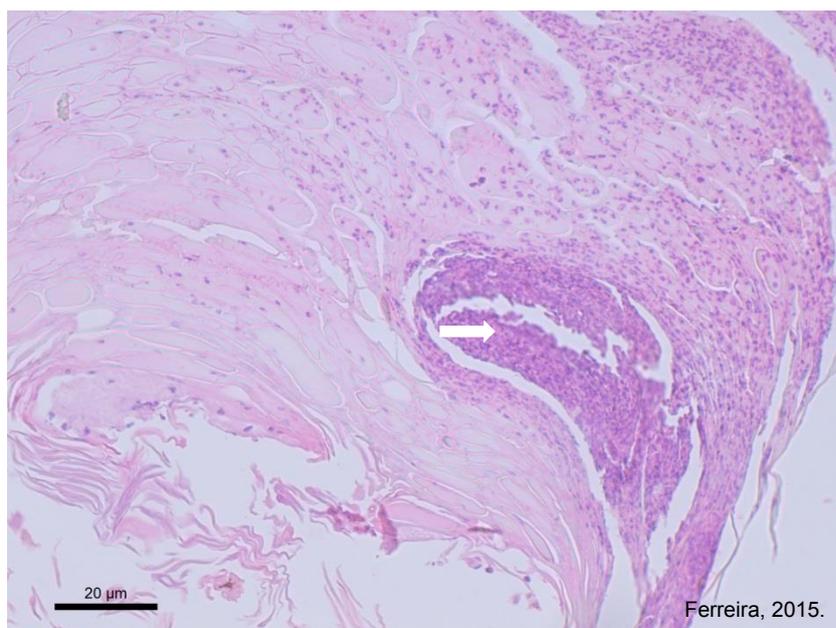


FIGURA 18- Biópsia do plano nasolabial de ovino com diagnóstico histopatológico sugestivo de Ectima Contagioso (*Orf vírus*)- pústula localizada no estrato espinhoso da epiderme. Intenso infiltrado neutrofílico (coloração hematoxilina eosina, aumento 400x). Botucatu, SP- 2015.

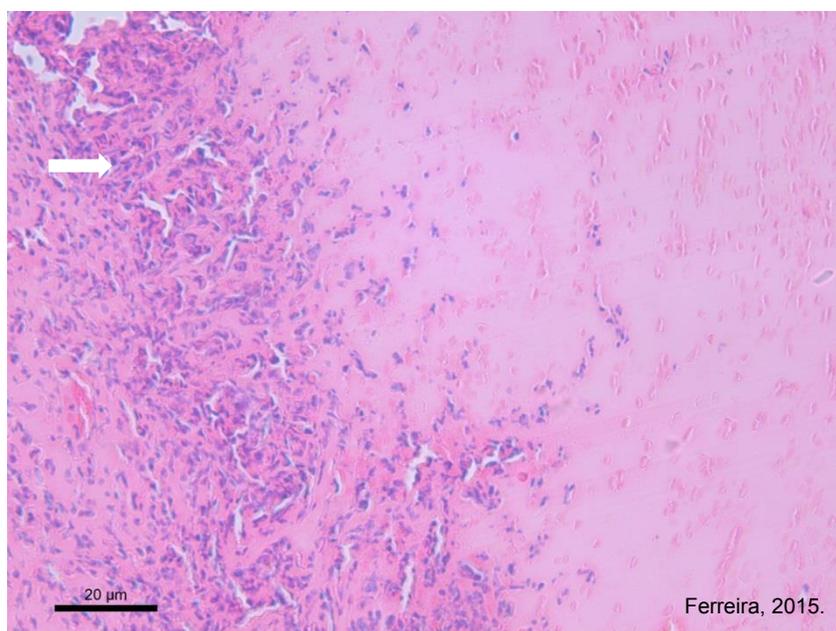


FIGURA 19- Biópsia do plano nasolabial de ovino com diagnóstico histopatológico sugestivo de Ectima Contagioso (*Orf vírus*) - crosta formada por tecido necrosado intensamente infiltrado por neutrófilos e exsudato (coloração hematoxilina eosina, aumento 400x). Botucatu, SP- 2015.

Neste estudo foi realizada biópsia em animais com crosta nas mais diferentes fases das lesões, conseguindo visualizar microscopicamente corpúsculos de inclusão, degeneração balonosa, vesículas, pústulas e crosta, assim como foi encontrado no estudo realizado por Nóbrega et al. (2008).

McGavin et al. (2009) citaram que a patogenia da formação da lesão e as características macro e microscópicas são consistentes com lesões típicas de *Poxvirus*, exceto pela rapidez do estágio vesicular. O estágio de úlceras e crostas persistiu e foi clinicamente predominante e a epiderme estava marcadamente hiperplásica. Os corpúsculos de inclusão foram detectáveis histologicamente somente rapidamente no estágio vesicular.

5.8- Análises das crostas

Dos 444 ovinos, 33 (7,21%) apresentavam sinais clínicos característicos da doença, possibilitando a realização da biópsia para análise por PCR e 412 (92,79%) não apresentavam lesões. Já dentre os 42 cuidadores dos animais, apenas um (2,38%) apresentou suspeita clínica. A prevalência de animais com crosta resultou em 7,2 (IC95%=4,8-9,6%) e em seus cuidadores 2,4 (IC 95= 0% -7%)

Dos 32 ovinos que apresentaram crosta (ilustrado na Figura 19), 30 (93,75%) confirmaram estar com a doença, por meio do exame histopatológico, enquanto outros dois (6,25%) animais apresentaram lesões sugestivas de doença vesicular pustular cutânea e carcinoma epidermoide de células escamosas (Tabela 3). Para os ovinos com crosta, não houve associação entre os métodos de PCR e Histopatológico, $p = 0,11$ (Tabela 4).

TABELA 3- Comparação dos resultados do teste diagnóstico histopatológicos entre ovinos e seus cuidadores com suspeita de Ectima Contagioso (*Orf vírus*). Botucatu, SP - 2015.

| Espécie | Histopatológico | | Total |
|------------------------------|-------------------|------------------------|-------|
| | Ectima Contagioso | Outras lesões cutâneas | |
| Cuidadores dos ovinos | 1 (100%) | 0 (0%) | 1 |
| Ovino | 30 (93,75%) | 2 (6,25%) | 32 |
| Total | 31 | 2 | 33 |



FIGURA 20- (a) Animal com sinal clínico de Ectima Contagioso nos lábios; (b) Animal com sinal clínico de Ectima Contagioso na gengiva; (c) Animal com sinal clínico nos tetos; (d) Animal com sinal clínico de Ectima Contagioso no focinho. Botucatu, SP- 2015.

Durante o estudo, dentre os 32 ovinos com sinais clínicos sugestivos de ecthima contagioso, apenas uma fêmea apresentou lesões no teto, enquanto seus três filhotes, lesões na língua e gengiva (Figura 20 b e c). Concordando com Hosamani et al. (2006) que encontraram ocasionalmente lesões nos tetos e raramente em língua e gengiva.

Das crostas analisadas, 32 crostas eram de ovinos, destas 11 (34,38%) foram negativas na PCR enquanto 21 (65,63%) foram positivas. Uma era humana, mas foi negativo na PCR.



FIGURA 21- Cuidadora de ovinos com sinais clínicos sugestivos de Ectima Contagioso (*Orf vírus*). Botucatu, SP- 2015.

A cuidadora acometida pela lesão sugestiva de Ectima Contagioso (*Orf vírus*) é uma senhora de 53 anos, sem doença imunossupressora, que cuidou de animais doentes durante 15 dias e logo após este período passou a apresentar sinais clínicos compatíveis com a doença.

A crosta da cuidadora dos ovinos (figura 21) que apresentou lesão característica no exame histopatológico teve resultado negativo à PCR. Dos 30 (93,75%) animais que apresentaram lesões típicas de Ectima Contagioso à patologia, apenas 21 (70%) foram positivos à PCR, conforme demonstra a Tabela 4.

TABELA 4- Comparação das crostas de ovinos com lesões características produzidas por *Orf vírus* e resultados positivos ao teste diagnóstico da PCR. Botucatu, SP- 2015.

| Histopatológico | PCR | | Total |
|----------------------|-------------|-------------|-------------|
| | Negativo | Positivo | |
| EC | 9 (30%) | 21 (70%) | 30 (93,75%) |
| Outras lesões | 2 (100%) | 0 (0%) | 2 (6,25%) |
| Total | 11 (34,38%) | 21 (65,63%) | 32 (100%) |

* Não houve associação dos métodos de PCR e Histopatológico entre as espécies (teste de Qui-quadrado, $p= 0,11$).

As propriedades que apresentavam um animal com sinais clínicos da doença, três a quatro dias depois, aproximadamente 100% dos cordeiros do mesmo lote ou com convívio direto também iniciaram a sintomatologia, concordando com Housawi et al. (1991), que citou essa alta morbidade.

O estudo ora realizado corrobora também com o estudo realizado por Murphy et al. (1999) e descrito por Radostits et al. (2012), confirmando que uma vez o *Orf vírus* introduzido no rebanho, ele apresenta alta morbidade e caráter infeccioso.

5.7 - Mediana dos títulos de anticorpos por VN

A mediana dos títulos de anticorpos por VN entre os animais com e sem crosta não foi diferente estatisticamente, $p= 0,62$. Conforme demonstra a Tabela 5.

TABELA 5- Mediana dos títulos de anticorpos no teste diagnóstico de virusneutralização para Ectima Contagioso (*Orf vírus*) em ovinos. Botucatu, SP - 2015.

| Crostas | Ovinos | Média | Desvio Padrão | Mediana* | Mínima | Máxima |
|----------|--------|-------|---------------|----------|--------|--------|
| Ausência | 412 | 0,98 | 0,82 | 0,9 | 0 | 2,1 |
| Presença | 32 | 0,92 | 0,66 | 0,9 | 0 | 2,1 |

* Medianas não foram diferentes entre os animais com e sem crosta (Teste de Kruskall-Wallis, $p=0,62$)

A mediana dos títulos de anticorpos por VN entre os cuidadores dos animais com e sem crosta não foi possível ser realizada, pois apenas uma pessoa apresentou sinais clínicos característicos do *Orf vírus*, assim como observado na Tabela 6.

TABELA 6- Mediana dos títulos de anticorpos no teste diagnóstico de virusneutralização para Ectima Contagioso (*Orf vírus*) nos cuidadores dos ovinos. Botucatu, SP - 2015.

| Crosta | Cuidadores | Média | Desvio Padrão | Mediana | Mínima | Máxima |
|--------|------------|-------|---------------|---------|--------|--------|
| 0 | 41 | 1,37 | 0,85 | 1,8 | 0 | 2,1 |
| 1 | 1 | 2,1 | | 2,1 | 2,1 | 2,1 |

5.8- Mediana dos títulos de anticorpos dos ovinos com crosta submetidas à PCR.

A mediana dos títulos de anticorpos dos ovinos que apresentaram crosta e esta submetida à PCR, quando se comparou os positivos com os ovinos negativos quanto à presença de anticorpos, constatou-se que a diferença não foi significativa estatisticamente, $p = 0,63$ (Tabela 7).

TABELA 7- Mediana dos títulos de anticorpos dos ovinos com suspeita de Ectima Contagioso (*Orf vírus*) que apresentaram crostas e foram submetidas ao teste diagnóstico da PCR. Botucatu, SP - 2015.

| PCR crosta | N ovinos | Soma dos escores | Esperado em H0 | Desvio Padrão em H0 | Média dos Escores* |
|------------|----------|------------------|----------------|---------------------|--------------------|
| Positivo | 21 | 4723,5 | 4672,5 | 560,48 | 224,92 |
| Sem crosta | 412 | 9201 | 91670 | 682,81 | 223,32 |
| Negativo | 11 | 2056,5 | 2447,5 | 410,4 | 186,95 |

*Medianas não foram diferentes entre os animais com e sem crosta (teste Teste de Wilcoxon, $p=0,63$).

6 – CONCLUSÃO

O teste de virusneutralização no soro entre as espécies foi significativo estatisticamente ($p = 0,048$), com isso, sugere-se que quanto maior a convivência dos ovinos com seus cuidadores, maior será sua titulação de anticorpos.

A concordância entre os métodos diagnósticos de virusneutralização, PCR e histopatológico, embora tenha sido moderada, são importantes associações para o diagnóstico conclusivo da doença.

Conclui-se ainda que o vírus encontra-se difundido no Estado de São Paulo e essa distribuição geográfica não influenciou a semelhança genética do vírus.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHÃO, J.S. et al. Detection and phylogenetic analysis of *ORF virus* from sheep in Brazil: a case report. **Virology Journal**, London, v.6, n.47, May 2009.

ALCAMI, A. Viral mimicry of cytokines, chemokines and their receptors. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 1, p.36-50, Jan. 2003.

AL-SALAM, S. et al. Ecthyma contagiosum (ORF)-report of a human case from the United Arab Emirates and review of the literature. **Journal of Cutaneous Pathology**, Copenhagen, v.35, n.6, p.603-607. June 2008.

ANDERSON, I.E. et al. Detection of cellular cytokine mRNA expression during *ORF virus* infection in sheep: differential interferon- γ mRNA expression by cells in primary versus reinfection skin lesions. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Penicuik, v.83, n. 3-4, p.161-176, Aug. 2001.

ALLEN, R. Observed the Histochemical changes in gill of the *O. mossambicus*. **Int. J. of Global Bioscience**. vol.2(3) 2013, pp212-217, 1995.

ASSARSSON, E. et al. Kinetic analysis of a complete poxvirus transcriptome reveals an immediate-early class of genes. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** La Jolla, v.105, n.6 , p.2140-2145. 2008.

ASSOCIAÇÃO PAULISTA DE CRIADORES DE OVINOS. **Ectima Contagiosos um perigo para caprinos e ovinos**. Materiais Técnicos: ASPACO, 2003. Disponível em: <www.aspaco.org.br/mate_tecnicos2.htm.2003.>. Acesso em: 05 maio 2012.

ASSOCIAÇÃO PAULISTA DE CRIADORES DE OVINOS. **Ectima Contagiosos um perigo para caprinos e ovinos**. Disponível em: <[http://www.aspaco.org.br/\(mlte2aqtrkadzk45xodzco55\)/artigo.aspx?Cod=153](http://www.aspaco.org.br/(mlte2aqtrkadzk45xodzco55)/artigo.aspx?Cod=153).> Acesso em: 29 abr. 2004.

AZULAY, R.D.; AZULAY, D.R. **Dermatologia**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008, 984p.

BALDWIN, A.S. JR. The NF- κ B and I κ B proteins: new discoveries and insights. **Annual Reviews in Immunology**, Chapel Hill, v.14, p.649-683, Apr. 1996.

BARRAVIEIRA, S.R.C.S. Diseases caused by poxvirus – *ORF* and milker's nodules – a review. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, Botucatu, v.11, n.2, 7p., March 3, 2005.

BARROS, C.S.L. Ectima Contagioso. In: RIET-CORREA, F., SCHILD, A.L., MENDEZ, M.D.C., LEMOS, R.A. **Doenças de Ruminantes e Equinos**, 2.ed., v.1. São Paulo: Livraria Varela, cap.2, 2001, p.72-76.

BARROS, C.S.L. Ectima Contagioso, In: RIET-CORREA F.; SCHILD A.L.; LEMOS R.A.A.; BORGES J.R. (Eds.). **Doenças de Ruminantes e Equinos**. 3.ed., v.1, Santa Maria: Pallotti, 2007, p.98-102.

BEBER, C.L. et al. Plano de marketing: proposta para participação de mercado para o cordeiro pantaneiro. In: V JORNADA CIENTIFICA DO CENTRO-OESTE DE ECONOMIA E ADMINISTRAÇÃO, 5, 2005, Campo Grande, **Anais...** Campo Grande, 2005. 1 CD-ROM.

BILLINIS, et al. Phylogenetic analysis of strains of *Orf virus* isolated from two outbreaks of the disease in sheep in Greece. Billinis et al. *Virology Journal* 2012, 9:24.

BOUGHTON, I.B.; HARDY, W. Contagious ecthyma (sore mouth) of sheep and goats. **Journal of American Veterinary Medical Association**, Ithaca, v. 85, p. 150-178, Aug. 1934.

BOWIE, A. et al. A46R and A52R from vaccinia virus are antagonists of host IL-1 and toll-like receptor signaling. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.** Denver, v. 97, n.18, p.10162-10167, Aug. 29, 2000.

BUDDLE, B. M.; PULFORD, H.D. Effect of passively-acquired antibodies and vaccination on the immune response to contagious ecthyma virus. **Veterinary Microbiology**, v.9, p.515- 522, 1984.

BUTTNER, M.; RZIHA, H.J. Parapoxvirus: from the lesion to the viral genome. **Journal of Veterinary Medicine**, Chicago, v. 49, p. 7-16, Oct. 2002.

CANAL, C.W. Poxviridae. In: FLORES, E.F. (Ed.) *Virologia Veterinária*. Santa Maria: Editora UFSM, 2007, p. 489-512.

CATROXO, M.H.B. et al. Ocorrência de Ectima Contagioso em ovinos criados em Itatiba, estado de São Paulo, Brasil. **Arquivos Instituto Biológico**, São Paulo, v.69, Supl.37, 2002.

CDC. **ORF humano imitando antraz cutânea** - Califórnia. *MMWR*, v. 22, p.108, 1973.

CHAGAS, A.C.S.; VERÍSSIMO, C.J. Principais enfermidades e manejo sanitário de ovinos. 1.ed. São Carlos: **Embrapa Pecuária Sudoeste**, 2008. Disponível em: <[http://pontovinos.akinaloja.com.br/loja/info_pages.php?nome=Ectima%20Contagioso%20\(BeosCsid=d1f5080e6e9a2f745dca8b14398295fb\)](http://pontovinos.akinaloja.com.br/loja/info_pages.php?nome=Ectima%20Contagioso%20(BeosCsid=d1f5080e6e9a2f745dca8b14398295fb))>. Acesso em 10 ago. 2011.

CHAN, K.W. et al. Identification and phylogenetic analysis of *ORF virus* from goats in Taiwan. **Virus Genes**, Boston, v.35, n.3, p.705-12, Aug. 2007.

CHEN, R.A.J. et al. Inhibition of IkappaB kinase by vaccinia virus virulence factor B14. **PLoS Pathog**. v.4, e22, Feb. 8, 2008.

CHOMKZYNSKI, P. A reagent for the single-step simultaneous isolation RNA, DNA and proteins from cells and tissue samples. **Biotechniques**, v.15, p.532-537, 1993.

COATES, J.W.; HOFF, S. Contagious ecthyma: an unusual distribution of lesions in goats. **Canadian Veterinary Journal**, Guelph, v.31, n.3, p.209-210, March 1990.

CUCÉ, L.C.; NETO, C.F. **Manual de Dermatologia**. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2001.

DAL POZZO, F.; et al. In vitro evaluation of the *anti-ORF* virus activity of alkoxyalkyl esters of CDV, cCDV and (S)-HPMPA. **Antiviral Research**, Amsterdam, v.75, n.1, p.52-57, July 2007.

DEANE, D. et al. ORF virus encodes a novel secreted protein inhibitor of granulocyte-Macrophage colony-stimulating factor and interleukin-2. **Journal of Virology**, v.74, n.3, p.1313-1320, Feb. 2000.

de la CONCHA-BERMEJILLO, A.; et al. Severe persistent *ORF* in young goats. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v.15, n.5, p.423-431, Sep. 2003.

DELHON, G. et al. Genomes of the parapoxviruses *ORF virus* and bovine papular stomatitis virus. **Journal Virology**, Baltimore, v.78, n.1, p.168-177, Jan. 2004.

DIEL, D.G. et al. A novel inhibitor of the NF- κ B signaling pathway encoded by the parapoxvirus *ORF virus*. **J. Virol.** v.84, n.8, p.3962- 3973, Feb. 2010.

DiPERNA, G. et al. Poxvirus protein N1L targets the I- κ B kinase complex, inhibits signaling to NF- κ B by the tumor necrosis factor superfamily of

receptors, and inhibits NF-kappaB and IRF3 signaling by toll-like receptors. **J. Biol. Chem.** v.279, p.36570-36578, 2004.

FERNANDES, F.M.N.A. Ovinocultura no Contexto Agropecuário Paulista. In: SIMPÓSIO PAULISTA DE OVINOCULTURA, 5, Botucatu, 1999, **Anais...** Campinas, 1989.

FERREIRA, B. L. S. **Associação da ocorrência do Ectima Contagioso (*Orf vírus*) com ovinos e seus cuidadores.** 2015. 91p. Tese de doutorado - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, São Paulo.

FLEMING, S.B.; MERCER, A.A. Genus Parapoxvirus, p. 127-165. In: MERCER, A.A.; SHMIDT, A.; WEBER, O. (Eds.). **Poxviruses**. 1.ed. Basel: Birkhäuser, 2007.

FLEMING, S.B. et al. A homolog of interleukin-10 is encoded by the poxvirus ORF virus. **Journal of Virology**, v.71, p.4857- 4861, 1997.

GALLINA, et al. (2006). A real time PCR assay for the detection and quantification of *ORF virus*. **J. Virol. Methods**. 134:140-145.

GEDEY, R. et al. Poxviral regulation of the host NF-kappaB response: the vaccinia virus M2L protein inhibits induction of NF-kappaB activation via an ERK2 pathway in virus-infected human embryonic kidney cells. **J. Virol.** v.80, p.8676-8685, 2006.

GEERNICK, K. et al. Um caso de ORF humano em paciente imunocomprometido tratadas com sucesso com creme de cidofovir. **J Med Virol**, v.64, p.543 – 9, 2001.

GILRAY, J.A. et al. Perfis de restrição de endonucleases de vírus isolados de ORF das Ilhas Britânicas. **Vet Rec**, v.143, p.237-240, 1998.

GOKCE, H. I. et al. Sero-prevalence of contagious ecthyma in lambs and humans in Kars, Turkey. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Science**, Ankara, v.29, p.95-101, 2005.

GUMBRELL, R.C.; MCGREGOR, D.A. Outbreak of severe fatal *ORF* in lambs. **Veterinary Record**, London, v.141, n. 6, p.150-151, Aug. 1997.

HAIG, D.M. *ORF virus* infection and host immunity. **Current Opinion in Infectious Disease**, London, v.19, n.2, p.127-131, Apr. 2006.

HAIG, D.M.; MERCER, A.A. Ovine diseases. *ORF*. **Veterinary Research**, Paris, v.29, n.3-4, p.311-326, May-Aug 1998.

HAIG, D.M.; et al. Cytokines and their inhibitors on *ORF virus* infection. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v.54, n.1-4, p.261-267, Nov. 1996a.

HAIG, D.M. et al. Cyclosporin A abrogates the acquired immunity to cutaneous reinfection with the parapoxvirus *ORF virus*. **Immunology**, v.89, p.524-531, 1996b.

HAIG, D.M. et al. Cytolytic activity and associated serine pretease expression by skin and afferent lymph CD8+ T cells during *ORF virus* infection. **Journal of General Virology**, v.77, p.953-961, 1996c.

HAIG, D.M.; FLEMING, S. Immunomodulation by virulence proteins of the parapoxvirus *ORF virus*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.72, p.81-86, 1999.

HAIG, D.M.; McINNIS, C. J. Immunity and counter-immunity during infection with the parapoxvirus *ORF virus*. **Virus Res.** v.88, p.3-16, 2002.

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

HOUSAWI, F.M.T. et al. *ORF* infection following eat taggin in goats. **Reviu D'Élevage et de Médecine Veterinaire des pays Tropicaux**, France, v.44, n.3, p.277-278, 1991.

HOSAMANI, M. et al. 2006. Comparative sequence analysis of major envelope protein gene (B2L) of Indian *orf* viruses isolated from sheep and goats. **Vet. Microbiol.** 116, 317–324.

HOSMARINI, M. et al. *ORF*: an update on current research an future perspectives. **Expert Review of Anti-infective Therapy**. v.7, p.879-893, 2009.

ICTV. (2014). International Committe on Taxonomy of Viruses. On-line. Capturado 23 jun. 2015. Disponível em: <http://ictvonline.org/virustaxonomy.asp>

INOSHIMA, Y.; MOROOKA, A.; SENTSUI, H. Detection and diagnosis of *Parapoxvirus* by the polymerase chain reaction. **J. Virol. Methods**, v. 84, n. 2, p. 201-208, 2000.

JENKINSON, D.M. et al. Location and spread of *ORF virus* antigen in infected ovine skin. **Vet. Dermatol.** v.1, p189-195, 1990.

JOSEPH, R.H. et al. Erythema multiforme after *ORF virus* infection: a report of two cases and literature review. **Epidemiol. Infect.** Cambridge University. p.1-6, 2014.

KATSAFANAS, G.C.; MOSS, B. Colocalization of transcription and translation within cytoplasmic poxvirus factories coordinates viral expression and subjugates host functions. **Cell Host and Microbe**, v.2, p.221-228, 2007.

KESHAN et al. (2010). Diagnosis and phylogenetic analysis of *Orf virus* from goats in China: a case report. *Virology Journal*. 7:78. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2877020/>>. Acesso em: janeiro de 2015.

KOTTARIDI, C. et al. Laboratory diagnosis of contagious ecthyma: Comparison of different PCR protocols with virus isolation in cell culture. *Journal of Virological Methods* 134 (2006) 119–124.

KURODA, Y. et al. Na epidemia de parapoxvírus em gado: isolamento e levantamento de anticorpos. *J Vet Med Sci*. v.61, p749-753, 1999.

LANGONI, H. et al. Ectima Contagiosa em ovinos na região de Botucatu. **Hora Veterinária**, Porto Alegre, n.84, p.60-62, 1995.

LI, Q.; VERMA, I.M. NF-kappaB regulation in the immune system. **Nature Reviews Immunology**, v.10, p.725-734, 2002.

LIVINGSTON, C.W.; HARDY, E.W. Longevity of contagious ecthyma virus. **Journal of American Veterinary Medical Association**, Ithaca, v.137, p.651, Dec. 1960.

LLOYD, J.B. et al. In vivo T-cell depletion suggests that CD4+ T-cells and a humoral immune response are important for elimination of *ORF virus* from the skin of sheep. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v.74, n.3-4, p.249-262, May 2000.

LOPES, MACÊDO, J.T.S.A. et al. Doença da pele de caprinos e ovinos no semi-árido brasileiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 28, n. 12, p. 633-542, 2008.

MACÊDO, V. de P. et al. Tissue and chemical compositions of loin from lambs fed sunflower seed in creep feeding. **Rev. Bras. Zootec.**, v.37, n.10, p.1860-1868, 2008.

MAVROGIANNI, V.S. et al. Teat disorders predispose ewes to clinical mastitis after challenge with *Mannheimia haemolytica*. **Veterinary Research**, Paris, v.37, n.1, p.89-105, Jan-Feb. 2006.

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

McGAVIN, M.D. et al. Bases da Patologia em Veterinária. 4ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. p.800.

McELROY, M.C.; BASSETT, H.F. The development of oral lesions in lambs naturally infected with *ORF virus*. **Veterinary Journal**, London, v.174, n.3, p.663-664, Nov. 2007.

McKEEVER, D.J. et al. Studies of the pathogenesis of *ORF virus* infection in sheep. **Journal of Comparative Pathology**, London, v.99, n.3, p.317-328, Oct. 1988.

MERCER, A.A. et al. Lack of cross-protection between vaccinia virus and *ORF virus* in hysterectomy-procured, barrier-maintained lambs. **Veterinary Microbiology**, v.41, n.4, p.373-382, 1994.

MERCER, A.A. et al. Molecular análises genéticas de patogenicidade parapoxviruses para os seres humanos. **Arch. Virol. Suppl.**, v.13, p.25-34, 1997.

MERCER, A.A. Comparative analysis of genome sequences of three isolates of *ORF virus* reveals unexpected sequence variation. **Virus Research**, v.116, p.146-158, 2006.

MOHAMED, M.R., McFADDEN, G. NF-kappaB inhibitors: Strategies from poxviruses. **Cell. Cycle**. v.8, n.19, p.3125-3132, 2009.

MOSS, B. Poxviruses: The Viruses and Their Replication, p. 2905-2946. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY; P.M. (eds.). **Fields Virology**, 5th ed., v.2. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams e Wilkins, Philadelphia, 2007.

MURPHY, F.A. et al. **Veterinary Virology**. 3ed. San Diego: Academic Press, 629p., 1999.

MYSKIW, C. et al. Vaccinia virus E3 suppresses expression of diverse cytokines through inhibition of the PKR, NF-kappaB, and IRF3 pathways. **J. Virol.**, v.83, p.6757-6768, 2009.

NÓBREGA JUNIOR, J.E.; et al. Ectima Contagioso em ovinos e caprinos no semi-árido da Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.28, n.1, p.135-139, mar. 2008.

NOGUEIRA FILHO, A. Ações de fomento do Banco do Nordeste e potencialidades da caprino-ovinocultura. p.43-55. In: **Anais do 2º SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE CAPRINOS E OVINOS DE CORTE**, João Pessoa, 2, set.-out. 2005.

NOURANI, H.; MALEKI, M. Contagious ecthyma: case report and review. **Pakistan J. Biol. Scien.** v.9, n.13, p.2543-2545, 2006.

PAHL, H. L. Activators and target genes of *Rel/NF-kappaB* transcription factors. **Oncogene**, Freiburg, v.18, n.49, p.6853-6866, Nov. 1999.

PROPHET, E. B. et al. (Eds.). **Métodos histotecnológicos**. Wahington: Registro de Patologia de los Estados Unidos de América, 1995. 280p.

PUGH, D. G. **Clínica de ovinos e caprinos**. São Paulo. Roca, 2005. 434p.

RADOSTITS, O. M. et al. **Clínica Veterinária: Um Tratado de Doenças dos Bovinos, Ovinos, Suínos, Caprinos e Equinos**. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

REED, L. J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. **The American Journal of Hygiene**, v. 27, n. 3, p. 493–497, May, 1938.

ROBINSON, A. J.; BALASSU, T. C. Contagious pustular dermatitis (*ORF*). **The Veterinary Bulletin**, Farnham Royal, v.51, n.10, p.771-782, Oct. 1981.

ROBINSON, A.J. Prevalence of contagious pustular dermatitis (*ORF*) in six million lambs at slaughter: a three-years study. **New Zealand Veterinary Journal**, Wellington, v.31, n.9, p.161-163, Sep. 1983.

ROBINSON A.J.; LYTTLE D.J. Parapoxviruses: their biology and potencial as recombinant vaccines. In: M. Binns, G.L.,Smith (eds): **Recombinant poxviruses**. CRC Press, Boca Raton, 285-327. 1992.

ROLLE, M.; MAYR, A.; BÜTTNER, M. **Medizinische Mikrobiologie**, Infektions- und Seuchenlehre. 8.ed, Germany. Enke, 2006.

SALLES, M.W.S. et al. Ectima Contagioso (Dermatite pustular) dos ovinos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.22, n.3, p.319-324, Ago. 1992.

SAMPAIO, S. A. P.; RIVITTI, E. A. Dermatologia. 3. ed. **Rev. e Ampl.** São Paulo: Artes Médicas, 2008. 1600p.

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

SAS Institute. SAS/STAT User's Guide. Version 9.3, SAS Institute Inc., Cary, NC, 2011.

SCHATZMAYR, H. G. et al. Detection of poxvirus in cattle associated with human cases in the state of Rio de Janeiro: preliminary report. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 95, n. 5, p. 625-627, 2000.

SCHRAMM, B.; LOCKER, J. K. **Cytoplasmic organization of poxvirus DNA replication**. *Traffic*, v.6, p.839-846, 2005.

SHELLEY, W.B.; SHELLEY, E.D. Tratamento cirúrgico da varíola de capoeira: *ORF*, nódulos ordenhador, bovinos papulares pox estomatite. **Cútis**, v.31, p.191-2, 1983.

SILVA, E. R. et al. **Caprinos e ovinos: guia de saúde**. Sobral: Embrapa Caprinos, 2001. 66p.

SIMPLÍCIO, A. A. A caprino-ovinocultura na visão do agronegócio. **Revista CFMV**, n.24, p.15-18, 2001.

SMITH, M. C.; SHERMAM, D. M. **Goat Medicine**. Philadelphia: Lea and Febiger, p.535-540, 1994.

SCHMIDT C. et al. **Partial sequence analysis of B2L gene of Brazilian orf viruses from sheep and goats**. *Veterinary Microbiology* 162 (2013) 245–253.

SUN, S. C.; XIAO, G. Deregulation of NF- κ B and its upstream kinases in cancer. **Cancer and Metastasis Reviews**, v.22, p.405-422, 2003.

TAMURA, K. et al. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, v.28, p.2731-2739, 2011.

TAMURA K. et al. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*30: 2725-2729.

TIKKANEN, M. K. et al. Recent isolates of parapoxvirus of Finnish reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*) are closely related to bovine pseudocowpox vírus. **Journal of General Virology**. 85, 1413–1418, 2004.

TIZARD, I. R. **Imunologia Veterinária**. 8ed. España: Elsevier, 2009.

TRINDADE, G. S. et al. Araçatuba virus: a vaccinia-like virus associated with infection in humans and cattle. **Emerging Infectious Disease**, v. 9, n. 2, p.155-160, 2003.

TORAFSON, E. G.; GUNADOTTIR, S. Reação em cadeia da polimerase para diagnóstico laboratorial de infecções por vírus ORF. **J. Clin. Virol.** v.24,p.79-84, 2002.

TORRES, S. Dermatite pustular contagiosa nos caprinos e ovinos no Pernambuco. **Bolm. Soc. Bras. Med. Vet.** v.9, p.107-108, 1939.

UZEL, M. et al. Uma infecção viral da mão comumente observada após a festa do sacrifício: *ORF* humano (*ORF* da mão). **Epidemiol Infect.** v.133, p.653-657, 2005.

WESTPHAL, D. et al. A novel Bcl-2-like inhibitor of apoptosis is encoded by the parapoxvirus *ORF virus*. **J. Virol.**, v.81, p.7178-7188, 2007.

YERUHAM, I. et al. *ORF* infection in four sheep flocks. **Veterinary Journal**, London, v.160, n.1, p.74-76, July 2000.

ANEXOS

Anexo 1:

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

**Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

Declaro para os devidos fins que estou ciente e autorizo a realização do procedimento de colheita de sangue, referente ao Projeto de Pesquisa intitulado ASSOCIAÇÃO DA OCORRÊNCIA DO ECTIMA CONTAGIOSO (*ORF VÍRUS*) COM OVINOS COM OS CUIDADORES DESTES ANIMAIS, de responsabilidade da Médica Veterinária Bruna Lapenna Sanches Ferreira.

Nome do animal: _____

Nome do Responsável: _____

RG: _____ Data: ___ / ___ / ___

Assinatura: _____

Anexo 2:

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(TERMINOLOGIA OBRIGATÓRIA EM ATENDIMENTO A RESOLUÇÃO 466/12-CNS-MS)

O sr(a) está sendo convidado(a) a participar de uma pesquisa chamada "Associação da ocorrência do Ectima Contagioso (ORF vírus) em ovinos com os cuidadores destes animais, que pretende analisar a associação da resposta sorológica do ORF vírus entre os animais e seus cuidadores, por meio de Reação de Virusneutralização (VN) e PCR do sangue.

O sr(a). foi selecionado(a) a participar dessa pesquisa por ter animais com lesões clínicas do vírus ou por alguns de seus animais já terem tido a doença relatada pelo sr(a) na propriedade.

A pesquisa consta de colheita de sangue e, se houver algum local do corpo com pele lesionada semelhante às características da doença em humanos, também será realizada a biópsia do local. O procedimento tem por finalidade comparar os vírus isolados nos humanos e nos animais.

O conhecimento dessas características permite prevenir os criadores de ovinos para esta zoonose.

Caso você não queira participar da pesquisa, é seu direito e isso não vai interferir com seu tratamento. Você poderá retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa sem nenhum prejuízo.

É garantido total sigilo do seu nome, imagem, resultado de exame ou doença, em relação aos dados relatados nesta pesquisa.

Você receberá uma via deste termo, e outra via será mantida em arquivo pelo pesquisador por cinco anos.

Qualquer dúvida adicional, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa, através do fone: (14) 3880-1608 / 1609.

CONCORDO EM PARTICIPAR DA PESQUISA

Nome : _____
Assinatura: _____
Pesquisadora: _____
Data: ____/____/____ Assinatura: _____

Orientador: José Rafael Modolo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ/UNESP-Botucatu/SP), Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública Veterinária, localizada no Distrito de Rubião Junior, s/n. CEP- 18.618-000. Fone: (14)38802095. E-mail: jrmodolo@fmvz.unesp.br

Pesquisadora: Bruna Lapenna Sanches Ferreira, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ/UNESP-Botucatu/SP), Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública Veterinária, localizada no Distrito de Rubião Junior, s/n. CEP- 18.618-000. Fone: (14)38802096. E-mail: bru_medvet@hotmail.com

Anexo 3:

| | | | |
|--|--|---|--|
| unesp | UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA CAMPUS DE BOTUCATU FACULDADE DE MEDICINA |  FACULDADE DE MEDICINA FMB BOTUCATU |  CEUA Comissão de Ética no Uso de Animais |
| | | |  |
| Criação através do Portaria DFM nº 811 de 13/12/2012 | | | |
| <h1>Certificado</h1> | | | |
| <p>CERTIFICAMOS que o (Protocolo CEUA 1033-2013) "Associação da ocorrência do Ectima contagioso (ORF vírus) em ovinos com os cuidadores destes animais" a ser conduzido por Bruna Lapenna Sanches Ferreira, orientada pelo Prof. Dr. José Rafael Modolo, Co-orientada pelo Prof. Titular Silvio Alencar Marques, com a colaboração de Edvirges Maristela Pituco, está de acordo com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, sendo utilizado "ovinos" no experimento.</p> | | | |
| Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEUA em 25/07/2013 | | | |
|  Prof. Dr. Katashi Okoshi Presidente da CEUA |  Alberto Santos Capelleppi Secretário da CEUA | | |
| <small>Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P. CEP: 18.618-970 Fone: (14) 3885-1608/3885-1609 e-mail secretaria_ceua@fmb.unesp.br</small> | | | |

Anexo 4:

| Tipo ▾ | Número CAAE ▾ | Título da Pesquisa ▾ | Pesquisador Responsável ▾ | Versão ▾ | Última Modificação ▾ | Situação ▾ | Gestão da Pesquisa |
|--------|----------------------|--|--------------------------------|----------|----------------------|------------|---|
| P | 19071013.7.0000.5411 | Associação da ocorrência do Ectima Contagioso (ORF vírus) em ovinos com os | BRUNA LAPENNA SANCHES FERREIRA | 1 | 05/08/2013 | Aprovado |    |