

X Congresso Internacional do Leite

X Workshop de Políticas Públicas

XI Simpósio de Sustentabilidade da Atividade Leiteira

Identificação sorológica e molecular do agente viral envolvido em surtos de vaccínia bovina no estado de Goiás

Juliana Almeida Leite¹, Antônio do Amaral Leal², Giliane de Souza Trindade³, Jônatas Santos Abrahão³,
Juliana Gonçalves Ramos⁴, Márcio Roberto Silva¹, Erna Geessien Kroon³

¹ Pesquisador, EMBRAPA Gado de Leite, Juiz de Fora/MG. juliana@cnpq.embrapa.br

² Fiscal Estadual Agropecuário, GESAN/AGRODEFESA, Goiânia/GO

³ Professor Adjunto, ICB/UFMG, Belo Horizonte/MG

⁴ Fiscal Estadual Agropecuário, AGRODEFESA, Vila Propício/GO

Resumo: Vários surtos de vaccínia bovina, popularmente conhecida como varíola bovina, vem ocorrendo no Brasil. Estes surtos são marcados pela infecção de vacas leiteiras que apresentam lesões típicas de poxvírus. Em alguns casos, infecções secundárias podem ocorrer gerando mastite. Queda na produção de leite é observada. A contaminação de bezerros durante a amamentação é comum, causando lesões no focinho, gengivas e mucosa oral; assim como a infecção de ordenhadores durante a ordenha. O agente etiológico envolvido nesses surtos é o vírus vaccínia e partículas infecciosas já foram detectadas e isoladas de amostras de leite coletadas durante alguns surtos. A presença de partículas virais infecciosas em amostras de leite experimentalmente infectadas mesmo após pasteurização lenta também já foi relatada. Esses dados são extremamente relevantes quando considerada a Instrução Normativa 51 do MAPA que autoriza o armazenamento de leite em tanques de expansão por até 24 horas e a Lei Estadual 14.185 de Minas Gerais para processamento do queijo Minas após a ordenha sem a pasteurização. O objetivo desse trabalho foi uma prospecção sorológica entre os animais acometidos e a identificação molecular do vírus envolvidos em dois surtos de vaccínia bovina ocorrido no estado de Goiás.

Palavras-chave: caracterização molecular, caracterização sorológica, Goiás, varíola bovina, vírus, zoonose

Serological and molecular identification of the viral agent involved in bovine vaccinia outbreaks in the state of Goiás

Abstract: Several bovine vaccinia outbreaks have been occurring in Brazil. During these outbreaks, dairy cattle get infected, presenting typical poxvirus. In some cases, secondary infection leading to mastitis occurs. Decrease in milk production is observed. Calves contamination during suckling is common, causing lesions on muzzle, gum and oral mucosa. Milkier contamination during milking is also common. The etiological agent involved in these outbreaks is the vaccinia virus and infectious particles have been detected and isolated in milk samples collected during some outbreaks. Presence of infectious viral particles in experimentally infected milk samples even after slow pasteurization has been reported. These data are very relevant when considering the Normative Instruction 51 from the Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply that authorizes milk storage in expansion tanks for up to 24 hours and the Minas Gerais State Law 14.185 for Minas cheese processing after milking without pasteurization. The objective of this work was a serological evaluation of infected animals and molecular identification of the virus involved in two bovine vaccinia outbreaks that occurred in the State of Goiás.

Keywords: bovine vaccinia, Goiás state, molecular characterization, serological characterization, virus, zoonosis

Introdução

Vários surtos de vaccínia bovina, popularmente conhecida como varíola bovina, que vem sido relatado em vários estados do país desde 1999 (TRINDADE et al., 2003; LEITE et al., 2005; TRINDADE et al., 2006; TRINDADE et al., 2007, ABRAHÃO et al., 2010). Os surtos de vaccínia bovina são marcados pela infecção de vacas leiteiras que apresentam lesões típicas de poxvírus que podem estar

X Congresso Internacional do Leite

X Workshop de Políticas Públicas

XI Simpósio de Sustentabilidade da Atividade Leiteira

presentes em vários estágios, desde pápulas a vesículas, pústulas e crostas (TRINDADE et al., 2003; TRINDADE et al., 2007a;). Essas lesões são ulcerativas, localizadas nas tetas e úbere das vacas em lactação. Infecções secundárias podem ocorrer, gerando mastite. Além do impacto na saúde animal, ocorre impacto na pecuária leiteira, sendo observada queda em torno de 40 a 60 % na produção de leite (LEITE et al., 2005). Contaminação de bezerras durante a amamentação é comum, causando lesões no focinho e mucosa oral (LEITE et al., 2005). Infecção de ordenhadores durante a ordenha também ocorre com frequência, levando a lesões nas mãos, dores no corpo, febre acima de 40°C e linfadenopatia (TRINDADE et al., 2007b). Impactos socioeconômicos significativos também ocorrem pois afastamento temporário do ordenhador do ambiente de trabalho também é comum (OLIVEIRA et al., 2010).

Adicionalmente, um grande problema é o potencial de animais infectados disseminarem microrganismos juntamente com o leite. Partículas infecciosas de vírus vaccínia já foram detectadas e isoladas de amostras de leite (ABRAHÃO et al., 2009a). Este fato envolve um problema de segurança alimentar, pois o consumo de leite cru é observado em algumas regiões rurais. Esse problema é ainda maior quando levado em consideração a produção de queijo feita a partir de leite cru. OLIVEIRA e colaboradores (2010) demonstraram a presença de partículas virais infecciosas em amostras de leite infectadas mesmo após pasteurização lenta. Partículas virais viáveis também estavam presentes no leite, no soro e na massa do queijo após armazenamento a 4°C por 24 horas. Esses dados são extremamente relevantes quando consideradas a Instrução Normativa 51 do MAPA que autoriza o armazenamento de leite em tanques de expansão por até 24 horas e a Lei Estadual 14.185 de Minas Gerais em que o processamento do queijo Minas deve ser iniciado 90 minutos após a ordenha sem a pasteurização.

Os fatores envolvidos na emergência ou re-emergência destes vírus no país ainda não são totalmente conhecidos. Conhecer os agentes virais envolvidos nestes surtos é importante para ajudar a entender os mecanismos que estão levando à ocorrência dos surtos de vaccínia bovina no Brasil. Assim, o objetivo desse trabalho foi uma prospecção sorológica entre os animais acometidos e a caracterização molecular do vírus envolvidos em dois surtos de vaccínia bovina ocorrido no estado de Goiás.

Material e Métodos

Amostras de crosta e soro de animais infectados durante os surtos com características clínicas de vaccínia bovina foram coletadas pela AGRODEFESA. Após realizados os procedimentos oficiais e descartado a suspeita de febre aftosa e estomatite vesicular, as amostras foram enviadas à Embrapa Gado de Leite em conjunto com o Laboratório de Vírus da UFMG para processamento e identificação sorológica e molecular.

Testes de ELISA foram realizados com os soros coletados para detecção de soroconversão dos animais infectados. Como antígeno, foi utilizado vírus vaccínia WR. Os soros foram diluídos em PBS contendo Tween e leite em pó desnatado e adicionados aos poços de placa de ELISA e incubados por 1 hora a temperatura ambiente. Após lavagem foi adicionado conjugado específico (anti-IgG conjugado a peroxidase). A leitura foi feita a 492 nm.

A identificação molecular foi baseada na amplificação do gene *vgf*, utilizando nested-multiplex PCR, conforme metodologia descrita por ABRAHÃO e colaboradores (2009b).

Resultados e Discussão

Esse estudo abrangeu a identificação do agente etiológico envolvido em dois surtos de vaccínia bovina que ocorreram concomitantemente em duas fazendas leiteiras no estado de Goiás. Ordenhadores também foram acometidos apresentando lesões características de poxvírus, febre e linfadenopatia. Foram realizados testes de ELISA para detecção de anticorpos do tipo IgG para ortopoxvírus e PCR específica para o gene do fator de crescimento do vírus vaccínia (*vgf*) para detecção de DNA viral nos soros bovinos. Foram realizadas PCR específica para o gene do fator de crescimento do vírus vaccínia (*vgf*) para detecção de DNA viral nas amostras de crostas de lesões epiteliais.

Foram analisadas 7 amostras de soro e 6 de crostas de lesões epiteliais, coletadas de 8 animais na Fazenda GO-1 (Tabela 1). Do total de 7 amostras de soro, todos apresentaram sorologia positiva para

X Congresso Internacional do Leite

X Workshop de Políticas Públicas

XI Simpósio de Sustentabilidade da Atividade Leiteira

ortopoxvírus sendo possível a detecção de DNA viral por meio de PCR para o gene *vgf* em 2 amostras de soro. Do total de 6 amostras de crosta de lesões epiteliais, foi possível a detecção de DNA viral por meio de PCR para o gene *vgf* em 4 amostras. Não foi possível a detecção de DNA viral por PCR nas amostras de crostas de lesões epiteliais e no soro de 2 animais com sorologia positiva para ortopoxvírus. Esse resultado sugere soroconversão com a resolução da virose, ou seja, com eliminação do agente viral, permanecendo apenas anticorpos anti-ortopoxvírus circulantes no soro destes animais.

Tabela 1 – Análise sorológica e molecular das amostras da Fazenda GO-1

Animal	ELISA ^a	PCR – Soro ^b	PCR – Crosta ^b
1	Positivo	negativo	positivo
2	-	-	positivo
3	Positivo	positivo	positivo
4	Positivo	negativo	negativo
5	Positivo	positivo	positivo
6	Positivo	negativo	negativo
7	Positivo	negativo	-
8	Positivo	negativo	-

^a = ELISA para ortopoxvírus; ^b = PCR para gene *vgf*

Foram analisadas 4 amostras de soro e 4 amostras de crostas de lesões epiteliais, coletadas de 4 animais na Fazenda GO-2 (tabela 2). Do total de 4 amostras de soro, 3 apresentaram sorologia positiva para ortopoxvírus sendo possível a detecção de DNA viral por meio de PCR para o gene *vgf* na amostra com sorologia negativa. Foi possível a detecção de DNA viral por meio de PCR para o gene *vgf* em todas as 4 amostras de crosta de lesões epiteliais. A detecção de DNA viral por PCR na amostra de soro e crosta de lesão epitelial do animal que não apresentou sorologia positiva para ortopoxvírus sugere a presença de vírus vaccínia, sem que tenha ainda ocorrido produção de anticorpos anti-ortopoxvírus do tipo IgG em quantidade detectável.

Tabela 2 – Análise sorológica e molecular das amostras da Fazenda GO-2

Animal	ELISA ^a	PCR – Soro ^b	PCR – Crosta ^b
1	Positivo	negativo	positivo
2	positivo	negativo	positivo
3	Positivo	negativo	positivo
4	negativo	positivo	positivo

^a = ELISA para ortopoxvírus; ^b = PCR para gene *vgf*

Conclusões

Os resultados sorológicos positivos para anticorpos circulantes anti-ortopoxvírus, gênero ao qual pertence a espécie do vírus vaccínia, juntamente com a detecção de DNA viral baseado no gene do gene do fator de crescimento do vírus vaccínia, foi identificada a presença do vírus vaccínia, agente etiológico envolvido em surtos vaccínia bovina, popularmente conhecida como varíola bovina. A identificação do agente viral é extremamente importante por se tratar de um diagnóstico diferencial para febre aftosa. Adicionalmente, a caracterização dos vírus envolvidos nos surtos de vaccínia bovina é importante para um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na ocorrência desses surtos no Brasil.

Literatura citada

ABRHÃO, J.S., OLIVEIRA, T., KROON, E.G., LOBATO, Z.P. **Bovine Vaccinia Outbreaks: Detection and Isolation of Vaccinia Virus in Milk Samples**. Food Patho and Dis, v.6, p.1141-1146, 2009a.
 ABRAHÃO, J.S., COTA, M.M.G., FERREIRA, V.M., CAMPOS, R.K., MAZUR, C., LOBATO, Z.I.P., TRINDADE, G.S., KROON, E.G. **Nested-multiplex PCR detection of Orthopoxvirus and Parapoxvirus directly from exanthematic clinical samples**. Virology Journal, v.6, p. 140 2009b.
 ABRHÃO, J.S., SILVA-FERNANDES, A.T., GUEDES, M.C., DRUMOND, B.P., LEITE, J.A., FONSECA, F.G., LOBATO, Z.I.P., MADRUREIRA, M., FERREIRA, P.C.P, BONJARDIM, C.A.,

X Congresso Internacional do Leite

X Workshop de Políticas Públicas

XI Simpósio de Sustentabilidade da Atividade Leiteira

- TRINDADE, G.S., KROON, E.G. **Human Vaccinia virus and Pseudocowpox virus co-infection: Clinical description and phylogenetic characterization.** J Clin Virol, v.48, p. 69–72, 2010.
- LEITE, J.A., DRUMOND, B.P., TRINDADE, G.S., LOBATO, Z.I.P., DA FONSECA, F.G., BONJARDIM, C.A., FERREIRA, P.C.P., KROON, E.G. **Passatempo virus: a novel Vaccinia virus isolated during a zoonotic outbreak in Brazil.** Emerg Infect Dis, v. 11, p. 1935-1938, 2005.
- OLIVEIRA, T.M.L., SIQUEIRA, J.M.F., ABRAHÃO, J.S., CAMPOS, R.K., KROON, E.G., LOBATO, Z.I.P. **Vaccinia Virus is not Inactivated After Thermal Treatment and Cheese Production Using Experimentally Contaminated Milk.** Foodborne Pathogens and Disease, v. 7, p. 1491-1496, 2010.
- SILVA-FERNANDES, A.T., TRAVASSOS, C.E.P.F., FERREIRA, J.M.S., ABRAHÃO, J.S., SANTOS, J.R., BONJARDIM, C.A., FERREIRA, P.C.P., KROON, E.G. **Natural human infections with Vaccinia virus during bovine vaccinia outbreaks.** J Clin Virol, v. 44, p. 308–313, 2009.
- TRINDADE, G.S., DA FONSECA, F.G., MARQUES, J.T., NOGUEIRA, M.L., PEIRO, J.R., PITUCO, E.M., BONJARDIM, C.A., FERREIRA, P.C. & KROON, E.G. **Aracatuba virus: a vaccinia-like virus associated with infection in humans and cattle.** Emerg Infect Dis, v. 9, p. 155-160, 2003.
- TRINDADE, G.S., LOBATO, Z.I.P., LEITE, J.A., GUEDES, M.I.M.C., DA FONSECA, F.G., BONJARDIM, C.A., FERREIRA, P.C., KROON, E.G. **Short report: isolation of two vaccinia virus strains from a single bovine vaccinia outbreak in rural area from Brazil: implications on the emergence of zoonotic orthopoxviruses.** Am J Trop Med Hyg, v. 75, p. 486–490, 2006.
- TRINDADE, G.S., LEITE, J.A., CAMPOS, M.A.S., DA FONSECA, F.G., LOBATO, Z.I.P., BONJARDIM, C.A., KROON, E.G. **Zoonotic Vaccinia virus infection in Brazil: clinical description and implications for health professionals.** J Clin Microbiol, v. 45, p. 1370–1372, 2007.