

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
VETERINÁRIA**

**VÍRUS DO ECTIMA CONTAGIOSO (ORFV):
AVALIAÇÃO DE VACINA PRODUZIDA EM CULTIVO
CELULAR, INVESTIGAÇÃO DE PERSISTÊNCIA
VIRAL E FILOGENIA DE AMOSTRAS BRASILEIRAS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Candice Schmidt

**Santa Maria, RS, Brasil
2012**

**VÍRUS DO ECTIMA CONTAGIOSO (ORFV): AVALIAÇÃO
DE VACINA PRODUZIDA EM CULTIVO CELULAR,
INVESTIGAÇÃO DE PERSISTÊNCIA VIRAL E FILOGENIA
DE AMOSTRAS BRASILEIRAS**

por

Candice Schmidt

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Área de concentração em Medicina Veterinária Preventiva, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária**

Orientador: Prof. Eduardo Furtado Flores

Santa Maria, RS, Brasil

2012

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
Aprova a Dissertação de Mestrado

**VÍRUS DO ECTIMA CONTAGIOSO (ORFV): AVALIAÇÃO DE
VACINA PRODUZIDA EM CULTIVO CELULAR, INVESTIGAÇÃO DE
PERSISTÊNCIA VIRAL E FILOGENIA DE AMOSTRAS BRASILEIRAS**

Elaborada por
Candice Schmidt

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária

Comissão Examinadora

Eduardo Furtado Flores, PhD, UFSM
(Presidente/orientador)

Charles Capinos Scherer, PhD, HIPRA

Mário Celso Sperotto Brum, Dr, UNIPAMPA

Santa Maria, 5 de março de 2012

AGRADECIMENTOS

Este espaço é dedicado àqueles que deram a sua contribuição para que esta dissertação fosse realizada. A todos vocês, deixo aqui o meu sincero agradecimento.

Agradeço inicialmente ao professor Eduardo Furtado Flores, orientador desta dissertação, pelo empenho, sabedoria, ensinamentos durante o desenvolvimento dos experimentos, e acima de tudo pela oportunidade de crescimento e pela confiança em mim depositada.

Ao professor Rudi Weiblen, pelo exemplo profissional, pelas sugestões, atenção, críticas, enfim pelos tantos ensinamentos que contribuíram muito para o meu crescimento profissional e pessoal.

Em especial, gostaria de agradecer aos meus queridos pais, Rosângela e Geraldo, assim como meu irmão Mateus e minha avó Terezinha, por terem me ensinado valores familiares, pelo amor incondicional e por sempre acreditarem em mim. Sou muito grata a vocês!

Aos colegas do Setor de Virologia da UFSM pela amizade, ajuda nos experimentos e que de uma forma ou outra contribuíram para a construção dessa dissertação

A todos os meus amigos e amigas que sempre estiveram presentes me aconselhando e incentivando com muito carinho e dedicação.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária, que forneceram o apoio necessário para realização desse trabalho.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

VÍRUS DO ECTIMA CONTAGIOSO (ORFV): AVALIAÇÃO DE VACINA PRODUZIDA EM CULTIVO CELULAR, INVESTIGAÇÃO DE PERSISTÊNCIA VIRAL E FILOGENIA DE AMOSTRAS BRASILEIRAS

AUTOR: CANDICE SCHMIDT
ORIENTADOR: EDUARDO FURTADO FLORES
Santa Maria, 5 de março de 2012

O ectima contagioso, também conhecido como *Orf*, é uma enfermidade contagiosa que afeta principalmente ovinos e caprinos e que está mundialmente distribuída. O agente da enfermidade, vírus do *Orf* (ORFV), é o protótipo do gênero *Parapoxvirus* (PPV), família *Poxviridae*. As vacinas atuais contra a doença apresentam eficácia questionável e são produzidas por métodos cruentos. Da mesma forma, a epidemiologia da infecção, especialmente os mecanismos utilizados pelo vírus para se perpetuar nos rebanhos e as suas possíveis variações genéticas e antigênicas são pouco conhecidas. Assim, os objetivos do presente trabalho foram: a. Desenvolvimento e teste de eficácia de uma vacina para o ORFV produzida em cultivo celular, b. Investigação da persistência viral em ovinos infectados experimentalmente, c. Análise filogenética de amostras brasileiras. O *capítulo 1* relata a produção e teste de eficácia de uma vacina produzida em cultivo celular. Para isto, a cepa IA-82 do ORFV foi submetida a 21 passagens em cultivo de células BHK-21 e usada para vacinar ovinos jovens (n=30), por escarificação cutânea na face interna da coxa. A vacinação produziu pústulas e crostas em 16 dos 30 ovinos vacinados, indicando imunização adequada em 53% dos animais. Noventa dias após a vacinação, ovinos vacinados (n=16) e controles (n=16) foram inoculados com uma cepa virulenta do ORFV ($10^{6,9}$ DICC₅₀/mL) após escarificação na comissura labial. Todos os animais desenvolveram lesões típicas de ectima, incluindo hiperemia, vesículas, pústulas e crostas. No entanto, os animais vacinados desenvolveram lesões mais leves e passageiras do que os controles, e os escores clínicos foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) entre os dias 10 e 22 pós-desafio. Além disso, o tempo de duração da doença foi significativamente inferior ($p < 0,05$) nos animais vacinados. Os animais vacinados também excretaram menor quantidade de vírus ($p < 0,05$) e por um período significativamente mais curto do que os controles (13,4 dias versus 22,6 dias, $p < 0,001$). Esses resultados demonstram a proteção parcial conferida pela vacina experimental e, dependendo da melhoria dos índices de imunização e proteção, são promissores no sentido da utilização de vacinas contra o ORFV produzidas em cultivo celular. O *capítulo 2* relata a investigação da persistência do ORFV em ovinos infectados experimentalmente. Para isto, ovinos inoculados com a cepa IA-82 foram submetidos a pesquisa de vírus e de DNA nas lesões a diferentes intervalos após a inoculação. A viabilidade do vírus também foi investigada em crostas de animais infectados mantidas à temperatura ambiente. Durante a infecção aguda, o vírus produziu lesões típicas de ectima em todos os animais inoculados (n=10), com duração de aproximadamente 22 dias. O vírus foi detectado continuamente nas lesões de todos os animais até o dia 24 pós inoculação (pi); quatro animais excretaram vírus até o dia 44 pi e um deles ainda excretava vírus no dia 51 pi. O vírus foi excretado em títulos de até $10^{5,5}$ DICC₅₀/ml, com picos de excreção viral entre os dias 10 e 12 pi. O DNA viral foi

detectado por PCR em biópsias coletadas de todos os animais no dia 37 pi, e em um animal o DNA viral foi detectado até o dia 79 pi. O vírus foi recuperado, por isolamento viral, nas crostas mantidas a temperatura ambiente por até seis meses após a coleta. Esses resultados demonstram que o ORFV pode persistir e ser excretado por longo período em animais infectados, mesmo após a resolução clínica das lesões. O *capítulo 3* relata a análise filogenética de nove amostras brasileiras de ORFV obtidas de ovinos e caprinos entre 2008 e 2011, além de três cepas vacinais. A sequência parcial do gene B2L, que codifica para uma proteína de envelope altamente imunogênica, foi amplificada por PCR e o fragmento gerado (594 bp) foi submetido ao sequenciamento. A análise das sequências revelou que as amostras brasileiras possuem um alto grau de similaridade, quando comparados entre si e com as cepas vacinais. As amostras brasileiras apresentaram um grau de similaridade de nucleotídeos de 97,7 a 100% e de aminoácidos de 96,1 a 100%. Quando comparadas com as cepas vacinais, as amostras analisadas apresentaram um grau de similaridade de nucleotídeos de 98,7 a 100% e de aminoácidos de 97,7 a 100%. A análise filogenética baseada na sequência deduzida de aminoácidos mostrou que as amostras de ovinos se agruparam junto com as cepas vacinais, e as amostras de caprinos se agruparam separadamente. Conjuntamente, esses resultados contribuem para o conhecimento acerca da biologia e epidemiologia do ORFV, e são promissores no sentido do uso de vacinas produzidas em cultivo celular.

Palavras-chave: ORFV, vacina, persistência, filogenia.

ABSTRACT

Master's Dissertation
Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

CONTAGIOUS ECTHYMA VIRUS: EVALUATION OF A VACCINE PRODUCED IN TISSUE CULTURE, INVESTIGATION OF VIRAL PERSISTENCE AND PHYLOGENY OF BRAZILIAN STRAINS

AUTHOR: CANDICE SCHMIDT
ADVISER: EDUARDO FURTADO FLORES
Santa Maria, march 5th 2012.

Contagious ecthyma, also known as *orf*, is an infectious disease of sheep and goats caused by orf virus (ORFV), the prototype of the genus *Parapoxvirus* (PPV) of the family *Poxviridae*. Current vaccines against the disease contain virulent virus, are empirically produced through skin scarification of live lambs and present questionable efficacy. Likewise, the epidemiology of the infection, especially the mechanisms used by the virus to be perpetuated in herds and possible genetic and antigenic variations are poorly understood. Thus, the objectives of this study were: a. Development and efficacy testing of a vaccine produced in tissue culture; b. Investigation of viral persistence in experimentally infected lambs and, c. Phylogenetic analysis of Brazilian strains. *Chapter 1* describes the development and testing of a ORFV vaccine produced in tissue culture. For this, ORFV strain IA-82 was submitted to 21 passages in BHK-21 cells and used to immunize lambs (n=30) through skin scarification of the internal face of the hind limb. Vaccination produced localized pustules and scabs lesions in 16 out of 30 animals, indicating an adequate replication of the vaccine virus. Ninety days after vaccination, vaccinated (n=16) and control lambs (n=16) were inoculated with a virulent ORFV strain in the labial commissure. Vaccinated and control lambs developed typical orf lesions, characterized by hyperemia, vesicles, pustules and scab formation. Nonetheless, vaccinated animals developed milder lesions compared to controls and the clinical scores were significantly lower (p<0.05) between days 10 and 22 post-challenge. In addition, the mean duration of clinical disease was significantly reduced in vaccinated animals (p<0.05). Furthermore, vaccinated animals excreted much less virus (p<0.05) and for a significantly shorter period of time than did the controls (13.4 days versus 22.6 days, p<0.001). These results demonstrate partial protection by the experimental vaccine and, upon improvement of immunization and protection indices, are promising towards the use of tissue culture-based ORFV vaccines. *Chapter 2* presents the investigation of ORFV persistence in experimentally infected lambs. For this, infected lambs were monitored for virus and viral DNA at different intervals after infection. Concomitantly, virus viability in scabs maintained at environmental temperatures was monitored. During acute infection, virus produced typical lesions of ecthyma in all inoculated lambs (n=10), with lesions during over 22 days. Infectious virus was recovered from lesions in titers up to 10^{5.5} TCID₅₀/ml, with peaks of virus excretion between days 10 and 12 post inoculation (pi). The virus was detected continuously in lesions of all animals up to day 24 pi; four lambs shed virus until day 44 pi and one up to day 51 pi. Viral DNA was detected by PCR in all skin biopsies up to day 37 pi, in four animals at day 51, in three animals at day 65 and one at day 79 pi. Infectious virus was detected in scabs maintained under environmental temperatures for up to 6 months. These results demonstrate that ORFV may be maintained and excreted for a long period by infected animals. *Chapter 3*

presents the sequence analysis of the major envelope glycoprotein gene (B2L) of nine Brazilian ORFV strains from sheep and goats obtained between 2008 and 2011 and three vaccine strains. Comparative sequence analysis revealed that Brazilian strains were highly related among themselves and with vaccine strains. Brazilian strains shared 97.7- 100% and 96.1-100% sequence identity of nucleotides and amino acids, respectively. With vaccine strains, Brazilian ORFVs showed 98.7-100% nucleotide identity and 97.7-100% amino acid similarity. Phylogenetic analysis based on deduced amino acid sequences showed that the Brazilian strains from sheep and vaccine strains clustered in the same branches; goat strains clustered into a separate branch. In summary, the obtained results contribute to the knowledge about the ORFV biology and epidemiology and are promising towards the use of a tissue culture based vaccine.

Keywords: ORFV, vaccine, persistence, phylogeny.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- FIGURA 1 (Fig.1) - Lesões na comissura labial de ovinos desafiados com uma amostra virulenta do ORFV..... 34
- FIGURA 2 (Fig.2) - Médias diárias dos escores clínicos do grupo vacinado e do grupo controle após o desafio com um isolado virulento do ectima contagioso..... 35
- FIGURA 3 (Fig.3) - Número de animais excretando vírus nas lesões, após inoculação com uma amostra virulenta do ORFV..... 36
- FIGURA 4 (Fig.4) - Títulos virais médios detectados nas lesões da comissura labial de animais inoculados com ORFV..... 37

CAPÍTULO 3

- FIGURA 1 (Fig.1) -Phylogenetic analysis of parapoxviruses based on the amino acid sequence of B2L gene product. The phylogenetic relationship was constructed by using the Neighbor-joining method of MEGA version 5.0..... 61

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

| | |
|---|----|
| TABELA 1 (Table 1) - Detection of virus and viral DNA in lambs experimentally infected with contagious ecthyma virus..... | 47 |
|---|----|

CAPÍTULO 3

| | |
|---|----|
| TABELA 1 (Table 1) - Origin of orf viruses submitted to phylogenetic analysis based on B2L gene..... | 60 |
| TABELA 2 (Table 2) - Nucleotide and deduced amino acid sequence identity of B2L gene among Brazilian orf viruses and vaccine strains..... | 62 |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 12 |
| 2. CAPÍTULO 1. VACINA EXPERIMENTAL PRODUZIDA EM CULTIVO CELULAR CONFERE PROTEÇÃO PARCIAL CONTRA O ECTIMA CONTAGIOSO EM OVINOS..... | 17 |
| Abstract..... | 18 |
| Resumo..... | 19 |
| Introdução..... | 20 |
| Material e métodos..... | 22 |
| Resultados..... | 26 |
| Discussão..... | 27 |
| Referências..... | 32 |
| 3. CAPÍTULO 2. PERSISTENCE OF CONTAGIOUS ECTHYMA VIRUS IN EXPERIMENTALLY INFECTED SHEEP..... | 38 |
| Abstract..... | 39 |
| Resumo..... | 40 |
| Texto..... | 41 |
| References..... | 45 |
| 4. CAPÍTULO 3. PHYLOGENETIC ANALYSIS OF BRAZILIAN ORF VIRUSES FROM SHEEP AND GOATS..... | 48 |
| Abstract..... | 49 |
| Introduction..... | 50 |
| Material and methods..... | 52 |
| Results and discussion..... | 54 |
| References..... | 57 |
| 5. CONCLUSÕES..... | 63 |
| 6. REFERÊNCIAS..... | 64 |

1. INTRODUÇÃO

O ectima contagioso, também conhecido como *orf* ou dermatite pustular contagiosa, é uma enfermidade debilitante que afeta principalmente ovinos e caprinos. Ocasionalmente, uma forma mais branda da enfermidade pode ser observada em pequenos ruminantes silvestres e humanos (HAIG & MERCER, 1998; CANAL, 2007). A denominação da enfermidade deriva de uma expressão inglesa antiga para *aspecto rugoso*, que se constitui em uma das características clínicas das lesões (CANAL, 2007). O ectima é uma doença zoonótica, que ocasionalmente afeta pessoas que tem contato com animais doentes (HAIG & MERCER, 1998).

O agente etiológico do ectima é um *Parapoxvirus* (PPV), chamado de vírus do Orf (ORFV), que pertence à subfamília *Chordopoxvirinae* da família *Poxviridae*. Outros membros desse gênero incluem o vírus da pseudovariola (*pseudocowpox virus*, PCPV) e o vírus da estomatite papular bovina (BPSV), associados à lesões de pele em bovinos (HAIG, 2006). Os PPVs são genética e antigenicamente relacionados, e apresentam grande similaridade na organização genômica e mecanismos de virulência (FLEMING et al., 1993). O genoma do ORFV consiste de uma molécula de DNA de fita dupla com 134 a 139 Kb (CHAN et al., 2007).

Dentre os membros do gênero PPV, o ORFV é o patógeno mais importante em animais de interesse econômico (BUTTNER & RZIHA, 2002). A infecção pelo ORFV possui distribuição mundial, sendo endêmica na maioria dos países que possuem criações comerciais de ovinos e caprinos (ROBINON & BALASSU, 1981). A estimativa da soroprevalência da infecção pelo ORFV é prejudicada pelo fato do vírus induzir baixos níveis de anticorpos neutralizantes, de difícil detecção em testes de soroneutralização (HAIG & MERCER, 1998). Por esse motivo a prevalência tem sido estimada com base em relatos de ocorrência da doença em rebanhos (ROBINSON & BALASSU, 1983) ou por meio de testes sorológicos imunoenzimáticos, como na Arábia Saudita e na Turquia, onde a soroprevalência observada foi de 60% e 52,8%, respectivamente (HOUSAWI et al., 1992; GÖKCE et al., 2005).

A enfermidade ocorre principalmente em ovinos e caprinos jovens, sendo mais frequente logo após o nascimento e entre os três e quatro meses de idade, causando uma condição debilitante, por diminuir a habilidade dos animais se alimentarem (FLEMING & MERCER, 2007). Embora a mortalidade seja relativamente baixa, a morbidade é alta, podendo afetar mais de 90% dos animais do rebanho. No Brasil, surtos da enfermidade tem sido frequentemente descritos (MAZUR & MACHADO, 1990; NÓBREGA et al., 2008;

MACÊDO et al., 2008; ABRAHÃO et al., 2009), indicando a ampla circulação do vírus. No Rio Grande do Sul, um surto da doença envolvendo ovinos esteve relacionado ao modo de alimentação desses animais. Neste estudo, a fonte de infecção não foi determinada, mas a infecção e a disseminação da doença parecem ter sido facilitadas pelo hábito dos animais de se alimentarem com a planta caraguatá (*Tillandsia usneoides*) que, devido aos seus espinhos, teria promovido abrasões e escarificações ao redor da boca e narinas dos ovinos (SALLES et al., 1992). Na região do semi-árido da Paraíba foram acompanhados diversos surtos de ectima contagioso em ovinos e caprinos, com casos de lesões em humanos. Os animais jovens eram os mais afetados, apresentando lesões crostosas, principalmente na comissura labial e plano naso-labial. Animais adultos apresentavam lesões especialmente no úbere e tetos. Em humanos, as lesões eram restritas aos dedos das mãos do tratador dos animais (MACÊDO et al., 2008; NÓBREGA Jr et al., 2008). Além dos relatos publicados, a ampla ocorrência do ectima é confirmada por inúmeros relatos informais de produtores e Médicos Veterinários.

A disseminação da infecção entre os animais é rápida, e a transmissão pode ocorrer pelo contato direto com os animais infectados, com as crostas das lesões eliminadas no solo ou com alimentos e pasto contaminados (FLEMING & MERCER, 2007). Animais lactentes também podem transmitir o vírus para os tetos e úbere de suas mães durante a amamentação, acarretando o desenvolvimento de lesões nesses locais e, conseqüentemente, na transmissão do vírus para outros animais do rebanho (FLEMING & MERCER, 2007). Um conceito clássico da epidemiologia da infecção pelo ORFV é que cordeiros jovens se contaminam pelo contato com as crostas contaminadas eliminadas no ambiente pelos animais infectados no ano anterior (ROBINSON & BALASSU, 1981). McKEEVER & REID (1986) demonstraram que isso somente é possível quando as crostas ficam em locais secos, como em galpões de parto. Quando expostas às condições ambientais, como sol e chuva, os vírions presentes nas crostas parecem perder rapidamente a infectividade e, por isso, o papel das crostas como fontes de infecção para novos surtos tem sido questionado (McKEEVER & REID, 1986).

Outro possível mecanismo de manutenção do vírus nos rebanhos seria a excreção esporádica ou contínua de vírus por animais previamente infectados (NETTLETON et al., 1996). Animais imunodeprimidos e persistentemente infectados também podem desempenhar um importante papel na manutenção do ORFV na natureza (YERUHAM et al., 2000). Não obstante, os mecanismos que o ORFV utiliza para se manter nos rebanhos, infectando sucessivas gerações de ovinos, ainda permanecem obscuros (REID, 1991).

A importância da infecção subclínica como forma de perpetuação do ORFV na natureza tem sido considerada. Nesse sentido, NETTLETON et al. (1996) descreveram um

surto de ectima, em que animais clinicamente saudáveis transmitiram o vírus para ovinos susceptíveis. No entanto, evidências da disseminação do vírus por animais clinicamente saudáveis são bastante limitadas.

Em geral, as lesões resultantes da infecção pelo ORFV são proliferativas e nodulares e se restringem ao epitélio dos lábios, narinas e mucosa oral (HOSAMANI et al., 2009). Após penetrar através de abrasões na pele, junção mucocutânea dos lábios ou mucosa oral (FLEMING & MERCER, 2007), o vírus replica localmente nas células da epiderme (HAIG, et al., 1997). Observações feitas por McKEEVER et al. (1988) indicam que as células alvo para a replicação do ORFV são os queratinócitos em estágio de diferenciação, e que o requisito básico para a infecção não é a destruição da epiderme por si, mas a proliferação dos queratinócitos associada com o processo de reparo tecidual. O período de incubação varia entre dois e seis dias (CANAL, 2007), e as lesões progridem pelos estádios de eritema, mácula, pápula, vesícula, pústula e crosta (HAIG, 2006; FLEMING & MERCER, 2007; CANAL, 2007). Lesões adjacentes podem coalescer e com a progressão da doença culminam com a formação de crostas (BUTTNER & RZIHA, 2002; CANAL, 2007; FLEMING & MERCER 2007). As lesões crostosas são salientes e frequentemente apresentam rachaduras e sangramento, podendo predispor a infecções secundárias e miíases (CANAL, 2007). De maneira geral, a resolução das lesões em infecções primárias ocorre em quatro a seis semanas (HAIG et al., 1997; HAIG, 2006; FLEMING & MERCER, 2007). As lesões resultantes da reinfeção progridem pelos mesmos estádios, mas geralmente são menores, não proliferativas e se resolvem mais rapidamente (HAIG & McINNES, 2006).

Não existem evidências de disseminação sistêmica do ORFV (HAIG & McINNES, 2006). A resposta imune a infecção e à reinfeção pelo ORFV tem sido estudada extensivamente. Entretanto, muitos aspectos dessa complexa interação vírus-hospedeiro ainda são desconhecidos, e o fato da imunidade gerada pelo ORFV ser de curta duração dificulta mais ainda o entendimento dessa interação (FLEMING & MERCER, 2007). Evidências sugerem que a imunidade celular desempenha papel mais importante do que a imunidade humoral na proteção contra a infecção pelo ORFV (FLEMING & MERCER, 2007). Embora a resposta imune à infecção pelo ORFV seja aparentemente eficiente, um fato marcante é a habilidade do vírus em reinfectar e replicar repetidamente em seus hospedeiros (HAIG & MERCER, 1998). Dentre as possíveis explicações para este fato, convém destacar: a infecção é aguda e aparentemente restrita aos queratinócitos da epiderme, o que permite ao vírus uma replicação inicial anterior ao recrutamento dos mecanismos efetores da imunidade antiviral; a infecção pode não estimular uma resposta protetora; ou o vírus utiliza mecanismos para

subverter ou interferir com componentes do sistema imune, conforme já foi demonstrado para os poxvírus (HAIG et al., 1997).

O ectima tem grande importância econômica devido a sua natureza endêmica em muitas regiões. Reinfecções de alguns indivíduos, inabilidade da vacina em conferir proteção completa e a persistência do vírus por longos períodos no ambiente, são fatores que dificultam o controle da enfermidade (HOSAMANI et al., 2009). O desenvolvimento de uma estratégia imunoprolática é crucial para o controle do ectima contagioso, entretanto o objetivo primário da vacinação é apenas reduzir a severidade e a duração do curso clínico da doença, uma vez que não existe uma vacina capaz de prevenir completamente a ocorrência das lesões.

Vacinas vivas elaboradas com cepas virulentas do ORFV têm sido utilizadas com esta finalidade em vários países (HOSAMANI et al., 2009). No Brasil, as vacinas são produzidas a partir de crostas infectivas, coletadas de cordeiros previamente escarificados e inoculados com ORFV. Este método de produção é cruento e, por isso, tem sido contestado por pesquisadores e entidades ligadas ao bem estar animal. No entanto, em alguns países como a Alemanha, vacinas já são produzidas em cultivo celular. O vírus originalmente isolado de ovinos foi adaptado, amplificado e atenuado por sucessivas passagens em células Vero (COTTONE, 1998). Essas vacinas têm se mostrado eficientes, produzindo lesões brandas após imunização, e promovendo imunidade por aproximadamente 4 a 6 meses (HOSAMANI et al., 2009). GREIG (1956) demonstrou que o ORFV é capaz de propagar-se em monocamadas de células de pele de embriões de ovino. Da mesma forma, cultivos celulares primários de testículos ovino (BUDDLE et al., 1984; PYE, 1990), e de corneto etmoidal ovino (DELHON et al., 2004) são susceptíveis ao ORFV. A produção de uma vacina em larga escala, no entanto, necessita a adaptação do vírus em linhagens celulares.

Estudos filogenéticos fornecem informações relevantes sobre genótipos de ORFV circulantes em diferentes regiões (ZHAO et al., 2010). O gene que codifica a proteína maior do envelope (B2L) vem sendo muito utilizado para caracterização molecular e análise filogenética dos ORFV. Este é um gene bem conservado, que se constitui em um importante alvo molecular dos PPV, e além disso, existem várias sequências disponíveis no GenBank (HOSAMANI et al., 2006; ABRAHÃO et al., 2009; ZHAO et al., 2010).

Isolados de ORFV tem sido caracterizados em muitos países, entretanto poucos estudos foram realizados no sentido de caracterizar geneticamente isolados circulantes no Brasil (MAZUR et al., 2000). Alguns trabalhos encontraram uma alta identidade entre as sequências do gene B2L dos ORFV (HOSAMANI et al. 2006; LOJKIC et al. 2010), Entretanto, um estudo comparando 2 isolados Brasileiros de ORFV mostrou uma certa variação entre as

sequências desse mesmo gene, sugerindo que existem diferenças genéticas entre isolados brasileiros (ABRAHÃO et al., 2009).

No Brasil, a ampla disseminação e os prejuízos causados pelo ORFV não são acompanhados de estudos epidemiológicos e medidas adequadas de combate à enfermidade. As vacinas atuais são confeccionadas por métodos empíricos, com as restrições inerentes. Da mesma forma, pouco se conhece sobre a epidemiologia e variabilidade genética e antigênica dos isolados de campo. Nesse sentido, este trabalho teve como objetivos: a. Desenvolver e avaliar uma vacina para ORFV produzida em cultivo celular, b. Investigar a persistência do vírus em ovinos infectados experimentalmente, c. Analisar filogeneticamente amostras de ORFV obtidas entre 2008 e 2011. O *Capítulo 1* relata a produção e avaliação de uma vacina contra o ORFV produzida em cultivo celular; o *Capítulo 2* descreve a investigação da persistência do ORFV em ovinos infectados experimentalmente, e o *Capítulo 3* relata a análise filogenética de amostras brasileiras do ORFV, com base na sequência parcial do gene B2L.

2. CAPÍTULO 1

Vacina experimental produzida em cultivo celular confere proteção parcial contra o ectima contagioso em ovinos¹

Candice Schmidt², Juliana Felipetto Cargnelutti², Mathias Martins², Rudi Weiblen² e Eduardo Furtado Flores^{2*}

(Artigo publicado na revista *Pesquisa Veterinária Brasileira* – 2011)

² Setor de Virologia, Departamento de Microbiologia e Parasitologia e Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

* Autor para correspondência: E.F. Flores, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil, 97105-900. Fone/fax + (55) 55 3220-8034. E-mail: eduardofurtadoflores@gmail.com

ABSTRACT.- Schmidt C., Cargnelutti J.F., Martins M., Weiblen R. & Flores E.F. **2012.** [Experimental vaccine produced in tissue culture confers partial protection against contagious ecthyma in sheep.] Vacina experimental produzida em cultivo celular confere proteção parcial contra o ectima contagioso em ovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 32(1):11-16. Setor de Virologia, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima 1000, Camobi, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil. E-mail: eduardofurtadoflores@gmail.com

Contagious ecthyma, also known as orf, is a debilitating disease of sheep and goats caused by the parapoxvirus, orf virus (ORFV). Vaccination has been used with relative success to reduce the losses caused by the disease, yet the current vaccines contain virulent virus, are empirically produced through skin scarification of live lambs, and present questionable efficacy. Therefore, the present study aimed at developing and testing an experimental ORFV vaccine produced in tissue culture. The ORFV strain IA-82 was submitted to 21 passages in BHK-21 cells and then used to immunize lambs (n=30) through skin scarification of the internal face of the hind limb. Vaccination produced localized pustules and scabs lesions in 16 out of 30 animals, indicating an adequate replication of the vaccine virus. Ninety days after vaccination, vaccinated (n=16) and control lambs (n=16) were inoculated with a virulent ORFV strain in the labial commissure. Vaccinated and control lambs developed typical orf lesions, characterized by hyperemia, vesicles, pustules and scab formation. Nonetheless, vaccinated animals developed milder lesions compared to controls and the clinical scores were significantly lower ($p<0.05$) between days 10 and 22 post-challenge. In addition, the mean duration of clinical disease was significantly reduced in vaccinated animals ($p<0.05$). Furthermore, vaccinated animals excreted much less virus ($p<0.05$) and for a significantly shorter period of time than did the controls (13.44 days versus 22.63 days, $p<0.001$). These results demonstrate partial protection by the experimental

vaccine and, upon improvement of immunization and protection indices, are promising towards the use of tissue culture-based ORFV vaccines.

INDEX TERMS: Contagious ecthyma, orf, sheep, vaccine, tissue culture.

RESUMO.- O ectima contagioso (também conhecido como *orf*), é uma doença debilitante de ovinos e caprinos causada pelo vírus do orf (ORFV). A vacinação tem sido usada com relativo sucesso no controle da doença. No entanto, as vacinas atuais contêm amostras virulentas do agente, são produzidas por escarificação cutânea de animais, e apresentam eficácia questionável. Assim, o presente trabalho teve como objetivo produzir e testar a eficácia de uma vacina experimental produzida em cultivo celular. A cepa IA-82 do ORFV foi submetida a 21 passagens em cultivo de células BHK-21 e usada para vacinar ovinos jovens (n=30), por escarificação cutânea na face interna da coxa. A vacinação produziu pústulas e crostas em 16 dos 30 ovinos vacinados, indicando imunização adequada. Noventa dias após a vacinação, ovinos vacinados (n=16) e controles (n=16) foram inoculados com uma cepa virulenta do ORFV ($10^{6.9}$ DICC₅₀/mL) após escarificação na comissura labial. Todos os animais desenvolveram lesões típicas de ectima, incluindo hiperemia, vesículas, pústulas e crostas. No entanto, os animais vacinados desenvolveram lesões mais leves e passageiras do que os controles, e os escores clínicos foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) entre os dias 10 e 22 pós-desafio. Além disso, o tempo de duração da doença foi significativamente inferior ($p < 0,05$) nos animais vacinados. Os animais vacinados também excretaram menor quantidade de vírus ($p < 0,05$) e por um período significativamente mais curto do que os controles (13,44 dias versus 22,63 dias, $p < 0,001$). Esses resultados demonstram a proteção parcial conferida pela vacina experimental e, dependendo da melhoria dos índices de imunização e proteção,

são promissores no sentido da utilização de vacinas contra o ORFV produzidas em cultivo celular.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Ectima contagioso, orf, ovinos, vacina, cultivo celular.

INTRODUÇÃO

O ectima contagioso, também conhecido como “orf” (do inglês: aspecto rugoso), estomatite pustular contagiosa ou dermatite pustular contagiosa, é uma enfermidade debilitante de ovinos e caprinos, e que ocasionalmente acomete o homem (Haig & Mercer 1998). A doença é causada pelo vírus do orf (ORFV), um vírus DNA, pertencente ao gênero *Parapoxvirus*, da família *Poxviridae* (Hosmarini et al. 2009). O ORFV possui distribuição mundial, e afeta principalmente ovinos e caprinos jovens, nos quais produz lesões inflamatórias proliferativas ao redor da boca e das narinas (Haig 2006). As lesões são progressivas e debilitantes, reduzindo a capacidade dos animais se alimentarem (Haig 2006, Fleming & Mercer 2007). Embora a mortalidade seja relativamente baixa, a ocorrência da infecção em um rebanho afetado pode chegar a 90%. A disseminação da infecção dentro do rebanho é rápida e pode ocorrer pelo contato direto entre animais ou pelo contato com crostas das lesões que ficam no ambiente (Fleming & Mercer 2007).

Em geral, as lesões da infecção pelo ORFV são confinadas ao epitélio dos lábios, narinas e mucosa oral (Haig 2006). Animais lactentes podem transmitir o vírus para os tetos e úbere de suas mães durante a amamentação, acarretando no desenvolvimento de lesões mamárias, e da mesma forma, animais que possuem lesões nos tetos podem transmitir o vírus para os cordeiros que estão sendo amamentados (Fleming & Mercer 2007). Após penetrar por abrasões na pele, junção mucocutânea dos lábios ou mucosa oral (Fleming & Mercer 2007), o vírus replica localmente nos queratinócitos em regeneração da epiderme (McKeever et al.

1988). O período de incubação da doença varia entre dois e seis dias, e as lesões progridem pelos estádios de eritema, máculas, pápulas, vesículas, pústulas e crostas (Haig 2006, Fleming & Mercer 2007). As lesões crostosas são proliferativas e, frequentemente, apresentam rachaduras e sangramento, podendo predispor a infecções secundárias e miíases (Haig 2006, Fleming & Mercer 2007). A resolução das lesões em infecções primárias, geralmente ocorre em quatro a seis semanas, enquanto que em re-infecções a resolução é mais rápida (Haig 2006, Fleming & Mercer 2007). Não existem evidências de disseminação sistêmica desse vírus (Haig 2006).

O ectima contagioso está amplamente difundido nos rebanhos ovino e caprinos do Brasil, e vários relatos têm sido publicados, alguns com comprometimento humano (Salles et al. 1992, Nóbrega Jr et al. 2008). Há relatos de surtos em rebanhos de ovinos no Rio Grande do Sul (Salles et al. 1992), em São Paulo (Langoni et al. 1995, Catroxo et al. 2002), e na Paraíba, onde o surto teve envolvimento de ovinos, caprinos e humanos (Nóbrega Jr et al. 2008). No nordeste, desde a década de 1930, a enfermidade é um dos principais problemas sanitários da exploração caprina, por acometer cerca de 60% das criações (Torres 1939).

Embora não confira proteção clínica completa, a vacinação tem sido utilizada com relativo sucesso no controle da doença em vários países. A dificuldade de se obter proteção completa deve-se a capacidade do vírus de re-infectar os seus hospedeiros, apesar da resposta à infecção (Haig 2006, Fleming & Mercer 2007). Diferentes tipos de vacinas contra o ORFV já foram produzidas, mas a vacina que contém o vírus replicativo, sem prévia atenuação, ainda é a mais utilizada em vários países (Nandi et al. 2011), inclusive no Brasil (Canal 2007). Essa vacina é produzida à partir de crostas infectivas, coletadas de animais previamente escarificados e inoculados com ORFV virulento. No entanto, este método apresenta várias restrições que limitam a sua aceitação, incluindo: i. método cruento de produção, envolvendo uso de animais; ii. possibilidade de contaminantes na vacina (Buddle et al. 1984);

iii. dificuldade de obtenção de doses em grande escala; iv. virulência do vírus vacinal, que pode causar a doença quando transmitido pelos animais vacinados (Musser et al. 2008). Vacinas com o vírus amplificado em cultivo celular têm sido desenvolvidas e utilizadas como alternativa (Pye 1990, Nettleton et al. 1996). Algumas dessas vacinas têm se mostrado relativamente eficazes e seguras, produzem apenas lesões brandas após escarificação, e promovem imunidade por aproximadamente 4 a 6 meses (Nettleton et al. 1996, Hosmarini et al. 2009). No entanto, a eficácia das vacinas contra o ectima em geral, e aquelas produzidas em cultivo celular em especial, ainda é questionada (Buddle et al. 1984).

Já foi demonstrado que o ORFV pode ser adaptado a replicar em vários tipos de células, incluindo células de pele de embriões de ovino (Greig 1956), em cultivos primários de testículo ovino (Buddle et al. 1984, Pye 1990), de rim e pulmão ovino (Pye 1990), de corneto etmoidal ovino (Delhon et al. 2004) e de linhagem de rim fetal ovino (Musser et al. 2008), entre outras. Assim, esse trabalho teve como objetivos adaptar a cepa IA82 do ORFV em células BHK-21 (*Baby Hamster Kidney*) e, subsequentemente, avaliar a proteção frente a desafio conferida pela imunização de ovinos com o vírus produzido em cultivo celular.

MATERIAL E MÉTODOS

Desenho experimental. Foram utilizados 46 ovinos, machos e fêmeas, das raças Ideal e Corriedale, com idade entre três e quatro meses, provenientes de uma propriedade sem histórico clínico de ectima contagioso há pelo menos oito anos. Inicialmente, 30 animais foram imunizados pela via intradérmica com a vacina experimental. A reação vacinal foi avaliada 10 dias após, e apenas os animais que apresentaram reação vacinal local foram incluídos na segunda fase do experimento. Estes animais (G1=16), e outros 16 controles não-vacinados (G2) foram desafiados por escarificação da comissura labial seguida da inoculação

com um isolado de campo de ORFV, 90 dias após a vacinação. Após o desafio, realizou-se a avaliação clínica e coleta de suabes para isolamento e quantificação viral.

Células e vírus. Células de linhagem BHK-21 foram utilizadas para a amplificação do vírus vacinal. Células primárias de corneto etmoidal ovino (CEO) foram utilizadas para isolamento e quantificação viral a partir das lesões. As células foram cultivadas em meio essencial mínimo (MEM), contendo penicilina (1,6 mg/l), estreptomicina (0,4mg/l), anfotericina B (2,25mg/l), e suplementadas com 10% de soro fetal bovino (SFB). A cepa IA-82 foi utilizada como vírus vacinal. Esta cepa foi isolada de secreções nasais de um ovino com ectima no estado de Iowa, EUA em 1982 e cedida pelo Dr. Daniel Rock (College of Veterinary Medicine, University of Illinois em Urbana-Champaign, USA). As crostas utilizadas para o desafio foram coletadas de um surto de ectima em um rebanho ovino no município de Canguçu, no Rio Grande do Sul.

Vacina experimental e imunização. A cepa ORFV IA-82 foi adaptada por 21 passagens em células BHK-21. Os cultivos infectados (passagem 21), foram então submetidos a três ciclos de congelamento e descongelamento, centrifugados e o sobrenadante foi utilizado como vacina. O inóculo vacinal continha um título de 10^6 DICC₅₀/ml (doses infectantes para 50% do cultivo celular). Inicialmente, 30 ovinos foram inoculados na parte interna da coxa, após escarificação cutânea em uma área aproximada de 2x2cm, com 200µl do vírus vacinal. Para a escarificação, utilizou-se um dispositivo metálico comercializado com as vacinas comerciais. Dez dias após a imunização, os animais foram examinados para investigarem-se as lesões resultantes da inoculação, denominadas empiricamente de “pega”. Os animais que não desenvolveram lesão vacinal foram excluídos do experimento. Somente os animais que apresentaram lesões sugestivas de replicação viral após a vacinação (n=16) foram incluídos no restante do estudo, constituindo o grupo vacinado (G1). Outros 16 animais, não vacinados, permaneceram como grupo controle (G2). Noventa dias após a vacinação, os animais de

ambos os grupos (G1 e G2) foram desafiados pela inoculação de um isolado de campo na comissura labial.

Desafio e monitoramento clínico. Para o desafio, foram utilizadas crostas de ectima contagioso provenientes de um surto ocorrido em Canguçu, no RS. As crostas foram maceradas e ressuspensas em MEM na proporção de 1:5 peso/volume. Após centrifugação a 2.500 rpm por 7 min coletou-se o sobrenadante, que foi titulado em células CEO e utilizado com inóculo. O vírus do desafio (400µl da suspensão de crostas) foi inoculado na junção mucocutânea da comissura labial após escarificação com agulha hipodérmica (título de $10^{6,9}$ DICC₅₀/ml).

Após o desafio, os animais foram monitorados durante 28 dias, em relação a aspectos clínicos e virológicos. O monitoramento clínico foi realizado por inspeção visual minuciosa das áreas de inoculação viral. Para tornar a avaliação clínica objetiva, estabeleceu-se um escore clínico para cada sinal observado. Os critérios utilizados foram os seguintes: hiperemia: ausência (-); hiperemia leve (+); hiperemia moderada (++); hiperemia severa (+++). Vesículas e/ou pústulas: ausência (-); pequeno número (+); número moderado (++); grande número (+++). Crostas: ausência (-); pequeno número (+); número moderado (++); grande número (+++). Exsudação e sangramento: ausência (-); presença (+). Mííase: ausência (-); presença (+). A metodologia para calcular o escore clínico foi adaptada de Nettleton et al. (1996). O escore clínico diário de cada grupo foi obtido pela média aritmética dos escores individuais.

Monitoramento virológico. Suabes coletados das lesões a cada dois dias foram submetidos a isolamento e quantificação de vírus. Os suabes foram drenados, centrifugados em baixa rotação, e o sobrenadante foi inoculado em placas de 24 cavidades contendo células CEO e submetidos à três passagens de cinco dias cada. Para a quantificação de vírus excretado, foram processadas aleatoriamente 10 amostras, sendo cinco amostras do grupo

vacinado e cinco do grupo controle, para os dias 6, 10, 12 e 14 pd. Essas amostras foram submetidas à quantificação viral pelo método de diluição limitante. A leitura das placas foi feita com seis dias e os títulos virais foram calculados de acordo com Reed & Muench (1938) e expressos em $\log_{10}\text{DICC}_{50}/\text{ml}$.

Análise estatística. As diferenças entre os escores clínicos diários observados para cada grupo foram comparadas pela Análise de Variância (ANOVA), seguido do Teste de Tukey que foi utilizado como *post hoc*. Os valores dos títulos virais em escala logarítmica foram submetidos à transformação para atender os pré-requisitos do teste e submetidos à Análise de Variância (ANOVA), seguido de Teste de Tukey. O tempo de excreção viral dos dois grupos foi comparado pelo Teste t de Student's. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o programa GraphPad Prism 5.

RESULTADOS

Adaptação da cepa IA-82 em células BHK-21. O efeito citopático de ORFV começou a aparecer após a 5ª passagem da cepa IA-82 em células BHK-21. No entanto, os títulos virais obtidos durante a adaptação se mantiveram baixos durante diversas passagens, sendo que apenas na passagem 21 obteve-se um título viral de 10^6 , possibilitando assim o seu uso como antígeno vacinal.

Reação vacinal. Dezesesseis animais vacinados (16/30) apresentaram lesões no sítio de vacinação, quando examinados 10 dias após, e foram mantidos no experimento. As lesões eram leves, restritas e caracterizavam-se por hiperemia local, pústulas coalescentes (0,5-2,5cm de extensão) e discreta formação de crostas. Os 14 animais que não apresentaram lesão vacinal foram excluídos do estudo.

Monitoramento clínico pós-desafio. Após o desafio, os 32 animais inoculados na comissura labial desenvolveram lesões características de ectima contagioso. Na maioria dos

animais, as lesões iniciaram ao redor do dia 4 pós-desafio (pd), caracterizando-se por hiperemia na região da escarificação, formação inicial de pápulas e vesículas no sítio de inoculação. Em geral, as lesões dos animais vacinados foram notavelmente mais brandas e regrediram mais rapidamente (Fig.1 e Fig.2). Até o dia 8pd, os sinais observados no sítio de inoculação e a média do escore clínico diário total se mantiveram semelhantes nos dois grupos (Fig.2). A partir do dia 10 pd, no entanto, as lesões no grupo vacinado (G1) apresentaram uma rápida regressão, comparando-se com os animais do grupo controle (G2), que nesse dia apresentavam intensa exsudação e sangramento das lesões (Fig.1A, B). Além disso, a partir do dia 12 pd alguns animais controle desenvolveram míiases e infecção secundária nas lesões. Entre os dias 10 pd e 22 pd, as médias diárias do escore clínico total diferiram significativamente ($P < 0,05$) entre os dois grupos (Fig.2). A partir do dia 20pd, as lesões haviam praticamente cicatrizado nos animais vacinados, mas mantiveram-se além do dia 28 em parte dos controles (Fig.2). Em resumo, tanto os animais vacinados quanto os controles desenvolveram lesões nos locais de inoculação viral, porém a severidade e duração das lesões foram notadamente inferiores nos animais vacinados.

Monitoramento virológico pós-desafio. Todos os animais desafiados excretaram o vírus nas lesões desenvolvidas na comissura labial, por períodos variáveis. Porém, os animais do grupo vacinado apresentaram um período médio de excreção de 13,4 dias \pm 0,4 (média \pm erro padrão) que foi significativamente inferior ($P < 0,001$) ao do grupo controle que, em média, excretou vírus por 22,6 dias \pm 1,0. As médias dos títulos virais excretados nos dias 6, 10, 12 e 14 pelos animais vacinados também foram significativamente inferiores ($P < 0,05$) às médias excretadas pelo grupo controle (Fig.3), com maior diferença observada no dia 10 pd ($P < 0,001$). Além disso, os animais vacinados cessaram a excreção viral vários dias antes dos controles (Fig.4). Enquanto no dia 14pd todos os animais (G1 e G2) ainda excretavam vírus, o número de animais vacinados excretando vírus foi se reduzindo rapidamente a partir do dia

16pd, e a excreção viral cessou a partir do dia 22pd (Fig.4). Já no grupo controle, nove animais ainda permaneciam excretando vírus no dia 28pd, quando o experimento foi descontinuado. Esses resultados demonstram que a vacinação reduziu significativamente o tempo de excreção viral e reduziu significativamente também, na maior parte do período, os títulos virais excretados.

DISCUSSÃO

As vacinas contra o ectima contagioso comercializadas no Brasil, a exemplo de outros países que possuem ovinocultura e caprinocultura desenvolvidas, são produzidas em animais, por métodos empíricos e cruentos, possuem vírus virulento em sua formulação e apresentam eficácia questionável. Por outro lado, a grande população ovina e caprina no país (aproximadamente 17 e 9 milhões de cabeças, respectivamente (IBGE, 2010) aliada com a ampla disseminação da doença e os prejuízos que causa, justificam o interesse por vacinas eficazes, seguras e produzidas sem o uso de animais e por métodos eticamente aceitáveis. Dessa forma, uma vacina experimental foi produzida em cultivo celular e a sua eficácia foi testada em ovinos. Embora a proteção conferida tenha sido parcial (a exemplo das vacinas comerciais), os resultados são promissores, desde que os índices de imunização (“pega”) e proteção possam ser melhorados.

As vacinas tradicionais contra o ectima são produzidas a partir de crostas obtidas após escarificação cutânea de ovinos com isolados virulentos do ORFV, e são aplicadas também por escarificação cutânea, geralmente na face interna do membro anterior ou posterior, para evitar a disseminação do vírus por contato. Essas vacinas apresentam restrições, que incluem questões éticas, de segurança (vírus vacinais virulentos que podem ser transmitidos e causar doença), risco de agentes contaminantes, além da dificuldade de padronização e produção em escala industrial. Para contornar esses problemas, vacinas produzidas em cultivo celular têm

sido propostas e desenvolvidas, algumas com relativo sucesso (Pye 1990, Nettleton et al. 1996). No entanto, a maior restrição às vacinas contra o ectima - e que se aplica tanto às tradicionais quanto às produzidas em cultivo celular - refere-se à falha em induzir proteção completa frente a exposição ao vírus de campo. As vacinas produzidas a partir de crostas de animais escarificados parecem ser mais imunogênicas (Buddle et al. 1984), porém a proteção conferida pelos dois tipos de vacina é geralmente parcial e incompleta, em diferentes níveis (Buddle et al. 1984, Pye 1990, Nettleton et al. 1996, Musser et al. 2008). Assim, na maioria dos relatos, uma parcela variável dos animais vacinados desenvolve sinais clínicos de ectima quando é desafiada com amostras de campo, embora esses sinais sejam usualmente mais brandos e passageiros (Buddle et al. 1984, Musser et al. 2008). As causas dessa proteção parcial e incompleta são pouco conhecidas, mas aparentemente não incluem eventuais diferenças antigênicas entre o vírus vacinal e o vírus do desafio (Buddle et al. 1984, Glover 1928).

A imunidade induzida após infecções naturais ou experimentais pelo ORFV é parcial e temporária. Dessa forma, o vírus possui a capacidade de re-infectar os seus hospedeiros e produzir lesões, que são geralmente mais leves e transitórias do que na infecção primária (de La Concha-Bermejillo et al. 1999, Haig et al. 2002). Assim, é possível que a falha em conferir proteção completa possa estar mais relacionada com peculiaridades das interações do vírus com o sistema imunológico do que com deficiências intrínsecas das vacinas.

No presente trabalho, a aplicação da cepa IA-82 por escarificação cutânea produziu lesões locais - observadas no dia 10 pós-vacinação - em 16 de 30 animais. A resposta local à vacinação (hiperemia, pústulas e crostas) tem sido adotada como indicador da replicação viral e, conseqüentemente, da eficácia da imunização (Buddle et al. 1984, Pye 1990, Nettleton et al. 1996, Musser et al. 2008). Embora o índice de “pega” das vacinas utilizadas a campo seja desconhecido e difícil de estimar, a frequência, intensidade e duração dos sinais pós-vacinais

relatados em estudos experimentais tem sido, em geral, superiores aos observados no presente trabalho (Buddle et al. 1984, Pye 1990, Nettleton et al. 1996, Musser et al. 2008). É provável que a adaptação da cepa IA-82 ao cultivo de células BHK-21 durante 21 passagens tenha resultado em atenuação excessiva do vírus. Além de variar entre isolados (de La Concha-Bermedillo et al. 2003, Musser et al. 2008), a capacidade imunogênica do ORFV está diretamente relacionada com a eficiência de replicação e capacidade de causar lesões nos sítios de inoculação (Pye 1990, Bundlle et al. 1996, Guo et al. 2003). Assim, vírus com fins vacinais amplificados em cultivo celular frequentemente apresentam capacidade reduzida de replicar em animais, produzem lesões mais leves e passageiras e, como consequência, são menos imunogênicos do que os vírus obtidos diretamente de crostas de animais doentes (Buddle et al. 1984). Por essas razões, os ORFV amplificados em cultivo celular com fins vacinais são submetidos a um número baixo de passagens (geralmente entre 2 e 3), provavelmente para evitar atenuação excessiva e redução da capacidade replicativa em animais (Pye 1990, Nettleton et al. 1996, Musser et al. 2008). Não obstante, alguns isolados de campo, mesmo submetidos a passagens em cultivo, podem apresentar capacidade replicativa *in vivo* e potencial imunogênico em níveis similares aos vírus obtidos de crostas (Pye 1990). Essas observações têm servido de premissa para o desenvolvimento e utilização de vacinas produzidas em cultivo (Pye 1990, Musser et al. 2008). No presente caso, para solucionar o problema da eficiência replicativa *in vivo* e baixa imunogenicidade da cepa IA-82, pretende-se testar diferentes isolados do ORFV em relação a capacidade replicativa e imunogênica em animais, após um número mínimo de passagens em cultivo celular.

A imunidade protetora contra o ORFV é geralmente de curta duração e decresce gradualmente ao longo dos meses (Haig & McInnes 2002, de La Concha-Bermedillo et al. 2003). Os animais jovens são mais susceptíveis a desenvolverem doença grave, e a sua resistência aumenta gradualmente com a idade e com a exposição ao agente (Haig et al. 2002,

de La Concha-Bermedillo et al. 2003). Por isso, em rebanhos endêmicos, a vacinação concentra-se nos animais jovens, com revacinações anuais dos animais introduzidos ou nascidos na próxima estação de reprodução (Musser et al. 2008). Por outro lado, as lesões da vacinação podem persistir por 28 – 35 dias (Buddle et al. 1984, Nettleton et al. 1996). Considerando-se esses aspectos, experimentos de proteção vacinal devem utilizar animais jovens, e o desafio não deveria ser realizado antes dos 3 ou 4 meses após a vacinação, como tem sido realizado em alguns trabalhos (Buddle et al. 1984, Pye 1990). No presente trabalho foram utilizados ovinos jovens (90-120 dias de idade), e o desafio foi realizado com intervalo de três meses, como descrito em alguns trabalhos (Nettleton et al. 1996, Musser et al. 2008).

O presente experimento utilizou uma metodologia diferente dos demais trabalhos para o desafio. A exemplo dos estudos anteriores, realizou-se o desafio com macerado de crostas de animais doentes (supostamente associados com isolados virulentos de ORFV (Buddle et al. 1984, Pye 1990, Nettleton et al. 1996, Musser et al. 2008). No entanto, neste trabalho o vírus foi aplicado na junção mucocutânea da comissura labial, após escarificação com agulha hipodérmica, enquanto que os outros estudos realizaram o desafio pela inoculação do vírus após escarificação da pele do membro contralateral ao membro vacinado. Tem sido sugerido que a superfície cutânea escarificada da axila, focinho, lábios e bochecha apresenta susceptibilidade equivalente ao ORFV (Buddle et al. 1984). No entanto, a principal porta de entrada do vírus em infecções naturais são os lábios, comissuras labiais e focinho, e a penetração do vírus é facilitada por abrasões e microlesões causadas pela alimentação em pastagens grosseiras (Haig 2006, Fleming & Mercer 2007). Assim, o procedimento de desafio adotado no presente experimento parece mais rigoroso para avaliar proteção do que inoculação em linhas de escarificação na pele da coxa. Não obstante, os próximos experimentos deverão utilizar desafio natural, pela exposição continuada dos animais vacinados (e controles) a animais deliberadamente infectados com vírus virulento. Dessa

forma, se poderá avaliar de forma mais realista o nível de proteção à infecção natural, mimetizando o que ocorre a campo.

Outro aspecto único do presente trabalho foi a mensuração quantitativa e temporal da excreção viral após o desafio. Embora possa possuir importância menor em relação à proteção clínica, a redução significativa da quantidade e tempo de excreção viral pelos animais pode ter um impacto importante na transmissão do vírus em rebanhos, resultando em reduzida contaminação de animais e das pastagens e, conseqüentemente, reduzindo a disseminação do vírus no rebanho.

Em resumo, os resultados do presente estudo são promissores no sentido da produção em cultivo celular de uma vacina eficaz e segura contra o ectima contagioso. No entanto, várias etapas devem ser revistas para atingir tal objetivo, incluindo: (1) Avaliar isolados de campo com relação à sua capacidade replicativa em cultivo celular; (2) Avaliar isolados com relação à capacidade de replicar em animais após imunização, e de conferir proteção frente a desafio; (3) Utilizar para vacinação amostras virais submetidas a um número menor de passagens em cultivo celular, para evitar atenuação excessiva; (4) Aperfeiçoar o método de imunização, para permitir uma replicação cutânea mais eficiente do vírus vacinal; e (5) Alterar o método de desafio, para melhor mimetizar a exposição natural ao vírus e, assim, objetivamente avaliar o nível de proteção ao qual os animais vacinados estarão submetidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Buddle B.M., Dellers, R.W. Schuring, G.G. 1984. Contagious ecthyma virus-vaccination failures. *Am. J. Vet. Res.* 45:263-269.
- Canal C.W. 2007. Poxviridae, p.489-510. In: Flores E.F. (Ed.), *Virologia Veterinária*. Vol.1. 2nd ed. Editora UFSM, Santa Maria. 888p.

- Catroxo M.H.B., Curi N.A., Pituco E.M., Garcia M., Okuda L.H., Porto A.C.R. & Stefano E. 2002. Ocorrência de ectima contagioso em ovinos criados em Itatiba, estado de São Paulo, Brasil. *Arqs Inst. Biológico.*, São Paulo, 69 (Supl.):37.
- De La Concha-Bermejillo A., Guo J., Zhang Z. & Waldro D. 2003. Severe persistent orf in young goats. *J. Vet. Diagn. Invest.* 15:423-431.
- Delhon G., Tulman, E.R., Afonso, C.L., Lu, Z., de La Concha-Bermejillo, A., Lehmkuhl, H.D., Piccone, M.E., Kutish, G.F., Rock, D.L. 2004. Genomes of the parapoxviruses orf virus and bovine papular stomatitis virus. *J. Virol.* 78:168-177.
- Fleming S.B. & Mercer A.A. 2007 Genus Parapoxvirus, p.127-166. In: Mercer A.A. (Ed.), *Poxviruses*. Vol.1.1nded. Birkauser, Berlin. 441p.
- Glover R.E. 1928. Contagious pustular dermatitis of the sheep. *J. Comp. Pathol.* 41:318-340.
- Greig A.S. 1956. Contagious ecthyma of sheep: Attempts to infect other hosts. *Can. J. Comp. Med. Vet. Sci.* 20:448-452.
- Guo J., Zhang Z., Edwards J.F., Ermel R.W., Taylor C.Jr & Concha-Bermejillo A. 2003. Characterization of a North American orf virus isolated from a goat with persistent, proliferative dermatitis. *Virus Res.* 93:169-179.
- Haig D. M. & Mercer, A. A. 1998. Ovine diseases: Orf. *Vet Res.* 29:311-326.
- Haig D.M. & McInnes C.J., 2002. Immunity and counter immunity during infection with the parapoxvirus orf virus. *Virus Res.* 88:3-16.
- Haig D.M. 2006. Orf virus infection and host immunity. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 19:127-131.
- Hosmarini M., Scagliarini A., Bhanuprakash V., McInnes C.J. & Singh R.K. 2009. Orf: an update on current research an future perspectives. *Expert Review of Anti-infective Therapy* 7:879-893.
- IBGE 2010. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_imprensa.php?id_noticia=1761> Acesso em 28 jun. 2011.
- Langoni H., Coelho K.I.R., Pimentel M.P., Siqueira E.R. & Spago E.N. 1995. Ectima contagioso em ovinos na região de Botucatu. *Hora Vet.*, Porto Alegre, 14:60-62.
- McKeever D.J. 1988. Studies of the pathogenesis of orf virus infection in sheep. *J. Comp. Pathol.* 99:318-327.
- Musser J.M.B., Taylor C.A., Guo J., Tizard I.R. & Walker J.W. 2008. Development of a contagious ecthyma vaccine for goats. *Am. J. Vet. Res.* 69:1366-1370.
- Nandi S., Ujjwal K. & Chowdhury S. 2011. Current status of contagious ecthyma or orf disease in goat and sheep: A global perspective. *Small Rum. Res.* 96:73-82.

- Nettleton P.F., Brebner J., Pow J., Gilray J.A., Bell G.D. & Reid H.W. 1996. Tissue culture-propagated orf virus vaccine protects lambs from orf virus challenge. *Vet. Res.* 138:184-186.
- Nóbrega Jr, J.E., Macêdo J.T.S.A., Araújo, J.A.S., Dantas, A.F.M., Soares, M.P. & Riet-Correa F. 2008. Ectima contagioso em ovinos e caprinos no semi-árido da Paraíba. *Pesq. Vet. Bras.* 28:135-139.
- Pye D. 1990. Vaccination of sheep with cell culture grown orf virus. *Aust. Vet. J.* 67:182-188.
- Reed L. & Muench H. 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 18:493-494.
- Robinson A.J. & Balassu T.C. 1981. Contagious pustular dermatitis (orf). *Vet. Bull.* 51:771-782.
- Salles M.W.S., Barros C.S.L., Lemos R.A.A. & Weiblen R. 1992. Ectima contagioso (Dermatite pustular) dos ovinos. *Ciência Rural* 22:319-324.
- Torres S. 1939. Dermatite pustular contagiosa nos caprinos e ovinos no Pernambuco. *Bolm Soc. Bras. Med. Vet.* 9:107-108.

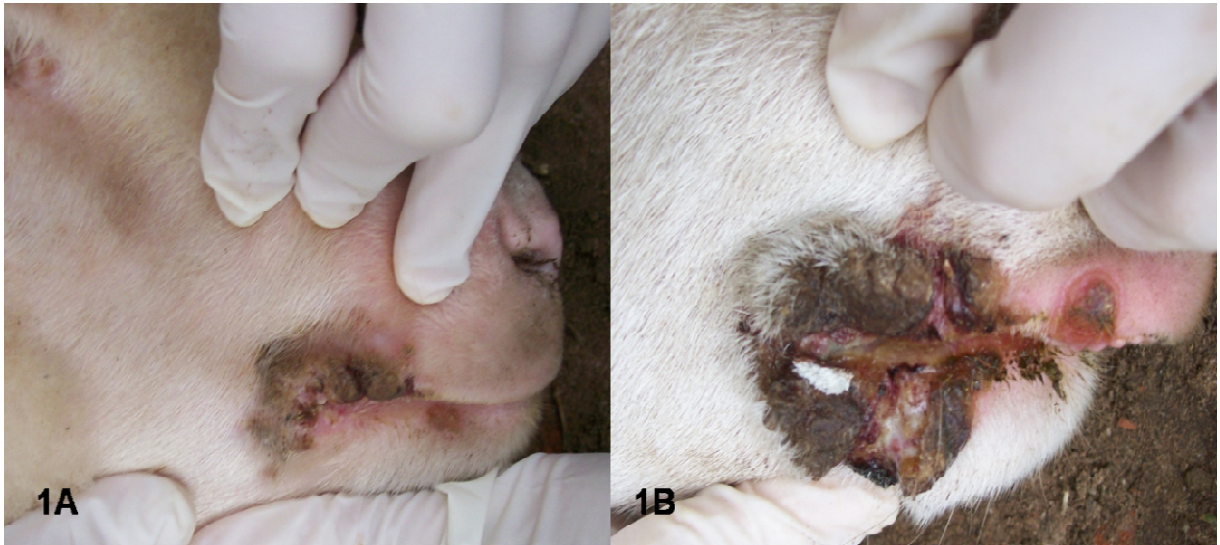


Fig.1. Lesões na comissura labial de ovinos desafiados com uma amostra virulenta do ORFV.

(A) Ovino vacinado apresentando lesão com leve hiperemia e intensidade moderada de crostas, 10 dias após o desafio. (B) Ovino controle, apresentando intensa formação de lesões crostosas, com rachaduras, exsudação e ovos de *Cochliomyia hominivorax*, 10 dias após o desafio.

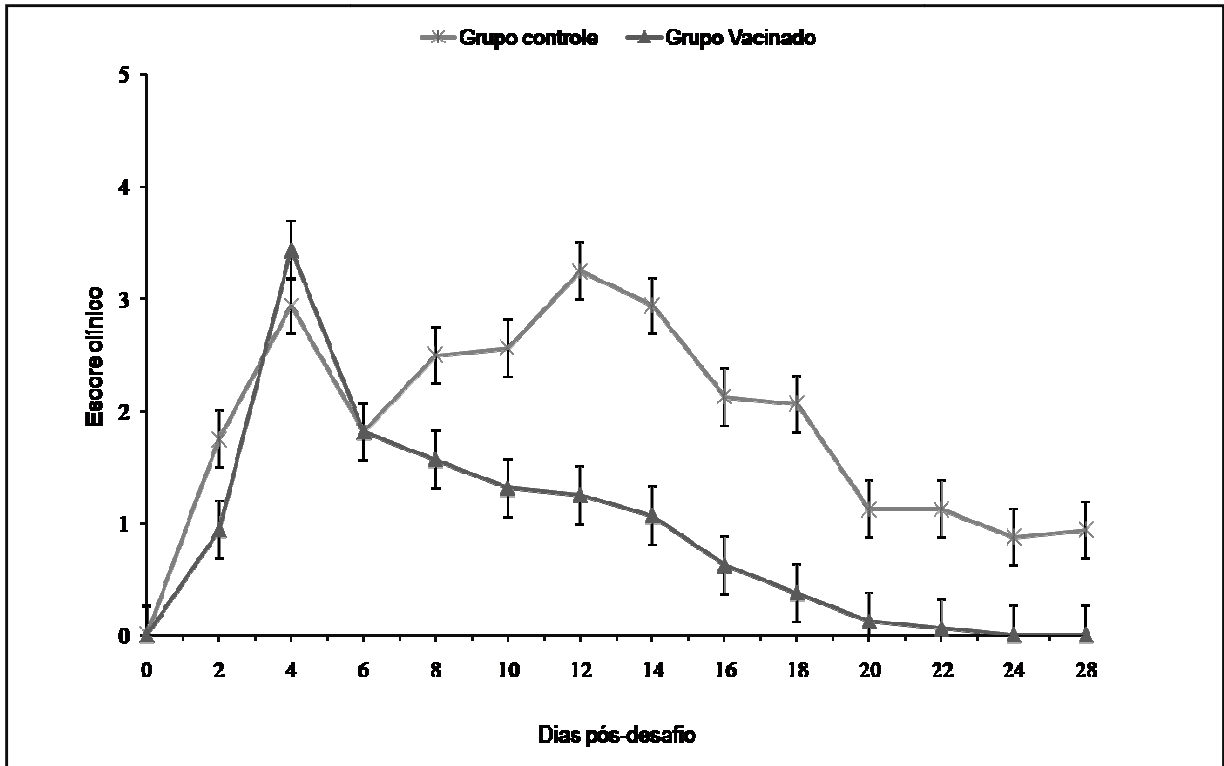


Fig.2. Médias diárias dos escores clínicos do grupo vacinado e do grupo controle após o desafio com um isolado virulento do ectima contagioso, 90 dias após a vacinação. As médias do grupo controle foram significativamente mais altas que as do grupo vacinado entre os dias 10 e 22 pós-desafio. As barras verticais demonstram o erro padrão entre as médias.

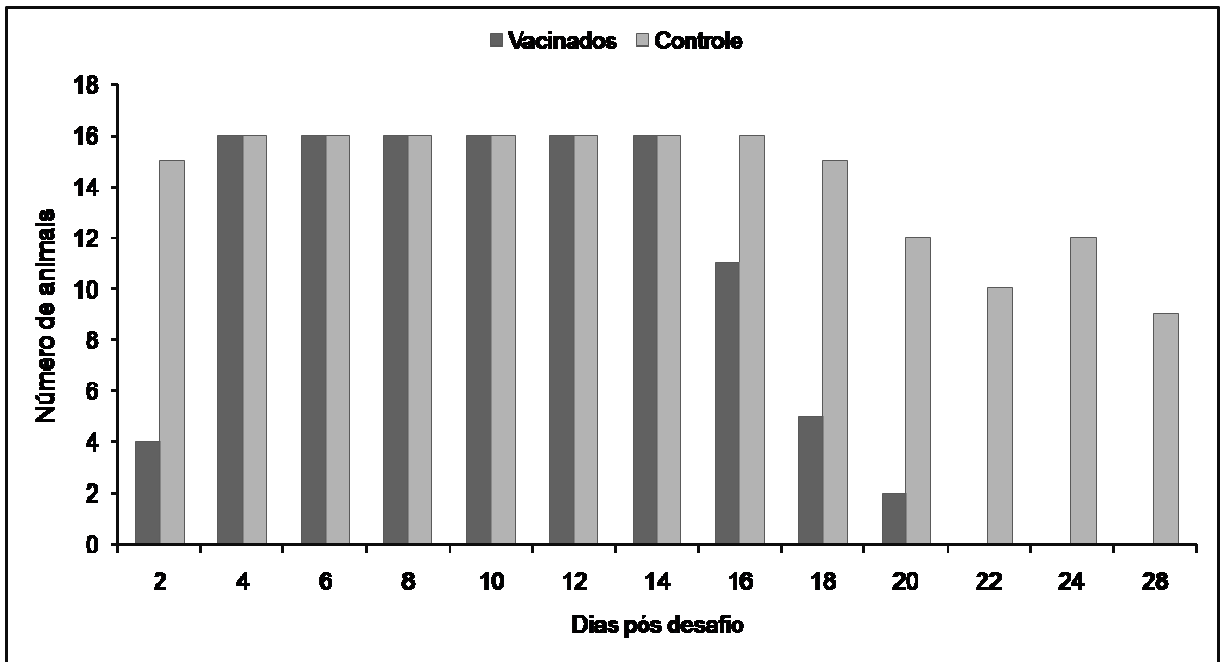


Fig.3. Número de animais excretando vírus nas lesões, após inoculação com uma amostra virulenta do ORFV.

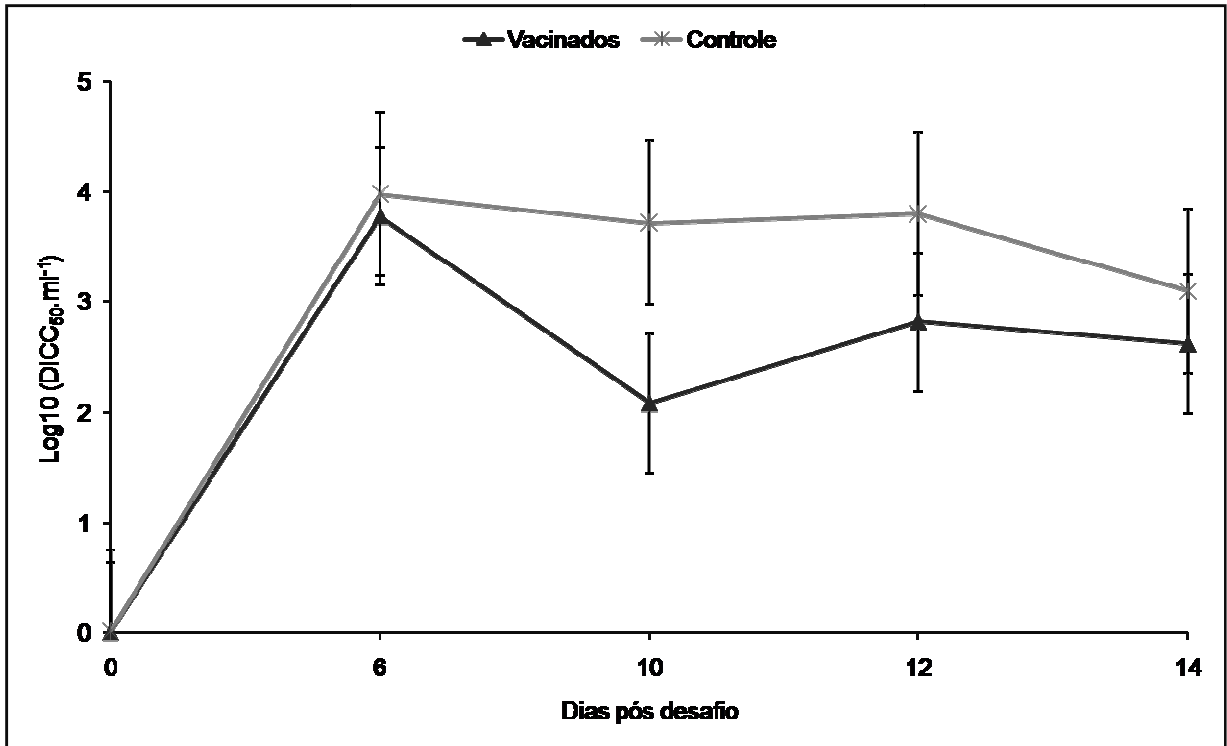


Fig.4. Títulos virais médios detectados nas lesões da comissura labial de animais inoculados com uma amostra virulenta do ORFV.

3. CAPÍTULO 2

Persistence of contagious ecthyma virus in experimentally infected sheep

Candice Schmidt¹, Juliana Felipetto Cargnelutti¹, Diego Gustavo Diel^{1*}, Rudi Weiblen¹ e
Eduardo Furtado Flores¹

(Nota submetida à revista *Ciência Rural* – 2011)

¹Setor de Virologia, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS 97105-900. Brasil. eduardofurtadoflores@gmail.com Autor para correspondência.

*Agricultural Research Services, United States Department of Agriculture, Southeast Poultry Research Laboratory - 934 College Station Rd, Athens, GA 30605, USA.

ABSTRACT

Contagious ecthyma virus is capable of persisting in sheep and goat flocks over long periods by still unknown means. The present study investigated the persistence of ecthyma in experimentally infected lambs through the search for virus and viral DNA in inoculated animals at different intervals after infection. Concomitantly, virus viability in scabs maintained at environmental temperatures was monitored. During acute infection, virus produced typical lesions of ecthyma in all inoculated lambs (n=10), with lesions during over 22 days. Infectious virus was recovered from lesions in titers up to $10^{5.5}$ TCID₅₀.ml⁻¹, with peaks of virus excretion between days 10 and 12 post inoculation (pi). The virus was detected continuously in lesions of all animals up to day 24 pi; four lambs shed virus until day 44 pi and one up to day 51 pi. Viral DNA was detected by PCR in all skin biopsies up to day 37 pi, in four animals at day 51, in three animals at day 65 and one at day 79 pi. Infectious virus was detected in scabs maintained under environmental temperatures for up to 6 months. These results demonstrate that contagious ecthyma virus may be maintained and excreted for a long period by infected animals. Nonetheless, the ability of the virus to persist viable in the environment seems to be important for its perpetuation in flocks. Therefore, control measures should target the infected animals and the environment as well.

Key words: ORFV, parapoxvirus, persistent infection.

RESUMO

O vírus do ectima contagioso é capaz de se manter em rebanhos ovinos e caprinos por longos períodos de tempo, no entanto, os mecanismos utilizados pelo vírus ainda não são completamente esclarecidos. O presente trabalho investigou a habilidade do vírus do ectima persistir em ovinos infectados experimentalmente. Para isto, o vírus e o DNA viral foram pesquisados nas lesões e sítios de inoculação, em diferentes intervalos após a inoculação. A viabilidade do vírus também foi investigada em crostas de animais infectados mantidas à temperatura ambiente. Durante a infecção aguda, o vírus produziu lesões típicas de ectima em todos os animais inoculados (n=10), com duração de aproximadamente 22 dias. O vírus foi detectado continuamente nas lesões de todos os animais até o dia 24 pós inoculação (pi); quatro animais excretaram vírus até o dia 44 pi e um deles ainda excretava no dia 51 pi. O vírus foi excretado em títulos de até $10^{5,5}$ DIC₅₀.ml⁻¹, com picos de excreção viral entre os dias 10 e 12 pi. O DNA viral foi detectado por PCR em biópsias coletadas de todos os animais no dia 37 pi, e em um animal o DNA viral foi detectado até o dia 79 pi. O vírus foi recuperado, por isolamento viral, nas crostas mantidas a temperatura ambiente por até seis meses após a coleta. Esses resultados demonstram que o vírus pode persistir e ser excretado por longo período em animais infectados, mesmo após a resolução clínica das lesões. Medidas de controle devem levar em consideração a persistência do vírus em animais e no ambiente.

Palavras-chave: ORFV, parapoxvirus, infecção persistente.

Contagious ecthyma or orf is an economically important, debilitating disease of sheep and goats distributed worldwide (DE LA CONCHA BERMEJILLO, 1995; NANDI et al., 2011). The etiologic agent, orf virus (ORFV), is a parapoxvirus within the family *Poxviridae* (FLEMING & MERCER, 2007). Although sheep and goats are the natural hosts, ORFV may occasionally infect other species including man, in which produces vesiculo-pustular lesions mostly in the fingers and hands (NANDI et al., 2011).

ORFV infects primarily young lambs and kids, producing inflammatory and proliferative lesions around the mouth and nostrils and reducing the ability of affected animals to feed. As a result, a debilitating condition frequently ensues. The incubation period usually ranges from two to six days and the lesions progress through the stages of erythema, macules, papules, vesicles, pustules and scabs (HAIG, 2006; FLEMING & MERCER, 2007).

Virus transmission occurs by direct or indirect contact between infected and susceptible animals (NANDI et al., 2011). A classic epidemiological concept stands that young lambs are infected through contact with scabs left in the environment in the previous lambing season (ROBINSON & BALASSU, 1981). McKEEVER & REID (1986) demonstrated that this is possible only when scabs remain in dry places, protected from environmental conditions such as rain and sunlight. When exposed to environmental conditions the virions present on scabs lose their infectivity within a few weeks. Likewise, although ORFV is abundant in acute proliferative lesions, infectivity is barely detected in healing scabs (ROMERO MERCADO et al., 1973). For the exposed reasons, the role of scabs as sources of new outbreaks has been questioned. A possible mechanism of virus maintenance in the herds over extended periods would be a continuous or intermittent virus shedding by healthy carriers (NETTLETON et al., 1996). Immunossupressed and persistently infected animals might also play some role in the perpetuation of the virus in flocks (YERUHAM et al., 2000). In this sense, virus transmission by healthy animals (NETTLETON et al., 1996)

and contamination of sheep through immersion baths have been reported (SARGISON et al., 2007). These observations may help in explaining the annual, recurrent outbreaks in some flocks, even without the introduction of new animals. Regardless, the mechanisms used by ORFV to be maintained in herds, infecting successive lamb generations, remain largely unclear (REID, 1991).

The present study investigated the ability of ORFV to persist subclinically in its host and, concomitantly, the viability of the virus in scabs maintained under environmental temperature ($\pm 22^{\circ}\text{C}$). Ten Corriedale lambs, three to four months old, from a flock with no history of ecthyma, were inoculated with a suspension of scabs (400 μl) obtained from an outbreak of the disease in Rio Grande do Sul state, Brazil, in a virus titer of $10^{6.9}\text{TCID}_{50}.\text{ml}^{-1}$. Inoculation was performed through swabs immersed on the virus suspension and frictioned against the labial commissure, after scarification with a needle. Inoculated animals were submitted to daily clinical monitoring and swab collection for virus isolation and quantization (every two days up to day 30 post inoculation [pi], and then weekly up to day 72 pi). Biopsies for PCR were obtained from the inoculation sites at days 37, 51, 65 and 79 pi. Swabs were submitted to virus isolation and quantitation in primary ovine ethmoidal turbinate cells (CEO), according to protocols previously described by SCHMIDT et al. (2011). Biopsies were performed after animal sedation with xilazine ($0.8\text{mg}.\text{Kg}^{-1}$), a skin fragment of approximately 1 x 1cm was excised from the site of virus inoculation. Total DNA was extracted from tissue fragments (50mg) using DNAzol® reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and submitted to a PCR according to INOSHIMA et al. (2000), using primers for the coding region of the major membrane parapoxvirus glycoprotein (B2L). For investigation of virus viability, scabs obtained from sick animals were aconditioned in an open flask at room temperature for six months. At monthly intervals, a scab fragment was removed and submitted to virus isolation in CEO cells.

The results of virus isolation from lesions are presented in Table 1. All samples were positive for virus up to day 20pi, and the frequency of positivity decreased progressively after that. Virus excretion was detected at day 37pi in two lambs, at day 44pi in four lambs and one lamb was still positive at day 51pi.

The results of PCR for ORFV sequences performed in skin biopsies collected at different intervals after virus inoculation are presented in Table 1. All samples were positive at day 37pi; four (40%) were positive at day 51 and three (30%) at day 65pi. The sample obtained from animal #46 still harbored viral DNA at day 79pi. The virus retained its infectivity in scabs maintained under room temperature for up to six months. All attempts to recover infectious virus from those scabs were successful up to the sixth month, when the experiment was discontinued.

Very little is known about the epidemiology of ORFV infection (NETTLETON et al., 1996). In particular, the mechanisms of virus persistence in flocks over extended periods of time are unclear. Likewise, the origin and means of introduction of the virus in the flocks in many outbreaks are unknown.

The present study demonstrated that ORFV may be excreted for over four weeks after the complete resolution of lesions. These findings reinforce previous observations by NETTLETON et al. (1996), who demonstrated that healthy animals were responsible for virus introduction in a susceptible flock. The most likely explanation for this finding is that the introduced animals harbored the virus in a subclinical infection, thereby serving as sources of infection for susceptible animals (NETTLETON et al., 1996). Virus shedding by healthy animals introduced in the flock was the most likely source of an outbreak of ecthyma in a flock with no past history of the disease in RS in 2005 (FLORES, E.F., personal communication). These observations reinforce the hypothesis that clinically healthy animals, especially those convalescent of a recent infection, may occasionally serve as sources of

infection. In the present study, viral DNA was shown to persist in the animals for up to 50 days after the resolution of lesions. Although the virus was not recovered from the animals for such a long time, it is reasonable to speculate that animals harboring viral DNA might occasionally re-excrete the virus. In this sense, other forms of viral persistence and/or subclinical infection with continuous or intermittent virus shedding should be investigated. This study also demonstrated that the virus may persist viable for up to six months in scabs. Although the role of environmental scabs on the occurrence of new outbreaks and in virus perpetuation over long periods remains questionable (ROBINSON & BALASSU, 1981; McKEEVER & REID, 1986), virus persistence in scabs over years has already been demonstrated (NANDI et al., 2011).

In summary, the present study demonstrated that ORFV (or viral DNA) may persist in convalescent, healthy animals for several weeks after the resolution of lesions. The long viability of the virus in the environment and the extended excretion period by infected animals likely contribute for the perpetuation of the virus in flocks. On the other hand, virus excretion by convalescent, healthy carriers observed herein should call attention when introducing new animals in free herds.

COMMITTEE OF ETHICS AND ANIMAL WELFARE

The project was approved by the *Comitê de Ética e Bem Estar Animal* of the Universidade Federal de Santa Maria: Protocol 23081.018427/2010-97, 101/2010.

REFERENCES

- DE LA CONCHA-BERMEJILLO, A. Poxviral diseases. In: FARRIS, R., MAHLOW, J., NEWMAN, E., NIX, B. **Health Hazards in Veterinary Practice**. Schaumburg: American Veterinary Medical Association, p.55–56, 1995.
- FLEMING, S.B.; MERCER, A.A. Genus Parapoxvirus. In: MERCER, A.A. et al. **Poxviruses**. Birkauser: Basel, p.127-166, 2007.
- HAIG, D.M.; MERCER, A.A. Orf. **Veterinary Research**, v. 29, p. 311-326, 1998.
- HAIG, D.M. Orf virus infection and host immunity. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v.19, p.127-131, 2006.
- INOSHIMA, Y. et al. Detection and diagnosis of parapoxvirus by the polymerase chain reaction. **Journal of Virological Methods**, v.84, p.201-208, 2000.
- McKEEVER, D. J.; REID, H. W. Survival of orf virus under British winter conditions. **Veterinary Record**, v. 118, p.613-614, 1986.
- NANDI, S. et al. Current status of contagious ecthyma or orf disease in goat and sheep-A global perspective. **Small Ruminant Research**, v.96, p.73-82, 2011.
- NETTLETON, P.F. et al. Natural transmission of orf virus from clinically normal ewes to orf-naive sheep. **The Veterinary Record**, v.139, p.364-366, 1996.
- REID, H. W. Contagious Ecthyma. In: ____ **Diseases of sheep**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1991. 265p.
- ROBINSON, A. J.; BALASSU, T.C. Contagious pustular dermatitis (orf). **The Veterinary Bulletin**, v. 51, p.771-782, 1981.
- ROMERO MERCADO, C. H. et al. Virus particles, antigens and antibodies in sheep infected with orf. **Archiv für die Gesamte Virusforschung**, v. 40, p.152-158, 1973.
- SARGISON, N.D. et al. Unusual outbreak of orf affecting the body of sheep associated with plunge dipping. **Veterinary Record**, v.160, p.372-373, 2007.

SCHMIDT, C. et al. Vacina experimental produzida em cultivo celular confere proteção parcial contra o ectima contagioso em ovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. 2011. Aceito para publicação (Trabalho 2349 LD).

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

Table 1- Detection of virus and viral DNA in lambs experimentally infected with contagious ecthyma virus.

| Animal | Virus shedding ^a | | | | | | | | | | Viral DNA ^b | | | |
|--------|-----------------------------|------|----|----|----|----|----|----|----|-------|------------------------|----|----|----|
| | (day pi) ^c | | | | | | | | | | (day pi) | | | |
| | 2 | 4-20 | 22 | 24 | 28 | 30 | 37 | 44 | 51 | 58-79 | 37 | 51 | 65 | 79 |
| 33 | + | + | - | - | - | + | + | + | + | ¥ | + | + | ¥ | ¥ |
| 34 | + | + | + | + | + | - | - | + | - | - | + | - | + | - |
| 35 | + | + | + | + | + | - | + | - | - | - | + | - | + | - |
| 36 | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | + | - | + | - |
| 38 | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | + | + | - | - |
| 39 | - | + | + | + | + | - | - | - | - | - | + | - | - | - |
| 43 | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | + | - | - | - |
| 45 | + | + | + | + | - | - | - | + | - | - | + | - | - | - |
| 46 | + | + | + | + | + | - | - | + | - | - | + | + | - | + |
| 47 | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | + | + | - | - |

^a Detected by virus isolation in CEO cells. ^b Detected by PCR of skin biopsies. ^c Days post infection. ¥ Animal # 33 died at day 58pi of unrelated causes.

4. CAPÍTULO 3

Phylogenetic analysis of Brazilian orf virus from sheep and goats

Candice Schmidt ^a, Juliana F. Cargnelutti ^a, Carolina K. Traesel ^a, Rudi Weiblen ^a,
Eduardo F. Flores ^{a*}

(Artigo a ser submetido à revista *Veterinary Microbiology* – 2012)

^a*Virology Section, Department of Preventive Veterinary Medicine, Federal University of Santa Maria (UFSM). Av. Roraima, 1000. Santa Maria, RS, Brazil. 97105-900*

**Corresponding author: DMVP-CCR-UFSM. Santa Maria, RS. Brazil. 97105-900.*

Phone: 5555-3220-8055. email: eduardofurtadoflores@gmail.com

Abstract

Orf virus (ORFV), the prototype of the *Parapoxvirus*, is the etiological agent of contagious ecthyma, an exanthematic and proliferative dermatitis that affects mainly sheep and goats. The ORFV genome consists of linear double stranded DNA, with 138 kbp. The central core region encodes proteins involved in virus structure and assembly, while the terminal regions contain genes implicated in host range and virulence. In the present study, sequence analysis of major envelope gene (B2L) of nine Brazilian ORFV strains from sheep and goats and three vaccine strains was carried out. Partial sequence of B2L gene from all nine ORFV strains and vaccine strains was amplified by PCR and the amplicons (594 bp) were sequenced. Sequence analysis revealed a high degree of similarity among Brazilian strains, and with vaccine strains as well. Brazilian viruses shared 97.7- 100% and 96.1-100% nucleotide and amino acid identity, respectively. In addition, Brazilian ORFVs showed 98.7-100% nucleotide identity and 97.7-100% amino acid similarity with three vaccine strains. Phylogenetic analysis based on deduced amino acids sequences showed that the Brazilian strains from sheep and vaccine strains clustered in the same branches, and isolates from goats clustered into a separate branch. Analysis of a higher number of field strains is necessary to establish relationships between genetic traits and geographical distribution and/or species origin of these viruses.

Keywords: Orf virus, B2L gene, phylogenetic analysis, sheep, goat.

1.Introduction

The genus *Parapoxvirus* (PPV) is composed by four members, orf virus (ORFV), bovine papular stomatitis virus (BPSV), pseudocowpox virus (PCPV), and parapoxvirus of red deer in New Zealand (PVNZ) (Murphy et al., 1999). PPVs are antigenically and genetically related and have a similar morphology, genomic organization and virulence mechanisms (Fleming et al., 1993). PPVs are morphologically distinguished from other poxviruses by their ovoid shape, the crisscross pattern on the particle surface, relatively small size and high G+C content of the genome (Delhon et al., 2004). Orf virus (ORFV), the prototype of the genus, is the etiological agent of contagious ecthyma, a exanthematic and proliferative dermatitis that affects domestic and wild small ruminants and, occasionally, may be transmitted to man (Moss, 2007).

Contagious ecthyma is characterized by inflammatory, proliferative and self-limiting lesions in the skin of lips, muzzle and oral mucosa and around the nostrils of sheep and goats. Lesions may be occasionally observed on the teats of nursing animals and rarely on the internal organs such as tongue and gums (Hosamani et al., 2006). Depending on the location of the lesions, animals may be unwilling to nurse, eat, or walk. Primary lesions usually resolve spontaneously within 3-4 weeks (McKeever et al., 1988).

The disease is usually transmitted through contact from infected to susceptible animals. However, transmission of ORFV from clinically normal sheep to naive sheep (Nettleton et al., 1996) and following plunge dipping has also been reported (Sargison et al., 2007). Iatrogenic transmission of ORFV may also occur during surgical intervention, hand contact, drenching and ear tagging (Allworth et al., 1987). Natural cross infection of ORFV between sheep and goats can occur, but experimental transmission of infection from one species to another may not be successful (De la Concha-Bermejillo et al., 2003).

The disease is economically important due to its endemic nature in many parts of the world (Hosamani et al., 2009). Reinfection of the same individual and inability of the vaccines to provide complete protection also makes disease control difficult. Therefore, development of a suitable immunoprophylactic is crucial. Live vaccines, either derived from crusts harvested from deliberately infected animals or produced in cell cultures, have been used in several countries (Hosamani et al., 2009). A number of outbreaks of contagious ecthyma have been reported in Brazil, affecting sheep, goats and, occasionally affecting human (Torres, 1939; Salles et al., 1992; Langoni et al., 1995; Catroxo et al., 2002; Nóbrega Jr et al., 2008).

The ORFV genome consists of a linear double stranded DNA, it is 138 kbp and contains 132 putative genes (Delhon et al., 2004). The central genomic core region encodes proteins involved in the virus structure and assembly, while the terminal regions contain genes implicated in host range and virulence proteins (Delhon et al., 2004). The envelope gene (B2L) of the ORFV encodes a highly immunogenic major envelope protein of about 42 kDa, which is a homolog of vaccinia virus major envelope antigen p37K (Sullivan et al., 1994). The B2L gene has been used for detection, molecular characterization and phylogenetic analysis of ORFV molecular target, and several B2L nucleotide and amino acids sequence are available in GenBank (Hosamani et al., 2006; Abrahão et al., 2009; Lojkic, et al. 2010). Genetic analysis of ORFV B2L gene has been used to examine the genetic variability of field viruses, to establish genetic relationships among viruses from different origins and to investigate possible origin of viruses in different countries (Hosamani et al., 2006; Abrahão et al., 2009; Lojkic, et al. 2010; Zhao et al., 2010; Venkatesan et al., 2011).

Orf virus strains have been characterized in many countries, but few studies are available on Brazilian ORFV isolates (Abrahão et al., 2009). Some studies have found high sequence identity of B2L gene among ORFV strains, showing that the protein is well

conserved in these viruses (Hosamani, et al. 2006; Lojkic, et al. 2010). Nevertheless, a study of two Brazilian orf virus isolates showed variation between sequences, suggesting genetic differences among Brazilian isolates (Abrahão, et al., 2009).

This article reports a phylogenetic analysis of 9 Brazilian ORFV strains, based on sequence analysis of B2L gene. The analyzed viruses were obtained from natural outbreaks of contagious ecthyma in sheep and goats, in Southern and Northeast Brazil. We also analysed three vaccine strains to assess the relationship among Brazilian viruses and vaccine strains used in the country.

2. Material and methods

2.1. Viruses

Clinical samples (scabs) obtained from naturally occurring cases of ecthyma in sheep in Rio Grande do Sul (n=6), Paraíba (n=1); and goats in Bahia (n=1), Pernambuco (n=1), between 2008 and 2011 were analysed. Three vaccine strains were also included in the analysis (Table 1). The samples were subjected to partial PCR amplification of B2L gene, nucleotide sequencing and phylogenetic analysis.

2.2. DNA extraction, PCR and DNA purification

Total DNA was extracted from 200mg of triturated scabs or from 500µl of vaccine suspension, using DNAzol® reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), according to the manufacturer's instructions.

A set of primers: PPP-1 (5'-gtc gtc cac gat gag cag ct-3) and PPP-4 (5'-tac gtg gga age gcc tcg ct-3), which amplifies a 594 bp fragment of the B2L gene was used (Inoshima et al., 2000). DNA was amplified by 95°C for 9 min, and 30 cycles of denaturation (94°C, 1 min), annealing (55°C, 1 min) and extension (72°C, 1 min), and final extension by 72°C for 7 min. An aliquot (5µl) of PCR product was analyzed by 1.0% agarose gel electrophoresis to

visualize the amplicons. The PCR products (95µl) were purified by using commercial kit Illustra™ GFX™ PCR DNA and gel band purification Kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), according to manufacturer's instructions, and the partial sequence of major envelope gene was submitted to nucleotide sequencing.

2.3. Nucleotide sequencing and analysis

Samples were submitted to sequencing in duplicate by ACTGene Análises Moleculares Ltd. (*Centro de Biotecnologia*, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil) using the automatic sequencer ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer armed with 50 cm capillaries and POP6 polymer (Applied Biosystems). DNA templates (30 to 45 ng) were labeled with 3.2 pmol of the primer (PPP-1 and PPP-4) and 3 µL of BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100 (Applied Biosystems) in a final volume of 10 µL. Labeling reactions were performed in a GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) thermocycler with a initial denaturing step of 96 °C for 3 min followed by 25 cycles of 96 °C for 10 sec, 55 °C for 5 sec and 60 °C for 4 min. Sequencing data were collected using the software Data Collection v 1.0.1 (Applied Biosystems) programmed with the following parameters: Dye Set "Z"; Mobility File "DT3100POP6{BDv3}v1.mob"; BioLIMS Project "3100_Project1"; Run Module 1 "StdSeq50_POP6_50cm_cfv_100"; and Analysis Module 1 "BC-3100SR_Seq_FASTA.saz".

The sequences were analysed by the Staden Package (Staden, 1996), to obtain consensus sequences of each sample, which were subsequently submitted to BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) software (Altschul et al., 1997) for comparison with sequences deposited in GenBank, using NCBI database. The sequences alignment were performed using the ClustalW, which is within the BioEdit Sequence Alignment Editor software suite, version 7.0.5.3 (Hall, 1999). The nucleotide identities, as well as those of amino acids, was also

obtained by BioEdit software. The phylogenetic tree reconstruction of isolates and reference strains of PPV was conducted in MEGA 5 (Tamura et al. 2007), by Neighbor-Joining method, with 2000 *bootstrap* replicates, based on p-distance model.

3. Results and discussion

This study analyzed the nucleotide and amino acid sequences of a fragment within the B2L gene of ORFV from nine isolates (field viruses from natural outbreaks) and three vaccine strains. In spite of the widespread distribution of the virus in Brazilian sheep and goat flocks, studies on genetic diversity of ORFV in Brazil are scarce (Abrahão et al., 2009). Recent studies on genetic diversity of ORFV strains and isolates from small ruminants were carried out in China (Zhao et al., 2010), India (Venkatesan et al., 2011), Brazil (Abrahão et al., 2009) and Croatian (Lojkic, et al., 2010).

A specific PCR product of 594 bp was obtained from all Brazilian ORFVs and vaccine strains by a B2L gene-based PCR. The B2L gene has been the main target for molecular detection and genetic analysis of ORFV and other PPVs as well (Abrahão et al., 2009; Lojkic, et al., 2010; Zhao et al., 2010; Venkatesan et al., 2011). Analysis of nucleotide sequence revealed a close relationship among the Brazilian ORFVs and with other ORFV sequences. Nucleotide alignment of edited sequences (539bp) and the identity matrix of nucleotide and deduced amino acid revealed close relationship among OFRV B2L gene of Brazilian samples from sheep and goats from different regions. Brazilian samples shared 97.7 - 100% and 96.1-100% nucleotide and amino acid identity, respectively. Comparison of Brazilian sequences with three vaccine strains used in Southern Brazil and Uruguay showed 98.7 - 100% nucleotide similarity and 97.7-100% amino acid identity. With ORFV reference strain (ORFV-IA82), Brazilian samples showed 98.1-100% and 97.7-100% nucleotide and amino acid identity, respectively. Levels of nucleotide and amino acid identity among Brazilian

sequences, vaccine strains and reference strain of ORFV B2L gene are shown in table 2. High nucleotide similarity level (98.7%) was already observed by Abrahão et al. (2009), in a study with Brazilian isolates (MT05 and NE1). The high identity level of B2L gene in ORFV, PCPV and BPSV reveals that the protein is well conserved in *Parapoxviruses* (Hosamani et al., 2006). This is consistent with the fact that central region of *Parapoxviruses* is generally well conserved in comparison with terminal regions (Delhon et al., 2004). The central genomic core region comprising open reading frames 009-111, encodes proteins involved in the virus structure and assembly, while the terminal regions contain less conserved genes, whose products are implicated in host range and virulence (Delhon et al., 2004).

The phylogenetic relationship was obtained by Neighbor-joining method and supported by 2000 bootstrap replicates (Fig.1). The phylogenetic analysis of the B2L gene, based on deduced amino acid sequences, showed that ORFV, PCPV and BPSV clustered in different branches. The grouping pattern of parapoxviruses – ORFV, PCPV and BPSV – formed separate clusters, which is consistent with other reports (Lojkic et al., 2010; Abrahão et al., 2009; Zhao et al., 2010). Brazilian viruses from sheep and vaccine strains clustered in the same branch, and viruses from goats clustered into a separate branch. SV578-08 is grouped with vaccine strain of Goat (AY278209) and ORFV-IA82 (AY386263). Canguçu and São Martinho grouped with ORFV-MT05 (FJ665818) in a separate cluster. Other Brazilian viruses SV251/11, SV269/11, SV 520/11, Patos and Vaccine A, Vaccine B, Vaccine C grouped all together. Goat isolates Bahia and SJE grouped with ORFV-NE1 (FJ665819).

In this work, Brazilian ORFV from sheep grouped near to the vaccine strains. These vaccines are available in Rio Grande do Sul and Uruguay, and are intended to be used mainly in sheep. The vaccine strains were probably obtained from these regions, and, therefore, are expected to be very similar to circulating viruses. Regarding to vaccine protection, a high similarity of vaccine strains with field viruses is a desirable trait. Although phylogeny of B2L

gene has not been specifically used to verify relationships related to antigenic cross-reactivity and vaccine protection, the genetic proximity among these viruses may also indicate antigenic relatedness.

Although ORFV infection is distributed worldwide and exerts an important impact on sheep and goat production, genetic analysis of field ORFV strains is scarce in the literature. Furthermore, most – if not all – available studies focus on genetic analysis of a single or few isolates (Abrahão et al, 2009; Lojkic et al., 2010; Zhao et al., 2010; Venkatesan et al., 2011). In general, these studies have shown a high degree of sequence similarity of B2L gene among isolates from different, distant geographical locations. The genetic relationships among different ORFV strains have been exploited to explain the origin of some strains (Hosamani et al., 2006; Lojkic et al., 2010; Zhao et al., 2010). In spite of the overall high similarity among ORFV field strains, analysis of B2L gene has allowed the identification of clusters of more related viruses, perhaps indicating different geographical origins and/or adaptation and evolution in different hosts (sheep versus goats).

ORFV is endemic in Brazil (Mazur et al., 2000). Vaccination has been implemented in some regions, but morbidity and economic losses are still significant. An increase in the Brazilian ovine and goat market has been observed over the last years, leading to increase in herd size, implementation of technology and intensification of animals transport and commerce. This scenario is favorable for an increased number of ORFV outbreaks (Abrahão et al., 2009). In contrast with this increase, the management of small ruminants in most flocks is primitive, using unsophisticated technical assistance and feeding basically on native grass. In this sense, molecular characterization of field viruses is a useful tool to understand the epidemiology of ORFV.

The phylogenetic studies showed that Brazilian samples are closely related with vaccine strains. In the available literature, genetic analysis of ORFV strains towards

investigation of antigenic relatedness between vaccine and field strains has not been carried out (Abrahão et al., 2009). Nevertheless, some genetic diversity has been observed among field viruses and may have some implication for vaccine protection. Thus, in addition to determine genetic relatedness, genetic analysis of field ORFV should also focus on detecting genetic variation that may influence antigenic properties and, therefore, with potential impact on vaccine protection.

References

- Abrahão, J.S., Campos, R.K., Trindade, G.S., Guedes, M.I.M., Lobato, Z.I.P., Mazur, C., Ferreira, C.P.P., Bonjardim, C.A., Kroon, E.G., 2009. Detection and phylogenetic analysis of Orf virus from sheep in Brazil: a case report. *Virology* 6, 47.
- Allworth, M.B., Hughes, K.L., Studdert, M.J., 1987. Contagious pustular dermatitis (orf) of sheep affecting ear following ear tagging. *Aust. Vet. J.* 64, 61–62.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389-3402.
- Barros, C.S.L., 2007. Ectima contagioso. In: Riet-Correa, F. (Ed.). *Doenças de ruminantes e equinos*. Palotti, Santa Maria, p. 98-102.
- Catroxo, M.H.B., Curi, N.A., Pituco, E.M., Garcia, M., Okuda, L.H., Porto, A.C.R., Stefano, E. 2002. Ocorrência de ectima contagioso em ovinos criados em Itatiba, estado de São Paulo, Brasil. *Arqs Inst Biológico*. São Paulo, 69 (Supl.):37.
- De la Concha-Bermejillo, A., Guo, J., Zhang, Z., Waldron, D., 2003. Severe persistent orf in young goats. *J Vet Diagn Invest.* 15, 423–431.
- Delhon, G., Tulman, E.R., Afonso, C.L., Luz, de la Concha-Bermejillo, A., Lehmkuhl, H.D., Piccone, M.E., Kutish, G.F., Rock, D.L. 2004. Genomes of the parapoxviruses ORF virus and bovine papular stomatitis virus. *J Virol.* 78, 168-177.
- Fleming, S.B., Blok, J., Fraser, K.M., Mercer, A.A., Robinson, A.J., 1993. Conservation of gene structure and arrangement between vaccinia virus and Orf virus. *Virology* 195, 175-184.
- Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series.* 41, 95-98.
- Hosamani, M., Bhanuprakash, V., Scagliarini, A., Singh, R.K., 2006. Comparative sequence analysis of major envelope protein gene (B2L) of Indian orf viruses isolated from sheep and goats. *Vet. Microbiol.* 116, 317–32.

- Hosamani, M., Scagliarini, A., Bhanuprakash, V., McInnes, C.J., Singh, R.K., 2009. Orf: an update on current research and future perspectives. *Expert Rev. Anti Infect Ther.* 7, 879-893.
- Inoshima, Y., Morooka, A., Sentsui, H., 2000. Detection and diagnosis of parapoxvirus by the polymerase chain reaction. *J Virol Methods.* 84, 201-208.
- Langoni, H., Coelho, K.I.R., Pimentel, M.P., Siqueira, E.R., Spago, E.N., 1995. Ectima contagioso em ovinos na região de Botucatu. *Hora Vet.* 14, 60-62.
- Lojkic, I., Cac, Z., Beck, A., Bedekovic, T., Cvetnic, Z., Sosteric, B., 2010. Phylogenetic analysis of Croatian orf viruses isolated from sheep and goats. *Viol J.* 7, 314.
- Mazur, C., Ferreira, I.I., Rangel Filho, F.B., Galer, R., 2000. Molecular characterization of Brazilian isolates of orf virus. *Vet Microbiol.* 73, 253-259.
- McKeever, D.J., Jenkinson, D.M., Hutchison, G., Reid, H.W., 1988. Studies of the pathogenesis of orf virus infection in sheep. *J Comp Pathol.* 99, 317-328.
- Mercer, A.A., Uedaa, N., Friederichs, S., Hofmann, K., Fraser, K.M., Bateman, T., Fleming, S.B., 2006. Comparative analysis of genome sequences of three isolates of Orf virus reveals unexpected sequence variation. *Vir Res.* 116, 146-158.
- Moss B. Poxviridae: The virus and their replication. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. *Fields Virology.* Lippincott Williams, Philadelphia, New York, 2007, p. 2079-2081.
- Murphy, F.A., Gibbs, E.P.J., Horzinek, M.C., Studdert, M.J., 1999. Poxviridae. In: Murphy FA, Gibbs EPJ, Horzinek MC, Studdert, M.J. (Eds.), *Veterinary virology.* 3rd ed. Academic Press, New York, p. 277-291.
- Nettleton, P.F., Gilray, J.A., Yirrell, D.L., Scott, G.R., Reid, H.W., 1996. Natural transmission of orf virus from clinically normal ewes to orf-naive sheep. *Vet. Rec.* 139, 364-366.
- Nóbrega Jr, J.E., Macêdo, J.T.S.A., Araújo, J.A.S., Dantas, A.F.M., Soares, M.P., Riet-Correa, F., 2008. Ectima contagioso em ovinos e caprinos no semi-árido da Paraíba. *Pesq. Vet. Bras.* 28, 135-139.
- Salles, M.W.S., Barros, C.S.L., Lemos, R.A.A., Weiblen R., 1992. Ectima contagioso (Dermatite pustular) dos ovinos. *Cienc. Rural.* 22, 319-324.
- Sargison, N.D., Scott, P.R., Rhind, S.M., 2007. Unusual outbreak of orf affecting the body of sheep associated with plunge dipping. *Vet. Rec.* 160, 372-373.
- Staden, R., 1996. The Staden sequence analysis package. *Mol Biotechnol.* 5, 233-241.
- Sullivan, J.T., Mercer, A.A., Fleming, S.B., Robinson, A.J., 1994. Identification and characterization of an orf homologue of the vaccinia virus gene encoding the major envelope antigen p37K. *Viol.* 202, 968-973.

- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evolut.* 24, 1596–1599.
- Torres, S. 1939. Dermatite pustular contagiosa nos caprinos e ovinos no Pernambuco. *Bol. Soc Bras Med Vet.* 9, 107-108.
- Venkatesan, G., Balamurugan, V., Bora, D.P., Yogisharadhya, R., Prabhu, M., Bhanuprakash, V., 2011. Sequence and phylogenetic analyses of an Indian isolate of orf virus from sheep. *Vet Ital.* 47, 323-332.
- Zhao, K., Song, D., He, W., Lu, H., Zhang, B., Li, C., Chen, K., Gao, F., 2010. Identification and phylogenetic analysis of an Orf virus isolated from an outbreak in sheep in the Jilin province of China. *Vet Microbiol.* 142, 408-415.

Table 1
Origin of orf viruses submitted to phylogenetic analysis of B2L gene

| Identification | Species | Lesions | Origin | Year |
|----------------|---------|-------------------------------------|--------|------|
| SV 578/08 | Sheep | Teats, udders | RS | 2008 |
| Patos | Sheep | Lips, nostrils | PB | 2009 |
| São Martinho | Sheep | Lips, nostrils | RS | 2009 |
| SJE | Goat | Lips, nostrils | PE | 2009 |
| Bahia | Goat | Lips, vulva | BA | 2010 |
| Canguçú | Sheep | Lips, nostrils, teats, udders, feet | RS | 2010 |
| SV 252/11 | Sheep | Teats | RS | 2011 |
| SV 269/11 | Sheep | Lips, nostrils, udders, teats | RS | 2011 |
| SV 520/11 | Sheep | Lips, nostrils, udders | RS | 2011 |
| Vaccine A | Sheep | Na | Na | Na |
| Vaccine B | Sheep | Na | Na | Na |
| Vaccine C | Sheep | Na | Na | Na |

RS – Rio Grande do Sul; BA – Bahia; PE – Pernambuco; PB – Paraíba; Na – non aplicable.

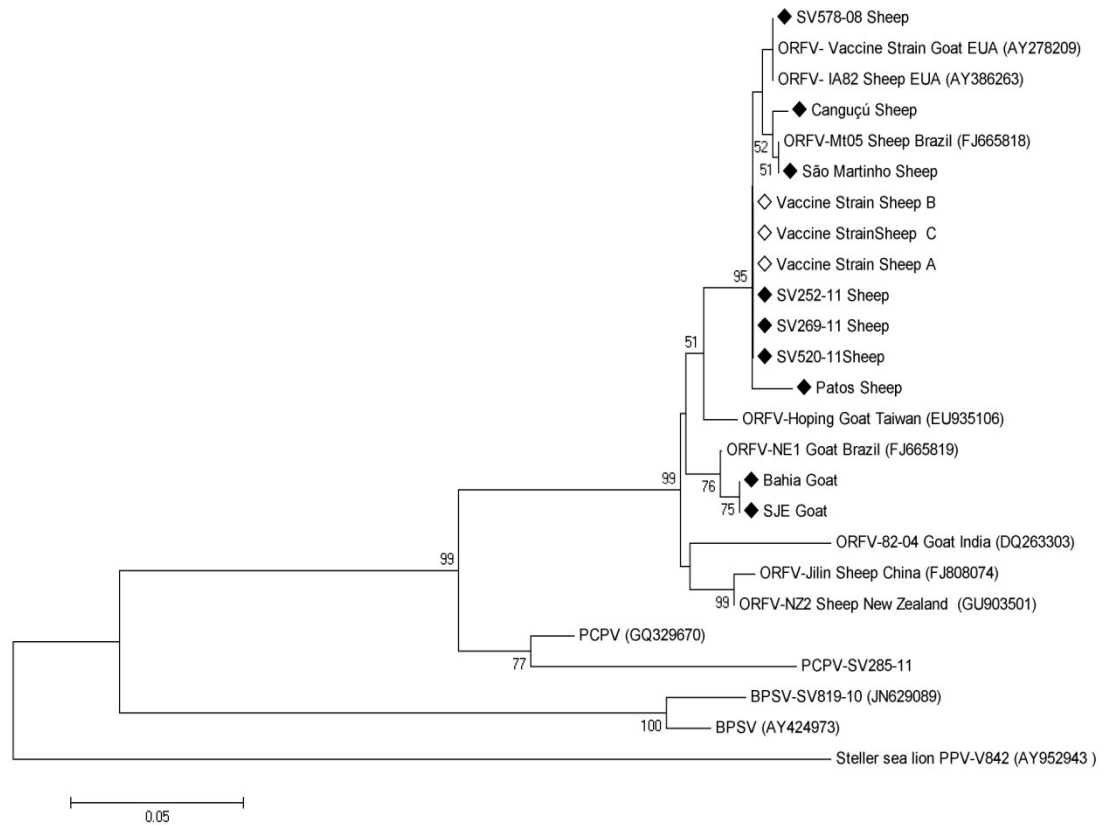


Fig. 1. Phylogenetic analysis of parapoxviruses based on the amino acid sequence of B2L gene product. The phylogenetic relationship was constructed by using the Neighbor-joining method of MEGA version 5.0. Numbers on the tree branches represent the bootstrap support calculated per 2000 bootstrap replicates. The scale bar beneath the tree represents the aa substitutions per site.

Table 2

Nucleotide and deduced amino acid sequence identity of B2L gene among Brazilian orf viruses and vaccine strains.

| Isolates | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 |
|-------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 1 IA82 | | 98,7 | 99,6 | 99,8 | 99,8 | 99,8 | 99,6 | 98,3 | 99,4 | 98,5 | 99,2 | 99,8 | 99,6 | 99,6 | 100 |
| 2 NE1 | 98,3 | | 98,7 | 98,8 | 98,8 | 98,8 | 98,7 | 99,6 | 98,1 | 99,8 | 98,3 | 98,8 | 98,7 | 98,7 | 98,7 |
| 3 MT05 | 100 | 98,3 | | 99,8 | 99,8 | 99,8 | 100 | 98,3 | 99,4 | 98,5 | 99,2 | 99,8 | 99,6 | 99,6 | 99,6 |
| 4 Vaccine A | 100 | 98,3 | 100 | | 100 | 100 | 99,8 | 98,5 | 99,2 | 98,7 | 99,4 | 100 | 99,8 | 99,8 | 99,8 |
| 5 Vaccine B | 100 | 98,3 | 100 | 100 | | 100 | 99,8 | 98,5 | 99,2 | 98,7 | 99,4 | 100 | 99,8 | 99,8 | 99,8 |
| 6 Vaccine C | 100 | 98,3 | 100 | 100 | 100 | | 99,8 | 98,5 | 99,2 | 98,7 | 99,4 | 100 | 99,8 | 99,8 | 99,8 |
| 7 São Mart. | 100 | 98,3 | 100 | 100 | 100 | 100 | | 98,3 | 99,4 | 98,5 | 99,2 | 99,8 | 99,6 | 99,6 | 99,6 |
| 8 Bahia | 98,3 | 100 | 98,3 | 98,3 | 98,3 | 98,3 | 98,3 | | 97,7 | 99,8 | 97,9 | 98,5 | 98,3 | 98,3 | 98,3 |
| 9 Canguçu | 99,4 | 97,7 | 99,4 | 99,4 | 99,4 | 99,4 | 99,4 | 97,7 | | 97,9 | 99,4 | 99,2 | 99,4 | 0,99 | 99,4 |
| 10 SJE | 98,3 | 100 | 98,3 | 98,3 | 98,3 | 98,3 | 98,3 | 1 | 97,7 | | 98,1 | 98,7 | 98,5 | 98,5 | 98,5 |
| 11 Patos | 100 | 98,3 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 98,3 | 99,4 | 98,3 | | 99,4 | 99,2 | 99,2 | 99,2 |
| 12 SV252-1 | 97,7 | 96,1 | 97,7 | 97,7 | 97,7 | 97,7 | 97,7 | 96,1 | 97,2 | 96,1 | 97,7 | | 99,8 | 99,8 | 99,8 |
| 13 SV269-1 | 99,4 | 97,7 | 99,4 | 99,4 | 99,4 | 99,4 | 99,4 | 97,7 | 100 | 97,7 | 99,4 | 97,2 | | 99,6 | 99,6 |
| 14 SV520-1 | 99,4 | 97,7 | 99,4 | 99,4 | 99,4 | 99,4 | 99,4 | 97,7 | 98,8 | 97,7 | 99,4 | 97,2 | 98,8 | | 99,6 |
| 15 SV578-0 | 100 | 98,3 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 98,3 | 99,4 | 98,3 | 100 | 97,7 | 99,4 | 99,4 | |

Sequence identity was determined by Clustal W method in the BioEdit program. The upper right triangle is the nucleotide sequence identity -and the lower left triangle is the deduced amino acid sequence identity.

4. CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho permitem concluir que:

- A vacina produzida em cultivo celular conferiu proteção parcial aos animais desafiados com um isolado virulento de ORFV;
- A vacina foi efetiva em reduzir a intensidade e a duração das lesões; reduzir a quantidade e o tempo de excreção viral;
- O vírus do ectima contagioso pode persistir e ser excretado por longo período em animais infectados, mesmo após a resolução clínica das lesões;
- O vírus pode ser recuperado de crostas mantidas em temperatura ambiente por até seis meses;
- As amostras brasileiras de ORFV submetidas à análise filogenética apresentaram uma alta similaridade no gene B2L;
- Filogeneticamente, as amostras brasileiras de ovinos se agruparam junto com as cepas vacinais; enquanto que as amostras de caprinos se agruparam separadamente.

5. REFERÊNCIAS

ABRAHÃO, J.S. et al. Detection and phylogenetic analysis of orf virus from sheep in Brazil: a case report. **Virology Journal**, London, v. 6, n. 47, p. 1-4, May 2009.

BUDDLE, B.M. et al. Contagious ecthyma virus-vaccination failures. **American Journal of Veterinary Research**, United states, v. 45, n. 2, p. 263-269, February 1984.

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

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

CHAN, K.W. et al. Identification and phylogenetic analysis of orf virus from goats in Taiwan. **Virus Genes**, v. 35, n. 3, p.705-712, December 2007.

DELHON, G. et al. Genomes of the parapoxviruses orf virus and bovine papular stomatitis virus. **Journal of Virology**, United States, v. 78, n. 1, p. 168-177, August 2004.

FLEMING S.B., et al. Conservation of gene structure and arrangement between vaccinia virus and Orf virus. **Virology**, New York, v. 195, n. 1, p. 175-184, July 1993.

FLEMING, S.B. & MERCER, A.A. Genus Parapoxvirus. In: MERCER, A.A. et al. **Poxviruses**. Birkauser: Basel, 2007, p. 127-166, 2007.

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

GREIG, A. S. Contagious echthyma of sheep: Attempts to infect other hosts. **Canadian Journal of Comparative Medecine and Veterinary Science**, Canada, v. 20, n. 12, p. 448-452, September 1956.

HAIG, D.M. et al. Cytokines and their inhibitors on orf virus infection. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 54, n. 4, p. 261-267, March 1997.

HAIG, D. M. & MERCER, A. A. Ovine diseases: Orf. **Veterinary Research**, England, v. 29, n. 3-4, p. 311-326, August 1998.

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

HAIG, D.M. & McINNES, C.J. Immunity and counter-immunity during infection with the parapoxvirus orf virus. **Virus Research**, Netherlands, v. 88, n. 1-2, p. 3-16, September 2006.

HOSAMANI, M. et al. Orf: an update on current research an future perspectives. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, London, v. 7, n. 7, p. 879-893, September 2009.

LOJKIC, I. et al. Phylogenetic analysis of Croatian orf viruses isolated from sheep and goats. **Virology Journal**, London, v. 7, p. 314, November 2010.

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

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

MAZUR, C., et al. Molecular characterization of Brazilian isolates of orf vírus. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 73, n. 4, p. 253-259, May 2000.

McKEEVER, D.J. et al. Studies of the pathogenesis of orf virus infection in sheep. **Journal of Comparative Pathology**, Liverpool, v. 99, n. 3, p. 318-327, October 1988.

McKEEVER, D. J. & REID, H. W. Survival of orf virus under British winter conditions. **Veterinary Record**, London, v. 118, n. 22, p.613-614, May1986.

NETTLETON, P.F. et al. Tissue culture-propagated orf virus vaccine protects lambs from orf virus challenge. **Veterinary Research**, London, v.138, n. 8, p. 184-186, February 1996.

NÓBREGA Jr, J. E. et al. Ectima contagioso em ovinos e caprinos no semi-árido da Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 28, n. 3, p. 135-139, Março 2008.

PYE, D. et al. Vaccination of sheep with cell culture grown orf virus. **Australian Veterinary Journal**, Australia, v. 67, n. 5, p. 182-188, May 1990.

REID, H. W. Contagious Ecthyma. In: **Diseases of sheep**. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1991. 265p.

ROBINSON, A. J. & BALASSU, T. C. Contagious pustular dermatitis (orf). **The Veterinary Bulletin**, England, v. 51, p. 771-782, November 1981.

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

ZHAO, K. et al. Identification and phylogenetic analysis of an Orf virus isolated from an outbreak in sheep in the Jilin province of China. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 142, n. 3-4, p. 408-415, May 2010.