LIRIA HIROMI OKUDA

***Orthopoxvirus* bovino: inquérito soropidemiológico e
caracterização de amostras pela técnica de PCR e RFLP**

São Paulo

2013

LIRIA HIROMI OKUDA

***Orthopoxvirus* bovino: inquérito soropidemiológico e caracterização de amostras pela técnica de PCR e RFLP**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de Concentração

Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses

Orientador

Prof. Dr. José Antonio Jerez

De acordo: _____
Orientador

São Paulo

2013

Obs: A versão original se encontra disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2848
FMVZ

Okuda, Liria Hiromi

Orthopoxvirus bovino: inquérito soroepidemiológico e caracterização de amostras pela técnica de PCR e RFLP / Liria Hiromi Okuda. -- 2013.
112 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2013.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. José Antonio Jerez.

1. *Orthopoxvirus*. 2. *Vaccinia*. 3. Virusneutralização. 4. Diagnóstico molecular. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "*Orthopoxvirus* em bovinos: inquérito soropidemiológico e caracterização dos isolados pelas técnicas de PCR e RFLP", protocolado sob o nº1472/2008, utilizando 1200 (um mil e duzentos) bovinos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. José Antonio Jerez, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 01/10/08.

We certify that the Research "*Orthopoxvirus* in bovine: serum-epidemiologic survey and characterization of isolates by PCR and RFLP techniques", utilizing 1200 (one thousand two hundred) bovines, protocol number 1472/2008, under the responsibility Prof. Dr. José Antonio Jerez, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 10/01/08.

São Paulo, 02 de outubro de 2008

Prof. Dr. José Luiz Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: OKUDA, L. H.

Título: *Orthopoxvirus* bovino: inquérito soroepidemiológico e caracterização de amostras pela técnica de PCR e RFLP.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

À minha família, com amor, admiração e gratidão por sua compreensão, carinho, presença e incansável apoio ao longo do período de elaboração deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Antonio Jerez, pela orientação, mas principalmente pelo ser humano formidável, que em diversas ocasiões tive a oportunidade de ver a demonstração de valores morais e princípios éticos e que muito me ensinou com isso.

Ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal pela oportunidade de realizar o curso de doutorado.

Aos médicos veterinários do Serviço Oficial que procederam às colheitas das amostras.

Ao Instituto Biológico, do qual me orgulho fazer parte dessa casa e pela liberação em fazer o Doutorado.

À Dra. Edviges Maristela Pituco pela atenção, orientação e apoio durante o processo de desenvolvimento do projeto bem como na vida profissional.

À toda equipe do Laboratório de Viroses de Bovídeos que contribuíram na execução desse trabalho.

À Dra. Márcia Helena Catroxo, Dra. Cláudia Del Fava e Dr. Ricardo Harakava pelas contribuições no enriquecimento deste trabalho.

Às Dra. Márcia Maria Rebouças, Nayte Vitiello e Silvana D'Agostini

"No momento em que nos comprometemos, a providência divina também se põe em movimento. Todo um fluir de acontecimentos surge ao nosso favor. Como resultado da atitude segue todas as formas imprevistas de coincidências, encontros e ajuda, que nenhum ser humano jamais poderia ter sonhado encontrar. Qualquer coisa que você possa fazer ou sonhar, você pode começar. A coragem contém em si mesma, o poder, o gênio e a magia."

Goethe

RESUMO

OKUDA, L. H. **Orthopoxvirus bovino: inquérito soroepidemiológico e caracterização de amostras pela técnica de PCR e RFLP**. [*Orthopoxvirus* cattle: sero-epidemiology survey and characterization of the samples by PCR and RFPL techniques]. 2013. 112 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

No Brasil, casos de doença exantemática em bovinos e humanos têm sido relatados em diversas regiões, cujo agente causal é o vírus *vaccinia* pertencente ao gênero *Orthopoxvirus* da família *Poxviridae*. Classicamente, a varíola bovina é causada pelo *Cowpoxvirus*, entretanto, outros *Poxvirus*, como o vírus *vaccinia* podem desenvolver sintomatologia clínica semelhante. Além de comprometer a cadeia produtiva de leite, uma vez que dificulta a ordenha, predispõe a mastite e descarte do produto, é uma zoonose e atualmente está incluída no diagnóstico de doença vesicular. A origem desses casos bem como a epidemiologia da doença ainda é pouco conhecida. Assim, objetivou-se no presente estudo 1) Avaliar a soroprevalência de *Orthopoxvirus* em rebanhos bovinos do circuito sete do Estado de São Paulo que compreendem as regiões do Vale do Paraíba e Mogi das Cruzes e associar os possíveis fatores de risco envolvidos na transmissão da doença; 2) Detectar e caracterizar a presença de *Orthopoxvirus* em amostras suspeitas de doença vesicular, no período de 2007 a 2009, provenientes de diversas regiões do Brasil utilizando técnicas convencionais e moleculares: microscopia eletrônica, isolamento viral, PCR e RFLP; 3) Sequenciamento e análise filogenética das amostras positivas para o vírus *vaccinia*. Para o inquérito soroepidemiológico foram analisadas 76 propriedades pertencentes ao circuito 7 que compreendem as regiões do Vale do Paraíba e Mogi das Cruzes, estado de São Paulo, selecionadas aleatoriamente, totalizando 619 animais, estratificados em fêmeas acima de dois anos. A soroprevalência de *Orthopoxvirus* no Vale do Paraíba foi de 32,3% (200/619) pela virusneutralização. Associação positiva foi encontrada para presença de animais silvestres. No diagnóstico virológico foram analisadas 227 amostras de epitélio, negativas para outras doenças vesiculares. Encontrou-se frequência de 63,4% (144/227) positivas para o *Orthopoxvirus* em praticamente todas as regiões do país. A análise por RFLP revelou perfil de padrão para o vírus *vaccinia*. O sequenciamento dos isolados confirmou que o vírus *vaccinia* é a estirpe circulante e está agrupado no grupo I de isolados de *vaccinia* brasileiros.

Palavras-chave: *Orthopoxvirus*. *Vaccinia*. Virusneutralização. Diagnóstico molecular.

ABSTRACT

OKUDA, L. H. ***Orthopoxvirus* cattle: sero-epidemiology survey and characterization of the samples by PCR and RFLP techniques.** [*Orthopoxvirus* bovino: inquérito soroepidemiológico e caracterização de amostras pela técnica de PCR e RFLP]. 2013. 112 f Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

In Brazil, cases of rash illness in cattle and humans have been reported in several regions whose causal agent is the *vaccinia* virus belonging to the genus *Orthopoxvirus* (OPV) family *Poxviridae*. Classically, cowpox is caused by *Cowpoxvirus*, however, other poxviruses such as *vaccinia* virus may develop same clinical signs. In addition to compromising the production chain of milk, as it hampers milking, predisposes to mastitis and discard the product, also it is a zoonosis and is currently included in the differential diagnosis of vesicular disease. The origin of these cases as well as the epidemiology of the disease is still unknown. Thus, the aim of the present study 1) assess the serum prevalence of OPV in cattle herds circuit seven Vale do Paraíba and associate the possible risk factors involved in disease transmission, 2) identify and characterize the presence of OPV in samples suspected vesicular disease in the period 2007-2009, from various regions of Brazil using conventional techniques and molecular electron microscopy, virus isolation, PCR and RFLP; 3) Sequencing and phylogenetic analysis of the samples positive for OPV. For epidemiological survey were analyzed 76 properties in the region of Vale do Paraíba, São Paulo, randomly selected, totaling 619 animals, stratified in females more than two years. The serum prevalence of OPV in the Paraíba Valley was 32.3% (200/619) by virus neutralization. Positive association was found for presence of wild animals. The virological diagnosis were analyzed 227 samples of epithelium, negative for other vesicular diseases. Met frequency of 63.4% (144/227) positive for OPV in practically all regions of the country. RFLP analysis revealed default profile for the *vaccinia* virus. The sequencing of the isolates confirmed that *vaccinia* virus strain is circulating and is clustered in group I isolates of Brazilians *vaccinia*.

Keywords: *Orthopoxvirus*. *Vaccinia*. Virus neutralization. Molecular diagnostics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Mapa 1 – Municípios que compreendem o Circuito 7 do Estado de São Paulo selecionados para o inquérito soroepidemiológico de <i>Orthopoxvirus</i>	33
Figura 1 - Esquema representativo da família <i>Poxviridae</i> : classificação segundo sub-família, gênero e espécies.....	18
Figura 2 - Frequência de animais analisados, no período de outubro a dezembro de 2011, de acordo com a divisão em Escritórios Regionais de Defesa Agropecuária.....	48
Figura 3 - Frequência de animais reagentes para <i>Orthopoxvirus</i> por propriedade.....	50
Figura 4 - Número de amostras com suspeita de doença vesicular recebidas no Lab. Viroses de Bovídeos, por ano.....	59
Figura 5 - Distribuição das amostras segundo Estado de origem.....	62
Figura 6 - Amostras recebidas no Laboratório de Viroses de Bovídeos, segundo ano e estado de origem.....	62
Figura 7 - Variáveis relacionadas a origem da doença na propriedade.....	64
Figura 8 - Detecção de <i>Orthopoxvirus</i> por ME.....	66
Figura 9 - Isolamento de <i>Poxvirus</i> em cultivo celular.....	66
Figura 10 - Detecção de <i>Orthopoxvirus</i> pela <i>hemi nested</i> PCR.....	67
Figura 11 - Análise da RFLP para <i>Orthopoxvirus</i>	68
Figura 12 - Árvore filogenética baseadas nas sequências nucleotídicas do gene HA.....	74
Figura 13 - Percentual de identidade entre OPV, baseado nas sequências de aminoácidos do gene HA.....	75
Figura 14 - Percentual de identidade entre OPV, baseado nas sequências nucleotídicas do gene HA.....	77
Quadro 1 - Detecção de <i>Orthopoxvirus</i> no Brasil, nos últimos 50 anos, em humanos, roedores e bovinos, caracterizados como variante do vírus vaccinia.....	21
Quadro 2 - Reação de virusneutralização para <i>Orthopoxvirus</i> modificado de Newman et al. (2003).....	38
Quadro 3 - Descrição dos <i>primers</i> utilizados nas reações de <i>hemi nested</i> PCR para <i>Orthopoxvirus</i>	42

Quadro 4 - Ciclo de amplificação da <i>hemi nested</i> PCR para <i>Orthopoxvirus</i>	43
Quadro 5 - Preparo da mistura de reagentes para a reação de sequenciamento....	45
Quadro 6 - Ciclo de amplificação da reação de sequenciamento.....	45
Quadro 7 - Concordância entre as técnicas ME e isolamento viral.....	71
Quadro 8 - Concordância entre as técnicas ME e <i>hemi nested</i> PCR.....	71
Quadro 9 - Concordância entre as técnicas Isolamento viral e <i>hemi nested</i> PCR.....	72

LISTA DE SIGLAS	
ARAV	Virus Araçatuba
CDA	Coordenadoria de Defesa Animal
CTGV	Virus Cantagalo
DNA	ácido desoxirribonucléico
EDA	Escritório Regional de Defesa Agropecuária
ELISA	ensaio imunoenzimático
GP1V	Virus Guarani P1
GP2V	Virus Guarani P2
HA	hemaglutinina
IC	Intervalo de confiança
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MARV	Virus Mariana
MEM	Meio essencial mínimo
mL	mililitro
μL	Microlitro
μM	micromolar
MURV	Virus Muriae
OD	<i>Odds ratio</i>
OPV	<i>Orthopoxvirus</i>
pb	pares de base
PCR	reação em cadeia pela polimerase
pH	potencial hidrogeniônico
PSTV	Virus Passatempo
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
rpm	rotação por minuto
SFB	soro fetal bovino
TAE	solução de Tris, Ácido Acético Glacial e EDTA
VACV	Virus <i>Vaccinia</i>

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Distribuição dos animais segundo os E.D.A. da C.D.A. Vale do Paraíba e informações contidas no questionário epidemiológico para correlação dos fatores de risco para o <i>Orthopoxvirus</i>	49
Tabela 2 - Prevalência de OPV segundo características da região estudada, manejo zootécnico e fatores de risco.....	51
Tabela 3 - Análise dos animais ao OPV pela regressão univariada. São Paulo, 2013.....	53
Tabela 4 - Análise dos animais ao OPV pela regressão multivariada. São Paulo, 2013.....	54
Tabela 5 – Prevalência de OPV pelas análises de regressão univariada e multivariada.....	55
Tabela 6 - Número de amostras encaminhadas ao Laboratório de Virose de Bovídeos para o diagnóstico diferencial, segundo município e Estado. São Paulo, 2013.....	60
Tabela 7 - Caracterização das amostras e informações quanto ao manejo zootécnico das propriedades. São Paulo, 2013.....	63
Tabela 8 - Detecção de <i>Orthopoxvirus</i> segundo as técnicas diagnósticas: ME, isolamento viral e hemi nested PCR. São Paulo, 2013.....	65
Tabela 9 - Frequência de <i>Orthopoxvirus</i> segundo as três técnicas diagnósticas e o ano. São Paulo, 2013.....	68
Tabela 10 - Frequência de <i>Orthopoxvirus</i> segundo as três técnicas diagnósticas e o estado de origem.....	69
Tabela 11 - Detecção do vírus utilizando as técnicas de microscopia eletrônica, isolamento viral e PCR segundo estado de origem.....	70
Tabela 12 - Amostras positivas de <i>Orthopoxvirus</i> pela PCR e RFLP submetidas ao sequenciamento e confirmadas como vaccinia, segundo a localidade. São Paulo, 2013.....	72

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 AGENTE ETIOLÓGICO	16
2.2 VIRUS VACCINIA COMO ANTÍGENO DE VACINA	19
2.3 EPIDEMIOLOGIA DO VÍRUS VACCINIA NO BRASIL	19
2.4 VIRUS VACCINIA NO DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE DOENÇAS VESICULARES	26
2.5 SINAIS CLÍNICOS E DIAGNÓSTICO	27
3 OBJETIVOS	31
4 MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1 SOROPREVALENCIA DO VIRUS VACCINIA (ESTUDO RETROSPECTIVO)	32
4.1.1 Local de estudo e amostragem	32
4.1.2 Questionário epidemiológico	34
4.1.3 Amostras de soro bovino	34
4.1.4 Linhagem celular	35
4.1.5 Estirpe viral padrão	36
4.1.6 Titulação viral	37
4.1.7 Reação de Virusneutralização (VN)	37
4.1.8 Análise Estatística	39
4.2 DIAGNÓSTICO VIROLÓGICO EM AMOSTRAS SUSPEITAS DE DOENÇA VESICULAR	40
4.2.1 Preparo das amostras de epitélio para isolamento viral e <i>hemi nested</i> PCR	40
4.2.2 Isolamento viral em cultivo celular	40
4.2.3 Microscopia eletrônica	41
4.2.4 Hemi nested PCR	41
4.2.4.1 Extração do DNA	42
4.2.4.2 Amplificação	43
4.2.4.3 Eletroforese em gel de agarose	44
4.2.4.4 Análise de restrição de polimorfismo do gene HA	44
4.2.4.5 Sequenciamento	45
4.2.4.6 Análise estatística	46
5 RESULTADOS: INQUÉRITO SORO-EPIDEMIOLÓGICO	48
5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS ANIMAIS QUANTO A LOCALIZAÇÃO E CARACTERÍSTICAS DAS PROPRIEDADES	48
5.2 SOROPREVALÊNCIA DE OPV SEGUNDO AS CARACTERÍSTICAS DAS PROPRIEDADES	50
5.3 FATORES DE RISCO ASSOCIADOS À SOROPOSITIVIDADE	52
5.4 DISCUSSÃO: INQUÉRITO SORO-EPIDEMIOLÓGICO	56
6 RESULTADOS: DIAGNÓSTICO DIRETO DE ORTHOPOXVIRUS	59
6.1 CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANALISADAS	59
6.2 DETECÇÃO DE OPV PELAS TÉCNICAS CONVENCIONAIS E MOLECULARES	65
6.3 DETECÇÃO DE OPV SEGUNDO ANO	68
6.4 DETECÇÃO DE OPV SEGUNDO ESTADO DE ORIGEM	69
6.5 CONCORDÂNCIA ENTRE OS MÉTODOS DIAGNÓSTICOS	70
6.6 ANÁLISE DO SEQUENCIAMENTO	72
6.7 DISCUSSÃO: DIAGNÓSTICO DIRETO DE ORTHOPOXVIRUS	78
6.7.1 Comparação entre os métodos diagnósticos	78
6.7.2 Análise dos casos de OPV	79
7 CONCLUSÃO	82
REFERÊNCIAS	83
APÊNDICES	95

1 INTRODUÇÃO

Dentre as poxviroses, aquela que teve maior impacto na história da humanidade foi o vírus da varíola (*smallpox*) e que foi considerada mundialmente erradicada, pela Organização Mundial de Saúde, em 1980 (WHO, 2001). Considerando o risco do seu uso como arma biológica, somente Estados Unidos e Rússia ainda detêm as estirpes vacinais para uso emergencial. Entretanto, a aplicação de outros poxvirus como arma biológica, uma vez que a população está imunologicamente desprotegida e pelo potencial zoonótico de outras espécies de Poxvirus que acometem animais domésticos e silvestres merece aprofundamento em estudos de impacto em saúde pública.

No Brasil têm sido relatados em bovinos, casos de doença exantemática atribuídos ao vírus *vaccinia*, estirpe usada na produção da vacina contra a varíola humana e, que foi de fundamental importância para o sucesso da erradicação mundial desta doença. Por se tratar de doença vesicular, o vírus *vaccinia* foi incluído no diagnóstico diferencial de Febre Aftosa e Estomatite Vesicular de acordo com recomendação do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Desta forma, na ocorrência de casos na propriedade as medidas de controle seguem o mesmo rigor da febre aftosa: interdição da propriedade, isolamento dos animais acometidos até a confirmação do diagnóstico laboratorial (BRASIL, 2009).

Considerando os surtos de *vaccinia* nos últimos anos, pode-se inferir que esta zoonose compromete de modo bastante consistente a cadeia produtiva do leite, incluindo licença saúde dos indivíduos acometidos, que são na maioria os ordenhadores, isolamento dos animais infectados, diminuição na produção e descarte do leite. A junção desses fatores leva a grandes perdas econômicas podendo até inviabilizar esse tipo de atividade, particularmente as não tecnificadas que ainda são em grande número em nosso País, caracterizando um problema social de relevância.

O presente trabalho visa relatar a soroprevalência do vírus *vaccinia* em rebanhos bovinos leiteiros do Circuito Sete da Região do Vale do Paraíba, Estado de São Paulo, e associar os possíveis fatores de risco envolvidos na transmissão da doença; detectar e caracterizar por meio de técnicas convencionais e biomoleculares amostras de vírus isoladas a partir de epitélios bovinos suspeitos de doença vesicular, provenientes de diversas regiões do Brasil e enviados para diagnóstico laboratorial ao Laboratório de Virose de Bovideos do Instituto Biológico de São Paulo, no período de 2007 a 2009 e sequenciamento com análise filogenética das amostras isoladas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 AGENTE ETIOLÓGICO

A família *Poxviridae* é classificada em duas grandes subfamílias, *Chordopoxvirinae* e *Entomopoxvirinae*, sendo a primeira pertencente a Poxvirus de vertebrados e a segunda de insetos. A subfamília *Chordopoxvirinae* possui oito gêneros: *Orthopoxvirus*, *Parapoxvirus*, *Avipoxvirus*, *Capripoxvirus*, *Leporipoxvirus*, *Suipoxvirus*, (Figura 1). Seu genoma é composto de DNA de fita dupla, simetria complexa envolvido por envelope lipoprotéico e se replica no citoplasma da célula hospedeira, característica única dentre os DNA vírus de fita dupla. Dependendo do gênero, o tamanho do genoma varia desde 130 kbp (*Parapoxvirus*) até 300 kbp (*Avipoxvirus*) e é capaz de codificar aproximadamente 200 proteínas. O cerne aparece bicôncavo com duas estruturas de função desconhecidas, chamadas de corpos laterais. De modo geral, todos os *Orthopoxvirus* são antigenicamente relacionados e possuem hospedeiros específicos (VAN REGENMORTEL et al., 2000; MOSS, 2007; ICTV, 2013).

Estudos de patogênese dos *Orthopoxvirus* sugerem que vários genes relacionados à virulência e ações sobre o hospedeiro estão localizados em regiões terminais do DNA viral, implicando na capacidade do vírus escapar da resposta imune do hospedeiro e se disseminar após infecção inicial, como o gene da hemaglutinina (HA). Estudos *in vitro* tem demonstrado que o gene HA, uma glicoproteína presente tanto na membrana citoplasmática de células infectadas como no envelope viral é capaz de se ligar à célula hospedeira, em pH neutro, propiciando a formação de sincícios. A fusão não ocorre quando o gene HA é inativado (TURNER; MOYER, 1992). A atividade do gene HA pode ser detectada 6 horas pós-infecção (BROWN; TURNER; MOYER, 1991) e tem sido selecionada para distinguir *Orthopoxvirus* de outros gêneros de Poxvirus (ROPP et al., 1995).

Segundo Buller e Palumbo (1991), a taxa de replicação do DNA varia entre os poxvirus. Para o vírus *vaccinia* ocorre entre 2 a 5 horas pós-infecção, com uma produção aproximada de 10.000 cópias do genoma.

Em termos de importância econômica e de Saúde Pública destacam-se os gêneros *Orthopoxvirus*, que incluem o vírus da varíola bovina e vírus *vaccinia* e *Parapoxvirus*, que causam a pseudovaríola bovina e o ectima contagioso dos ovinos; ambos os gêneros estão

relacionados à doença exantemática em animais e humanos. Esses dois gêneros podem ser diferenciados morfollogicamente por microscopia eletrônica e pela inoculação em ovos embrionados. O primeiro possui simetria oval e os túbulos são assimétricos ao passo que, o gênero *Parapoxivirus* possui túbulos distribuídos de forma simétrica (VAN REGENMORTEL et al., 2000). Além disso, somente o *Orthopoxvirus* desenvolve lesão na camada cório-alantóide de ovo embrionado (HAHON; FRIEL, 1962).

A varíola bovina é classicamente causada pelo *cowpoxvirus*, pertencente ao gênero *Orthopoxvirus* da família *Poxviridae*, no entanto, outros poxvirus podem desenvolver a mesma sintomatologia clínica levando a confusão do termo varíola bovina (BRASIL, 2009). Todos são antigenicamente e intrinsecamente relacionados e de grande importância para a saúde humana e animal (BULLER; PALUMBO, 1991).

Figura 1 - Esquema representativo da Família *Poxviridae*: classificação segundo sub-família, gênero e espécies

Fonte: Okuda, L. H.

2.2 VIRUS VACCINIA COMO ANTÍGENO DE VACINA

A primeira vacina empregada para o controle de *smallpox* foi desenvolvida por Edward Jenner, em 1798, a partir da observação de que humanos em contato com lesões de vacas acometidas pelo vírus da varíola bovina (*cowpoxvirus*) desenvolviam uma reação local branda e que conferia proteção contra a doença. Atualmente existe uma linha de pensamento que discute se, de fato, Jenner utilizou o *cowpoxvirus* como antígeno da vacina, uma vez, que naquela época ainda não existiam metodologias de diagnóstico capazes de distinguir as diferentes estirpes de poxvirus, como o vírus *vaccinia*, cuja origem, até os dias de hoje é controversa: supõe-se que seja derivada do *cowpoxvirus* e que durante o processo de produção da vacina sofreu mutações. O vírus *vaccinia* foi empregado até a completa erradicação da varíola humana que ocorreu na década de 1980. Por outro lado, as vacinas eram produzidas em bezerros e, portanto, havia o risco do mesmo se infectar por outra estirpe, podendo ocasionar adaptação ao hospedeiro e proteção ou até mesmo desencadear quadros mais graves da doença em indivíduos imunizados, o que levava a intuir que a vacina não era uma medida profilática adequada (FERNANDES, 2004).

A vacina antivariólica foi introduzida no Brasil, em 1804 e era “braço-a-braço”, ou seja, escravos eram enviados a Lisboa para serem vacinados no braço e retornavam ao país. A partir de 1887 é que a vacina passou a ser produzida em bezerros dentro de laboratórios e em 1920, a mesma passou a ser produzida em escala industrial, pelo Instituto Vacinológico, sendo posteriormente transferido para o Instituto Oswaldo Cruz (FERNANDES, 1999). O risco de escape viral era alto, quer pelos escravos, quer pelos laboratórios uma vez que não existia biossegurança.

No Brasil, as estirpes vacinais empregadas na campanha de erradicação do *smallpox* foram as NYCBOH e Lister trazidas de Paris (FERNANDES, 1999).

Após a erradicação da varíola humana pela OMS, todas as estirpes vacinais foram destruídas, somente Estados Unidos e Rússia mantêm um banco dessas estirpes para casos de uso como arma biológica.

No Brasil, vários poxvirus têm sido isolados desde 1960 e caracterizados como vírus *vaccinia* em diferentes espécies animais, como roedores e bovinos (quadro 1). Cada isolado recebeu um nome de acordo com a região detectada, mas todos foram caracterizados como vírus *vaccinia* (MEDEIROS-SILVA et al., 2010). Os relatos de transmissão sempre partem dos animais para os humanos (SCHATZMAYR et al., 2009).

Na Europa, os casos de varíola bovina são atribuídos ao *cowpoxvirus* e os reservatórios são gatos, raposas, gerbis e roedores silvestres (BOULANGER et al., 1996; CZERNY et al., 1996; BENNET et al., 1997). Entretanto, no Brasil, para o vírus *vaccinia* ainda se desconhece quais seriam os possíveis reservatórios e como essa estirpe pôde persistir durante tanto tempo na natureza, após o final da vacinação contra a varíola humana. Fica o questionamento se a doença não estava sendo diagnosticada (TRINDADE et al., 2003), pois até o presente momento, dentre as doenças vesiculares em bovinos, a febre aftosa e estomatite vesicular são as primeiras a serem analisadas. Em humanos é considerada uma doença ocupacional e os indivíduos acometidos são tratados somente com terapias de suporte, o que reforça a necessidade de se promover programas de educação sanitária (TRINDADE et al., 2007).

Os casos confirmados da presença do vírus *vaccinia* são relatados nos estados do Amazonas, Bahia, Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Pará, Paraná, Rio de Janeiro e São Paulo mostrando a disseminação deste agente no país (OKUDA, 2009).

Quadro 1 – Detecção de *Orthopoxvirus* no Brasil, nos últimos 50 anos, em humanos, roedores e bovinos sendo caracterizados como variante do vírus *vaccinia*

(Continuação)

Nome do isolado	Ano	Estado	Hospedeiro	Características	Referência
<u>SPAn232 vírus</u> (<u>SPAnv</u>) – <u>Cotia vírus</u>	1961	SP	Ratos sentinela	Isolado em 1961 em ratos sentinelas da floresta da região de Cotia, estado de São Paulo. Inicialmente foi denominado de <i>Cotia vírus</i> . Apresenta 99% de homologia com a estirpe vacinal VAC-WR	Lopes et al. (1965); da Fonseca et al. (2002)
<u>Belém Vaccinia vírus</u> (BeAn vírus <u>5809658</u>)	1963	PA	Roedores (gênero <i>Oryzomys</i>)	Isolado em 1963 em sangue de roedores do gênero <i>Oryzomys</i> na floresta tropical, na região do Belém do Pará. Somente em 1998, após análises morfológicas e moleculares foi identificado como pertencente ao gênero <i>Orthopoxvirus</i> da família <i>Poxviridae</i> e, variante do vírus <i>vaccinia</i> .	Fonseca et al. (1998)
<u>Cantagalo vírus</u> (<u>CTGV</u>)	1999	RJ	Bovinos e ordenhadores	Isolado em 1999 durante surto de doença exantemática em bovinos e humanos (ordenhadores), de fazendas do município de Cantagalo, estado do Rio de Janeiro. Evidência de escape viral de estirpe de <i>vaccinia</i> usada na campanha contra a varíola humana; Apresenta deleção de 18 nucleotídeos no gene HA	Damaso et al. (2000)
<u>Araçatuba vírus</u> (<u>ARAV</u>)	1999	SP	Bovinos e ordenhadores	Isolado de vacas leiteiras e ordenhadores do município de Araçatuba, Estado de São Paulo. O diagnóstico foi confirmado pela microscopia eletrônica (<i>Orthopoxvirus</i>) e as amostras foram posteriormente caracterizadas, molecularmente, como variante do vírus <i>vaccinia</i> Apresenta deleção de 18 nucleotídeos do gene HA igual ao vírus Cantagalo	Mendes et al. (1999); Trindade et al.(2003)

(Continuação)

Nome do isolado	Ano	Estado	Hospedeiro	Características	Referência
<u>Muriaé virus</u>	2000	MG	Bovinos e ordenhadores	Em 2000 foi isolada nova variante do vírus <i>vaccinia</i> denominado de vírus Muriaé de bovinos e ordenhadores de várias propriedades leiteiras do Estado de Minas Gerais. Este isolado pertence ao grupo do CTGV, ARAV, Passatempo (PSTV). Apresenta deleção de 18 nucleotídeos no gene HA igual ao vírus Cantagalo	Trindade et al. (2007b)
<u>Guarani vírus</u>	2001	MG	Bovinos e ordenhadores	Isolado em 2001, a partir de surto ocorrido na cidade de Guarani, Estado de Minas Gerais. Afetou vacas leiteiras e ordenhadores, inclusive transmissão entre pessoas foi relatado. Identificados dois subtipos: Guarani P1 (GP1V) e Guarani 2 (GP2V) em duas propriedades distantes 10 km entre elas, mostrando que houve variação genética e circulação de diferentes populações do vírus <i>vaccinia</i> no país. * Guarani P1 (GP1V): relacionado com estirpe vacinal VAC-WR e VBH * Guarani P2 (GP2V): relacionado com surtos em bovinos	Trindade et al. (2006)
<u>Passatempo virus (PSTV)</u>	2003	MG	Bovinos e ordenhadores	Detectado na cidade de Passatempo, Estado de Minas Gerais em 2003. Acometeram vacas e ordenhadores com lesões vesiculares, características de outros isolados de <i>vaccinia</i> . Os ordenhadores apresentaram anticorpos contra a cepa WR do vírus <i>vaccinia</i> . - Apresenta deleção de 18 nucleotídeos no gene HA (idem vírus Cantagalo)	Leite et al. (2005)

(Conclusão)

<u>Nome do isolado</u>	<u>Ano</u>	<u>Estado</u>	<u>Hospedeiro</u>	<u>Características</u>	<u>Referência</u>
<u>Belo Horizonte</u> <u>virus (VBH)</u>	?	MG	camundongos	Isolado de camundongos do Instituto de Biociências da Universidade Federal de Minas Gerais. A origem desse surto é desconhecida, mas foi identificado como variante do vírus <i>vaccinia</i> e denominado de vírus Belo Horizonte	Trindade et al. (2004)
<u>Variantes do</u> <u>vírus vaccinia</u> <u>não nominado</u>	2004	MS	humanos	Identificação de uma variante do vírus <i>vaccinia</i> em humanos com sintomas de doença vesicular no Vale do Paraíba, Estado de São Paulo e Vale São Patricio, Estado de Goiás. A análise do sequenciamento mostrou 99,9% de similaridade com o <i>Cantagalo virus</i> ,	Nagasse-Sugahara et al. (2004)
<u>Mariana vírus</u>	2009		Roedores, bovinos e ordenhadores	Isolado o vírus <i>vaccinia</i> em roedores peridomiciliares, ordenhadores e bovinos demonstrando o papel dos roedores como fator de risco para transmissão do vírus.	Abrahão et al., 2009a

Fonte: (OKUDA, 2013)

Fagliari et al. (1999) identificaram a presença de *Poxvirus* em duas propriedades leiteiras, localizadas no município de Aparecida do Tabuado, Mato Grosso do Sul. O resultado da microscopia eletrônica revelou tratar-se de um *Orthopoxvirus* e foi isolado em cultura de células. Schatzmayr et al. (2000) verificaram a ocorrência de *Poxvirus* em quatro ordenhadores de uma propriedade leiteira no município de Piraí, Rio de Janeiro. Quatro meses depois, dez indivíduos que viviam em cidades próximas, Cantagalo e Santo Antônio de Pádua, desenvolveram lesões vesiculares, que foram caracterizadas como *Orthopoxvirus*. Em 2001, um surto de infecção por *Poxvirus* ocorreu na região do Vale do Paraíba, Estado de São Paulo, acometendo bovinos e ordenhadores, o qual foi classificado como *Orthopoxvirus* (PITUCO et al., 2002).

Estes fatos apontam claramente para a existência e ampla disseminação do vírus em áreas rurais e despovoadas do Brasil e que alguns isolados foram caracterizados como *vaccinia*. É difícil determinar se o número de infecções por este vírus tem aumentado recentemente ou se somente agora estão sendo notificadas (TRINDADE et al., 2003).

A origem do vírus *vaccinia* ainda permanece desconhecida e questiona-se a persistência da estirpe vacinal na natureza após tanto tempo após a erradicação da varíola humana. A hipótese mais provável é a de que alguns hospedeiros selvagens, até o presente momento ainda desconhecidos, se tornaram reservatórios e transmitiram a doença para os animais e o homem (TRINDADE et al., 2003; KROON et al., 2011).

Em 2007, estudo filogenético foi realizado entre os diversos isolados de vírus *vaccinia* no Brasil procurando avaliar se existia a possibilidade da origem desses surtos serem por escape vacinal considerando que inicialmente a vacina era trazida nos braços dos escravos e pela falta de biossegurança na produção da vacina no Brasil em bezerros. A análise filogenética demonstrou que existe uma diferença entre os isolados e sua correlação com as estirpes vacinais indicando que possa ter ocorrido uma adaptação do vírus em diferentes reservatórios e ambiente (TRINDADE et al., 2007; DRUMMOND et al., 2008). Os isolados brasileiros estão divididos em dois grupos: grupo I (CTG, ARAV, GP2V e PSTV) e grupo II (SPANv, BeAn virus 58058, GP1V e VBH), sendo este último correlacionado com a estirpe vacinal WR, que derivou a estirpe NY empregada no Brasil na produção da vacina antivariólica (FERNANDES, 1999; TRINDADE et al., 2007). O fato do grupo II ser restrito a isolados em roedores reforça essa espécie animal como reservatório.

No Brasil, os roedores são apontados como possíveis reservatórios do vírus *vaccinia*, uma vez que, já foi detectada a presença desse agente em roedores silvestres da floresta

amazônica e paulista, na década de 60 (LOPES et al., 1965). Experimentalmente, a detecção desse vírus em fezes de camundongos Balb/c, 60 dias após infecção, foi evidenciada por Abrahão et al. (2009a). Considerando que normalmente, nas propriedades há presença de roedores, é importante incluir como medida de biossegurança o controle desses animais. Por outro lado, o papel de mamíferos silvestres como reservatório também não é descartado tendo em vista, que já foram detectados anticorpos anti-OPV em macacos da região amazônica (ABRAHÃO et al., 2010a). Entretanto, desconhece-se o papel de outras espécies domésticas e silvestres que poderiam atuar como reservatórios, garantindo a manutenção do vírus na natureza. Cargnelutti et al. (2012) verificaram a suscetibilidade de cobaias experimentalmente infectadas pelo vírus vaccinia e a eficiência da transmissão da doença. Nenhum dos animais inoculados (via intranasal) apresentou sinais clínicos locais e sistêmicos embora tenham apresentado soroconversão com títulos de anticorpos variando entre 2 a 16 e foi baixa a taxa de excreção viral ($10^{1.8}$ TCID₅₀/mL) não transmitindo à infecção as cobaias sentinelas.

Peres et al. (2013)¹ avaliaram o papel de roedores silvestres (*Olygoryzomys nigripes*, *Oligoryzomys flavescens*, *Akodon montensis*, *Sooretamys angouya*, *Nectomys squamipes*, e *Calomys tener*) bem como marsupiais (*Didelphis albiventris* e *Didelphis aurita*) da região de Botucatu, Estado de São Paulo como reservatórios do vírus vaccinia e concluíram que estas espécies não tinham participação na cadeia de transmissão da doença, porém, não excluíram a possibilidade de outras espécies de roedores silvestres ou peridomésticos e marsupiais atuarem como reservatórios. Os mesmos autores encontraram elevada frequência de cães portadores de anticorpos anti-OPV bem como a fonte de água, sistema de esgoto, presença de morcegos como potenciais fatores de risco envolvidos na transmissão do vírus vaccinia.

Iketani et al. (2002) demonstraram a existência de animais portadores para a pseudovariola bovina, causado pelo *pseudocowpoxvirus*, em linfonodos de vacas experimentalmente e naturalmente infectadas, sem sintomas clínicos. No caso do gênero *Orthopoxvirus*, pesquisa de animais portadores jamais foi estudada, mas tal hipótese não deveria ser descartada, uma vez que casos da doença ainda tem sido diagnosticados na região de Botucatu, Estado de São Paulo (PERES et al., 2013)⁴.

^{1,4} PERES, M. G.; BACCHIEGA, T. S.; APPOLINARIO, C.M.; VICENTE, A.F.; ALLENDORF, S.D.; ANTUNES, J.M.A.P.; MOREIRA, S.A.; LEGATTI, E.; FONSECA, C.R.; PITUCO, E.M.; OKUDA, L.H.; PANTOIA, J.C.F.; FERREIRA, F.; MEGID, J. Serological study of vaccinia virus reservoirs in áreas with and without official reports of outbreaks in cattle and humans in São Paulo, Brazil. *Archives of Virology*, 2013. Dóí: 10.1007/s00705-013-1740-5. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00705-013-1740-5#page-2>>. Acesso em: 1 jul. 2013.

2.4 VIRUS VACCINIA NO DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE DOENÇAS VESICULARES

A produção brasileira de leite vem crescendo a taxas ao redor de 5% ao ano praticamente em todas as regiões do país. A maior região produtora de leite é a Sudeste, que produziu 10,9 bilhões de litros, seguida pela Região Sul com 9,6 bilhões. A Região Norte em torno de 1,7 bilhões de litros enquanto que a Centro-Oeste responde por cerca de 4,4 bilhões de litros e o Nordeste com produção de 4,0 bilhões de litros (ZOCCAL et al., 2011).

Segundo dados da Associação de Leite Brasil (RUBEZ, 2013), as maiores regiões produtoras de leite no estado de São Paulo, em ordem de importância, considerando a produção de 2004, foram: São José do Rio Preto (1.074 mil litros/dia), Vale do Paraíba (556 mil litros/dia), Ribeirão Preto (518 mil litros/dia) e Campinas (502 mil litros/dia).

As propriedades rurais paulistas são responsáveis por 7,7% da renda gerada pelo leite no Brasil. O leite ocupa o quinto lugar em geração de renda na agropecuária paulista, atrás da cana-de-açúcar, carne bovina, laranja e carne de frango (RUBEZ, 2013).

O controle sanitário dos rebanhos e a utilização de animais geneticamente superiores contribuem para uma pecuária mais competitiva, porém ainda existem questões sanitárias que precisam ser revistas e melhoradas. Dentre elas, destacam-se as barreiras sanitárias do mercado internacional de carnes e produtos pecuários. A febre aftosa exemplifica bem esta realidade, pois com o avanço no programa de erradicação tem permitido a abertura de mercados com preço e qualidade competitivos, baseando-se sempre nas normas de comércio internacional de animais e subprodutos, definidas pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE, 2011). Para que o Brasil mantenha a condição sanitária alcançada é necessária uma vigilância epidemiológica consistente das doenças vesiculares visando impedir a entrada em zonas livres. Para tanto, a implementação do diagnóstico diferencial com outras viroses que apresentam a mesma sintomatologia clínica, tal como a varíola bovina é fundamental. A investigação epidemiológica trará significativa contribuição aos programas de sanidade animal (BRASIL, 2009).

A varíola bovina acarreta problemas para o setor produtivo, sendo a cadeia produtiva de leite, a mais afetada (vacas em lactação e bezerros em fase de amamentação). Por se tratar de doença vesicular, as propriedades ficam interditadas até a confirmação do diagnóstico laboratorial sendo vetada a comercialização dos animais e seus produtos. Provoca queda na produção devido à dificuldade em ordenhar e, pelo fato das lesões servirem de porta de

entrada para patógenos, pode levar a quadros de mastite bacteriana secundária, tais como *S. aureus* e *Klebsiella spp.* Por não amamentar os bezerros também ocorre perda de peso. Custos com tratamentos dos animais também são aumentados, além, do risco de transmissão aos seres humanos e afastamento do ordenhador por certo período de tempo (WELLENBERG et al., 2002; BRASIL, 2009). A contaminação do leite pelo vírus *vaccinia* já foi relatada por Abrahão et al. (2009b) mostrando o risco de transmissão pelo leite. Oliveira et al. (2010) demonstraram que mesmo após tratamento térmico a 65°C por 30 minutos, o leite experimentalmente contaminado ainda possuía partículas virais e risco no consumo de requeijão e coalhada.

Casos de varíola bovina são comumente associados a propriedades não tecnificadas, condições precárias de higiene e que não adotam medidas de biossegurança propiciando a manutenção do vírus no ambiente (PERES et al., 2013)³.

A identificação do agente com caracterização molecular é importante para implantar medidas de prevenção e controle visando impedir a disseminação do agente infeccioso para outras áreas, e ainda para avaliação da situação epidemiológica da enfermidade. Considerando a similaridade das lesões causadas pelo vírus *vaccinia* ou *cowpox* com outras doenças tais como, Mamilite Ulcerativa Bovina (Herpesvirus bovino tipo 2), Estomatite Vesicular (*Vesiculovirus*), Pseudovaríola (*Parapoxvirus*), é fundamental realizar o diagnóstico diferencial, empregando uma combinação de provas clássicas e de biologia molecular, para se isolar e caracterizar esses agentes (PITUCO et al., 2002; SIMONETTI, 2007).

2.5 SINAIS CLÍNICOS E DIAGNÓSTICO

Os *Orthopoxvirus* exibem um tropismo para células epiteliais desencadeando as lesões cutâneas, que são caracterizadas inicialmente por máculas, pápulas, vesículas e finalmente pústulas e crosta escuras. O período de incubação varia de 3 a 5 dias (BRASIL, 2009; SCHATZMAYR et al., 2009). As lesões se curam entre 15 a 20 dias, no entanto, no caso de infecções por *Parapoxvirus* pode haver casos reincidentes que duram meses (IKETANI et al., 2002).

³ PERES, M. G.; BACCHIEGA, T.S.; APPOLINARIO, C.M.; VICENTE, A.F.; ALLENDORF, S.D.; ANTUNES, J.M.A.P.; MOREIRA, S.A.; LEGATTI, E.; FONSECA, C.R.; PITUCO, E.M.; OKUDA, L.H.; PANTOIA, J.C.F.; FERREIRA, F.; MEGID, J. Serological study of vaccinia virus reservoirs in áreas with and without official reports of outbreaks in cattle and humans in São Paulo, Brazil. *Archives of Virology*, 2013. Dóí: 10.1007/s00705-013-1740-5. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00705-013-1740-5#page-2>>. Acesso em: 1 jul. 2013.

Nos bezerros as lesões localizam-se principalmente na gengiva e raramente nos lábios e na região do focinho enquanto que nas vacas acometidas, as lesões estão localizadas, principalmente nos tetos (MEDEIROS-SILVA et al., 2010).

Considerando-se que enfermidades vesiculares apresentam sintomas semelhantes, epitélio de lesões ou líquido vesicular e soro devem ser colhidos e encaminhados para realização do diagnóstico laboratorial (BRASIL, 2009).

O sorodiagnóstico pode ser realizado por técnicas de neutralização, imunodifusão em gel de agar, fixação do complemento e ELISA (ACHA; SZYFRES, 2003; INOSHIMA et al., 2000; WHO, 2001; ABRAHÃO et al., 2009a). Embora estes testes sorológicos possam apresentar reações cruzadas entre os vírus da família *Poxviridae*, constituem-se em uma importante metodologia de diagnóstico diferencial com outras doenças vesiculares que apresentam sinais clínicos semelhantes (ESPOSITO; MASSUNG, 1995).

Para o diagnóstico direto podem ser empregadas, técnicas como isolamento em cultivo celular, inoculação em ovos embrionados, microscopia eletrônica (ME) e técnicas moleculares (MEDEIROS-SILVA et al., 2010).

O isolamento viral é realizado utilizando-se material colhido de lesões, que apresenta altos títulos virais, inoculando-se em monocamadas de cultura primária de células de rim bovino ou de linhagens contínuas (BHK, VERO, MDBK), onde pode ser observado o efeito citopático. Outro método de isolamento bastante específico é a inoculação em ovos embrionados, pois permite a identificação do *Orthopoxvirus* na membrana cório-alantóide, caracterizado pelo aparecimento de lesões necróticas pustulares. Os vírus do gênero *Parapoxvirus* não se replicam neste teste diagnóstico (HAHON; FRIEL, 1962; ACHA; SZYFRES, 2003).

Para a identificação do agente são necessárias provas complementares, como a microscopia eletrônica (ME), reação em cadeia pela polimerase (PCR), análise por polimorfismo (RFLP) e seqüenciamento (DAMASO et al., 2007; . ABRAHÃO et al., 2010b).

A ME permite a identificação do agente por gênero pelas suas características morfológicas e moleculares, identificando-os, respectivamente, como *Orthopoxvirus* ou *Parapoxvirus*, entretanto não é possível a diferenciação entre espécies do mesmo gênero, como *vaccinia* e *cowpoxvirus* (SIMONETTI, 2007).

A utilização do microscópio eletrônico empregando técnicas de microscopia eletrônica de transmissão, contrastação negativa, imunomicroscopia eletrônica e imunomarcação com ouro, tornam-se cada vez mais relevantes no diagnóstico veterinário de agentes virais, principalmente no diagnóstico de doenças emergentes (GELDERBLUM; MÄNNEL, 2003).

Com a introdução da contrastação negativa e a disponibilidade dos microscópios eletrônicos, estes se tornaram essenciais na caracterização de novos isolados detectados em amostras clínicas ou em culturas de células. As informações sobre o tamanho e a morfologia das partículas virais, levam à rápida identificação do agente infeccioso (HAZELTON; GELDERBLOM, 2003). A técnica de contrastação negativa é caracterizada como a mais simples e rápida para diagnóstico de vírus em amostras biológicas (DOANE; ANDERSON, 1987), possibilitando ainda detectar diferentes partículas virais em uma amostra, ou seja, revelar infecções mistas, permitir a descoberta de novos vírus, requer pouca quantidade de amostra, além de excluir a possibilidade de obtenção de resultados falso-positivos (ALMEIDA, 1983; FENNER et al., 1992; UEDA et al., 1998). A utilização desta técnica introduzida por Brenner e Horne (1959) permitiu a caracterização viral quanto aos aspectos morfológicos e muitos dados foram obtidos sobre suas propriedades físicas (MURPHY, 1987). A microscopia eletrônica de secções ultrafinas tem fornecido dados complementares em relação à morfologia dos vírions, modo e local de morfogênese (sítio de brotamento, etc). Assim, muitas viroses foram classificadas em famílias e gêneros apropriados após a simples visualização e obtenção de medidas ao microscópio eletrônico (MURPHY, 1987) e esclarecendo questões básicas sobre a estrutura e função (GELDERBLOM; MÂNNEL, 2003).

Métodos biomoleculares, dentre eles a reação em cadeia pela polimerase (PCR) e PCR em tempo real quantitativo vem sendo aceito como teste de eleição para detecção de ácidos nucléicos de diversos agentes e tornou-se método essencial na pesquisa laboratorial devido a sua rapidez, sensibilidade e especificidade (MACKAY; ARDEN; NITSCHKE, 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). Para tanto, regiões conservadas do genoma viral, como os genes codificadores da hemaglutinina (HA), timidina kinase (TK), corpúsculo de inclusão do tipo (ATI) e fator de crescimento do vírus *vaccinia* (VGF) tem sido selecionados. Os genes TK e VGF são genes presentes em todas as espécies de *Poxvirus*, enquanto que os genes HA e ATI são específicos para os *Orthopoxvirus*. O gene codificador da HA (A56R) possui uma peculiaridade entre os vírus *vaccinia* brasileiros, o que os divide em dois grupos: o grupo I possui uma deleção de 6 aminoácidos na posição 251 como o de bovinos (ARAV, CTGV, PSTV, GP2V, MURV, S2V, MARV e P2V) e o grupo II não possui essa deleção (GP1V, BHV, P1V, BAV e SAV), conforme descrito por Damaso et al. (2007). Segundo Moussatché et al. (2008) a aplicação de primers específicos para o gene codificador HA, tornou possível a

diferenciação entre *Orthopoxvirus* originados do Velho e Novo Mundo e, consequentemente, melhor entendimento sobre a evolução de Poxvirus no mundo.

O primeiro teste padrão empregado para diferenciar o vírus *vaccinia* de outros poxvirus foi à análise de restrição de fragmentos de polimorfismo (RFLP) do DNA genômico viral seguido da PCR convencional, análise de PCR-RFLP e PCR em tempo real (ROPP et al., 1995; TRINDADE et al., 2003; OLSON et al., 2004).

Trindade et al. (2003) escolheram a sequência de oligonucleotídeos do gene ATI para caracterizar o vírus Araçatuba (nº de acesso no Genbank: AY523994.1), identificado como uma variante do vírus *vaccinia*. O uso deste gene na PCR convencional permite a identificação e caracterização de diferentes espécies de *Orthopoxvirus*, como *variola*, *cowpox virus*, *vaccinia virus*, *Monkeypox virus*, *ectromelia virus*, *camelpox virus*, *raccoonpox vírus*, no tamanho de fragmento de aproximadamente 900 bp.

Damaso et al. (2007), no Brasil, realizaram um estudo para identificar isolados brasileiros caracterizados como variantes do vírus *vaccinia* baseados na amplificação do gene codificador HA pela PCR convencional. Os autores verificaram que das 43 amostras analisadas pela PCR combinada com RFLP, 41 pertenciam ao gênero *Orthopoxvirus*, denominada estirpe viral Cantagalo. Estes isolados também foram submetidos à PCR para *Parapoxvirus* sendo todos negativos.

A análise de PCR-RFLP, multiplex PCR e PCR em tempo real empregando sondas fluorogênicas vem sendo aplicados no diagnóstico molecular de diversas enfermidades, sendo este último considerado tecnologia de ponta, capaz de detectar o DNA viral no estágio inicial da doença (WHO, 2001).

Desse modo, a implantação de métodos biomoleculares visando à detecção e identificação do agente assume importância cada vez maior. Por outro lado, o uso de técnicas convencionais, como o isolamento viral, permitirá a formação de um “banco de isolados” para futuros estudos e desenvolvimento de vacinas, caso seja necessário.

3 OBJETIVOS

- Estimar a soroprevalência do vírus *vaccinia* em rebanhos bovinos leiteiros do Circuito Sete da Região do Vale do Paraíba, Estado de São Paulo;
- Associar os possíveis fatores de risco envolvidos na transmissão da doença;
- Detectar, isolar e caracterizar, por técnicas convencionais e biomoleculares, amostras de vírus selvagens provenientes de diversas regiões do país, enviadas para o diagnóstico laboratorial ao Laboratório de Viroses dos Bovídeos do Instituto Biológico de São Paulo, no período de 2007 a 2009;
- Avaliar a concordância entre os as técnicas convencionais e biomoleculares: microscopia eletrônica, isolamento viral e hemi nested PCR;
- Sequenciar e analisar filogeneticamente as amostras isoladas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho atendeu os princípios éticos preconizados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão do Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

4.1 SOROPREVALENCIA DO VIRUS VACCINIA (ESTUDO RETROSPECTIVO)

4.1.1 Local de estudo e amostragem

O inquérito soropidemiológico foi realizado no Vale do Paraíba/SP, conforme mapa 1. Os municípios abrangidos foram: São José dos Campos, Pindamonhangaba, São Luiz do Paraitinga, Taubaté, São Bento do Sapucaí, Cunha, Jacareí, Santo Antonio do Pinhal, Redenção da Serra, Paraibuna, Caçapava, Natividade da Serra, Monteiro Lobato, Santa Isabel, Jambeiro, Caraguatatuba, Santa Branca, Igaratá, Mogidas Cruzes, Salesópolis, Guararema, Campos do Jordão, Lorena, Poá e Ferraz de Vasconcelos. A escolha desta região foi em decorrência de vários surtos de doenças vesiculares causadas por *Orthopoxvírus* a partir do ano de 2000.

Foram utilizados soros bovinos colhidos entre outubro a dezembro de 2001, destinados ao inquérito soropidemiológico da brucelose e estocados no Instituto Biológico. Este inquérito foi coordenado pela Coordenadoria de Defesa Agropecuária e o delineamento experimental foi feito de conformidade com as normas do Programa Nacional de Combate e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Foram escolhidas, inicialmente, 150 propriedades, levando-se em conta para a escolha das mesmas os seguintes critérios: diferentes sistemas de produção, práticas de manejo, finalidades de exploração, tamanho dos rebanhos e sistemas de comercialização.

Através das simulações de sensibilidade e especificidade de rebanho, adotado no trabalho de Dias (2004) e utilizando o pacote estatístico EpiInfo 6.04, o estudo amostral foi feito em dois estágios: no primeiro foi sorteado, aleatoriamente, baseada no cadastro de propriedades rurais paulista, o número de propriedades com atividade reprodutiva (unidade primária de amostragem) e no segundo um número de fêmeas com idade igual ou superior a 24 meses (unidades secundárias); a escolha desta categoria animal foi determinada em estudo prévio sobre a infecção por *Brucella abortus*, considerando-se como estimativa de prevalência de propriedade positiva o valor de 20%, erro absoluto de 6% e intervalo de confiança de 95%. Foram sorteadas 76 propriedades. Nas propriedades com até 10 fêmeas com idade superior a 24 meses colheu-se sangue de todas; naquelas com até 100 fêmeas foram amostradas 10 e para aquelas acima de 100 foram amostradas 15. No total foram analisadas 619 amostras de soro.

Mapa 1 – Municípios que compreendem o Circuito 7 do Estado de São Paulo selecionados para o inquérito soropidemiológico de *Orthopoxvirus*

Fonte: adaptado da Secretaria do Meio Ambiente Estado de São Paulo. 29 jun 2013

4.1.2 Questionário Epidemiológico

Para avaliação de possíveis fatores de risco que pudessem estar associados na transmissão da doença, a partir do questionário epidemiológico elaborado e inseridos no programa Microsoft Access® delineados no projeto da brucelose selecionou-se as seguintes informações:

- ✓ tipo de exploração pecuária (corte, leite ou mista);
- ✓ tipo de criação (confinado, semiconfinado e extensivo);
- ✓ número de ordenhas por dia;
- ✓ tipo de ordenha (manual mecânica ao pé, mecânica em sala de ordenha);
- ✓ produção de leite;
- ✓ raça predominante;
- ✓ presença de outras espécies animais na propriedade;
- ✓ existência de silvestres em vida livre na propriedade;
- ✓ aluguel de pasto;
- ✓ pastagem em comum com outras propriedades;
- ✓ fornecimento de leite.

4.1.3 Amostras de soro bovino

As seiscentas e dezenove amostras de soro estocadas no Instituto Biológico em freezer -20°C foram previamente descongeladas, incubadas em banho-maria à temperatura de 56°C durante 30 minutos, para inativação do sistema complemento, para realização da reação de virusneutralização.

4.1.4 Linhagem celular

Cultura de células da linhagem VERO-CCL 81 (rim de macaco verde africano) proveniente do American Type Cell Collection (ATCC) na passagem 120 e mantida através de sucessivos repiques no Laboratório de Viroses de Bovídeos do Instituto Biológico foi utilizada nas provas diagnósticas de virusneutralização, isolamento viral e hemi nested PCR.

Para a multiplicação das células de linhagem VERO CCL-81, foram utilizadas garrafas de poliestireno, área de 75 cm² (Costar®) mantidas com meio mínimo essencial de Eagle modificado/MEM (Cultilab®) acrescidas de 10% de soro fetal bovino/SFB (Cultilab®). A partir de cada garrafa “mãe”, foram semeadas três novas garrafas de igual tamanho. Os repiques foram realizados a cada sete dias, em condições de estrita assepsia, conforme protocolo abaixo discriminado:

- 1- o meio de crescimento da garrafa foi desprezado pelo lado oposto ao da monocamada de células, em frasco esterilizado de boca larga e com gaze de algodão;
- 2- foi realizada a “pré-lavagem” da monocamada com solução tripsina versene 0,25%, previamente aquecida em banho-maria a 37°C seguida de descarte da mesma;
- 3- oito mL da solução tripsina versene 0,25% foi adicionado e após 3 minutos parte desta solução foi desprezada;
- 4- foi observado o descolamento da monocamada, agitando a garrafa;
- 5- dez mL de meio Eagle-MEM, acrescido de 10% de SFB foi adicionado para homogeneizar esta suspensão;
- 6- foi completado o volume para 200 mL com meio de Eagle-MEM, acrescido de 10% de SFB, sendo que o conteúdo foi igualmente distribuído entre as garrafas novas;
- 7- as mesmas foram identificadas e armazenadas em estufa a 37°C para o crescimento celular;
- 8- diariamente foi monitorado o crescimento das células em microscópio óptico invertido, considerando-se o critério de crescimento uniforme, morfologia característica, meio sem turvação e progressiva acidificação.

As células foram contadas em câmara da Neubauer para o ajuste da concentração de células necessário para a titulação viral e virusneutralização (3×10^5 células/mL) e para o isolamento viral em placas de 24 cavidades (2×10^5 células/mL).

4.1.5 Estirpe viral padrão

Foi utilizada como estirpe viral padrão, nas reações de virusneutralização e de PCR, a amostra viral Araçatuba, isolada no Laboratório de Vírozes de Bovídeos do Instituto Biológico de São Paulo, classificada como variante do vírus *vaccinia* e adaptada ao cultivo em monocamadas de cultura de células da linhagem VERO CCL 81 (TRINDADE, 2003).

O estoque da estirpe viral padrão foi preparado em monocamada de células VERO-CCL 81, previamente cultivada em garrafa de poliestireno, área 75 cm² (Costar®), conforme o seguinte protocolo:

- 1- desprezou-se o meio de crescimento de uma monocamada de células VERO-CCL 81, previamente cultivada em garrafa de poliestireno, área 75 cm² (Costar®);
- 2- lavou-se a monocamada com 10 mL de meio Eagle-MEM;
- 3- adicionou-se 3,0 mL da estirpe viral;
- 4- incubou-se em estufa à 37°C com 5% de CO₂ durante uma hora para permitir a adsorção vírus-células;
- 5- decorrido esse período, acrescentou-se 27 mL de meio de Eagle-MEM, contendo 2% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de solução de antibióticos (Anexo 1);
- 6- incubou-se a garrafa nas mesmas condições anteriores;
- 7- após 18 horas de incubação, assim que o efeito citopático atingiu totalmente a monocamada, transferiu-se o conteúdo da garrafa para tubos de centrifugação;
- 8- centrifugou-se a suspensão viral à 2.000 g durante 10 minutos, à temperatura de 4°C;
- 9- distribuiu-se o sobrenadante em alíquotas de 1,0 mL, em tubos criogênicos identificados de acordo com a estirpe viral, linhagem celular e data do envase;
- 10- as alíquotas do vírus padrão foram armazenadas em nitrogênio líquido (-196°C) até sua utilização na reação de virusneutralização e *hemi nested* PCR.

4.1.6 Titulação viral

A titulação da estirpe viral foi realizada para se determinar a dose infectante ($\text{DICT}_{50\%/50\mu\text{L}}$) a ser usada na virusneutralização.

A titulação foi realizada conforme protocolo abaixo:

- 1- em 8 tubos de ensaio, previamente esterilizados, distribuiu-se inicialmente 4,5mL de meio Eagle-MEM e mantidos em banho de gelo;
- 2- retirou-se uma ampola do vírus estocado em nitrogênio líquido, o qual foi descongelado, sob agitação, em banho-maria a 37°C e 0,5 mL foi transferido para o primeiro tubo, correspondendo a diluição 10^{-1} ;
- 3- após homogeneização, 0,5 mL foi transferido para o tubo seguinte (diluição 10^{-2}) e assim sucessivamente (até a diluição 10^{-8});
- 4- na microplaca de 96 cavidades distribuiu-se 50 μL de meio de Eagle-MEM da coluna 1 até 8 e 100 μL de meio de Eagle-MEM nas colunas 10 a 12. A Coluna 9 ficou vazia.
- 5- em seguida 50 μL de cada diluição do vírus (10^{-1} a 10^{-8}) foi transferido para a microplaca, obedecendo à seguinte distribuição: nas oito cavidades da coluna 1 foi adicionado a diluição 10^{-1} ; nas oito cavidades da coluna 2, a diluição 10^{-2} e assim, sucessivamente, até as oito cavidades da coluna 8 (diluição 10^{-8});
- 6- as colunas 10, 11 e 12 foram utilizadas como controle de células;
- 7- acrescentou-se 50 μL de uma suspensão de células VERO-CCL 81, na concentração de 3×10^5 células/mL em todas as cavidades da microplaca e incubou-se em estufa úmida com atmosfera de 5% de CO_2 à temperatura de 37°C por 48 horas;
- 8- decorrido esse período foi realizada a leitura da reação em microscópio óptico invertido, calculando-se o título infeccioso em $\text{DICT}_{50\%/50\mu\text{L}}$ pelo método de Reed e Muench (1938).

4.1.7 Reação de vírus-neutralização (VN)

A pesquisa de anticorpos soroneutralizantes foi realizada segundo Newman et al. (2003), com algumas modificações, conforme quadro 2.

Quadro 2 – Reação de virusneutralização para *Orthopoxvirus*

	Newman et al. (2003)	Modificada
Estirpe viral	VAC-WR	Araçatuba
Concentração viral	40 a 60 PFU	100 DICT _{50%/50µL}
Linhagem celular	BSC-40	VERO

Fonte: modificado de Newman et al. (2003)

As amostras de soro foram diluídas em diluições seriadas em base 2, partindo-se da diluição 1:2 até 1:2048, e testadas em quadruplicata para se determinar o título de anticorpos neutralizantes pela técnica de Reed e Munch (1938). A mistura de soro-virus (100 DICT_{50%/50µL}) foi incubada durante 15 horas em estufa a 37°C contendo 5% CO₂, para melhorar à sensibilidade do teste. Suspensão de células da linhagem VERO CCL 81, na concentração 3 x 10⁵ células/mL foram adicionados após este período e as placas foram novamente incubadas nas mesmas condições anteriores, por 72 horas. A leitura foi realizada em microscópio óptico invertido.

A VN seguiu o protocolo abaixo discriminado:

- 1- considerou-se a coluna 1 como controle de células, onde adicionou-se 100 µL de meio Eagle-MEM;
- 2- a partir da coluna 2 até a coluna 12 adicionou-se 50 µL de meio Eagle-MEM;
- 3- adicionou-se 50 µL de cada soro nas colunas 2 e 3. Estabeleceu-se a coluna 2 como controle de soro e a coluna 3 para se iniciar as diluições seriadas dos soros, a partir da diluição 1:2. Desta maneira, em cada microplaca foram analisadas 02 amostras de soro.
- 4- as amostras de soro da coluna 3 foram homogeneizadas e 50 µL transferidos para a coluna 4 e assim sucessivamente, até a coluna 12, desprezando-se 50 µL da última diluição.
- 5- em seguida 50µL da suspensão viral da estirpe Araçatuba, contendo 100 TCIDT_{50%/50µL} foi adicionado em todas as cavidades, exceto nas colunas 1 e 2, correspondentes aos controles de célula e de soro. Desta forma, a diluição inicial de cada amostra de soro foi de 1:4 e a final 1:2048.
- 6- após a distribuição de soro e vírus, as microplacas foram incubadas em estufa úmida a 37°C com 5% CO₂ para interação antígeno-anticorpo por um período de 15 horas;

- 7- decorrido esse período foi adicionado 50µL da suspensão de células da linhagem VERO CCL81, na concentração 3×10^5 células/mL e as microplacas foram novamente incubadas nas mesmas condições anteriores, por mais 2 dias;
- 8- para cada microplaca utilizada na reação VN, foi utilizada uma microplaca controle, contendo 100 DICT_{50%/50µL} da amostra viral padrão e retrotitulação do mesmo para controle do título viral.
- 9- a leitura das microplacas foi realizada em microscópio óptico invertido.

A prova foi considerada válida quando os controles de células, a ausência de citotoxicidade do soro e o efeito citopático do vírus na placa controle apresentaram os resultados esperados.

Foram consideradas reagentes, as diluições das amostras de soro que apresentaram 100% de neutralização do vírus. O título de anticorpos neutralizantes de cada amostra de soro foi definido como a recíproca da maior diluição, variando de 4 a 2048, que protegeu 100% da monocamada de células frente a 100 DICT_{50%/50µL} do vírus. Os animais foram considerados reagentes quando apresentaram título de anticorpos superior a 4.

4.1.8 Análise estatística

A soroprevalência de OPV foi descrita segundo as características das propriedades. Para comparar as proporções de propriedades com animais infectados foi utilizado o teste qui-quadrado de Pearson ou o teste exato de Fisher, quando as frequências esperadas eram menores que 5 (HOSMER; LEMERSHOW, 1989; ALTMAN, 1991).

Para identificar os fatores associados ao OPV foram ajustados modelos de regressão logística simples (abordagem univariada) e múltipla (abordagem multivariada). Nestes modelos, considerou-se como variável dependente a presença do vírus (pelo menos um animal infectado na propriedade) e como variáveis independentes as características da propriedade. Os resultados foram apresentados em razões de chances (*odds ratio*) e intervalos de confiança de 95%. O nível de significância adotado foi 0,05.

O programa estatístico para efetuar os cálculos foi o SPSS for Windows, versão 19.0.

4.2 DIAGNÓSTICO VIROLÓGICO EM AMOSTRAS SUSPEITAS DE DOENÇA VESICULAR

Duzentos e vinte e sete fragmentos de lesões de animais acometidos por enfermidades vesiculares (epitélio, suabe, líquido de vesícula), com diagnóstico negativo para febre aftosa e estomatite vesicular foram encaminhados ao Laboratório de Vírus de Bovídeos do Instituto Biológico de São Paulo para a realização do diagnóstico diferencial de doenças vesiculares, seguindo o Manual de Atendimento à notificação de suspeita de doença vesicular (BRASIL, 2009). Estes fragmentos foram divididos em três frações, quando a quantidade era suficiente, para as análises por microscopia eletrônica, isolamento viral e PCR.

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) 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 dos testes diagnósticos, as amostras foram descongeladas sob agitação em banho-maria a 37°C, centrifugadas a 2.000 x g por 10 minutos e o sobrenadante recolhido e transferido para novos frascos destinados ao isolamento viral e para a PCR.

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, na concentração de 2×10^5 céls/mL e com 24 horas de crescimento. O meio de crescimento foi retirado, a monocamada lavada, duas a três vezes, com meio MEM e inoculadas com 1 mL da suspensão de epitélio, previamente preparada (item 4.2.2). 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 em microscópio óptico invertido para acompanhamento de efeito citopático durante cinco dias. O resultado foi considerado negativo até três passagens cegas, com intervalo de cinco dias cada. As amostras que apresentaram efeito citopático foram confirmadas por microscopia eletrônica, PCR e RFLP.

4.2.3 Microscopia eletrônica (ME)

Amostras de epitélio (item 4.2.1) e de isolados em cultivo celular (item 4.2.2) foram submetidas à ME para identificação e confirmação do isolamento empregando a técnica de contrastação negativa, segundo HAYAT; MILLER (1990).

Técnica de Contrastação Negativa: As amostras de epitélio foram suspensas em tampão fosfato 0,1M e pH 7,0 e colocadas em contato com grades metálicas, previamente cobertas com filme de colódio e carbono. A seguir as telas foram drenadas com papel filtro, contrastadas negativamente com molibdato de amônio a 2%, pH 5,0 e observadas ao microscópio eletrônico de transmissão Philips EM 208. As amostras isoladas de culturas celulares foram processadas diretamente nas grades metálicas seguindo os demais passos no papel filtro, contrastadas com o molibdato e observadas ao microscópio.

4.2.4 Hemi-nested PCR

A *hemi-nested* PCR para identificação e caracterização de *Orthopoxvirus* foi realizada segundo Damaso et al. (2007).

Como padrão positivo da reação para *Orthopoxvirus* foi utilizado o vírus Araçatuba, caracterizado como vírus vaccinia (TRINDADE et al., 2003). Como controle negativo das reações foi utilizado a linhagem celular VERO CCL 81.

A escolha dos “primers” baseou-se no gene HA que codificam proteínas altamente conservadas de todas as espécies do gênero *Orthopoxvirus* (Quadro 3).

Quadro 3 - Descrição dos primers utilizados nas reações de *hemi-nested* PCR para *Orthopoxvirus*

Gênero	Referencia	Gene Codificador	Primers (orientação)	Sequência	Tamanho do amplicon
<i>Orthopoxvirus</i>	Damaso et al. (2007)	HA (A56R)	EACP1 (sense)	5' ATG ACA CGA TTG CCA ATA C 3'	846pb
			EACP2 (anti-sense)	5' CTA GAC TTT GTT TTC TG 3'	
			HA80 F (sense)	5' TAC GTG GGA AGC GCC TCG CT 3'	

4.2.4.1 Extração do DNA

A extração de DNA das amostras de epitélio e isolados em cultivo celular foi realizada segundo CHOMKZYNSKI (1993), conforme descrição abaixo:

1. adicionou-se 250 µL de amostra (suspensão do epitélio ou isolado de cultivo celular) em um tubo tipo eppendorf.
2. acrescentou-se à preparação anterior 750 µL de Trizol LS (Invitrogen®), pulsou-se por 05 segundos em vortex para lisar de forma eficiente e incubou-se por 05 minutos em temperatura ambiente.
3. adicionou-se à preparação, 200 µL de clorofórmio, homogeneizou-se por inversão e incubou-se por 05 minutos em temperatura ambiente.
4. centrifugou-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 µL de etanol a 100%, homogeneizou-se por inversão e incubou-se por 3 minutos à temperatura ambiente.
6. repetiu-se a etapa 4.
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 a temperatura ambiente por 15 minutos. Durante esse processo, ocasionalmente, homogeneizou-se a mistura por inversão.
9. centrifugou-se, por 5 minutos, 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. repetiram-se as etapas 7 a 10.
12. acrescentou-se 1 mL de etanol 75% e homogeneizou-se por inversão.
13. incubou-se a temperatura ambiente por 15 minutos. Durante esse processo, cuidadosamente, homogeneizou-se a mistura por inversão.
14. repetiu-se a etapa 9.
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. adicionou-se 50 μ L do tampão HEPES para ajustar o pH entre 7 a 8.
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 20° C negativos até a etapa de amplificação.

4.2.4.2 Amplificação do DNA

Para amplificação do DNA viral as amostras extraídas foram preparadas conforme protocolo abaixo:

Para volume total de 25 μ L de reação, a mistura de reagentes para amplificação compreendeu 100 ng do DNA da amostra extraída, 12.5 μ L do tampão do kit comercial PCR Master Mix™ Promega® e 0,5 μ M de cada primer. As amplificações descritas por Damaso et al. (2007) podem ser visualizadas no quadro 4.

Quadro 4 – Ciclo de amplificação da *hemi nested* PCR para *Orthopoxvirus*

Nº de ciclos	Temperatura (°C)	Tempo
1 ciclo	95	05 min
40 ciclos	94	01 min
	48	01 min
	72	01 min
1 ciclo	72	05 min
Hold	4	∞

Fonte: Damaso et al. (2007).

4.2.4.3 Eletroforese em gel de agarose

O produto de cada amplificação foi aplicado em gel de agarose a 1%, preparado em tampão TAE 1X (LGC®) e submetido à eletroforese com uma voltagem constante de 100 V por 1 hora. A presença de *amplicons* foi evidenciada após coloração com brometo de etídio (5µg/mL) 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 esperado foi de aproximadamente de 846 pb.

4.2.4.4 Análise de restrição de polimorfismo (RFLP) do gene HA

Dez microlitros do produto amplificado na PCR usando o par de primers EACP1/EACP2 foram digeridas com enzima de restrição *Taq I* (PROMEGA®) a 37° C por 2 horas, seguindo instruções do fabricante. O produto foi visualizado em gel de agarose a 2% usando tampão Tris-borato-EDTA.

4.2.4.5 Sequenciamento

Para o sequenciamento foram selecionadas 44 amostras positivas do período de 2007 a 2009, correspondendo a pelo menos, um isolado de cada região do país. 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 EACP1 e EACP2 (ROPP et al., 1995).

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 5.

Quadro 5 – 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
Primer (3.2 pmol/µl)	1,5
DNA purificado	4,5
TOTAL	10

Para reação de sequenciamento adotou-se o seguinte ciclo:

Quadro 6 – Ciclo de amplificação da reação de sequenciamento

Nº de ciclos	Temperatura (°C)	Tempo
1 ciclo	95	01 min
35 ciclos	95	30 seg
	50	15 seg
	60	04 min
Hold	4	∞

Em seguida, os produtos foram precipitados pelo método de isopropanol 75%, conforme protocolo abaixo:

1. transferiu-se o volume de 10 µL da reação de sequenciamento de cada amostra para a placa de sequenciamento;

2. adicionou-se 40 μ L de isopropanol a 75% em cada amostra e homogeneizou-se com a pipeta;
3. selou-se a placa com filme adesivo;
4. centrifugou-se a 3.000 x g por 40 minutos;
5. retirou-se o filme adesivo, inverteu-se a placa para descartar o conteúdo;
6. envolveu-se a placa em papel absorvente e centrifugou-se a 3.000 x g. por 90 segundos para retirada do isopropanol residual;
7. adicionou-se 100 μ L de isopropanol a 75% em cada tubo de amostra e em seguida inverteu-se a placa para descartar o conteúdo;
8. repetiu-se a etapa 6;
9. colocou-se a placa em estufa 37°C por 10 minutos para secagem.
10. adicionou-se 10 μ L de formamida HI-DI (Applied Biosystems™) em cada amostra;
11. selou-se a placa com filme adesivo;
12. promoveu-se a desnaturação dos produtos no termociclador a 95°C por 2 minutos.
13. resfriou-se a placa no cooler;
14. procedeu-se o sequenciamento no Sequenciador 3500 XL Genetic Analyzer.

Para avaliar a qualidade das sequencias 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 5.0 (TAMURA et al., 2011).

4.2.4.6 Análise estatística

Para a comparação entre os estados quanto à frequência de resultados positivos foi utilizado o teste Qui quadrado de Pearson.

A concordância entre as provas diagnósticas (microscopia eletrônica, isolamento viral e *hemi nested* PCR) foi avaliada pelo índice *Kappa* (concordância entre dois métodos) e *Kappa* generalizado (concordância entre três métodos), respectivamente, segundo Fleiss (1971) e Fleiss, Levin e Paik (2003).

Os programas estatísticos utilizados foram o SPSS versão 20.0 e o R (função `kappam.fleiss` do pacote IRR).

5 RESULTADOS: INQUÉRITO SORO-EPIDEMIOLÓGICO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS ANIMAIS QUANTO A LOCALIZAÇÃO E CARACTERÍSTICAS DAS PROPRIEDADES

No presente estudo foram analisadas 619 amostras de soro de fêmeas da espécie bovina, com idade superior a 24 meses, colhidas entre outubro e dezembro do ano de 2001, provenientes de 76 propriedades de criação localizadas no circuito 7 da Coordenadoria da Defesa Agropecuária do estado de São Paulo (C.D.A.). Do total de amostras, 527 ($527/619 = 85\%$) pertenciam ao Escritório Regional de Defesa Agropecuária (E.D.A.) de Pindamonhangaba, 50 ($50/619 = 8\%$) ao de Mogi das Cruzes e 42 ($42/619 = 7\%$) ao de Guaratinguetá (Figura 2).

Figura 2 - Frequência de animais analisados, no período de outubro a dezembro de 2001, de acordo com a divisão em Escritórios Regionais de Defesa Agropecuária.

A distribuição dos animais, segundo a localização das propriedades nos E.D.A. da C.D.A. Vale do Paraíba e as principais características de criação estão resumidas na tabela 1.

Tabela 1 - Distribuição dos animais segundo as informações extraídas do questionário epidemiológico para correlação dos fatores de risco para o OPV - São Paulo - 2013

Variáveis	n	%
E.D.A.		
Pindamonhangaba	527	85
Mogi das Cruzes	50	8
Guaratinguetá	42	7
Tipo de exploração zootécnica		
Mista	272	44
Leite	248	40
Corte	99	16
Tipo de criação		
Extensivo	359	58
Semi-confinado	260	42
Tipo de ordenha		
Manual	531	86
Mecânica	40	6
Não ordenha	39	6
Não informado	9	1
Tipo de raça		
Mestiça	481	78
Zebuína	81	13
Européia	40	6
Não informada	17	2
Total de animais analisados na propriedade		
Menos de 10 animais	265	43
10 animais ou mais	354	57
Convive com espécies silvestres em vida livre	163	26
Aluguel de pasto em alguma época do ano	61	10
Pasto comum com outras propriedades	76	12

Nenhuma das propriedades utilizava inseminação artificial e em todas havia criação de, pelo menos, uma outra espécie de animal doméstico.

5.2 Soroprevalência de OPV segundo as características das propriedades

Das 619 amostras de soro analisadas pela reação de virusneutralização, 32,3% (200/619) foram consideradas reagentes por apresentarem títulos de anticorpos anti-*Orthopoxvirus* variando entre 4 a 256 ($4 \leq \text{HA} \leq 256$). Em 58 propriedades ($58/76 = 76\%$) foi detectado pelo menos um animal reagente. O número de animais reagentes por propriedade variou de 1 a 15 (Figura 3), com média de 8 animais (desvio padrão = 3).

Figura 3 - Número de animais analisados para *Orthopoxvirus*

O número de animais reagentes e as características das propriedades estão distribuídos na tabela 2. Foi observada diferença estatisticamente significativa em relação ao E.D.A., com maior ocorrência em Pindamonhangaba; ao tipo de exploração zootécnica, em animais pertencentes às propriedades que exploram apenas animais de corte e entre as propriedades com 10 animais ou mais. Embora não tenha sido significativa para o nível de $p < 0,05$, foram observadas diferenças quanto tipo de criação, tipo de ordenha, raça e convivência com animais silvestres. O maior número de animais reagentes pertenciam às propriedades que praticavam criação em semi-confinamento, nas que utilizavam ordenha manual, nas raças zebuínas e naquelas que responderam afirmativamente que havia contato com animais silvestres de vida livre, sendo as espécies mais relatadas os cervídeos e as capivaras.

Tabela 2 - Frequência de animais reagentes para OPV segundo as características das propriedades - São Paulo - 2013

(Continua)

Variáveis	Reagentes n (%)	p-valor
Escritório de defesa agropecuária		
Pindamonhangaba (n=527)	188 (35,7%)	<0,001
Mogi das Cruzes (n=50)	3 (6,0%)	
Guaratinguetá (n=42)	9 (21,4%)	
Tipo de exploração zootécnica		
Mista (n=272)	87 (32,0%)	<0,001
Leite (n=248)	63 (25,4%)	
Corte (n=99)	50 (50,5%)	
Tipo de criação		
Extensivo (n=359)	112 (31,2%)	0,487
Semi-confinado (n=260)	88 (33,8%)	
Tipo de ordenha*		
Manual (n=531)	168 (31,6%)	0,079
Mecânica (n=40)	8 (20,0%)	
Não ordenha (n=39)	17 (43,6%)	
Tipo de raça**		
Mestiça (n=481)	151 (31,4%)	0,067
Zebuína (n=81)	34 (42,0%)	
Européia (n=40)	9 (22,5%)	
Espécies silvestres em vida livre		
Não (n=456)	157 (34,4%)	0,059
Sim (n=163)	43 (25,4%)	
Aluguel de pasto em alguma época do ano		
Não (n=558)	175 (31,4%)	0,127
Sim (n=61)	25 (41,0%)	

(Conclusão)		
Variáveis	Reagentes	
	n (%)	p-valor
Pasto comum com outras propriedades		
Não (n=543)	177 (32,6%)	0,684
Sim (n=76)	23 (30,3%)	
Total de animais analisados na propriedade		
Menos de 10 (n=265)	92 (34,7%)	0,268
10 ou mais (n=354)	108 (30,5%)	

* 9 animais sem informação sobre o tipo de ordenha da propriedade; ** 17 animais sem informação sobre a raça dos animais da propriedade

5.3 Fatores de risco associados à soropositividade

Os resultados dos modelos de regressão logística (análise univariada e multivariada) são apresentados nas tabelas 3, 4 e 5.

Na univariada, observamos maior probabilidade da presença de vírus em animais de Pindamonhangaba e Guaratinguetá quando comparados aos de Mogi das Cruzes. A probabilidade foi maior, também, em animais de propriedades com gado de corte, em zebuínos (quando comparados aos de raça européia) e em animais não ordenhados (quando comparados àqueles com ordenha mecânica), conforme observado na tabela 3.

Quando analisamos todos os fatores simultaneamente, alguns fatores perdem a importância (no caso o tipo de exploração e ordenha), no entanto outras diferenças aparecem (raça e animais silvestres). Com base no modelo multivariado é possível concluir que há maior probabilidade de contato com o vírus entre os animais de Pindamonhangaba e menor probabilidade de animais da raça européia e entre os que convivem com animais silvestres (tabelas 4 e 5).

Tabela 3 - Prevalência de OPV pela análise de regressão univariada - São Paulo - 2013

Variáveis	Odds Ratio	IC 95%	p-valor
Escritório de defesa agropecuária			
Mogi das Cruzes (n=50)	1,00	-	-
Pindamonhangaba (n=527)	8,69	[2,67 ; 28,29]	<0,001
Guaratinguetá (n=42)	4,27	[1,08; 16,99]	0,039
Tipo de exploração zootécnica			
Mista (n=272)	1,00	-	-
Leite (n=248)	0,72	[0,49; 1,06]	0,099
Corte (n=99)	2,17	[1,36; 3,47]	0,001
Tipo de criação			
Extensivo (n=359)	1,00	-	-
Semi-confinado (n=260)	1,13	[0,80; 1,59]	0,487
Tipo de ordenha			
Mecânica (n=40)	1,00	-	-
Manual (n=531)	1,85	[0,34; 4,10]	0,129
Não ordenha (n=39)	3,09	[0,14; 8,41]	0,027
Tipo de raça			
Européia (n=40)	1,00	-	-
Mestiça (n=481)	1,51	[0,70; 3,26]	0,291
Zebuína (n=81)	2,49	[1,05; 5,91]	0,038
Espécies silvestres em vida livre			
Não (n=456)	1,00	-	-
Sim (n=163)	0,68	[0,46; 1,02]	0,060
Aluguel de pasto em alguma época do ano			
Não (n=558)	1,00	-	-
Sim (n=61)	1,52	[0,89; 2,61]	0,129
Pasto comum com outras propriedades			
Não (n=543)	1,00	-	-
Sim (n=76)	0,90	[0,53; 1,51]	0,684
Total de animais analisados na propriedade			
Menos de 10 (n=265)	1,00	-	-
10 ou mais (n=354)	0,83	[0,59; 1,16]	0,268

Tabela 4 - Prevalência de OPV pela análise de regressão multivariada - São Paulo - 2013

Variáveis	Odds Ratio	IC 95%	p-valor
Escritório de defesa agropecuária			
Mogi das Cruzes (n=50)	1,00	-	-
Pindamonhangaba (n=527)	8,28	[2,36 ; 29,02]	0,001
Guaratinguetá (n=42)	3,46	[0,78; 15,26]	0,101
Tipo de exploração zootécnica			
Mista (n=272)	1,00	-	-
Leite (n=248)	0,66	[0,40; 1,096]	0,198
Corte (n=99)	1,59	[0,79; 3,21]	0,106
Tipo de criação			
Extensivo (n=359)	1,00	-	-
Semi-confinado (n=260)	1,50	[0,92; 2,45]	0,108
Tipo de ordenha*			
Mecânica (n=40)	1,00	-	-
Manual (n=531)	0,78	[0,27; 2,22]	0,635
Não ordenha (n=39)	1,54	[0,43; 5,55]	0,510
Tipo de raça**			
Européia (n=40)	1,00	-	-
Mestiça (n=481)	4,14	[1,28; 13,37]	0,017
Zebuína (n=81)	4,36	[1,24; 15,4]	0,022
Espécies silvestres em vida livre			
Não (n=456)	1,00	-	-
Sim (n=163)	0,61	[0,37; 0,99]	0,047
Aluguel de pasto em alguma época do ano			
Não (n=558)	1,00	-	-
Sim (n=61)	1,03	[0,57; 1,89]	0,918
Pasto comum com outras propriedades			
Não (n=543)	1,00	-	-
Sim (n=76)	0,68	[0,39; 1,19]	0,177
Total de animais analisados na propriedade			
Menos de 10 (n=265)	1,00	-	-
10 ou mais (n=354)	0,95	[0,64; 1,42]	0,818

Tabela 5 - Prevalência de OPV pelas análises de regressão univariada e multivariada - São Paulo - 2013

Variáveis	Univariada			Multivariada		
	OR	IC 95%	p-valor	OR	IC 95%	p-valor
EDA						
Pindamonhangaba/Mogi das Cruzes	8,69	[2,67 ; 28,29]	<0,001	8,28	[2,36 ; 29,02]	0,001
Guaratinguetá /Mogi das Cruzes	4,27	[1,08; 16,99]	0,039	3,46	[0,78; 15,26]	0,101
Tipo de exploração						
Leite /Mista	0,72	[0,49; 1,06]	0,099	0,66	[0,40; 1,096]	0,198
Corte /Mista	2,17	[1,36; 3,47]	0,001	1,59	[0,79; 3,21]	0,106
Tipo de criação						
Semi-confinado/ Extensivo	1,13	[0,80; 1,59]	0,487	1,50	[0,92; 2,45]	0,108
Tipo de ordenha						
Manual /Mecânica	1,85	[0,34; 4,10]	0,129	0,78	[0,27; 2,22]	0,635
Não ordenha /Mecânica	3,09	[0,14; 8,41]	0,027	1,54	[0,43; 5,55]	0,510
Tipo de raça						
Mestiça / Européia	1,51	[0,70; 3,26]	0,291	4,14	[1,28; 13,37]	0,017
Zebuína / Européia	2,49	[1,05; 5,91]	0,038	4,36	[1,24; 15,4]	0,022
Espécies silvestres em vida livre	0,68	[0,46; 1,02]	0,060	0,61	[0,37; 0,99]	0,047
Aluguel de pasto em alguma época do ano	1,52	[0,89; 2,61]	0,129	1,03	[0,57; 1,89]	0,918
Pasto comum com outras propriedades	0,90	[0,53; 1,51]	0,684	0,68	[0,39; 1,19]	0,177
10 ou mais analisados na propriedade	0,83	[0,59; 1,16]	0,268	0,95	[0,64; 1,42]	0,818

5.4 DISCUSSÃO: INQUÉRITO SOROEPIDEMIOLÓGICO

A ocorrência de surtos de doença exantemática em bovinos e humanos foi relatada no Estado de São Paulo desde os anos 1950 sempre relacionando a doença em bovinos após a vacinação de ordenhadores contra o *smallpox* (MELLO; QUEIROZ; TOMANIK, 1960).

A região do circuito 7 que compreende os escritórios regionais de Pindamonhangaba, Guaratinguetá e Mogi das Cruzes destaca-se por intensa e diversificada atividade econômica sendo que Guaratinguetá e Pindamonhangaba respondem pelo 2º maior polo produtor de leite bovino do estado de São Paulo (SÃO PAULO, 2012), com predomínio de explorações mista e leite, conforme já relatado por Dias (2004). Este circuito está estrategicamente situado entre os Estados do Rio de Janeiro e Minas Gerais que já relataram a presença do vírus *vaccinia* em rebanhos leiteiros desde a década de 1990 (LOBATO et al., 2002; TRINDADE et al., 2003; DAMASO et al., 2007).

No presente circuito foi descrito no ano de 2001, em meados de julho a setembro, a detecção de *Orthopoxvirus* em rebanhos leiteiros e ordenhadores (PITUCO et al., 2002), o que corrobora com a frequência de anticorpos encontrados nas amostras de soro de fêmeas bovinas analisadas no presente estudo, cuja colheita ocorreu entre outubro a dezembro do mesmo ano. A persistência de anticorpos para os vírus do gênero *Orthopoxvirus* é duradoura e mesmo em rebanhos sadios foi possível encontrar animais reagentes (MADUREIRA, 2009), que ainda observou maior título de anticorpos em animais cujas lesões se encontravam em fase de cicatrização, em comparação com aqueles que estavam na fase de vesícula e úlcera.

A prevalência de animais sororeagentes para o OPV foi de 32,3% (200/619) e o EDA de Pindamonhangaba apresentou maior número de propriedades positivas bem como maior frequência de animais soropositivos. Peres et al. (2013)⁴ encontraram frequência de 15,3% (105/668) de vacas criadas na região de Botucatu, estado de São Paulo.

Os resultados comprovam que os animais reagentes foram expostos ao vírus *vaccinia* em algum momento, uma vez que, no questionário epidemiológico não constava a informação de doença vesicular na propriedade e nem relato de acometimento em humanos.

⁴ PERES, M. G.; BACCHIEGA, T.S.; APPOLINARIO, C.M.; VICENTE, A.F.; ALLENDORF, S.D.; ANTUNES, J.M.A.P.; MOREIRA, S.A.; LEGATTI, E.; FONSECA, C.R.; PITUCO, E.M.; OKUDA, L.H.; PANTOIA, J.C.F.; FERREIRA, F.; MEGID, J. Serological study of vaccinia virus reservoirs in áreas with and without official reports of outbreaks in cattle and humans in São Paulo, Brazil. *Archives of Virology*, 2013. Dó: 10.1007/s00705-013-1740-5. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00705-013-1740-5#page-2>>. Acesso em: 1 jul. 2013.

As tabelas 3 e 4 mostraram associação positiva com o gado zebuino, no entanto, o questionário não indica a raça, desta forma, pode se tratar de bovinos de corte com dupla aptidão, uma vez, que os animais pertencem a uma importante bacia leiteira.

A transmissão de OPV é por contato direto, desta forma animais estabulados poderiam ser fatores de risco, no entanto, não houve associação positiva entre rebanhos semi-intensivos e nem com o tipo de ordenha, principalmente a manual. Peres et al. (2013)⁵ também não encontraram significado estatístico nos rebanhos avaliados para o tipo de ordenha. As variáveis, aluguel de pasto e pasto comum entre propriedades não foram assinaladas como práticas comuns das propriedades estudadas e, portanto, não determinantes para a introdução e transmissão do vírus *vaccinia* nos rebanhos. Das 76 propriedades estudadas, 76,31% (58/76 = 76,31%) apresentaram pelo menos um animal reagente à infecção por OPV, demonstrando ampla difusão do vírus na região.

Os roedores sempre foram apontados como possíveis reservatórios para o vírus *vaccinia*, desde a década de 1950, uma vez que foram detectados anticorpos em roedores em arrozais (LOPES et al., 1965), entretanto, somente após a confirmação de casos de *Orthopoxvirus* em bovinos e humanos na década de 1990, é que voltou-se a considerar o papel dos roedores na transmissão do vírus *vaccinia*. Abrahão et al. (2009a) verificaram, experimentalmente, que camundongos Balb/c eliminaram este agente pelas fezes, por até 60 dias após infecção. Considerando-se que a presença de roedores nas propriedades rurais é bastante comum, o controle desses animais é fundamental para garantir a biossegurança. Almeida-Silva (2012) encontraram na cidade de São Paulo, dez roedores portadores de anticorpos para OPV pela técnica de VN, porém nenhum foi positivo no diagnóstico direto (isolamento em cultivo celular e PCR) indicando exposição prévia à esse agente. Peres et al. (2013)⁹ avaliaram a participação de roedores silvestres na transmissão do vírus porém não houve associação positiva entre animais reagentes e silvestres.

O presente trabalho encontrou associação positiva para OPV nas propriedades que relataram a presença de animais silvestres, como cervídeos, capivaras e outros, sendo descrito maior frequência de capivaras. Este resultado é o primeiro a encontrar associação de outras

^{5,9} PERES, M. G.; BACCHIEGA, T. S.; APPOLINARIO, C.M.; VICENTE, A.F.; ALLENDORF, S.D.; ANTUNES, J.M.A.P.; MOREIRA, S.A.; LEGATTI, E.; FONSECA, C.R.; PITUCO, E.M.; OKUDA, L.H.; PANTOIA, J.C.F.; FERREIRA, F.; MEGID, J. Serological study of vaccinia virus reservoirs in áreas with and without official reports of outbreaks in cattle and humans in São Paulo, Brazil. **Archives of Virology**, 2013. doi: 10.1007/s00705-013-1740-5. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00705-013-1740-5#page-2>>. Acesso em: 1 jul. 2013.

espécies silvestres como fator de risco para o vírus *vaccinia* e sugere novas pesquisas para se avaliar o papel destas espécies na cadeia epidemiológica deste agente.

6 RESULTADOS: DIAGNÓSTICO DIRETO DE ORTHOPOXVIRUS

6.1 CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANALISADAS

Das 227 amostras recebidas no Laboratório de Viroses de Bovídeos do Instituto Biológico, 38 ($38/227 = 16,7\%$) foram analisadas em 2007, 87 ($87/227 = 38,3\%$) em 2008 e 102 ($102/227 = 44,9\%$) em 2009, conforme figura 4.

Figura 4 - Número de amostras com suspeita de doença vesicular recebidas no Lab. Viroses de Bovídeos, por ano

As amostras suspeitas de doença vesicular foram oriundas de propriedades localizadas em 59 municípios de 12 estados brasileiros (Tabela 6 e Figura 5). Os municípios que enviaram maior número de amostras foram: 11% ($25/227 = 11\%$) de Botucatu-SP, 10% ($23/227 = 10\%$) de Ji-Paraná-RO e 6% ($13/227 = 6\%$) de Araputanga-MT (Tabela 6); com relação ao estado federativo, Minas Gerais foi o que enviou maior número de amostras ($68/227 = 30\%$), seguido por São Paulo ($50/227 = 22\%$) (Figura 6).

Tabela 6 - Número de amostras recebidas para o diagnóstico diferencial de doenças vesiculares, segundo município e Estado - São Paulo – 2013

(Continua)

Município	Estado	n	%	Município	Estado	n	%	Município	Estado	n	%
Botucatu	SP	25	11,0	Açailândia	MA	4	1,82	Vale do São Domingos	MT	3	1,3
Ji-Paraná	RO	23	10,1	Doresópolis	MG	4	1,82	Vitória da Conquista	BA	3	1,3
Araputanga	MT	13	5,76	Gov. Edson Lobão	MA	4	1,82	Bacabal	MA	2	0,9
Cacoal	RO	10	4,4	Itanhaem	BA	4	1,82	Gonçalves	MG	2	0,9
Paraisópolis	MG	7	3,1	João Lisboa	MA	4	1,82	Grupiara	MG	2	0,9
Barnach	PA	6	2,63	Nova independência	SP	4	1,82	Guaratinguetá	SP	2	0,9
Sapucaí Mirim	MG	6	2,63	Porteirinha	MG	4	1,82	Nerópolis	GO	2	0,9
Andradas	MG	5	2,2	Vitorino Freire	MA	4	1,82	Piumbi	MG	2	0,9
Coromandel	MG	5	2,2	Areado	MG	3	1,3	Santo Antonio do Pinhal	SP	4	1,8
João Pinheiro	MG	5	2,2	Bom Jesus das Selvas	MA	3	1,3	São Bento do Sapucaí	SP	2	0,9
Matias Barbosa	MG	5	2,2	Cunha	SP	3	1,3	V. Bela da Santíssima Trindade	MS	2	0,9
Paraguaçu	MG	5	2,2	Jauru	MT	3	1,3	Vale de São Domingos	MT	2	0,9

(Conclusão)

Município	Estado	n	%	Município	Estado	n	%	Município	Estado	n	%
Recife	PE	5	2,2	Nhandeara	SP	3	1,3	Colatina	ES	1	0,4
Serro	MG	5	2,2	Ivaporã	PR	1	0,4	Passos	MG	1	0,4
Tapira	MG	5	2,2	Lagoa Formosa	MG	1	0,4	Patos de Minas	MG	1	0,4
Santo Afonso	MT	3	1,3	Moipora	GO	1	0,4	Ponte e Lacerda	MT	1	0,4
Sebastianópolis do Sul	SP	3	1,3	Monteiro Lobato	SP	1	0,4				
Amaporã	PR	1	0,4	Não informado	SP	1	0,4				
Avaré	SP	1	0,4	Olho D'Agua Cunhãs	MA	1	0,4				
Caem	BA	1	0,4	Ourlândia do Norte	PA	1	0,4				

Figura 5 - Distribuição das amostras segundo Estado de origem - São Paulo - 2013

Figura 6 - Amostras recebidas no Laboratório de Vírus de Bovideos, segundo ano e estado de origem

A tabela 7 apresenta a caracterização das amostras em relação às variáveis estudadas. A coluna descrita porcentagem de casos válidos excluiu-se o campo “não informado”.

Observou-se que em relação ao tipo de amostra, 91% era de epitélio (206/227 = 90,7%).

Quanto à caracterização das propriedades: 38% (86/227 = 38%) era de exploração leiteira, 59,5% (135/227 = 59,5%) eram provenientes de propriedades não tecnificadas; 56,4% (128/227 = 56,4%) responderam que era a principal atividade da propriedade e 44,1% (100/227 = 44,1%) criavam outras espécies animais.

Em relação à notificação dos casos de doença vesicular observou-se que 31,7% (72/227 = 31,7%) não informaram seguidos de 27,3% (62/227 = 27,3%) que partiram do proprietário, 26,4% (60/227 = 26,4%) do Serviço Oficial de Defesa do Estado e 14,5% (33/227 = 14,5%) de terceiros.

Tabela 7 - Caracterização das amostras e informações quanto ao manejo zootécnico das propriedades - São Paulo – 2013

(continua)			
Variáveis	n	% em relação ao total	% dos casos válidos
Tipo de amostra			
Epitélio	206	91	91
Suabe	10	4	4
Vesícula	6	3	3
Isolado cultivo celular	5	2	2
Tipo de exploração zootécnica			
Leite	86	38	56
Mista	67	30	44
Não informado	74	33	
Propriedade tecnificada			
Sim	17	7	11
Não	135	59	89
Não informado	75	33	
Quem notificou a propriedade			
Proprietário	62	27	40
Vigilância	60	26	39
Terceiro	33	14	21
Não informado	72	32	

			(conclusão)
É a principal atividade da propriedade?			
Sim	128	56	86
Não	20	9	13
Não informado	79	35	
Cria outras espécies animais?			
Sim	100	44	65
Não	55	24	35
Não informado	72	32	

Das propriedades que responderam sobre a possível origem da doença, 52 (52/28,7%) eram de origem desconhecida. Em 46 (25,4%) a doença pode ter sido trazida por pessoas (veterinários ou empregados) e em 24 (13,2%) a doença veio de propriedades vizinhas. Outras variáveis como estrada, presença de animais silvestres, introdução de novos animais, veículos, água e pasto comum foram pontuados como possíveis causas da doença na propriedade, conforme demonstrado na figura 7.

Figura 7 - Variáveis relacionadas à possível origem da doença na propriedade

Detalhamento por tipo de amostra, localidade e características das propriedades estão apresentados no apêndice B.

6.2 Detecção de OPV pelas técnicas convencionais e moleculares

As 227 amostras suspeitas para *Orthopoxvirus* foram confirmadas em pelo menos uma das técnicas. Detalhamento por tipo de amostra e resultados pelas três técnicas estão apresentados no apêndice C.

Em todos os formulários de notificação de doença vesicular (FORM-IN) encaminhados juntos com as amostras, os veterinários relataram lesões cutâneas no teto das vacas ou na região do focinho em bezerros bem como ordenhadores acometidos.

Tabela 8 - Detecção de OPV pelas técnicas convencionais e moleculares segundo as técnicas diagnósticas: ME, isolamento viral e hemi nested PCR - São Paulo - 2013

Tipo de técnica	n	%
Microscopia eletrônica		
Negativo	26	11
<i>Orthopoxvirus</i>	85	37
insuficiente	116	51
Isolamento viral		
Negativo	38	17
Positivo	61	27
insuficiente	116	51
contaminação bacteriana	12	5
Hemi nested PCR		
Negativo	83	37
<i>Orthopoxvirus</i>	144	63

Das 227 amostras recebidas somente 111 foram submetidas a microscopia eletrônica das quais 37,4% (85/227) foram positivas para o gênero *Orthopoxvirus*, conforme demonstrado na tabela 8. Foram observadas partículas virais de forma típica de “ladrilho” e disposição irregular dos túbulos, medindo entre 250 x 300 nm de diâmetro (Figura 8).

Figura 8 - Foto de um isolado de *Orthopoxvirus*: a partícula da esquerda mostra a distribuição irregular dos túbulos e da direita mostra o envelope viral

Fonte: Laboratório de Microscopia eletrônica, Instituto Biológico (2012)

Das 227 amostras submetidas ao isolamento viral em linhagem de células VERO CCL-81, 27% ($61/227 = 27\%$) apresentaram efeito citopático característico de *Orthopoxvirus*: células com alterações citoplasmáticas e formação de sincícios (figura 9).

Figura 9 – Foto de isolamento de *Poxvirus* em cultivo celular. A: Controle de células da linhagem VERO CCL-81. B: efeito citopático característico de *Orthopoxvirus*: alterações citoplasmáticas (setas pretas) e formações sinciciais

Fonte: Laboratório de Virose de Bovídeos – Instituto Biológico (2010)

Há que se considerar que das 227 amostras submetidas ao isolamento viral, 99 foram consideradas para análise, uma vez que 116 não tinham material suficiente e 12 foram eliminadas por conta da contaminação bacteriana. Nas amostras que apresentaram efeito citopático

característico, a confirmação do resultado foi realizada por microscopia eletrônica e *hemi-nested PCR*.

Das 227 amostras submetidas a *hemi-nested PCR*, 63,4% ($144/227 = 63,4\%$) foram positivas para o vírus *vaccinia*, com visualização de uma banda na altura aproximada de 846 bp, conforme demonstrado na figura 10. As amostras positivas foram então submetidas a análise por RFLP.

A digestão dos isolados amplificados com os primers EACP1 e EACP2 do gene HA usando a enzima *TaqI* produziu padrões distintos gerando 3 fragmentos de, aproximadamente 451, 295 e 105 pb (Figura 11).

Figura 10 - Detecção de *Orthopoxvirus* em amostras de epitélio pela PCR

Fonte: Laboratório de Virose de Bovideos – Instituto Biológico (2011)
 Legenda: Linhas 1 a 12 e 15: amostras isoladas; Linha 13: controle positivo; Linha 14: controle negativo

Ao correlacionar os resultados da microscopia eletrônica, isolamento positivo de *Orthopoxvirus*, *hemi nested PCR* com a RFLP permite inferir que os isolados do presente estudo estão relacionados com os vírus *vaccinia* brasileiros.

Figura 11 - Resultado da RFLP das amostras de epitélio positivas para *Orthopoxvirus* pela *hemi nested* PCR

Fonte: Laboratório de Vírus de Bovideos – Instituto Biológico (2013)

Legenda: M = marcador de 100bp. Linhas 1 a 11: amostras digeridas com enzima *Taq I*; Linha 12: controle positivo (Araçatuba).

6.3 Detecção de OPV segundo ano

A tabela 9 mostra a frequência de *Orthopoxvirus* analisadas no período de 2007 a 2009 pelas 3 técnicas diagnósticas. Observou-se que em 2007 todas as amostras recebidas foram analisadas pelas 3 técnicas, no entanto, em 2008 e 2009, somente pela *hemi nested* PCR todas as amostras foram analisadas.

Tabela 9 - Frequência de *Orthopoxvirus* utilizando as três técnicas diagnósticas segundo o ano - São Paulo - 2013

Tipo de técnica	Ano					
	2007 (n=38)		2008 (n=87)		2009 (n=102)	
	n	%	n	%	n	%
Microscopia eletrônica						
Negativo	20	53%	1	1%	5	5%
<i>Orthopoxvirus</i>	18	47%	10	12%	57	56%
Insuficiente	-		76	87%	40	39%
Isolamento viral						
Negativo	11	29%	6	7%	21	21%
Positivo	15	39%	16	18%	30	29%
Insuficiente	12	32%	64	74%	40	39%
Contam.bacteriana	-		1	1%	11	11%
PCR						
Negativo	19	50%	27	31%	37	36%
<i>Orthopoxvirus</i>	19	50%	60	69%	65	64%

6.4 Detecção do vírus segundo o estado de origem

Na tabela 10 verifica-se que no estado de Minas Gerais, apenas 14 amostras foram analisadas por ME e 13 amostras foram analisadas por isolamento viral, ao passo que o estado de São Paulo e Outros, a frequência de amostras recebidas foi maior

. Segundo a técnica PCR na qual todas as amostras foram analisadas, não houve diferença estatisticamente significantes entre os estados ($p=0,441$).

Tabela 10 -Frequência de *Orthopoxvirus* utilizando as técnicas de microscopia eletrônica, isolamento viral e hemi nested PCR segundo estado de origem - São Paulo - 2013

Estado de Origem								
		MG (n=68)		SP (n=50)		Outros (n=109)		
Tipo de técnica								
Microscopia eletrônica	n	%	n	%	n	%	Total	%
Negativo	1	1%	12	24%	13	12%	26	76,6
<i>Orthopoxvirus</i>	13	19%	20	40%	52	48%	85	
Insuficiente	54	79%	18	36%	44	40%		
Isolamento viral								
Negativo	8	11,8%	11	22,0%	19	17,4%	38	61,2%
Positivo	5	7,4%	13	26,0%	43	39,4%	61	
Insuficiente	52	76,5%	24	48,0%	40	36,7%	--	
Contam.bacterian	3	4,4%	2	4,0%	7	6,4%	--	
a								
PCR								
Negativo	21	31%	21	42,0%	41	37,6%	83	63,4%
<i>Orthopoxvirus</i>	47	69%	29	58,0%	68	62,4%	144	

A tabela 11 representa a frequência de amostras consideradas válidas,ou seja, excluindo as amostras insuficientes ou que apresentaram contaminação bacteriana. Observa-se que a ME e Isolamento viral apresentaram maior frequência de positividade em relação à *hemi nested* PCR.

Tabela 11 - Detecção do vírus utilizando as técnicas de microscopia eletrônica, isolamento viral e PCR segundo estado de origem - São Paulo - 2013

Tipo de técnica	Estado de Origem					
	MG		SP		Outros	
	n	%	n	%	n	%
Microscopia eletrônica						
Negativo	1	7,1%	12	37,5%	13	20,0%
Positivo	13	92,9%	20	62,5%	52	80,0%
Total	14	100%	32	100%	65	100%
Isolamento viral						
Negativo	8	61,5%	11	45,8%	19	30,6%
Positivo	5	38,5%	13	54,2%	43	69,4%
Total	13	100%	24	100%	62	100%
PCR						
Negativo	21	30,9%	21	42,0%	41	37,6%
Positivo	47	69,1%	29	58,0%	68	62,4%
Total	68	100%	50	100%	109	100%

6.5 Concordância entre os métodos diagnósticos

Para analisar a concordância entre os métodos foram desconsideradas as amostras com material insuficiente e analisados somente os resultados positivos e negativos para o *Orthopoxvirus*.

Comparação entre ME e Isolamento viral

Das setenta e duas amostras analisadas por ME e Isolamento viral, 68,1% ($49/72 = 68,1\%$) foram positivas pelas duas técnicas, conforme demonstrado no quadro 5. A concordância entre os dois métodos foi moderada (coeficiente Kappa=0,585) e aparentemente não houve tendência de maior positividade para um dos dois métodos.

Quadro 7 - Concordância entre as técnicas ME e isolamento viral

		Isolamento viral		Total
		Negativo	Positivo	
ME	Negativo	12 16,7%	5 6,9%	17 23,6%
	Positivo	6 8,3%	49 68,1%	55 76,4%
Total		18 25,0%	54 75,0%	72 100,0%

Comparação entre ME e PCR

Das cento e onze amostras analisadas por ME e PCR, 64,9% ($72/111 = 64,9\%$) foram positivas para *Orthopoxvirus*, conforme demonstrado no quadro 6. A concordância foi moderada (coeficiente Kappa=0,672) e aparentemente a ME tende a dar mais resultados positivos do que o PCR (discordâncias em azul).

Quadro 8 - Concordância entre as técnicas ME e hemi nested PCR

		PCR		Total
		Negativo	Positivo	
ME	Negativo	24 21,6%	2 1,8%	26 23,4%
	Positivo	13 11,7%	72 64,9%	85 76,6%
Total		37 33,3%	74 66,7%	111 100,0%

Comparação entre Isolamento viral e PCR

Noventa e nove amostras foram analisadas por isolamento viral e PCR sendo encontrados 51,5% ($51/99 = 51,5\%$) para ambas as técnicas, conforme demonstrado no quadro 7. A concordância foi boa (coeficiente Kappa=0,754). Assim como a ME, a técnica de isolamento viral tende a dar mais resultados positivos do que a PCR.

Quadro 9 - Concordância entre as técnicas Isolamento viral e hemi nested PCR

		PCR		Total
		Negativo	Positivo	
Isolamento	Negativo	36 36,4%	2 2,0%	38 38,4%
	Positivo	10 10,1%	51 51,5%	61 61,6%
Total		46 46,5%	53 53,5%	99 100%

Apenas 72 amostras (31,7%) foram analisadas pelos 3 métodos. De um modo geral a concordância entre os testes foi moderada (coeficiente **Kappa generalizado=0,657**).

6.6 Análise do sequenciamento

Para o sequenciamento foram selecionadas 44 amostras representando pelo menos um Estado, conforme tabela 12.

Tabela 12 – Amostras positivas de OPV pela PCR e RFLP submetidas ao sequenciamento e confirmadas como *vaccinia*, segundo a localidade - São Paulo - 2013

(Continuação)

ORDEM	AMOSTRA	LOCALIDADE	ORDEM	AMOSTRA	LOCALIDADE
1	Pag ₀₇ 314	Botucatu – SP	23	Pag ₀₈ 92	Vale de São Domingos – MT
2	Pag ₀₇ 336	Nerópolis - GO	24	Pag ₀₈ 105	Serro – MG
3	Pag ₀₇ 337	Barnach –PA	25	Pag ₀₈ 110	Sebastianópolis do Sul – SP
4	Pag ₀₇ 398	Botucatu –SP	26	Pag ₀₈ 112	Redenção da Serra – SP
5	Pag ₀₇ 400	Botucatu –SP	27	Pag ₀₈ 113	Jauru – MT
6	Pag ₀₇ 424	Recife - PE	28	Pag ₀₈ 125	São Bento do Sapucaí - SP
7	Pag ₀₈ 19	Caem- BA	29	Pag ₀₈ 130	Itanhaem - BA
8	Pag ₀₈ 20	Ivaporã – PR	30	Pag ₀₈ 132	Monteiro Lobato - SP
9	Pag ₀₈ 22	Cunha - SP	31	Pag ₀₉ 02	Guaratinguetá - SP
10	Pag ₀₈ 27	V. B. Santíssima Trindade - MS	32	Pag ₀₉ 03	Pontes e Lacerda - MT
11	Pag ₀₈ 29	Guaratinguetá - SP	33	Pag ₀₉ 15	Andradas - MG
12	Pag ₀₈ 31	Paraguaçu – MG	34	Pag ₀₉ 21	Bacabal - MA
13	Pag ₀₈ 42	Coromandel - MG	35	Pag ₀₉ 27	Nhandeara - SP

(Conclusão)

ORDEM	AMOSTRA	LOCALIDADE	ORDEM	AMOSTRA	LOCALIDADE
14	Pag ₀₈ 47	Jauru - MT	36	Pag ₀₉ 36	João Lisboa - MA
15	Pag ₀₈ 55	Araputanga – MT	37	Pag ₀₉ 38	Amaporã – PR
16	Pag ₀₈ 62	Paraisópolis – MG	38	Pag ₀₉ 139	Ji-Parana - RO
17	Pag ₀₈ 63	Rio Verde - GO	39	Pag ₀₉ 144	João Lisboa - MA
18	Pag ₀₈ 73	Porteirinha – MG	40	Pag ₀₉ 154	Cacoal - RO
19	Pag ₀₈ 76	Santo Antonio do Pinhal – SP	41	Pag ₀₉ 199	Nova Independencia - SP
20	Pag ₀₈ 78	Itanhaem – BA	42	Pag ₀₉ 214	Areado - MG
21	Pag ₀₈ 85	Açailândia – MA	43	Pag ₀₉ 256	Matias Barbosa - MG
22	Pag ₀₈ 88	Sapucaí Mirim – MG	44	Pag ₀₉ 264	Gov. Edson Lobão - MA

O resultado do sequenciamento, a partir do gene HA revelou alta identidade entre os isolados do presente estudo (99%) com vírus *vaccinia* brasileiros como Araçatuba, Cantagalo, Mariana e Serro depositadas no GenBank (Figura 12). Nenhuma apresentou similaridade com estirpes vacinais padrões, como Lister, Malbran, Duke e IOC.

A análise filogenética foi construída usando o programa MEGA versão 5.0 (TAMURA et al., 2011) conforme demonstrado na figura 12 empregando o método de máxima verossimilhança, com valores de *bootstrap* baseados em 1000 replicatas. Somente valores acima de 50% foram aceitos.

O alinhamento das sequências de HA revela que os isolados do presente estudo apresentam uma deleção de 6 aminoácidos no final da região codificadora do gene (posição 240 a 245), encontrada também em diversas amostras de VACV isoladas durante surtos de no Brasil, como ARAV, CTGV, Serro, GP2 e MURV; mas ausente nas amostras GP1 e VBH. Embora a amostra vacinal IOC apresente esta deleção em HA, outras amostras de VACV utilizadas como vacinas no Brasil, como Malbran e LST-BTT, não a possuem (Figura 13).

Figura 12 - Árvore filogenética baseadas nas sequências nucleotídicas do gene HA

Fonte: Okuda, L.H.

Legenda: As sequências nucleotídicas obtidas no presente estudo foram alinhadas com as sequências de outros OPV disponíveis no GenBank, e utilizadas para a construção das árvores filogenéticas, máxima verossimilhança, com valor de bootstrap de 1000 replicatas (MEGA 5.0). Em destaque (pontos azuis) as amostras de VACV analisadas no presente trabalho, obtidas de diversas regiões do Brasil.

Figura 13 - Percentual de identidade entre OPV, baseado nas sequências de aminoácidos do gene HA

Figura 14 - Percentual de identidade entre OPV, baseado nas sequências nucleotídicas do gene HA.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67
A1523994.1 VACV Aracatuba	ID	100%	100%	100%	100%	95%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	95%	95%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	95%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	99%	100%	100%	99%	100%	100%	94%	92%	92%	92%	83%	96%	96%	95%	88%	95%	30%	29%	40%	40%	40%	32%	25%	
PA607.134 - Botucatu/SP	ID	100%	100%	100%	100%	95%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	95%	95%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	95%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	99%	100%	100%	99%	100%	100%	94%	92%	92%	92%	83%	96%	96%	94%	88%	95%	30%	29%	40%	40%	40%	32%	25%	
PA607.136 - Nerpólis/GO	ID	100%	100%	ID	100%	95%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	95%	95%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	95%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	99%	100%	100%	99%	100%	100%	94%	92%	92%	92%	83%	96%	96%	94%	88%	95%	30%	29%	40%	40%	40%	32%	25%
PA607.337 - Barachi/PA	ID	100%	100%	ID	100%	95%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	95%	95%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	95%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	99%	100%	100%	99%	100%	100%	94%	92%	92%	92%	83%	96%	96%	94%	88%	95%	30%	29%	40%	40%	40%	32%	25%
PA607.386 - Botucatu/SP	95%	95%	100%	100%	ID	95%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	95%	95%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	95%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	99%	100%	100%	99%	100%	100%	94%	92%	92%	92%	83%	96%	96%	94%	88%	95%	30%	29%	40%	40%	40%	32%	25%	
PA607.400 - Botucatu/SP	95%	95%	95%	95%	ID	95%	95%	95%	95%	95%	95%	95%	95%	95%	95%	95%	95%	95%	95%	95%	95%	100%	100%	95%	95%	95%	95%	95%	95%	95%	95%	95%	95%	95%	95%	95%	95%	95%	95%	95%	95%	95%	95%	95%	94%	95%	95%	96%	95%	96%	96%	89%	96%	96%	90%	91%	90%	30%	30%	39%	39%	39%	30%	24%				
PA607.434 - Recife/PE	100%	100%	100%	100%	95%	ID	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	95%	95%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	95%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	99%	100%	100%	99%	100%	100%	94%	92%	92%	92%	83%	96%	96%	94%	88%	95%	30%	29%	40%	40%	40%	32%	25%			
PA608.19 - Camé/BA	100%	100%	100%	100%	95%	ID	ID	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	95%	95%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	95%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	99%	100%	100%	99%	100%	100%	94%	92%	92%	92%	83%	96%	96%	94%	88%	95%	30%	29%	40%	40%	40%	32%	25%			
PA608.20 - Naporá/PR	100%	100%	100%	100%	100%	95%	ID	ID	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	95%	95%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	95%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	99%	100%	100%	99%	100%	100%	94%	92%	92%	92%	83%	96%	96%	94%	88%	95%	30%	29%	40%	40%	40%	32%	25%			
PA608.22 - Cunha/SP	100%	100%	100%	100%	95%	100%	100%	100%	100%	ID	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	95%	95%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	95%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	99%	100%	100%	99%	100%	100%	94%	92%	92%	92%	83%	96%	96%	94%	88%	95%	30%	29%	40%	40%	40%	32%	25%			
PA608.27 - V.B.S.ta Trindade/MS	100%	100%	100%	100%	100%	95%	100%	100%	100%	ID	ID	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	95%	95%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	95%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	99%	100%	100%	99%	100%	100%	94%	92%	92%	92%	83%	96%	96%	94%	88%	95%	30%	29%	40%	40%	40%	32%	25%		
PA608.29 - Guaratinguetá/SP	100%	100%	100%	100%	95%	100%	100%	100%	100%	ID	ID	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	95%	95%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	95%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	99%	100%	100%	99%	100%	100%	94%	92%	92%	92%	83%	96%	96%	94%	88%	95%	30%	29%	40%	40%	40%	32%	25%			
PA608.31 - Paraguaçu/MG	100%	100%	100%	100%	95%	100%	100%	100%	100%	ID	ID	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	95%	95%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	95%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	99%	100%	100%	99%	100%	100%	94%	92%	92%	92%	83%	96%	96%	94%	88%	95%	30%	29%	40%	40%	40%	32%	25%		
PA608.42 - Coronado/MS	100%	100%	100%	100%	95%	100%	100%	100%	100%	ID	ID	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	95%	95%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	95%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	99%	100%	100%	99%	100%	100%	94%	92%	92%	92%	83%	96%	96%	94%	88%	95%	30%	29%	40%	40%	40%	32%	25%		
PA608.47 - Jauru/MT	100%	100%	100%	100%	95%	100%	100%	100%	100%	ID	ID	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	95%	95%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	95%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	99%	100%	100%	99%	100%	100%	94%	92%	92%	92%	83%	96%	96%	94%	88%	95%	30%	29%	40%	40%	40%	32%	25%		
PA608.55 - Anupatanga/MT	100%	100%	100%	100%	95%	100%	100%	100%	100%	ID	ID	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	95%	95%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	95%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	99%	100%	100%	99%	100%	100%	94%	92%	92%	92%	83%	96%	96%	94%	87%	95%	29%	29%	40%	40%	40%	32%	25%			
PA608.62 - Paraisópolis/MG	100%	100%	100%	100%	95%	100%	100%	100%	100%	ID	ID	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	95%	95%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	95%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	99%	100%	100%	99%	100%	100%	94%	92%	92%	92%	83%	96%	96%	94%	88%	95%	30%	29%	40%	40%	40%	32%	25%			
PA608.63 - Rio Verde/GO	100%	100%	100%	100%	95%	100%	100%	100%	100%	ID	ID	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	95%	95%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	95%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	99%	100%	100%	99%	100%	100%	94%	92%	92%	92%	83%	96%	96%	94%	88%	95%	30%	29%	40%	40%	40%	32%	25%			
PA608.73 - Porteirinha/MG	100%	100%	100%	100%	95%	100%	100%	100%	100%	ID	ID	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	95%	95%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	95%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	99%	100%	100%	99%	100%	100%	94%	92%	92%	92%	83%	96%	96%	94%	88%	95%	30%	29%	40%	40%	40%	32%	25%			
PA608.76 - Santo Antônio do Pinhal/SP	95%	95%	95%	95%	95%	100%	95%	95%	95%	95%	95%	95%	95%	95%	95%	95%	95%	95%	95%	95%	100%	ID	100%	95%	95%	95%	95%	95%	95%	95%	95%	95%	95%	95%	95%	95%	95%	95%	95%	95%	95%	95%	95%	95%	94%	95%	95%	96%	95%	96%	96%	89%	96%	96%	90%	91%	90%	30%	30%	39%	39%	39%	30%	24%				
PA608.78 - Itanhém/BA	95%	95%	95%	95%	95%	100%	95%	95%	95%	95%	95%	95%	95%	95%	95%	95%	95%	95%	95%	95%	100%	ID	95%	95%	95%	95%	95%	95%	95%	95%	95%	95%	95%	95%	95%	95%	95%	95%	95%	95%	95%	95%	95%	95%	95%	94%	95%	95%	96%	95%	96%	96%	89%	96%	96%	90%	91%	90%	30%	30%	39%	39%	39%	30%	24%			
PA608.85 - Apalândia/MA	100%	100%	100%	100%	95%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	95%	95%	ID	100%	100%	100%	100%	100%	100%	95%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	99%	100%	100%	99%	100%	100%	94%	92%	92%	92%	83%	96%	96%	94%	87%	95%	29%	29%	40%	40%	40%	32%	25%			
PA608.88 - Sapucaia Mirim/MG	100%	100%	100%	100%	95%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	95%	95%	ID	100%	100%	100%	100%	100%	100%	95%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	99%	100%	100%	99%	100%	100%	94%	92%	92%	92%	83%	96%	96%	94%	88%	95%	30%	29%	40%	40%	40%	32%	25%				

6.7 DISCUSSÃO DO DIAGNÓSTICO DIRETO DE *ORTHOPOXVIRUS*

6.7.1 Comparação entre os métodos diagnósticos

O fato dos *Orthopoxvirus* serem epitéliotrópicos facilita o diagnóstico, uma vez que, há grande quantidade de partículas virais no material (MOUSSATCHÉ; DAMASO; MCFADDEN, 2008). Desta forma, a probabilidade de se identificar o agente envolvido é praticamente garantida.

Para o presente estudo a concordância entre a *hemi nested* PCR, isolamento viral e ME foi boa e moderada, respectivamente, o que reforça a importância da complementação de testes para um diagnóstico conclusivo. Simonetti (2007) também associou as mesmas técnicas diagnósticas para confirmação de amostras suspeitas de doença vesicular oriundas do Estado do Rio de Janeiro.

A microscopia eletrônica é uma metodologia útil para complementar o diagnóstico de doenças vesiculares. Por diferenciar os gêneros *Orthopoxvirus* de *Parapoxvirus* direciona o diagnóstico pois detecta qual o possível agente infeccioso envolvido complementando com os resultados de outros testes diagnósticos.

No presente trabalho, a concordância foi moderada tanto no isolamento viral como na *hemi nested* PCR. Quando comparado com o isolamento viral, a ME identificou 6 casos a mais. Fatores relacionados com a qualidade da amostra, inativação viral, colheita do material em fase de cicatrização podem explicar o resultado negativo do isolamento viral. Por outro lado, a ME detectou 13 amostras a mais que a *hemi nested* PCR indicando que possa ter ocorrido presença de inibidores (Quadro 8). As desvantagens da aplicação da ME para rotina diagnóstica é que necessita de equipamento especializado, infra-estrutura adequada e técnicos capacitados (KROON et al., 2011).

Por outro lado, a concordância entre isolamento viral e *hemi nested* PCR foi boa, o que permite inferir que a aplicação desses dois métodos é recomendada para o diagnóstico de *Orthopoxvirus*. Segundo Blut (2010), o isolamento de *Poxvirus*, em amostras clínicas, é metodologia útil para a epidemiologia molecular ou investigações forenses e comprova a presença do vírus infeccioso. Entretanto, ressalta o risco de contaminação viral entre amostras durante o processamento da técnica, que necessita de pelo menos, 3 passagens seriadas para o

resultado definitivo. No presente estudo, 10 amostras foram positivas em relação à *hemi nested* PCR (Quadro 9), os quais foram retestadas para descartar a possibilidade de contaminação durante o processo de análise. Confirmou-se o resultado do isolamento e quando estas amostras foram submetidas à *hemi nested* PCR, confirmou-se como positivas para *Orthopoxvirus*. Vale destacar que o isolamento do vírus não indica qual o agente infeccioso envolvido, sendo necessária a confirmação por outras técnicas laboratoriais, como a ME e PCR. Outro fator limitante foi à qualidade da amostra, que em alguns casos, veio contaminada por bactérias ou foi colhida na fase de cicatrização, diminuindo a chance de sucesso no isolamento. Desta forma, para um teste de triagem, a *hemi nested* PCR ou ME são os métodos de escolha recomendados, pois se tratando de doença vesicular, necessita de um diagnóstico rápido para tomada de decisões, profilaxia, entre outras.

6.7.2 Análise dos casos de OPV

Os casos diagnosticados de *Orthopoxvirus* nos anos de 2007 a 2009 (Tabela 6) demonstram ampla disseminação do vírus, sendo identificada a presença deste agente em praticamente todas as regiões do país. Observou-se que o encaminhamento de amostras para o diagnóstico diferencial de doenças vesiculares a partir de 2007 foi crescente: 38 amostras ao passo que em 2008 e 2009 houve um salto, respectivamente de 87 e 102, o que indica o comprometimento do Serviço Oficial (26,1%) em monitorar e concluir os casos de doença vesicular nas propriedades acometidas.

Conforme dados obtidos do próprio formulário de encaminhamento de doença vesicular (FORM-IN) verifica-se que a doença foi diagnosticada, principalmente, em propriedades não tecnificadas e de atividade leiteira ou mista, o que corrobora com os descritos na literatura (LOBATO et al., 2002; MEGID et al., 2008; PERES et al., 2013⁷).

A associação de presença de vesículas nos animais e acometimento em humanos já alerta o médico veterinário que possa estar diante de um caso de estomatite vesicular ou poxvirus. Entretanto, não havendo relatos da doença em humanos há necessidade de se investigar outros agentes infecciosos como a mamilite herpética bovina, IBR/IPV, BVD e

⁷ PERES, M. G.; BACCHIEGA, T.S.; APPOLINARIO, C.M.; VICENTE, A.F.; ALLENDORF, S.D.; ANTUNES, J.M.A.P.; MOREIRA, S.A.; LEGATTI, E.; FONSECA, C.R.; PITUCO, E.M.; OKUDA, L.H.; PANTOIA, J.C.F.; FERREIRA, F.; MEGID, J. Serological study of *vaccinia* virus reservoirs in áreas with and without official reports of outbreaks in cattle and humans in Sao Paulo, Brazil. **Archives of Virology**, 2013. Dó: 10.1007/s00705-013-1740-5. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00705-013-1740-5#page-2>>. Acesso em: 1 jul. 2013.

FORM-IN, a criação de outras espécies animais (Tabela 7), nenhuma dessas apresentou doença vesicular, restrito somente aos bovinos.

Quanto a origem da doença nas propriedades: pessoas, propriedades vizinhas, estradas, introdução de novos animais, veículos, água e pasto comum foram apontados como possíveis vias de transmissão (Figura 7), o que mostra a importância da adoção de medidas de biossegurança nas propriedades. Madureira (2009) também verificou que veículos, principalmente o caminhão de leite, a introdução de novos animais podem ter sido determinantes para a entrada do vírus *vaccinia* nas propriedades de Minas Gerais.

As técnicas moleculares utilizadas no presente estudo foram fundamentais para identificação e caracterização dos isolados de *Orthopoxvirus*, a partir das lesões como de isolados de cultivo celular. Os resultados da RFLP revelaram que as amostras positivas para *Orthopoxvirus* pertencem ao vírus *vaccinia*. Ropp et al. (1995) empregaram a *TaqI* com o objetivo de diferenciar as espécies de *Orthopoxvirus* da Europa e da África. Nossos resultados demonstraram que essa é a estirpe circulante causadora de doença exantemática em bovinos e humanos no Brasil, conforme já relatado por outros pesquisadores (DAMASO et al., 2007; TRINDADE et al., 2007; MADUREIRA, 2009; PERES et al., 2013⁸). O sequenciamento das amostras positivas mostrou o perfil de *Orthopoxvirus* no Brasil. A análise do sequenciamento utilizando o gene codificador da HA revelou que todas as amostras caracterizadas como *Orthopoxvirus* (Figura 12) pertencem ao vírus *vaccinia* e que apresentou homologia com o grupo I de *vaccinia* isolados no Brasil, como o MARV, ARAV, PSTV, CTGV, MURV, Serro, GP2V (DAMASO et al. 2007; MOUSSATCHÉ; DAMASO; MCFADDEN, 2008; MADUREIRA, 2009; KROON et al., 2011). O resultado do alinhamento das sequências de aminoácidos dos isolados de *vaccinia* baseada no gene HA revelou diferença com as estirpes vacinais WR, Lister, conforme já identificado por DAMASO et al. (2007). Não houve correlação com os isolados VACV Guarani P1 e Belo Horizonte que estão relacionados ao grupo II de *vaccinia*, isolados de roedores e estirpes vacinais (MOUSSATCHÉ et al., 2008). Nenhuma alteração do vírus foi evidenciado ao longo dos anos, em diferentes regiões demonstrando que é a mesma estirpe que está circulando em bovinos e humanos no Brasil. O resultado do alinhamento das sequências de aminoácidos dos isolados de *vaccinia* baseada no gene HA revelou uma deleção de 6 aminoácidos entre as posições 240 a 245, que os

⁸ PERES, M. G.; BACCHIEGA, T.S.; APPOLINARIO, C.M.; VICENTE, A.F.; ALLENDORF, S.D.; ANTUNES, J.M.A.P.; MOREIRA, S.A.; LEGATTI, E.; FONSECA, C.R.; PITUCO, E.M.; OKUDA, L.H.; PANTOIA, J.C.F.; FERREIRA, F.; MEGID, J. Serological study of vaccinia virus reservoirs in áreas with and without official reports of outbreaks in cattle and humans in São Paulo, Brazil. *Archives of Virology*, 2013. Dó: 10.1007/s00705-013-1740-5. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00705-013-1740-5#page-2>>. Acesso em: 1 jul. 2013.

diferencia das estirpes vacinais de *vaccinia*, que apresentam deleção de 5 aminoácidos, conforme já identificado por DAMASO et al. (2007).

Os resultados moleculares do presente estudo ainda indicam a persistência do vírus no local, já que em Botucatu, estado de São Paulo, este agente têm sido sistematicamente detectado em 2007 e 2008, o que corrobora com os achados por Peres et al. (2013)⁹. Outros pesquisadores também tem encontrado em outras regiões do país, o que reforça a hipótese do vírus estar albergado em outros hospedeiros ou no ambiente (MADUREIRA, 2009; ABRAHÃO et al., 2009a). Por outro lado, a possibilidade do próprio bovino estar atuando como portador do vírus deve ser estudada, já que foi evidenciada a persistência de *Parapoxvirus* em bovinos naturalmente infectados (IKETANI et al., 2002).

⁹ PERES, M. G.; BACCHIEGA, T.S.; APPOLINARIO, C.M.; VICENTE, A.F.; ALLENDORF, S.D.; ANTUNES, J.M.A.P.; MOREIRA, S.A.; LEGATTI, E.; FONSECA, C.R.; PITUCO, E.M.; OKUDA, L.H.; PANTOIA, J.C.F.; FERREIRA, F.; MEGID, J. Serological study of vaccinia virus reservoirs in áreas with and without official reports of outbreaks in cattle and humans in São Paulo, Brazil. **Archives of Virology**, 2013. Dóí: 10.1007/s00705-013-1740-5. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00705-013-1740-5#page-2>>. Acesso em: 1 jul. 2013.

7 CONCLUSÃO

1. A prevalência de *Orthopoxvirus* foi de 32,3% na região do Vale do Paraíba, SP.
2. Os fatores de risco para transmissão de *Orthopoxvirus* foram espécies silvestres de vida livre e raças.
3. A concordância entre os métodos diagnósticos foi moderada indicando que a associação de técnicas é importante para diagnóstico conclusivo de *Orthopoxvirus*.
4. A análise do sequenciamento revelou que o vírus *vaccinia* é a estirpe circulante no país e que pertencem ao grupo I de isolados brasileiros em bovinos.
5. O vírus *vaccinia* encontra-se presente em várias regiões do território nacional.

REFERENCIAS

ABRAHÃO, J. S.; GUEDES, M. I.; TRINDADE, G. S.; FONSECA, F. G.; CAMPOS, R. K.; MOTA, B. F.; LOBATO, Z. I.; SILVA-FERNANDES, A. T.; RODRIGUES, G. O.; LIMA, L. S.; FERREIRA, P. C.; BONJARDIM, C. A.; KROON, E. G. One more piece in the VACV ecological puzzle: could peridomestic rodents be the link between wildlife and bovine vaccinia outbreaks in Brazil? **PLoS One**, v. 19, p. e7428, 2009a.

ABRAHÃO, J. S., OLIVEIRA, T. M., CAMPOS, R.K., MADUREIRA, M.C., KROON, E.G., LOBATO, Z.I.P. Bovine *vaccinia* outbreaks: detection and isolation of *vaccinia* virus in milk samples. **Foodborne Pathogen Diseases**, v. 6, p. 1141–1146, 2009b.

ABRAHÃO, J.S.; SILVA-FERNANDES, A.T.; LIMA, L.S.; CAMPOS, R.K.; GUEDES, M.I.M.C.; COTA, M.M.G.; ASSIS, F.L.; BORGES, I.A.; SOUZA-JUNIOR, M.F.; LOBATO, Z.I.P.; BONJARDIM, C.A.; FERREIRA, P.C.P.; TRINDADE, G.S.; KROON, E.G. *Vaccinia* Virus Infection in Monkeys, Brazilian Amazon. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 6, p. 976-979, 2010a.

ABRAHÃO J.S., DRUMOND, B.P.; TRINDADE, G.S.; SILVA-FERNANDES, A.T., FERREIRA, J.M.S.; ALVES, P.A.; CAMPOS, R.K.; SIQUEIRA, L.; BONJARDIM, C.A.; FERREIRA, P.C.P.; KROON, E.G. Rapid detection of *Orthopoxvirus* by semi-nested PCR directly from clinical specimens: a useful alternative for routine laboratories. **Journal of Medical Virology**, v. 82, n. 4, p. 692-699, 2010b.

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmissibles comunes al hombre y a los animales**. 3. ed. Washington (DC): Organizacion Panamericana de la Salud, 2003. v. 2. (OPAS – Publicación Científica, 580).

ALMEIDA, J.D. Uses and abuses of diagnostic electron microscopy. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 104, p. 147-158, 1983.

ALMEIDA-SILVA, M. J. F. **Agentes causadores de zoonoses isolados em *rattus rattus* capturados em áreas sujeitas a inundação no município de São Paulo**. 2012. 66 f. Dissertação. (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) - Instituto Biológico, São Paulo, 2012.

ALTMAN, D.G. **Practical Statistics for Medical Research**. London: Chapman & Hall, 1991.

BENNETT, M.; CROUCH, A.J.; BEGON, M.; DUFFY, B.; FEORE, S.; GASKELL, R.M.; KELLY, D.F.; MCCracken, C.M.; VICARY, .; BAXBY, D. Cowpox in British voles and mice. **Journal of Comparative Pathology**, v. 116, n. 1, p. 35-44, 1997.

BLUT, A. Orthopox viruses: infections in humans. **Transfusion Medicine Hemotherapy**, v. 37, p. 351–364, 2010.

BOULANGER, D., CROUCH, A.J., BROCHIER, B., BENNETT, M., CLEMENT, M., GASKELL, R.M., BAXBY, D., PASTORET, P.P. Serological survey of *Orthopoxvirus* infection of wild mammals in areas where a recombinant rabies virus is used to vaccinate foxes. **Veterinary Record**, v. 138, n. 11, p. 247-249, 1996.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Plano de ação para febre aftosa. Atendimento à notificação de suspeita de doença vesicular. 1ª edição. / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília: MAPA/SDA/DSA, v. 1, 96 p., 2009. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/>. Acesso em: 01 maio 2013.

BRENNER, S.; HORNE, R. W. A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. **Biochimica Biophysica Acta**, v. 34, p.103, 1959.

BROWN CK, TURNER PC, MOYER RW. Molecular characterization of the vaccinia virus hemagglutinin gene. **Journal of Virology**. v. 65, n. 7, p. 3598–3606, 1991.

CARRASCOSA, J.L. Immunoelectron microscopical studies on viruses. **Electron Microscopy Reviews**, v.1, n. 01, p.1-16, 1988.

CARGNELUTTI, J.F.; WENDLANT; WEIBLEIN; FLORES, E.F. Guinea pigs experimentally infected with vaccinia virus replicate and shed, but do not transmit the virus. **Ciencia Rural**, v. 42, n. 6, p. 1057-1060, 2012.

BULLER, M.L.; PALUMBO, G.J. Poxvirus Pathogenesis. **Microbiology Reviews**, v. 55, n. 01, p. 80-122, 1991.

CARGNELUTTI, J.F.; FLORES, M.M.; TEIXEIRA, F.R.M.; WEIBLEN, R.; FLORES, E. F. An outbreak of *pseudocowpox* in fattening calves in southern Brazil. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 24, n.2, p. 437–441, 2012.

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.

CZERNY, C.P., WAGNER, K., GESSLER, K., MAYR, A., KAADEN, O.R. A monoclonal blocking ELISA for detection of *Orthopoxvirus* antibodies in feline sera. **Veterinary Microbiology**, v. 52, n. 03-04, p. 185-200, 1996.

DAMASO, C.R.A., REIS, S.A., JESUS, D. M., LIMA, P.S.F., MOUSSATCHÉ, N. A PCR based assay for detection of emerging vaccinia like viruses isolated in Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infection Disease**, v. 57, n. 01, p. 39-46, 2007.

DIAS, R. A. **Caracterização Espacial da Brucelose Bovina no Estado de São Paulo**. 2004, 112f. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo. São Paulo, 2004.

DOANE, F.W., ANDERSON, M. **Electron microscopy in diagnostic virology – A practical guide and atlas**. Cambridge University Press, Cambridge, 1987, 178p.

DRUMOND, B.P.; LEITE, J.A.; DA FONSECA, F.G.; BONJARDIM, C.A.; FERREIRA, P.C.P.; KROON E. Brazilian Vaccinia virus strains are genetically divergent and differ from the Lister vaccine strain. **Microbes and Infection**, v. 10, n. 2, p. 185-197, 2008.

ESPOSITO, J.J.; MASSUNG, R. F. Poxviruses infecting humans. In: **Manual of Clinical Microbiology**, 6^a ed., American Society for Microbiology, Washington, D.C, p. 1131-1138, 1995. P.R. Murray, F. Tenover, E.J. Baron, M. A. Pfaller e R. H. Tenover (Eds).

FAGLIARI, J. J.; PASSIPIERI, M.; OKUDA, H. T. F. Relato sobre a ocorrência de pseudovariola bovina em vacas lactentes e ordenhadores no município de Aparecida do Tabuado, MS. **Arquivos Instituto Biológico**, v. 66, p. 128, 1999. Supplement. Trabalho apresentado no III Congresso Brasileiro de Buiatria, 023, 1999.

FENNER, F.; BACHMANN, P. A.; GIBBS, E. P. J.; MURPHY, F. A.; STUDDERT, M. J.; White, D. O. (1992). *Virologia Veterinária Zaragoza*: Ed. Acibia, 364-367, 561-565.

FERNANDES, T. M. Vacina antivariólica: visões da Academia de Medicina no Brasil Imperial. História, Ciências, Saúde . **Manguinhos**, v. 11, n. 1, p. 141-163, 2004.

FERNANDES, T. M. 1999 Vacina antivariólica: ciência, técnica e o poder dos homens (1808-1920). Rio de Janeiro, Editora Fiocruz.

FLEISS, J. L. Measuring nominal scale agreement among many raters. *Psychological Bulletin*, 76, 378-382, 1971.

FLEISS, J.L.; LEVIN, B.; PAIK, M.C. Statistical Methods for Rates and Proportions, 3rd. Edition. New York: John Wiley & Sons, 2003.

FONSECA, F.G.; LANNA, M.C.; CAMPOS, M.A. KITAJIMA, E.W.; PERES, J.N.; GOLGHER, R.R.; FERREIRA, P.C.; KROON, E.G. Morphological and molecular characterization of the poxvirus BeAn 58058. **Archives of Virology**. v. 143, n. 6, p. 1171-1186, 1998.

GELDERBLOM, H.R.; MÄNNEL, A. Diagnostic electron microscopy in infectious diseases: up date 2003. **Microscopy and Microanalysis**, v. 9, suppl.3, p. 432-433, 2003.

HAZELTON, P.R.; GELDERBLOM, H.R. Electron microscopy for rapid diagnosis of emerging infectious agents. **Emerging Infectious Disease.**, v. 9, n. 3, p. 294-303, 2003.

HAYAT, M. A.; MILLER, S. E. **Negative staining**. Mc. Graw-Hill Publ. Company, 1990. 253 p.

HAHON, N.; FRIEL, J. J. Comparative studies of the multiplication of antigenically related poxviruses on the chorioallantoic membrane of the chick embryo. **Journal of Bacteriology**, v. 83, n. 4, p. 837-843, 1962.

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.

HOSMER, D. W.; LEMESHOW, S. **Applied Logistic Regression**. New York: John Wiley & Sons, 1989.

ICTV. Virus Taxonomy. Ninth report of International Committee on taxonomy on viruses. 2012. Disponível em: <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2012>. Acesso em 24 junho 2013.

IKETANI, Y.; INOSHIMA, Y.; ASANO, A.; MURAKAMI, K.; SHIMIZU, S.; SENTSU, H. Persistent *Parapoxvirus* infection in Cattle. **Microbiology and Immunology.**, v. 46, n. 04, p. 285-291, 2002.

INOSHIMA, Y.; MOROOKA, A.; SENTSU, H. Detection and diagnosis of *Parapoxvirus* by the polymerase chain reaction. **Journal Virological Methods**, v. 84, n. 02, p. 201-208, 2000.

KROON, E. G.; MOTA, B. E. F.; ABRAHÃO, J. S.; da FONSECA, F. G.; TRINDADE, G. S. Zoonotic Brazilian vaccinia virus: from field to therapy. **Antiviral Research**, v.92, n.2, p.150-163, 2011. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166354211004190>>. Acesso: 01 maio 2013.

LEITE, J. A.; DRUMOND, B. P.; TRINDADE, G. S.; LOBATO, Z. I.; da FONSECA, F. G.; MADUREIRA, M. C.; GUEDES, M. I.; FERREIRA, J. M.; BONJARDIM, C. A.; FERREIRA, P. C.; KROON, E. Passatempo virus, a vaccinia virus strain, Brazil. **Emerging Infectious Disease.**, v. 11, n. 12, p. 1935-1938, 2005

LOBATO, Z. I. P.; TEIXEIRA, B. M.; RIBEIRO, E. B. O. I.; DIAS, G. R. C.; LIMA, F. A.; TRINDADE, G. S.; FROIS, M. C. M.; KROON, E. G. Study on an outbreak of bovine variola due to vaccinia virus in a region of Minas Gerais. **Virus Reviews & Research**, v. 7, n. 1, p. 87, 2002. Trabalho apresentado no XIII National Meeting of Virology. SBV. CP13, 2002, Águas de Lindóia.

LOPES, O. S.; LACERDA, J. P. G.; FONSECA, I. E. M. Cotia virus: a new agent isolated from sentinel mice in São Paulo, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine Hygiene**. v. 14, n. 1, p. 156-157, 1965.

MACKAY, I. A.; ARDEN, K. E.; NITSCH, A. Real-time PCR in virology. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 6, p. 1292-1305, 2002.

MADUREIRA, M. C. **Vaccinia Bovina no Estado de Minas Gerais, 2005 – 2007**, 102f. Tese (Doutorado em Epidemiologia) – Escola de Veterinária – Universidade Federal de Minas Gerais. Minas Gerais, 2009.

MEDEIROS-SILVA, D. C.; MOREIRA-SILVA, E. A. S.; GOMES, J. A. S.; FONSECA, F. G.; CORREA-OLIVEIRA, R. Clinical signs, diagnosis, and case reports of Vaccinia virus infections. **Brazilian Journal Infectious Disease**, v. 14, n. 2, p. 129-134, 2010.

MEGID, J., APOLINÁRIO, C. M., LANGONI, H., PITUCO, E. M., OKUDA, L. H. Short Report: Vaccinia Virus in Humans and Cattle in Southwest Region of São Paulo State, Brazil. **American Journal Tropical Medicine Hygiene**, v. 79, n. 5, pp. 647–651, 2008.

MELLO, D.; QUEIROZ, J. C.; TOMANIK, J. P. Variola bovina. Observações sobre casos animais e humanos ocorridos no Estado de São Paulo em 1959. **O Biológico**, v. 26, p. 132-136, 1960.

MENDES, L. C. N.; PITUCO, E. M.; BORGES, A. S.; OKUDA, L. H.; PIERÓ, J. R.; CATROXO, M. H. B. Pseudovariola bovina em um rebanho leiteiro na região de Araçatuba, Estado de São Paulo, Brasil. **Arquivos Instituto Biológico**, v. 66, p. 127, 1999. Suplement. Trabalho apresentado no III Congresso Brasileiro de Buiatria, 022, 1999.

MOUSSATCHÉ, N.; DAMASO, C. R.; MCFADDEN, G. When good vaccines go wild: Feral Orthopoxvirus in developing countries and beyond. **Journal Infectious Developing Countries**, v. 2, n. 3, p. 156-173, 2008.

NAGASSE-SUGAHARA, T. K.; KISIELIUS, J. J.; UEDA-ITO, M.; CURTI, S. P.; FIGUEREDO, C. A.; CRUZ, A. S.; SILVA, M. M. J.; RAMOS, C. H.; SILVA, M. C. C.; SAKURAI, T.; SALLES-FOMES, L. F. Human vaccinia-like virus outbreaks in São Paulo and Goiás States, Brazil: virus detection, isolation and identification. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 46, n. 06, p. 315-322, 2004.

NEWMAN, F. K.; FREY, S. E.; BLEVINS, T. P.; MANDAVA, M.; BONIFACIO, A.; YAN, L.; BELSHE, R. B. Improved assay to detect neutralizing antibody following vaccination with diluted or undiluted vaccinia (Dryvax) vaccine. **Journal Clinical Microbiology**, v. 41, n. 07, p. 3154-3157, 2003.

OIE. WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH. Terrestrial Animal Health Code. 13th Ed., 2004. Paris: OIE. Disponível em http://www.oie.int/eng/publicat/em_code.htm Acesso em: 19 fev. 2011.

OLIVEIRA, T. M.; REHFELD, I. S.; SIQUEIRA, J. M.; ABRAHÃO, J. M.; CAMPOS, R. K.; SANTOS, A. K.; CERQUEIRA, M. M.; KROON, E. G.; LOBATO, Z. I. Vaccinia virus is not inactivated after thermal treatment and cheese production using experimentally contaminated milk. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 7, n. 12, p. 1491-1496, 2010.

PITUCO, E. M.; LEITE, W. F.; OKUDA, L. H.; CARDOSO, J. L. C.; CATROXO, M. H. B.; STEFANO, E. Vesicular Mamilitis in Dairy Cows and Skin Infections in Humans.. In: XIII National Meeting of Virology. SBV. CP15, 2002, Águas de Lindóia. **Anais... Virus Reviews & Research**, v. 7, n. 1, p. 88, 2002.

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

ROPP, S. L.; JIN, Q. I.; KNIGHT, J. C.; MASSUNG, R. F.; ESPOSITO, J. J. PCR Strategy for Identification and Differentiation of *Smallpox* and Other Orthopoxviruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, N. 8, p. 2069–2076, 1995.

RUBEZ, J. MAPA DO LEITE NO ESTADO DE SÃO PAULO. LEITE BRASIL: Disponível em <<http://www.leitebrasil.org.br/download/mapadoleitesp.pdf>>. Acesso em: 24 jun. 2013

SÃO PAULO (Estado). **Região Metropolitana do Vale do Paraíba e Litoral Norte**. Editora Imprensa Oficial, 2012, 128p.

SCHATZMAYR, H. G.; LEMOS, E. R. S.; MAZUR, C.; SCHUBACH, A.; MAJEROWICZ, S.; ROZENTAL, T.; SCHUBACH, T. M. P.; BUSTAMANTE, M. C.; BARTH, O. M. Detection of Poxvirus in Cattle Associated with Human Cases in the State of Rio de Janeiro: Preliminary Report. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 5, p. 625-627, 2000.

SCHATZMAYR, H. G.; COSTA, R. V. C.; GONÇALVES, M. C. R.; BARRETO, D. F.; BATISTA, V. H.; SILVA, M. E. V.; BRUST, L. A. C.; BARTH, O. M. Infecções humanas causadas por poxvirus relacionados ao vírus *vaccinia* no Brasil. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 6, p. 672-676, 2009.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, p. 2731-2739, 2011.

TRINDADE, G. S.; FONSECA, F. G.; MARQUES, J. T.; NOGUEIRA, M. L.; MENDES, L. C. N.; BORGES, A. S.; PEIRÓ, J. R.; PITUCO, E. M.; BONJARDIM, C. A.; FERREIRA, P. C. P.; KROON, E. Araçatuba virus: a vaccinia-like virus associated with infection in humans and cattle. **Emerging Infectious Disease**, v. 9, n. 2, p.155-160, 2003.

TRINDADE, G. S.; DA FONSECA, F. G.; MARQUES, J. T.; DINIZ, S.; LEITE, J. A.; DE BODT, S.; VAN DER PEER, Y.; BONJARDIM C. A.; FERREIRA, P. C. P.; KROON, E. G. Belo Horizonte virus: a vaccinia-like virus lacking the A-type inclusion body gene isolated from infected mice. **Journal of General Virology**, v. 85, n. 7, p. 2015-2021, 2004.

TRINDADE, G. S.; LOBATO, Z. I. P.; DRUMOND, B. P.; LEITE, R.C.; TRIGUEIRO, M. I. M. C.; GUEDES, F. G.; da FONSECA, J. R.; SANTOS, J. R.; BONJARDIM, C. A.; FERREIRA, P. C. P.; KROON, E. G. Short Report: Isolation of Two Vaccinia Vírus Strains from a Single Bovine Vaccinia Outbreak in Rural Área from Brazil: Implications on the emergence of Zoonotic Orthopoxviruses. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 75, n. 3, p. 486-490, 2006.

TRINDADE, G. S.; EMERSON, G. L.; CARROLL, D. S.; KROON, E. G; DAMON, I. K. Brazilian vaccinia viruses and their origins. **Emerging Infectious Disease**, v. 13, n. 7, p. 965-967, 2007.

TURNER, P. C.; MOYER, R. W. An *Orthopoxvirus* serpinlike gene controls the ability of infected cells to fuse. **Journal Virology**, v.66, n. 04, p. 2076-2085, 1992.

UEDA, M.; TANAKA, H.; KISIELIUS, J. J.; PIRES, M. F. C.; WEIGL, D. R. Importance of electron microscopy and its contribution to viral diagnosis. **Virus Reviews Research**, v. 3, n. 1-2, p. 9-36, 1998.

VAN REGENMORTEL, M. H. V.; FAUQUET, C. M.; BISHOP, D. H. L.; CARSTENS, E. B.; ESTES, M. K.; LEMON, S. M.; MANILOFF, J.; MAYO, M. A.; MCGEOCH, D. J.; PRINGLE, C. R.; WICKNER, R. D. (Ed.). Family *Poxviridae*. In: FAUQUET, C. M.; MAYO, M. A. **Virus taxonomy: the classification and nomenclature of viruses**. 7th ed. San Diego: Academic Press, 2000. p. 137-157. Chap. 00.058, 1167 p.

ZOCCAL, R.; ALVES, E. R.; GASQUES, J. G. **Diagnóstico da pecuária de leite nacional. Estudo preliminar – contribuição para o Plano Pecuário 2012**. 2012. Disponível em: <http://www.cnpgl.embrapa.br/nova/Plano_Pecuario_2012.pdf>. Acesso em: 24 maio 2013.

WELLENBERG, G. J.; VAN DER POEL, W. H. M.; VAN OIRSCHOT, J. T. Viral infections and bovine mastitis: a review. **Veterinary Microbiology**, v. 88, n. 01, p. 27-45, 2002.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Advisory Committee on variola virus research. 2001. Disponível em <<http://www.who.int/emc>>. Acesso em: 05 abr. 2009.

APENDICE A. Dados das propriedades avaliadas para *Orthopoxvirus* extraídos do questionário epidemiológico, segundo o EDA, município, dados zootécnicos, fatores de risco e resultado da virusneutralização (São Paulo, 2013).

N	EDA	Cód. Rebanho	Registro Acess	Município	Exploração	Criação	Ordenha não	Raça	Criação de outras espécies	IA	Silvestres	Aluga pasto	Pasto comum	NR	R	Total
1	Mogi das Cruzes	00.450001	180	Salesópolis	mista	extensivo	ordenha	mestiça	sim	não	não	não	não	5	0	5
2	Pindamonhangaba	00.23001	934	Natividade da Serra	mista	extensivo	manual	mestiça	sim	não	não	não	sm	10	0	10
3	Pindamonhangaba	00.499002	935	São José dos Campos	mista	extensivo	manual	mestiça	sim	não	não	não	não	8	0	8
4	Pindamonhangaba	00.323003	936	Natividade da Serra	mista	extensivo	manual	mestiça	sim	não	não	não	sim	8	0	8
5	Pindamonhangaba	00.317002	937	Monteiro Lobato	mista	extensivo	manual	zebuína	sim	não	não	não	não	2	5	7
6	Pindamonhangaba	00.356004	938	Paraibuna	mista	extensivo	manual	mestiça	sim	não	não	sim	sim	2	0	2
7	Pindamonhangaba	00.317001	939	Monteiro Lobato	mista	extensivo	manual	zebuína	sim	não	não	não	não	8	2	10
8	Pindamonhangaba	00.486004	941	São Bento do Sapucaí	mista	extensivo	manual	mestiça	sim	não	não	não	não	7	2	9
9	Pindamonhangaba	00.4999007	942	São José dos Campos	mista	extensivo	manual	zebuína	sim	não	não	sim	não	2	1	3
10	Pindamonhangaba	00.499006	943	São José dos Campos	mista	extensivo	manual	mestiça	sim	não	não	não	não	2	2	4
11	Pindamonhangaba	00.499005	944	São José dos Campos	mista	extensivo	manual	zebuína	sim	não	não	não	não	3	0	3
12	Pindamonhangaba	00.423003	945	Redenção da Serra	mista	extensivo	manual	mestiça	sim	não	não	não	sim	0	7	7
13	Pindamonhangaba	00.500004	946	São Luiz do Paraitinga	corte	extensivo	manual	mestiça	sim	não	não	não	não	2	7	9
14	Pindamonhangaba	00.500006	947	São Luiz do Paraitinga	mista	semi- confinado	manual	mestiça	sim	não	sim	não	não	2	8	10
15	Pindamonhangaba	000.85001	948	Caçapava	corte	extensivo	manual	zebuína	sim	não	não	não	não	5	3	8
16	Pindamonhangaba	00.541005	949	Taubaté	mista	extensivo	manual	mestiça	sim	não	não	não	não	6	3	9
17	Pindamonhangaba	00.323004	950	Natividade da Serra	mista	extensivo	manual	mestiça	sim	não	não	não	não	6	2	8
18	Pindamonhangaba	00.244003	952	Jacareí	leite	semi- confinado	manual	mestiça	sim	não	sim	não	não	6	4	10
19	Pindamonhangaba	00.244001	953	Jacareí	corte	semi- confinado	manual	zebuína	sim	não	sim	não	não	5	10	15
20	Pindamonhangaba	00.38001	954	Pindamonhangaba	mista	semi- confinado	manual	mestiça	sim	não	não	sim	não	8	7	15
21	Pindamonhangaba	00.541004	955	Taubaté	corte	extensivo	ordenha	mestiça	sim	não	não	não	não	2	8	10
22	Pindamonhangaba	00.499003	956	São José dos Campos	leite	semi- confinado	manual	zebuína	sim	não	não	não	sim	6	4	10

(continuação)

N	EDA	Cód. Rebanho	Registro Acess	Município	Exploração	Criação	Ordenha	Raça	Criação de outras espécies	IA	Silvestres	Aluga pasto	Pasto comum	NR	R	Total
23	Pindamonhangaba	00.482003	957	Santo Antonio do Pinhal	mista	extensivo	manual não ordenha	zebuína	sim	não	não	não	não	1	3	4
24	Pindamonhangaba	00.317003	958	Monteiro Lobato	corte	extensivo	ordenha	zebuína	sim	não	não	sim	não	2	3	5
25	Pindamonhangaba	00.423002	959	Redenção da Serra	mista	extensivo	manual	mestiça	sim	não	não	não	sim	4	4	8
26	Pindamonhangaba	00.541001	960	Taubaté	leite	extensivo	mecânica	mestiça	sim	não	não	não	não	11	4	15
27	Pindamonhangaba	00.136015	961	Santo Antonio do Pinhal	mista	semi- confinado	manual	mestiça	sim	não	não	sim	sim	4	3	7
28	Guaratinguetá	00.136011	963	Lorena	mista	extensivo	manual	mestiça	sim	não	não	não	não	4	0	4
29	Pindamonhangaba	00.136021	964	Caçapava	leite	extensivo	manual	mestiça	sim	não	não	não	não	9	1	10
30	Guaratinguetá	00.136017	965	Cunha	leite	extensivo	manual	mestiça	sim	não	não	não	não	4	0	4
31	Pindamonhangaba	00.136022	966	São Bento do Sapucaí	mista	extensivo	manual	mestiça	sim	não	não	sim	não	8	2	10
32	Guaratinguetá	00.136008	968	Cunha	mista	semi- confinado	manual	mestiça	sim	não	não	não	não	4	3	7
33	Guaratinguetá	272002	969	Cunha	mista	confinado	manual	mestiça	sim	não	não	não	não	6	4	10
34	Pindamonhangaba	00.482001	970	Santo Antonio do Pinhal	mista	extensivo	manual	mestiça	sim	não	não	não	não	5	5	10
35	Pindamonhangaba	00.482002	971	Santo Antonio do Pinhal	mista	extensivo	manual	mestiça	sim	não	sim	não	não	6	4	10
36	Pindamonhangaba	00.486001	972	São Bento do Sapucaí	mista	extensivo	manual	zebuína	sim	não	não	não	não	4	1	5
37	Pindamonhangaba	00.499011	973	São José dos Campos	leite	confinado	manual	mestiça	sim	não	sim	não	não	9	1	10
38	Mogi das Cruzes	00.468003	974	Santa Isabel	mista	extensivo	manual	mestiça	sim	não	sim	não	não	10	0	10
39	Mogi das Cruzes	00.183001	975	Guararema	leite	extensivo	manual	mestiça	sim	não	não	não	não	7	1	8
40	Mogi das Cruzes	00.468001	976	Santa Isabel	leite	extensivo	manual	mestiça	sim	não	não	não	não	10	0	10
41	Mogi das Cruzes	00.306001	977	Mogi das Cruzes	leite	extensivo	manual não ordenha	mestiça	sim	não	não	não	não	9	1	10
42	Mogi das Cruzes	00.450002	978	Salesópolis	corte	extensivo	ordenha	mestiça	sim	não	sim	não	não	3	1	4
43	Mogi das Cruzes	00.391001	979	Poá	mista	extensivo	manual	mestiça	sim	não	não	não	não	1	0	1
44	Pindamonhangaba	00.85002	980	Caçapava	leite	extensivo	manual	mestiça	sim	não	não	sim	não	5	5	10
45	Mogi das Cruzes	00.183002	981	Guararema	leite	extensivo	manual	mestiça	sim	não	não	não	não	1	0	1

(continuação)

N	EDA	Cód. Rebanho	Registro Acess	Município	Exploração	Criação	Ordenha	Raça	Criação de outras espécies	IA	Silvestres	Aluga pasto	Pasto comum	NR	R	Total
46	Pindamonhangaba	00.486002	982	São Bento do Ssapucaí	leite	extensivo	manual	mestiça	sim	não	não	não	não	4	6	10
47	Guaratinguetá	00.136007	986	Cunha	leite	extensivo	manual	mestiça	sim	não	não	não	não	6	0	6
48	Guaratinguetá	00.136005	987	Cunha	mista	extensivo semi- confinado	manual	mestiça	sim	não	não	não	não	8	2	10
49	Pindamonhangaba	00.423001	988	Redenção da Serra	corte	confinado	manual	zebuína	sim	não	sim	não	sim	12	2	14
50	Mogi das Cruzes	00.157001	989	Ferraz de Vasconcelos	mista	extensivo semi- confinado	manual	mestiça	sim	não	não	não	não	1	0	1
51	Pindamonhangaba	00.500002	990	São Luiz do Paraitinga	leite	confinado	manual	mestiça	sim	não	não	não	não	5	4	9
52	Pindamonhangaba	00.249002	991	Jambeiro	leite	extensivo semi- confinado	manual	mestiça	sim	não	não	não	não	3	5	8
53	Pindamonhangaba	00.380004	994	Pindamonhangaba	corte	confinado semi- confinado	ordenha	européia	sim	não	não	não	não	10	5	15
54	Pindamonhangaba	00.380005	995	Pindamonhangaba	leite	confinado semi- confinado	mecânica	européia	sim	não	sim	não	não	14	1	15
55	Pindamonhangaba	00.499001	996	São José dos Campos	corte	confinado semi- confinado	manual	mestiça	sim	não	não	não	não	6	4	10
56	Pindamonhangaba	00.500007	997	São Luiz do Paraitinga	leite	confinado	manual	mestiça não	sim	não	não	sim	não	5	4	9
57	Pindamonhangaba	000.97001	998	Campos do Jordão	leite	extensivo semi- confinado	manual	informada	sim	não	sim	não	não	3	2	5
58	Pindamonhangaba	00.500001	1000	São Luiz do Paraitinga	leite	confinado	manual	mestiça	sim	não	sim	não	não	5	1	6
59	Pindamonhangaba	00.541003	1003	Taubaté	corte	extensivo	manual	mestiça	sim	não	não	não	não	2	7	9
60	Pindamonhangaba	00.486003	1004	São Bento do Ssapucaí	mista	extensivo semi- confinado	manual	mestiça não	sim	não	não	não	não	3	4	7
61	Pindamonhangaba	00.380002	1005	Pindamonhangaba	mista	confinado	manual	informada	sim	não	não	não	não	5	4	9
62	Pindamonhangaba	00.356002	1006	Paraibuna	mista	extensivo semi- confinado	manual	mestiça	sim	não	não	não	não	6	4	10
63	Pindamonhangaba	00.249001	1008	Jambeiro	leite	confinado semi- confinado	mecânica	européia	sim	não	não	não	não	7	3	10
64	Pindamonhangaba	00.500005	1009	São Luiz do Paraitinga	leite	confinado semi- confinado	manual	mestiça	sim	não	não	não	não	5	3	8
65	Pindamonhangaba	00.460001	1010	Santa Branca	leite	confinado semi- confinado	manual	mestiça	sim	não	não	não	não	7	3	10
66	Pindamonhangaba	00.499009	1011	São José dos Campos	leite	confinado semi- confinado	manual	mestiça	sim	não	não	não	não	2	2	4
67	Pindamonhangaba	00.244002	1012	Jacareí	leite	confinado	manual	mestiça	sim	não	sim	não	não	9	0	9
68	Pindamonhangaba	00.356003	1013	Paraibuna	mista	extensivo	manual	mestiça	sim	não	não	não	não	4	2	6
69	Pindamonhangaba	00.105001	1014	Caraguatatuba	mista	extensivo	manual	mestiça	sim	não	sim	não	não	13	2	15

(Conclusão)

N	EDA	Cód. Rebanho	Registro Acess	Município	Exploração	Criação	Ordenha	Raça	Criação de outras espécies	IA	Silvestres	Aluga pasto	Pasto comum	NR	R	Total
70	Pindamonhangaba	00.202001	1015	Igaratá	leite	extensivo semi- confinado	manual	mestiça	sim	não	sim	não	não	3	0	3
71	Pindamonhangaba	00.202002	1016	Igaratá	leite	extensivo semi- confinado	manual	mestiça	sim	não	não	não	não	8	2	10
72	Pindamonhangaba	00.356001	1017	Paraibuna	mista	extensivo semi- confinado	manual	mestiça	sim	não	sim	não	não	9	1	10
73	Pindamonhangaba	00.460002	1018	Santa Branca	leite	extensivo semi- confinado	manual	mestiça	sim	não	não	não	não	3	0	3
74	Pindamonhangaba	00.499008	1019	São José dos Campos	leite	extensivo semi- confinado	manual	mestiça	sim	não	sim	não	não	4	3	7
75	Pindamonhangaba	00.499010	1020	São José dos Campos	leite	extensivo semi- confinado	manual	mestiça	sim	não	sim	não	sim	7	3	10
76	Pindamonhangaba	00.499004	1021	São José dos Campos	leite	extensivo semi- confinado	manual	mestiça	sim	não	não	não	não	8	0	8

APENDICE B. Dados das propriedades extraídos do formulário FORM-IN, segundo o município, Estado, dados zootécnicos, fatores de risco e criação de outras espécies animais São Paulo, 2013).

(Continuação)

Nº amostras	Ano	REG. LVB	MUNICÍPIO	ESTADO	Exploração	Tecnificada	Principal atividade	Outras espécies	Notificação
1	2007	Pag ₀₇ 313	Botucatu	SP	NI ¹⁰	NI	NI	NI	NI
2	2007	Pag ₀₇ 314	Botucatu	SP	NI	NI	NI	NI	NI
3	2007	Pag ₀₇ 315	Botucatu	SP	NI	NI	NI	NI	NI
4	2007	Pag ₀₇ 316	Botucatu	SP	NI	NI	NI	NI	NI
5	2007	Pag ₀₇ 317	Botucatu	SP	NI	NI	NI	NI	NI
6	2007	Pag ₀₇ 318	Botucatu	SP	NI	NI	NI	NI	NI
7	2007	Pag ₀₇ 319	Botucatu	SP	NI	NI	NI	NI	NI
8	2007	Pag ₀₇ 320	Botucatu	SP	NI	NI	NI	NI	NI
9	2007	Pag ₀₇ 321	Botucatu	SP	NI	NI	NI	NI	NI
10	2007	Pag ₀₇ 322	Botucatu	SP	NI	NI	NI	NI	NI
11	2007	Pag ₀₇ 323	Botucatu	SP	NI	NI	NI	NI	NI
12	2007	Pag ₀₇ 324	Botucatu	SP	NI	NI	NI	NI	NI
13	2007	Pag ₀₇ 325	Botucatu	SP	NI	NI	NI	NI	NI
14	2007	Pag ₀₇ 326	Botucatu	SP	NI	NI	NI	NI	NI
15	2007	Pag ₀₇ 327	Botucatu	SP	NI	NI	NI	NI	NI
16	2007	Pag ₀₇ 328	Botucatu	SP	NI	NI	NI	NI	NI
17	2007	RAG ₀₇ 89	Araputanga	MT	leite	não	NI	sim	terceiro
18	2007	RAG ₀₇ 90	Araputanga	MT	leite	não	NI	não	terceiro
19	2007	RAG ₀₇ 91	Araputanga	MT	leite	não	NI	sim	terceiro
20	2007	RAG ₀₇ 92	Araputanga	MT	leite	não	NI	não	vigilância
21	2007	Pag ₀₇ 335	Nerópolis	GO	leite	não	sim	não	proprietário
22	2007	Pag ₀₇ 336	Nerópolis	GO	leite	não	sim	não	proprietário
23	2007	Pag ₀₇ 337	Barnach	PA	mista	não	não	sim	proprietário
24	2007	Pag ₀₇ 338	Barnach	PA	mista	não	não	sim	proprietário

¹⁰ NI = não informado

(Continuação)

Nº amostras	Ano	REG. LVB	MUNICÍPIO	ESTADO	Exploração	Tecnificada	Principal atividade	Outras espécies	Notificação
25	2007	Pag ₀₇ 339	Barnach	PA	mista	não	não	sim	proprietário
26	2007	Pag ₀₇ 340	Barnach	PA	NI	não	sim	sim	proprietário
27	2007	Pag ₀₇ 341	Barnach	PA	NI	não	sim	sim	proprietário
28	2007	Pag ₀₇ 342	Barnach	PA	NI	não	sim	sim	proprietário
29	2007	Pag ₀₇ 398	Botucatu	SP	NI	NI	NI	NI	NI
30	2007	Pag ₀₇ 399	Botucatu	SP	NI	NI	NI	NI	NI
31	2007	Pag ₀₇ 400	Botucatu	SP	NI	NI	NI	NI	NI
32	2007	Pag ₀₇ 401	Botucatu	SP	NI	NI	NI	NI	NI
33	2007	Pag ₀₇ 402	Botucatu	SP	NI	NI	NI	NI	NI
34	2007	Pag ₀₇ 422	Recife	PE	NI	NI	NI	NI	NI
35	2007	Pag ₀₇ 423	Recife	PE	NI	NI	NI	NI	NI
36	2007	Pag ₀₇ 424	Recife	PE	NI	NI	NI	NI	NI
37	2007	Pag ₀₇ 425	Recife	PE	NI	NI	NI	NI	NI
38	2007	Pag ₀₇ 426	Recife	PE	NI	NI	NI	NI	NI
39	2008	Pag ₀₈ 01	NI	SP	leite	NI	NI	NI	NI
40	2008	Pag ₀₈ 09	Vale do São Domingos	MT	leite	não	sim	sim	proprietário
41	2008	Pag ₀₈ 15	Avaré	SP	NI	NI	NI	NI	NI
42	2008	Pag ₀₈ 16	Ourilândia do Norte	PA	mista	NI	NI	sim	proprietário
43	2008	Pag ₀₈ 19	Caem	BA	leite	não	não	sim	proprietário
44	2008	Pag ₀₈ 20	Ivaporã	PR	mista	não	sim	sim	terceiro
45	2008	Pag ₀₈ 22	Cunha	SP	leite	não	sim	não	proprietário
46	2008	Pag ₀₈ 27	V. B. Ssa.Trindade	MS	mista	não	sim	sim	vigilância
47	2008	Pag ₀₈ 28	V. B. Ssa.Trindade	MS	mista	não	sim	sim	vigilância
48	2008	Pag ₀₈ 29	Guaratinguetá	SP	leite	sim	sim	não	vigilância
49	2008	Pag ₀₈ 31	Paraguaçu	MG	leite	não	sim	não	terceiro
50	2008	Pag ₀₈ 32	Paraguaçu	MG	leite	não	sim	não	terceiro
51	2008	Pag ₀₈ 33	Paraguaçu	MG	leite	não	sim	não	terceiro
52	2008	Pag ₀₈ 34	Paraguaçu	MG	leite	não	sim	não	terceiro

(Continuação)

Nº amostras	Ano	REG. LVB	MUNICÍPIO	ESTADO	Exploração	Tecnificada	Principal atividade	Outras espécies	Notificação
53	2008	Pag ₀₈ 35	Paraguaçu	MG	leite	não	sim	não	terceiro
54	2008	Pag ₀₈ 42	Coromandel	MG	mista	não	sim	sim	proprietário
55	2008	Pag ₀₈ 43	Coromandel	MG	mista	não	sim	sim	proprietário
56	2008	Pag ₀₈ 44	Coromandel	MG	mista	não	sim	sim	proprietário
57	2008	Pag ₀₈ 45	Coromandel	MG	mista	não	sim	sim	proprietário
58	2008	Pag ₀₈ 46	Coromandel	MG	mista	não	sim	sim	proprietário
59	2008	Pag ₀₈ 47	Jauru	MT	leite	não	sim	sim	proprietário
60	2008	Pag ₀₈ 50	Araputanga	MT	leite	não	sim	não	vigilância
61	2008	Pag ₀₈ 51	Araputanga	MT	leite	não	sim	não	vigilância
62	2008	Pag ₀₈ 52	Araputanga	MT	leite	não	sim	não	vigilância
63	2008	Pag ₀₈ 53	Araputanga	MT	leite	não	sim	não	vigilância
64	2008	Pag ₀₈ 54	Araputanga	MT	leite	não	sim	não	vigilância
65	2008	Pag ₀₈ 55	Araputanga	MT	leite	não	sim	não	vigilância
66	2008	Pag ₀₈ 56	Araputanga	MT	leite	não	sim	não	vigilância
67	2008	Pag ₀₈ 57	Araputanga	MT	leite	não	sim	não	vigilância
68	2008	Pag ₀₈ 58	Araputanga	MT	leite	não	sim	não	vigilância
69	2008	Pag ₀₈ 59	Paraisópolis	MG	mista	não	sim	sim	proprietário
70	2008	Pag ₀₈ 60	Paraisópolis	MG	mista	não	sim	sim	proprietário
71	2008	Pag ₀₈ 61	Paraisópolis	MG	mista	não	sim	sim	proprietário
72	2008	Pag ₀₈ 62	Paraisópolis	MG	mista	não	sim	sim	proprietário
73	2008	Pag ₀₈ 63	Rio Verde	GO	leite	não	sim	não	proprietário
74	2008	Pag ₀₈ 64	Vitória da Conquista	BA	leite	não	sim	sim	terceiro
75	2008	Pag ₀₈ 65	Vitória da Conquista	BA	leite	não	sim	sim	terceiro
76	2008	Pag ₀₈ 65A	Vitória da Conquista	BA	leite	não	sim	sim	terceiro
77	2008	Pag ₀₈ 72	Porteirinha	MG	mista	não	sim	sim	proprietário
78	2008	Pag ₀₈ 73	Porteirinha	MG	mista	não	sim	sim	proprietário
79	2008	Pag ₀₈ 74	Porteirinha	MG	mista	não	sim	sim	proprietário
80	2008	Pag ₀₈ 75	Porteirinha	MG	mista	não	sim	sim	proprietário

(Continuação)

Nº amostras	Ano	REG. LVB	MUNICÍPIO	ESTADO	Exploração	Tecnificada	Principal atividade	Outras espécies	Notificação
81	2008	Pag ₀₈ 76	S. Antonio do Pinhal	SP	mista	sim	sim	não	vigilância
82	2008	Pag ₀₈ 77	S. Antonio do Pinhal	SP	mista	sim	sim	não	vigilância
83	2008	Pag ₀₈ 78	Itanhaem	BA	mista	não	sim	sim	proprietário
84	2008	Pag ₀₈ 79	Itanhaem	BA	mista	não	sim	sim	proprietário
85	2008	Pag ₀₈ 80	Sapucaí Mirim	MG	mista	não	sim	não	vigilância
86	2008	Pag ₀₈ 81	Sapucaí Mirim	MG	mista	não	sim	não	vigilância
87	2008	Pag ₀₈ 82	Sapucaí Mirim	MG	mista	não	sim	não	vigilância
88	2008	Pag ₀₈ 83	Sapucaí Mirim	MG	mista	não	sim	não	vigilância
89	2008	Pag ₀₈ 84	Açailândia	MA	leite	não	sim	sim	proprietário
90	2008	Pag ₀₈ 85	Açailândia	MA	leite	não	sim	sim	proprietário
91	2008	Pag ₀₈ 86	Açailândia	MA	leite	não	sim	sim	proprietário
92	2008	Pag ₀₈ 87	Açailândia	MA	leite	não	sim	sim	proprietário
93	2008	Pag ₀₈ 88	Sapucaí Mirim	MG	mista	não	sim	sim	vigilância
94	2008	Pag ₀₈ 89	Sapucaí Mirim	MG	mista	não	sim	sim	vigilância
95	2008	Pag ₀₈ 90	Gonçalves	MG	mista	não	sim	sim	vigilância
96	2008	Pag ₀₈ 91	Gonçalves	MG	mista	não	sim	sim	vigilância
97	2008	Pag ₀₈ 92	Vale de São Domingos	MT	mista	não	não	sim	terceiro
98	2008	Pag ₀₈ 93	Vale de São Domingos	MT	mista	não	não	sim	terceiro
99	2008	Pag ₀₈ 94	S. Antonio do Pinhal	SP	leite	sim	sim	não	vigilância
100	2008	Pag ₀₈ 95	S. Antonio do Pinhal	SP	leite	sim	sim	não	vigilância
101	2008	Pag ₀₈ 96	Santo Afonso	MT	leite	não	sim	não	proprietário
102	2008	Pag ₀₈ 97	Santo Afonso	MT	leite	não	NI	não	vigilância
103	2008	Pag ₀₈ 98	Santo Afonso	MT	leite	não	NI	não	vigilância
104	2008	Pag ₀₈ 99	Itanhaem	BA	leite	sim	sim	não	vigilância
105	2008	Pag ₀₈ 103	serro	MG	leite	não	sim	sim	terceiro
106	2008	Pag ₀₈ 104	serro	MG	leite	não	sim	sim	terceiro
107	2008	Pag ₀₈ 105	serro	MG	leite	não	sim	sim	terceiro
108	2008	Pag ₀₈ 106	serro	MG	leite	não	sim	sim	terceiro

Nº amostras	Ano	REG. LVB	MUNICÍPIO	ESTADO	Exploração	Tecnificada	Principal atividade	Outras espécies	Notificação
109	2008	Pag ₀₈ 107	serro	MG	leite	não	sim	sim	terceiro
110	2008	Pag ₀₈ 109	Sebastianópolis do Sul	SP	NI	NI	NI	NI	NI
111	2008	Pag ₀₈ 110	Sebastianópolis do Sul	SP	NI	NI	NI	NI	NI
112	2008	Pag ₀₈ 111	Sebastianópolis do Sul	SP	NI	NI	NI	NI	NI
113	2008	Pag ₀₈ 112	Redenção da Serra	SP	leite	não	sim	sim	terceiro
114	2008	Pag ₀₈ 113	Jauru	MT	leite	não	sim	sim	terceiro
115	2008	Pag ₀₈ 114	Jauru	MT	leite	não	sim	sim	terceiro
116	2008	Pag ₀₈ 117	Botucatu	SP	NI	NI	NI	NI	NI
117	2008	Pag ₀₈ 118	Botucatu	SP	NI	NI	NI	NI	NI
118	2008	Pag ₀₈ 119	Botucatu	SP	NI	NI	NI	NI	NI
119	2008	Pag ₀₈ 120	Botucatu	SP	NI	NI	NI	NI	NI
120	2008	Pag ₀₈ 125	São Bento do Sapucaí	SP	leite	não	sim	não	proprietário
121	2008	Pag ₀₈ 126	São Bento do Sapucaí	SP	leite	sim	sim	não	vigilância
122	2008	Pag ₀₈ 128	Vale do São Domingos	MT	leite	não	sim	sim	proprietário
123	2008	Pag ₀₈ 129	Vale do São Domingos	MT	leite	não	sim	sim	proprietário
124	2008	Pag ₀₈ 130	Itanhaem	BA	mista	não	sim	não	proprietário
125	2008	Pag ₀₈ 132	Monteiro Lobato	SP	leite	sim	sim	não	proprietário
126	2009	Pag ₀₉ 02	Guaratinguetá	SP	leite	sim	sim	não	terceiro
127	2009	Pag ₀₉ 03	Ponte e Lacerda	MT	leite	não	sim	sim	proprietário
128	2009	Pag ₀₉ 09	Colatina	ES	leite	não	sim	não	terceiro
129	2009	Pag ₀₉ 12	Andradas	MG	mista	não	não	sim	vigilância
130	2009	Pag ₀₉ 13	Andradas	MG	mista	não	não	sim	vigilância
131	2009	Pag ₀₉ 14	Andradas	MG	mista	não	não	sim	vigilância
132	2009	Pag ₀₉ 15	Andradas	MG	mista	não	não	sim	vigilância
133	2009	Pag ₀₉ 16	Paraisópolis	MG	leite	não	sim	sim	vigilância
134	2009	Pag ₀₉ 17	Paraisópolis	MG	leite	não	sim	sim	vigilância
135	2009	Pag ₀₉ 18	Paraisópolis	MG	leite	não	sim	sim	vigilância
136	2009	Pag ₀₉ 21	Bacabal	MA	mista	não	sim	sim	terceiro

(Continuação)

Nº amostras	Ano	REG. LVB	MUNICÍPIO	ESTADO	Exploração	Tecnificada	Principal atividade	Outras espécies	Notificação
137	2009	Pag ₀₉ 26	Nhandeara	SP	leite	não	sim	não	vigilância
138	2009	Pag ₀₉ 27	Nhandeara	SP	leite	não	sim	não	vigilância
139	2009	Pag ₀₉ 28	Nhandeara	SP	leite	não	sim	não	vigilância
140	2009	Pag ₀₉ 36	João Lisboa	MA	mista	não	sim	não	vigilância
141	2009	Pag ₀₉ 37	Olho D'Agua Cunhãs	MA	mista	não	sim	não	vigilância
142	2009	Pag ₀₉ 38	Amaporã	PR	mista	não	sim	sim	terceiro
143	2009	Pag ₀₉ 46	Vitorino Freire	MA	mista	não	não	não	vigilância
144	2009	Pag ₀₉ 47	Vitorino Freire	MA	mista	não	não	não	vigilância
145	2009	Pag ₀₉ 48	Vitorino Freire	MA	mista	não	não	não	vigilância
146	2009	Pag ₀₉ 49	Vitorino Freire	MA	mista	não	não	não	vigilância
147	2009	Pag ₀₉ 50	Doresópolis	MG	leite	não	sim	sim	proprietário
148	2009	Pag ₀₉ 51	Doresópolis	MG	leite	não	sim	sim	proprietário
149	2009	Pag ₀₉ 55	Bacabal	MA	mista	não	sim	sim	proprietário
150	2009	Pag ₀₉ 56	Bom Jesus das Selvas	MA	mista	não	não	sim	proprietário
151	2009	Pag ₀₉ 57	Bom Jesus das Selvas	MA	mista	não	não	sim	proprietário
152	2009	Pag ₀₉ 58	Bom Jesus das Selvas	MA	mista	não	não	sim	proprietário
153	2009	Pag ₀₉ 60	Doresópolis	MG	leite	não	sim	não	terceiro
154	2009	Pag ₀₉ 61	Doresópolis	MG	leite	não	sim	não	terceiro
155	2009	Pag ₀₉ 62	Moipora	GO	mista	NI	não	não	proprietário
156	2009	Pag ₀₉ 63	João Pinheiro	MG	mista	não	sim	sim	proprietário
157	2009	Pag ₀₉ 64	João Pinheiro	MG	mista	não	sim	sim	proprietário
158	2009	Pag ₀₉ 65	João Pinheiro	MG	mista	não	sim	sim	proprietário
159	2009	Pag ₀₉ 66	João Pinheiro	MG	mista	não	sim	sim	proprietário
160	2009	Pag ₀₉ 67	João Pinheiro	MG	mista	não	sim	sim	proprietário
161	2009	Pag ₀₉ 68	Andradas	MG	mista	não	não	sim	vigilância
162	2009	Pag ₀₉ 69	Grupiara	MG	leite	não	sim	não	vigilância
163	2009	Pag ₀₉ 70	Grupiara	MG	leite	não	sim	não	vigilância
164	2009	Pag ₀₉ 116	Piumbi	MG	leite	não	sim	sim	vigilância

(Continuação)

Nº amostras	Ano	REG. LVB	MUNICÍPIO	ESTADO	Exploração	Tecnificada	Principal atividade	Outras espécies	Notificação
165	2009	Pag09 117	Piumbi	MG	leite	não	sim	sim	vigilância
166	2009	Pag09 139	Ji-Paraná	RO	NI	NI	NI	NI	NI
167	2009	Pag09 140	Ji-Paraná	RO	NI	NI	NI	NI	NI
168	2009	Pag09 141	Ji-Paraná	RO	NI	NI	NI	NI	NI
169	2009	Pag09 142	Ji-Paraná	RO	NI	NI	NI	NI	NI
170	2009	Pag09 143	João Lisboa	MA	NI	NI	NI	NI	NI
171	2009	Pag09 144	João Lisboa	MA	NI	NI	NI	NI	NI
172	2009	Pag09 145	João Lisboa	MA	NI	NI	NI	NI	NI
173	2009	Pag09 147	Ji-Paraná	RO	NI	NI	NI	NI	NI
174	2009	Pag09 148	Ji-Paraná	RO	NI	NI	NI	NI	NI
175	2009	Pag09 149	Ji-Paraná	RO	NI	NI	NI	NI	NI
176	2009	Pag09 150	Ji-Paraná	RO	NI	NI	NI	NI	NI
177	2009	Pag09 151	Ji-Paraná	RO	NI	NI	NI	NI	NI
178	2009	Pag09 152	Ji-Paraná	RO	NI	NI	NI	NI	NI
179	2009	Pag09 153	Cacoal	RO	NI	NI	NI	NI	NI
180	2009	Pag09 154	Cacoal	RO	NI	NI	NI	NI	NI
181	2009	Pag09 155	Cacoal	RO	NI	NI	NI	NI	NI
182	2009	Pag09 156	Cacoal	RO	NI	NI	NI	NI	NI
183	2009	Pag09 157	Cacoal	RO	NI	NI	NI	NI	NI
184	2009	Pag09 158	Cacoal	RO	NI	NI	NI	NI	NI
185	2009	Pag09 159	Cacoal	RO	NI	NI	NI	NI	NI
186	2009	Pag09 160	Cacoal	RO	NI	NI	NI	NI	NI
187	2009	Pag09 161	Cacoal	RO	NI	NI	NI	NI	NI
188	2009	Pag09 162	Cacoal	RO	NI	NI	NI	NI	NI
189	2009	Pag09 163	Ji-Paraná	RO	NI	NI	NI	NI	NI
190	2009	Pag09 164	Ji-Paraná	RO	NI	NI	NI	NI	NI
191	2009	Pag09 165	Ji-Paraná	RO	NI	NI	NI	NI	NI
192	2009	Pag09 166	Ji-Paraná	RO	NI	NI	NI	NI	NI

(Continuação)

Nº amostras	Ano	REG. LVB	MUNICÍPIO	ESTADO	Exploração	Tecnificada	Principal atividade	Outras espécies	Notificação
193	2009	Pag09 167	Ji-Paraná	RO	NI	NI	NI	NI	NI
194	2009	Pag09 168	Ji-Paraná	RO	NI	NI	NI	NI	NI
195	2009	Pag09 169	Ji-Paraná	RO	NI	NI	NI	NI	NI
196	2009	Pag09 170	Ji-Paraná	RO	NI	NI	NI	NI	NI
197	2009	Pag09 171	Ji-Paraná	RO	NI	NI	NI	NI	NI
198	2009	Pag09 172	Ji-Paraná	RO	NI	NI	NI	NI	NI
199	2009	Pag09 173	Ji-Paraná	RO	NI	NI	NI	NI	NI
200	2009	Pag09 174	Ji-Paraná	RO	NI	NI	NI	NI	NI
201	2009	Pag09 175	Ji-Paraná	RO	NI	NI	NI	NI	NI
202	2009	Pag09 198	Nova independência	SP	mista	não	sim	sim	vigilância
203	2009	Pag09 199	Nova independência	SP	mista	não	sim	sim	vigilância
204	2009	Pag09 200	Nova independência	SP	mista	não	sim	sim	vigilância
205	2009	Pag09 201	Nova independência	SP	mista	não	sim	sim	vigilância
206	2009	Pag09 212	Areado	MG	leite	não	não	sim	vigilância
207	2009	Pag09 213	Passos	MG	leite	sim	sim	não	proprietário
208	2009	Pag09 214	Areado	MG	leite	não	sim	sim	vigilância
209	2009	Pag09 215	Areado	MG	leite	não	sim	sim	vigilância
210	2009	Pag09 255	Matias Barbosa	MG	leite	sim	sim	sim	terceiro
211	2009	Pag09 256	Matias Barbosa	MG	leite	sim	sim	sim	terceiro
212	2009	Pag09 257	Matias Barbosa	MG	leite	sim	sim	sim	terceiro
213	2009	Pag09 258	Matias Barbosa	MG	leite	sim	sim	sim	terceiro
214	2009	Pag09 259	Matias Barbosa	MG	leite	sim	sim	sim	terceiro
215	2009	Pag09 262	Gov. Edson Lobão	MA	mista	não	sim	sim	vigilância
216	2009	Pag09 263	Gov. Edson Lobão	MA	leite	sim	sim	sim	proprietário
217	2009	Pag09 264	Gov. Edson Lobão	MA	mista	não	sim	sim	proprietário
218	2009	Pag09 265	Gov. Edson Lobão	MA	mista	não	sim	sim	proprietário
219	2009	Pag09 309	Patos de Minas	MG	mista	não	sim	sim	vigilância
220	2009	Pag09 310	Lagoa Formosa	MG	mista	sim	sim	sim	proprietário

(Conclusão)

Nº amostras	Ano	REG. LVB	MUNICÍPIO	ESTADO	Exploração	Tecnificada	Principal atividade	Outras espécies	Notificação
221	2009	Pag09 312	Cunha	SP	leite	0	sim	não	vigilância
222	2009	Pag09 313	Cunha	SP	NI	0	NI	NI	NI
223	2009	Pag09 314	Tapira	MG	leite	não	sim	sim	proprietário
224	2009	Pag09 315	Tapira	MG	leite	não	sim	sim	proprietário
225	2009	Pag09 316	Tapira	MG	leite	não	sim	sim	proprietário
226	2009	Pag09 317	Tapira	MG	leite	não	sim	sim	proprietário
227	2009	Pag09 318	Tapira	MG	leite	não	sim	sim	proprietário

APENDICE C. Dados das propriedades extraídos do formulário FORM-IN, segundo tipo de amostra, resultado das técnicas diagnósticas ME, Isolamento viral e hemi nested PCR e provável origem da doença (São Paulo, 2013).

Nº amostras	Ano	REG. LVB	AMOSTRA	ME	Isolamento	PCR	Provável origem da doença
1	2007	Pag ₀₇ 313	suabe	negativo	negativo	negativo	NI
2	2007	Pag ₀₇ 314	epitélio	positivo	positivo	positivo	NI
3	2007	Pag ₀₇ 315	suabe	negativo	insuficiente	negativo	NI
4	2007	Pag ₀₇ 316	epitélio	positivo	negativo	negativo	NI
5	2007	Pag ₀₇ 317	suabe	negativo	positivo	positivo	NI
6	2007	Pag ₀₇ 318	epitélio	positivo	positivo	positivo	NI
7	2007	Pag ₀₇ 319	suabe	negativo	positivo	positivo	NI
8	2007	Pag ₀₇ 320	epitélio	positivo	positivo	positivo	NI
9	2007	Pag ₀₇ 321	suabe	negativo	positivo	negativo	NI
10	2007	Pag ₀₇ 322	epitélio	negativo	positivo	negativo	NI
11	2007	Pag ₀₇ 323	epitélio	negativo	negativo	negativo	NI
12	2007	Pag ₀₇ 324	suabe	negativo	negativo	negativo	NI
13	2007	Pag ₀₇ 325	epitélio	negativo	negativo	negativo	NI
14	2007	Pag ₀₇ 326	epitélio	negativo	negativo	negativo	NI
15	2007	Pag ₀₇ 327	epitélio	positivo	positivo	positivo	NI
16	2007	Pag ₀₇ 328	epitélio	negativo	negativo	negativo	NI
17	2007	RAG ₀₇ 89	epitélio	positivo	positivo	positivo	peessoas (veterinários, empregados)
18	2007	RAG ₀₇ 90	epitélio	positivo	positivo	positivo	peessoas (veterinários, empregados)
19	2007	RAG ₀₇ 91	epitélio	positivo	positivo	positivo	propriedade vizinha
20	2007	RAG ₀₇ 92	epitélio	positivo	positivo	positivo	peessoas (veterinários, empregados)
21	2007	Pag ₀₇ 335	epitélio	negativo	negativo	negativo	propriedade vizinha

(Continuação)

Nº amostras	Ano	REG. LVB	AMOSTRA	ME	Isolamento	PCR	Provável origem da doença
22	2007	Pag ₀₇ 336	epitélio	positivo	positivo	positivo	propriedade vizinha
23	2007	Pag ₀₇ 337	epitélio	positivo	positivo	positivo	peessoas (veterinários, empregados)
24	2007	Pag ₀₇ 338	epitélio	positivo	positivo	positivo	peessoas (veterinários, empregados)
25	2007	Pag ₀₇ 339	epitélio	positivo	positivo	positivo	peessoas (veterinários, empregados)
26	2007	Pag ₀₇ 340	epitélio	negativo	negativo	negativo	propriedade vizinha, pessoas
27	2007	Pag ₀₇ 341	epitélio	negativo	negativo	negativo	propriedade vizinha, pessoas
28	2007	Pag ₀₇ 342	epitélio	negativo	negativo	negativo	propriedade vizinha, pessoas
29	2007	Pag ₀₇ 398	epitélio	positivo	insuficiente	positivo	NI
30	2007	Pag ₀₇ 399	epitélio	positivo	insuficiente	positivo	NI
31	2007	Pag ₀₇ 400	epitélio	positivo	insuficiente	positivo	NI
32	2007	Pag ₀₇ 401	epitélio	positivo	insuficiente	positivo	NI
33	2007	Pag ₀₇ 402	epitélio	positivo	insuficiente	positivo	NI
34	2007	Pag ₀₇ 422	isolado cultivo celular	negativo	positivo	negativo	NI
35	2007	Pag ₀₇ 423	isolado cultivo celular	negativo	positivo	negativo	NI
36	2007	Pag ₀₇ 424	isolado cultivo celular	negativo	positivo	negativo	NI
37	2007	Pag ₀₇ 425	isolado cultivo celular	negativo	positivo	negativo	NI
38	2007	Pag ₀₇ 426	isolado cultivo celular	negativo	positivo	negativo	NI
39	2008	Pag ₀₈ 01	epitélio	negativo	negativo	negativo	NI
40	2008	Pag ₀₈ 09	vesícula	insuficiente	negativo	negativo	desconhecida
41	2008	Pag ₀₈ 15	vesícula	insuficiente	insuficiente	negativo	NI
42	2008	Pag ₀₈ 16	vesícula	insuficiente	insuficiente	positivo	propriedade vizinha
43	2008	Pag ₀₈ 19	epitélio	positivo	positivo	positivo	animais adquiridos de outras propriedades
44	2008	Pag ₀₈ 20	epitélio	positivo	positivo	positivo	desconhecida
45	2008	Pag ₀₈ 22	epitélio	insuficiente	insuficiente	positivo	peessoas (veterinários, empregados)

(Continuação)

Nº amostras	Ano	REG. LVB	AMOSTRA	ME	Isolamento	PCR	Provável origem da doença
46	2008	Pag ₀₈ 27	epitélio	insuficiente	insuficiente	negativo	animais adquiridos de outras propriedades
47	2008	Pag ₀₈ 28	epitélio	insuficiente	insuficiente	negativo	animais adquiridos de outras propriedades
48	2008	Pag ₀₈ 29	epitélio	insuficiente	insuficiente	positivo	desconhecida
49	2008	Pag ₀₈ 31	epitélio	insuficiente	insuficiente	positivo	animais introduzidos temporariamente
50	2008	Pag ₀₈ 32	epitélio	insuficiente	insuficiente	positivo	animais introduzidos temporariamente
51	2008	Pag ₀₈ 33	epitélio	insuficiente	insuficiente	negativo	animais introduzidos temporariamente
52	2008	Pag ₀₈ 34	epitélio	insuficiente	insuficiente	positivo	animais introduzidos temporariamente
53	2008	Pag ₀₈ 35	epitélio	insuficiente	insuficiente	negativo	animais introduzidos temporariamente
54	2008	Pag ₀₈ 42	epitélio	insuficiente	insuficiente	positivo	desconhecida
55	2008	Pag ₀₈ 43	epitélio	insuficiente	insuficiente	positivo	desconhecida
56	2008	Pag ₀₈ 44	epitélio	insuficiente	insuficiente	positivo	desconhecida
57	2008	Pag ₀₈ 45	epitélio	insuficiente	insuficiente	positivo	desconhecida
58	2008	Pag ₀₈ 46	epitélio	insuficiente	insuficiente	negativo	desconhecida
59	2008	Pag ₀₈ 47	epitélio	insuficiente	insuficiente	positivo	propriedade vizinha
60	2008	Pag ₀₈ 50	epitélio	insuficiente	insuficiente	positivo	propriedade vizinha
61	2008	Pag ₀₈ 51	epitélio	insuficiente	insuficiente	positivo	propriedade vizinha
62	2008	Pag ₀₈ 52	epitélio	insuficiente	insuficiente	positivo	propriedade vizinha
63	2008	Pag ₀₈ 53	epitélio	insuficiente	insuficiente	positivo	peessoas (veterinários, empregados)
64	2008	Pag ₀₈ 54	epitélio	insuficiente	insuficiente	positivo	desconhecida
65	2008	Pag ₀₈ 55	epitélio	insuficiente	insuficiente	positivo	peessoas (veterinários, empregados)
66	2008	Pag ₀₈ 56	epitélio	insuficiente	insuficiente	positivo	peessoas (veterinários, empregados)
67	2008	Pag ₀₈ 57	epitélio	insuficiente	insuficiente	positivo	desconhecida
68	2008	Pag ₀₈ 58	epitélio	insuficiente	insuficiente	positivo	peessoas (veterinários, empregados)
69	2008	Pag ₀₈ 59	epitélio	insuficiente	insuficiente	positivo	animais silvestres
70	2008	Pag ₀₈ 60	epitélio	insuficiente	insuficiente	positivo	animais silvestres
71	2008	Pag ₀₈ 61	epitélio	insuficiente	insuficiente	positivo	animais silvestres
72	2008	Pag ₀₈ 62	epitélio	insuficiente	insuficiente	positivo	animais silvestres

(Continuação)

Nº amostras	Ano	REG. LVB	AMOSTRA	ME	Isolamento	PCR	Provável origem da doença
73	2008	Pag ₀₈ 63	epitélio	insuficiente	insuficiente	negativo	peessoas (veterinários, empregados)
74	2008	Pag ₀₈ 64	vesícula	insuficiente	insuficiente	positivo	peessoas (veterinários, empregados)
75	2008	Pag ₀₈ 65	vesícula	insuficiente	insuficiente	positivo	peessoas (veterinários, empregados)
76	2008	Pag ₀₈ 65A	suabe	insuficiente	insuficiente	negativo	peessoas (veterinários, empregados)
77	2008	Pag ₀₈ 72	epitélio	insuficiente	negativo	negativo	propriedade vizinha, peessoas, água comum
78	2008	Pag ₀₈ 73	epitélio	insuficiente	insuficiente	positivo	propriedade vizinha, peessoas, água comum
79	2008	Pag ₀₈ 74	epitélio	insuficiente	insuficiente	negativo	propriedade vizinha, peessoas, água comum
80	2008	Pag ₀₈ 75	epitélio	insuficiente	insuficiente	negativo	propriedade vizinha, peessoas, água comum
81	2008	Pag ₀₈ 76	epitélio	insuficiente	insuficiente	positivo	desconhecida
82	2008	Pag ₀₈ 77	epitélio	insuficiente	insuficiente	positivo	desconhecida
83	2008	Pag ₀₈ 78	epitélio	insuficiente	insuficiente	positivo	estrada no interior ou periferia da propriedade, água comum
84	2008	Pag ₀₈ 79	epitélio	insuficiente	insuficiente	positivo	estrada no interior ou periferia da propriedade, água comum
85	2008	Pag ₀₈ 80	epitélio	insuficiente	insuficiente	positivo	estrada no interior ou periferia da propriedade, animais silvestres
86	2008	Pag ₀₈ 81	epitélio	insuficiente	insuficiente	positivo	estrada no interior ou periferia da propriedade, animais silvestres
87	2008	Pag ₀₈ 82	epitélio	insuficiente	insuficiente	negativo	estrada no interior ou periferia da propriedade, animais silvestres
88	2008	Pag ₀₈ 83	epitélio	insuficiente	insuficiente	positivo	estrada no interior ou periferia da propriedade, animais silvestres
89	2008	Pag ₀₈ 84	epitélio	positivo	positivo	positivo	estrada no interior ou periferia da propriedade
90	2008	Pag ₀₈ 85	epitélio	positivo	positivo	positivo	estrada no interior ou periferia da propriedade
91	2008	Pag ₀₈ 86	epitélio	positivo	positivo	positivo	estrada no interior ou periferia da propriedade
92	2008	Pag ₀₈ 87	epitélio	positivo	positivo	positivo	estrada no interior ou periferia da propriedade
93	2008	Pag ₀₈ 88	epitélio	insuficiente	insuficiente	positivo	propriedade vizinha, animais silvestres
94	2008	Pag ₀₈ 89	epitélio	insuficiente	insuficiente	negativo	propriedade vizinha, animais silvestres
95	2008	Pag ₀₈ 90	epitélio	insuficiente	insuficiente	positivo	animais silvestres
96	2008	Pag ₀₈ 91	epitélio	insuficiente	insuficiente	positivo	animais silvestres
97	2008	Pag ₀₈ 92	epitélio	insuficiente	insuficiente	positivo	veículo, peessoas (veterinários, empregados)
98	2008	Pag ₀₈ 93	epitélio	insuficiente	insuficiente	positivo	veículo, peessoas (veterinários, empregados)
99	2008	Pag ₀₈ 94	epitélio	insuficiente	insuficiente	negativo	desconhecida

(Continuação)

Nº amostras	Ano	REG. LVB	AMOSTRA	ME	Isolamento	PCR	Provável origem da doença
100	2008	Pag ₀₈ 95	epitélio	insuficiente	insuficiente	negativo	desconhecida
101	2008	Pag ₀₈ 96	epitélio	insuficiente	insuficiente	negativo	animais adquiridos de outras propriedades
102	2008	Pag ₀₈ 97	epitélio	insuficiente	insuficiente	negativo	peessoas (veterinários, empregados)
103	2008	Pag ₀₈ 98	epitélio	insuficiente	insuficiente	negativo	peessoas (veterinários, empregados)
104	2008	Pag ₀₈ 99	epitélio	insuficiente	insuficiente	negativo	propriedade vizinha, estrada no interior ou periferia da propriedade, água comum
105	2008	Pag ₀₈ 103	epitélio	insuficiente	insuficiente	negativo	animais adquiridos de outras propriedades
106	2008	Pag ₀₈ 104	epitélio	insuficiente	insuficiente	positivo	animais adquiridos de outras propriedades
107	2008	Pag ₀₈ 105	epitélio	insuficiente	insuficiente	positivo	animais adquiridos de outras propriedades
108	2008	Pag ₀₈ 106	epitélio	insuficiente	insuficiente	positivo	animais adquiridos de outras propriedades
109	2008	Pag ₀₈ 107	epitélio	insuficiente	insuficiente	negativo	animais adquiridos de outras propriedades
110	2008	Pag ₀₈ 109	epitélio	positivo	positivo	positivo	NI
111	2008	Pag ₀₈ 110	epitélio	positivo	contaminação bacteriana	positivo	NI
112	2008	Pag ₀₈ 111	epitélio	insuficiente	positivo	negativo	NI
113	2008	Pag ₀₈ 112	epitélio	insuficiente	positivo	positivo	animais adquiridos de outras propriedades
114	2008	Pag ₀₈ 113	epitélio	insuficiente	positivo	positivo	peessoas (veterinários, empregados)
115	2008	Pag ₀₈ 114	epitélio	insuficiente	positivo	positivo	peessoas (veterinários, empregados)
116	2008	Pag ₀₈ 117	epitélio	insuficiente	positivo	positivo	NI
117	2008	Pag ₀₈ 118	epitélio	insuficiente	negativo	negativo	NI
118	2008	Pag ₀₈ 119	epitélio	insuficiente	positivo	positivo	NI
119	2008	Pag ₀₈ 120	epitélio	insuficiente	negativo	negativo	NI
120	2008	Pag ₀₈ 125	epitélio	insuficiente	positivo	positivo	desconhecida
121	2008	Pag ₀₈ 126	epitélio	insuficiente	negativo	negativo	desconhecida
122	2008	Pag ₀₈ 128	epitélio	insuficiente	insuficiente	positivo	peessoas (veterinários, empregados)
123	2008	Pag ₀₈ 129	epitélio	insuficiente	insuficiente	positivo	peessoas (veterinários, empregados)
124	2008	Pag ₀₈ 130	epitélio	positivo	positivo	positivo	propriedade vizinha
125	2008	Pag ₀₈ 132	epitélio	positivo	positivo	positivo	desconhecida
126	2009	Pag ₀₉ 02	epitélio	positivo	positivo	positivo	NI

(Continuação)

Nº amostras	Ano	REG. LVB	AMOSTRA	ME	Isolamento	PCR	Provável origem da doença
127	2009	Pag ₀₉ 03	vesícula	positivo	insuficiente	positivo	desconhecida
128	2009	Pag ₀₉ 09	epitélio	negativo	negativo	negativo	animais adquiridos de outras propriedades
129	2009	Pag ₀₉ 12	epitélio	positivo	contaminação bacteriana	positivo	desconhecida
130	2009	Pag ₀₉ 13	epitélio	positivo	contaminação bacteriana	positivo	desconhecida
131	2009	Pag ₀₉ 14	epitélio	positivo	contaminação bacteriana	positivo	desconhecida
132	2009	Pag ₀₉ 15	epitélio	positivo	positivo	positivo	desconhecida
133	2009	Pag ₀₉ 16	epitélio	positivo	insuficiente	positivo	veículo, pessoas (veterinários, empregados)
134	2009	Pag ₀₉ 17	epitélio	positivo	insuficiente	positivo	veículo, pessoas (veterinários, empregados)
135	2009	Pag ₀₉ 18	epitélio	positivo	insuficiente	positivo	veículo, pessoas (veterinários, empregados)
136	2009	Pag ₀₉ 21	epitélio	positivo	positivo	positivo	propriedade vizinha
137	2009	Pag ₀₉ 26	epitélio	positivo	insuficiente	positivo	pessoas (veterinários, empregados)
138	2009	Pag ₀₉ 27	epitélio	positivo	insuficiente	positivo	pessoas (veterinários, empregados)
139	2009	Pag ₀₉ 28	epitélio	positivo	insuficiente	positivo	pessoas (veterinários, empregados)
140	2009	Pag ₀₉ 36	epitélio	positivo	insuficiente	positivo	propriedade vizinhaNI
141	2009	Pag ₀₉ 37	epitélio	positivo	insuficiente	positivo	desconhecida
142	2009	Pag ₀₉ 38	epitélio	positivo	insuficiente	positivo	pessoas (veterinários, empregados)
143	2009	Pag ₀₉ 46	epitélio	positivo	insuficiente	positivo	desconhecida
144	2009	Pag ₀₉ 47	epitélio	negativo	insuficiente	negativo	desconhecida
145	2009	Pag ₀₉ 48	epitélio	negativo	insuficiente	negativo	desconhecida
146	2009	Pag ₀₉ 49	epitélio	negativo	insuficiente	negativo	desconhecida
147	2009	Pag ₀₉ 50	epitélio	negativo	insuficiente	negativo	desconhecida
148	2009	Pag ₀₉ 51	epitélio	positivo	insuficiente	positivo	desconhecida
149	2009	Pag ₀₉ 55	epitélio	insuficiente	insuficiente	positivo	desconhecida
150	2009	Pag ₀₉ 56	epitélio	insuficiente	insuficiente	negativo	veículo, pessoas (veterinários, empregados)
151	2009	Pag ₀₉ 57	epitélio	insuficiente	insuficiente	positivo	veículo, pessoas (veterinários, empregados)
152	2009	Pag ₀₉ 58	epitélio	insuficiente	insuficiente	positivo	veículo, pessoas (veterinários, empregados)
153	2009	Pag ₀₉ 60	epitélio	insuficiente	insuficiente	positivo	pessoas (veterinários, empregados)

(Continuação)

Nº amostras	Ano	REG. LVB	AMOSTRA	ME	Isolamento	PCR	Provável origem da doença
154	2009	Pag ₀₉ 61	epitélio	insuficiente	insuficiente	negativo	peessoas (veterinários, empregados)
155	2009	Pag ₀₉ 62	epitélio	insuficiente	insuficiente	positivo	desconhecida
156	2009	Pag ₀₉ 63	epitélio	insuficiente	insuficiente	positivo	desconhecida
157	2009	Pag ₀₉ 64	epitélio	insuficiente	insuficiente	positivo	desconhecida
158	2009	Pag ₀₉ 65	epitélio	insuficiente	insuficiente	positivo	desconhecida
159	2009	Pag ₀₉ 66	epitélio	insuficiente	insuficiente	negativo	desconhecida
160	2009	Pag ₀₉ 67	epitélio	insuficiente	insuficiente	positivo	desconhecida
161	2009	Pag ₀₉ 68	epitélio	insuficiente	insuficiente	negativo	desconhecida
162	2009	Pag ₀₉ 69	epitélio	insuficiente	insuficiente	positivo	desconhecida
163	2009	Pag ₀₉ 70	epitélio	insuficiente	insuficiente	positivo	desconhecida
164	2009	Pag ₀₉ 116	epitélio	insuficiente	insuficiente	positivo	peessoas (veterinários, empregados)
165	2009	Pag ₀₉ 117	epitélio	insuficiente	insuficiente	negativo	peessoas (veterinários, empregados)
166	2009	Pag ₀₉ 139	epitélio	positivo	positivo	positivo	NI
167	2009	Pag ₀₉ 140	suabe	positivo	positivo	positivo	NI
168	2009	Pag ₀₉ 141	suabe	positivo	negativo	negativo	NI
169	2009	Pag ₀₉ 142	suabe	positivo	negativo	negativo	NI
170	2009	Pag ₀₉ 143	epitélio	positivo	contaminação bacteriana	negativo	NI
171	2009	Pag ₀₉ 144	epitélio	positivo	positivo	positivo	NI
172	2009	Pag ₀₉ 145	epitélio	positivo	positivo	positivo	NI
173	2009	Pag ₀₉ 147	epitélio	positivo	contaminação bacteriana	positivo	NI
174	2009	Pag ₀₉ 148	epitélio	positivo	positivo	positivo	NI
175	2009	Pag ₀₉ 149	epitélio	positivo	positivo	positivo	NI
176	2009	Pag ₀₉ 150	epitélio	positivo	positivo	positivo	NI
177	2009	Pag ₀₉ 151	epitélio	positivo	contaminação bacteriana	positivo	NI
178	2009	Pag ₀₉ 152	epitélio	positivo	positivo	positivo	NI
179	2009	Pag ₀₉ 153	epitélio	insuficiente	negativo	negativo	NI
180	2009	Pag ₀₉ 154	epitélio	positivo	positivo	positivo	NI

(Continuação)

Nº amostras	Ano	REG. LVB	AMOSTRA	ME	Isolamento	PCR	Provável origem da doença
181	2009	Pag09 155	epitélio	positivo	positivo	positivo	NI
182	2009	Pag09 156	epitélio	insuficiente	negativo	negativo	NI
183	2009	Pag09 157	epitélio	positivo	positivo	positivo	NI
184	2009	Pag09 158	epitélio	insuficiente	negativo	negativo	NI
185	2009	Pag09 159	epitélio	insuficiente	negativo	negativo	NI
186	2009	Pag09 160	epitélio	positivo	positivo	positivo	NI
187	2009	Pag09 161	epitélio	insuficiente	negativo	negativo	NI
188	2009	Pag09 162	epitélio	insuficiente	negativo	negativo	NI
189	2009	Pag09 163	epitélio	positivo	contaminação bacteriana	negativo	NI
190	2009	Pag09 164	epitélio	positivo	positivo	positivo	NI
191	2009	Pag09 165	epitélio	positivo	positivo	positivo	NI
192	2009	Pag09 166	epitélio	positivo	positivo	positivo	NI
193	2009	Pag09 167	epitélio	positivo	positivo	positivo	NI
194	2009	Pag09 168	epitélio	positivo	positivo	positivo	NI
195	2009	Pag09 169	epitélio	positivo	contaminação bacteriana	positivo	NI
196	2009	Pag09 170	epitélio	positivo	contaminação bacteriana	negativo	NI
197	2009	Pag09 171	epitélio	positivo	contaminação bacteriana	negativo	NI
198	2009	Pag09 172	epitélio	positivo	positivo	positivo	NI
199	2009	Pag09 173	epitélio	insuficiente	negativo	negativo	NI
200	2009	Pag09 174	epitélio	insuficiente	negativo	negativo	NI
201	2009	Pag09 175	epitélio	insuficiente	negativo	negativo	NI
202	2009	Pag09 198	epitélio	insuficiente	contaminação bacteriana	negativo	propriedade vizinha
203	2009	Pag09 199	epitélio	positivo	positivo	negativo	estrada no interior ou periferia da propriedade
204	2009	Pag09 200	epitélio	positivo	positivo	negativo	estrada no interior ou periferia da propriedade
205	2009	Pag09 201	epitélio	positivo	positivo	positivo	estrada no interior ou periferia da propriedade
206	2009	Pag09 212	epitélio	insuficiente	negativo	negativo	propriedade vizinha
207	2009	Pag09 213	epitélio	insuficiente	negativo	negativo	desconhecida

(Conclusão)

Nº amostras	Ano	REG. LVB	AMOSTRA	ME	Isolamento	PCR	Provável origem da doença
208	2009	Pag09 214	epitélio	positivo	positivo	positivo	propriedade vizinha
209	2009	Pag09 215	epitélio	positivo	positivo	positivo	propriedade vizinha
210	2009	Pag09 255	epitélio	insuficiente	negativo	negativo	desconhecida
211	2009	Pag09 256	epitélio	positivo	positivo	positivo	desconhecida
212	2009	Pag09 257	epitélio	positivo	positivo	positivo	desconhecida
213	2009	Pag09 258	epitélio	insuficiente	negativo	negativo	desconhecida
214	2009	Pag09 259	epitélio	insuficiente	negativo	negativo	desconhecida
215	2009	Pag09 262	epitélio	positivo	negativo	negativo	NI
216	2009	Pag09 263	epitélio	positivo	negativo	positivo	NI
217	2009	Pag09 264	epitélio	positivo	positivo	negativo	peessoas (veterinários, empregados)
218	2009	Pag09 265	epitélio	positivo	positivo	negativo	peessoas (veterinários, empregados)
219	2009	Pag09 309	epitélio	positivo	negativo	negativo	desconhecida
220	2009	Pag09 310	epitélio	insuficiente	negativo	positivo	desconhecida
221	2009	Pag09 312	epitélio	insuficiente	insuficiente	positivo	animais adquiridos de outras propriedades
222	2009	Pag09 313	epitélio	insuficiente	insuficiente	positivo	NI
223	2009	Pag09 314	epitélio	insuficiente	insuficiente	positivo	desconhecida
224	2009	Pag09 315	epitélio	insuficiente	insuficiente	positivo	desconhecida
225	2009	Pag09 316	epitélio	insuficiente	insuficiente	positivo	desconhecida
226	2009	Pag09 317	epitélio	insuficiente	insuficiente	positivo	desconhecida
227	2009	Pag09 318	epitélio	insuficiente	insuficiente	positivo	desconhecida