

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

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E FENOTÍPICA DE
AMOSTRAS DO VÍRUS DO ECTIMA CONTAGIOSO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Mathias Martins

**Santa Maria, RS, Brasil
2014**

CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E FENOTÍPICA DE AMOSTRAS DO VÍRUS DO ECTIMA CONTAGIOSO

Mathias Martins

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 obtenção de grau de
Mestre em Medicina Veterinária

Orientador: Prof. Rudi Weiblen

Santa Maria, RS, Brasil

2014

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária**

**A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado**

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E FENOTÍPICA DE AMOSTRAS
DO VÍRUS DO ECTIMA CONTAGIOSO**

elaborada por
Mathias Martins

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

COMISSÃO EXAMINADORA:

Rudi Weiblen, PhD.
(Presidente/Orientador)

Eduardo Furtado Flores, PhD. (UFSM)

Mário Celso Sperotto Brum, Dr. (UNIPAMPA)

Santa Maria, 3 de fevereiro de 2014

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, agradeço minha família pela confiança em mim depositada, além do amor e união em todos os momentos. Em especial ao meu pai, pelo incentivo incondicional, por todos os conselhos e por tudo que me ensinou. Mesmo tendo nos deixado, será sempre minha principal referência.

Ao Setor de Virologia, representado por todas as pessoas que em algum momento fizeram parte do grupo de pesquisa e principalmente aos colegas da pós e bolsistas que colaboraram diretamente com a realização deste trabalho.

Aos orientadores, prof. Rudi e prof. Eduardo, pela oportunidade e confiança, pela dedicação e pelos tantos ensinamentos que contribuíram muito para meu crescimento pessoal e profissional.

À Ju, além da grande amizade, por ter sido uma colega/orientadora, pela paciência e por ter estado sempre disponível.

Aos amigos do laboratório, da faculdade, e todos os outros que tornaram meus dias mais agradáveis, com certeza também foram importantes.

À Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) e ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária pela oportunidade de realizar mestrado em um programa de excelência da CAPES.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização deste objetivo, meu muito obrigado!

RESUMO

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

CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E FENOTÍPICA DE AMOSTRAS DO VÍRUS DO ECTIMA CONTAGIOSO

AUTOR: MATHIAS MARTINS
ORIENTADOR: RUDI WEIBLEN
Santa Maria, 3 de fevereiro de 2014

O vírus da orf (ORFV) pertence à família *Poxviridae*, subfamília *Chordopoxvirinae* gênero *Parapoxvirus* e é o agente etiológico do ectima contagioso, uma doença mucocutânea que afeta principalmente ovinos e caprinos jovens e pode, ocasionalmente, afetar pessoas. Clinicamente, a enfermidade evolui com a formação de áreas hiperêmicas, vesículas, pústulas, úlceras e lesões proliferativas e crostosas sobre a pele dos lábios, comissura labial e narinas. Apresentações clínicas variáveis, com diferentes graus de severidade, ocorrem frequentemente e podem estar associadas a características do hospedeiro e, principalmente, a características genéticas do agente. O presente trabalho teve como objetivo investigar o fenótipo *in vivo* e caracterizar genes de virulência de quatro amostras de ORFV oriundas de surtos no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Para isso, foram utilizados vinte ovinos, com idade entre 6 e 8 meses, divididos em cinco grupos de quatro animais cada. Os ovinos foram inoculados na comissura labial com homogeneizados de crostas (títulos virais $10^{5,6}$ DICC₅₀/ml) obtidas dos surtos (amostras SV269/11, SV252/11, SV581/11 e SV820/10-Canguçu). Os animais foram avaliados durante 30 dias com relação aos aspectos clínicos e virológicos, por inspeção clínica e coleta de suabes das lesões para detecção da excreção viral. As manifestações clínicas foram convertidas em um escore clínico, para cada animal e para os grupos. Os animais inoculados com as quatro amostras desenvolveram lesões típicas de ectima contagioso, caracterizadas por hiperemia, pápulas, máculas, vesículas e pústulas, e formação de crostas em diferentes graus de intensidade e duração. As amostras SV269/10 e SV820/10-Canguçu induziram lesões mais graves, escores clínicos maiores e maior tempo de duração das lesões. Os animais inoculados com a amostra SV581/11 desenvolveram lesões e escores clínicos significativamente inferiores aos demais grupos, mas excretaram o vírus por período mais longo. Para a caracterização genética, foi realizada a amplificação por PCR e sequenciamento de nucleotídeos de três genes de virulência (VEGF, VIR e IL-10v). Foram identificadas deleções e mutações nas sequências dos genes VEGF e IL-10v das amostras SV581/11 e SV252/11. O grau de identidade de aminoácidos entre as amostras foi variável, sendo que a menor homologia foi encontrada no gene VEGF da amostra SV581/11, quando comparado com os demais vírus e a cepa padrão. Assim, os resultados obtidos demonstram que as amostras SV581/11 e SV252/11, em especial a primeira, foram menos virulentas em ovinos do que as amostras SV269/11 e SV820/10-Canguçu. Possivelmente essa diferença fenotípica observada *in vivo* seja resultado das alterações genéticas detectadas nos genes de virulência.

Palavras-chave: *orf*, ORFV, virulência, fenótipo *in vivo*, imunomodulação, fator de virulência, VEGF, VIR, IL-10v.

ABSTRACT

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

GENETIC AND PHENOTYPIC CHARACTERIZATION OF CONTAGIOUS ECTHYMA VIRUS ISOLATES

AUTHOR: MATHIAS MARTINS

ADVISER: RUDI WEIBLEN

Santa Maria, February 3rd, 2014

Orf virus (ORFV) belongs to the family *Poxviridae*, subfamily *Chordopoxvirinae* and genus *Parapoxvirus* and is the agent of contagious ecthyma, a mucocutaneous disease that affects mainly young sheep and goats and, occasionally, may affect people. The clinical lesions progress through stages of hyperemia, papules, vesicles, pustules, ulcers and proliferative and scabby lesions, located mainly on the labial commissure, lips and nostrils. Variable clinical lesions with different degrees of severity often occur in sheep and goats, and may be associated with host and/or viral genetics. The present study aimed to investigate the phenotype *in vivo* and to characterize virulence genes of four ORFV isolates recovered from contagious ecthyma outbreaks in Rio Grande do Sul State, Brazil. Twenty sheep, aged 6 and 8 months, were divided into five groups of four animals each and inoculated in the labial commissure with homogenates of scabs (viral titers $10^{5.6}$ TCID₅₀/ml) obtained from different outbreaks: SV269/11, SV252/11, SV581/11 and SV820/10-Canguçu. The animals were evaluated for 30 days in clinical and virological aspects by clinical inspection and swab collection for virus isolation. A clinical score was established for each animal and group. All ORFV inoculated animals developed classical ecthyma contagious lesions, characterized by hyperemia, papules, macules, vesicles, pustules and scabs in varied degrees and duration. SV269/10 and SV820/10-Canguçu isolates induced more severe lesions resulting in higher clinical scores and longer duration of lesions. The animals inoculated with SV581/11 developed milder lesions and clinical scores significantly lower than other groups, but they shed virus for a longer period of time. For genetic analyses, PCR amplification and nucleotide sequencing of three virulence genes (VEGF, VIR and IL-10v) were performed. Deletion and mutations on VEGF and IL-10v amino acid sequence of SV581/11 and SV252/11 isolates were identified. The degree of amino acid identity among ORFV sequences was variable, and the lowest homology was found in the VEGF gene of SV581/11 when compared with the standard strains and other viruses. Thus, the present results showed that SV581/11 and SV252/11 isolates, particularly the former, are less virulent in sheep than SV269/11 and SV820/10-Canguçu. Possibly, the variable phenotypic observed *in vivo* is due to genetic alterations detected in the analyzed virulence genes.

Key words: *orf*, ORFV, virulence, phenotype *in vivo*, immunomodulation, virulence factor, VEGF, VIR, IL-10v.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 (Fig. 1) - Lesões apresentadas pelos ovinos experimentalmente infectados com quatro amostras do vírus do ectima contagioso (ORFV) nos dias 6, 14 e 22 pós-inoculação (pi) 33
- FIGURA 2 (Fig. 2) - Médias diárias dos escores clínicos dos grupos inoculados com quatro amostras do vírus do ectima contagioso, entre os dias 0 e 30 pós-inoculação (pi). As barras verticais demonstram o erro padrão da média (EPM). 34
- FIGURA 3 (Fig. 3) - Alinhamento de sequências de aminoácidos codificados pelo gene VEGF (A) e sequências parciais codificadas pelo gene IL-10v (B) de amostras de ORFV (sequências recuperadas do GenBank), incluindo as sequências obtidas neste estudo. As sequências foram alinhadas utilizando o programa BioEdit. Regiões destacadas evidenciam deleções ou substituições de aminoácidos por outros com diferentes composições químicas e funções quando comparados à cepa de referência..... 35

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 (Quadro 1) - Sequências dos iniciadores utilizados para a amplificação dos genes de virulência	29
TABELA 2 (Quadro 2) - Detecção de vírus em suabes coletados da comissura labial de ovinos inoculados com amostras do vírus do ectima contagioso (ORFV).....	30
TABELA 3 (Quadro 3) - Números de acesso ao GenBank para as sequências de nucleotídeos dos genes de virulência das amostras de ORFV analisadas neste estudo.....	31
TABELA 4 (Quadro 4) - Percentual de identidade das sequências completas e parciais de aminoácidos dos genes de virulência entre as amostras analisadas neste estudo e com a cepa de referência OV-IA82	32

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. CAPÍTULO 1 - CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E FENOTÍPICA DE AMOSTRAS DO VÍRUS DO ECTIMA CONTAGIOSO.....	14
INTRODUÇÃO.....	17
MATERIAL E MÉTODOS	18
RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
CONCLUSÃO	24
REFERÊNCIAS.....	25
3. CONCLUSÃO.....	36
4. REFERÊNCIAS	37

1. INTRODUÇÃO

O ectima contagioso, também conhecido como *orf*, estomatite ou dermatite pustular contagiosa, é uma enfermidade viral que cursa com lesões crostosas e proliferativas na pele e nas junções mucocutâneas de ovinos, caprinos e, ocasionalmente, do homem (ROBINSON & BALASSU, 1981; HAIG & MERCER, 1998). A denominação *orf* deriva de uma expressão inglesa antiga para *aspecto rugoso*, referindo-se as características clínicas das lesões (CANAL, 2007).

O ectima contagioso é causado pelo vírus da orf (ORFV) que pertence à família *Poxviridae*, subfamília *Chordopoxvirinae* e gênero *Parapoxvirus* (HAIG & MERCER, 1998). Outros membros do gênero *Parapoxvirus* incluem o vírus da pseudovariola (PCPV), o vírus da estomatite papular bovina (BPSV), associados com lesões de pele em bovinos, e os parapoxvírus dos veados na Nova Zelândia (PVNZ) (MURPHY et al., 1999). Os parapoxvírus (PPVs) são genética e antigenicamente relacionados entre si, e apresentam grande similaridade na organização genômica e mecanismos de virulência (FLEMING et al., 1993). O ORFV é um vírus envelopado, contém uma fita dupla de DNA linear como genoma, com aproximadamente 140 Kb, conteúdo médio de G + C de 64% e codifica aproximadamente 132 produtos (DELHON et al., 2004).

O ORFV é o membro mais importante dos PPV em animais de interesse econômico (BUTTNER & RZIHA, 2002). O ectima contagioso possui distribuição mundial, sendo endêmico na maioria dos países que possuem criações comerciais de ovinos e caprinos (ROBINSON & 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 doença tem sido estimada com base na ocorrência da doença em rebanhos (ROBINSON, 1983). Outra maneira de verificar a prevalência da enfermidade são testes imunoenzimáticos, já utilizados na Arábia e na Turquia, onde a soroprevalência observada foi de 60% e 52,8%, respectivamente (HOUSAWI et al., 1992; GÖKCE et al., 2005).

Infecções pelo ORFV levam a importantes perdas econômicas nos rebanhos afetados, devido a sua alta morbidade. Os animais jovens geralmente são os mais afetados, justamente pela ausência de imunidade ao vírus e maior susceptibilidade às infecções (HAIG, 2006). Nesses animais, as lesões se localizam ao redor da boca e narinas que, além de predispor a infecções secundárias, limitam a ingestão de alimentos, reduzindo o ganho de peso (HAIG &

MERCER, 1998). Embora a morbidade seja elevada, a mortalidade é baixa e, quando ocorre, pode-se atribuir à incapacidade de amamentação (devido às lesões) ou pelas infecções oportunistas, por bactérias e parasitas (GUNBRELL & MCGREGOR, 1997). Em fêmeas lactantes, as lesões são encontradas principalmente ao redor dos tetos, o que pode favorecer os quadros de mastites, aumentando as perdas (MAVROGIANNI et al., 2006). As lesões em humanos são leves e autolimitantes, que tendem a se resolver em poucas semanas (HAIG & MERCER, 1998).

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 pastos contaminados (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 é possível quando as crostas ficam em locais secos, como estábulos. Quando expostos 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 fonte de infecção para novos surtos tem sido questionado (McKEEVER & RAID, 1986).

Em geral, as lesões resultantes da infecção pelo ORFV são proliferativas e nodulosas e se restringem ao epitélio dos lábios, narinas e mucosa oral (HOSAMANI et al., 2009). Após penetrar por abrasões na pele, junção dos lábios ou mucosa oral (FLEMING & MERCER, 2007), o vírus replica localmente nas células da epiderme (HAIG et al., 1997), especificamente nos queratinócitos em diferenciação, sendo que o requisito básico para infecção não é a destruição da epiderme em si, mas a proliferação dos queratinócitos associada com processo de reparo tecidual (McKEEVER et al., 1988). O período de incubação varia entre dois e seis dias e as lesões progridem pelos estágios de eritema, mácula, pápula, vesícula, pústula e crosta (HAIG, 2006; FLEMING & MERCER, 2007; CARGNELUTTI et al., 2011). Lesões adjacentes podem coalescer e com a progressão da doença culminam com a formação de crostas (BUTTNER & RZIHA, 2002; FLEMING & MERCER, 2007). As lesões crostosas são salientes e frequentemente apresentam rachadura e sangramento, podendo predispor à infecções secundárias e miíase (CANAL, 2007). De maneira geral, a resolução das infecções primárias ocorre em quatro a seis semanas (HAIG et al., 1997; HAIG, 2006; FLEMING & MERCER, 2007; CARGNELUTTI et al., 2011). As lesões resultantes de reinfecções progridem pelos mesmos estágios, mas geralmente são menores, não proliferativas e se resolvem mais rapidamente (HAIG & McINNES, 2002).

Não há evidências da disseminação hematogena do ORFV (HAIG & McINNES, 2002). A resposta imune à infecção e reinfeção pelo ORFV tem sido investigada (YIRRELL et al., 1989; HAIG & McINNES, 2002; HAIG, 2006), sendo que muitos aspectos da complexa interação vírus-hospedeiro ainda permanecem desconhecidos. Além disso, o fato da imunidade gerada pelo ORFV ser de curta duração, dificulta ainda mais 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 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 de reinfetar e replicar repetidamente em seu hospedeiro (HAIG & MERCER, 1998). Existem algumas possíveis explicações para este fato: 1. a infecção pelo ORFV 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; 2. a infecção pode não estimular uma resposta protetora; 3. 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 ORFV está amplamente difundido nos rebanhos ovinos e caprinos do Brasil, ocorrendo em surtos de doença cutânea com apresentações clínicas variáveis (SALLES et al., 1992; LANGONI et al., 1995; CATROXO et al., 2002; NOBREGA et al., 2008). As apresentações da enfermidade chamam atenção pela ocorrência de lesões de diferentes gravidades e distribuição. As lesões em diferentes surtos variam desde hiperemia e discretas pústulas e crostas ao redor da boca e das narinas (SCHMIDT, 2012), até a presença de lesões crostosas e exudativas multifocais, com envolvimento de regiões mucocutâneas e pele (SALLES et al., 1992; SCHMIDT, 2012). Já foram descritos casos mais graves, quando os animais desenvolvem lesões de longa duração no esôfago, no intestino e no trato respiratório (LEITE-BROWNING, 2008). Apresentação atípica com predomínio de lesões nos membros e na cabeça com persistência por mais de dois meses foram descritas em surtos em ovinos nos EUA (SMITH et al., 2002). Também nos EUA, foi descrito um surto de ectima de longa duração em cabritos jovens que desenvolveram lesões proliferativas generalizadas, algumas vezes apresentando artrite supurativa, pneumonia e involução precoce do timo (DE LA CONCHA-BERMEJILLO et al., 2003). No Brasil, um surto em cabras com apresentação multifocal e alta letalidade foi descrito no estado do Pará. As cabras doentes apresentaram lesões nodulares e proliferativas com tamanhos entre 3-8cm disseminadas na pele das axilas,

tetos, úbere, vulva, base da cauda, abdome, ao redor dos cascos, nos lábios e narinas (DE OLIVEIRA et al., 2012).

Diversos fatores do hospedeiro podem influenciar nas diferentes manifestações clínicas do ectima contagioso, como o caráter de infecção (infecção primária ou reinfecções), a idade dos animais, susceptibilidade genética, estresse e estado imunológico do hospedeiro (HAIG & MERCER, 1998; YERUHAM et. al., 2000; DE LA CONCHA-BERMEJILLO et al., 2003; HAIG 2006). Fatores ambientais, como a presença de vegetações mais abrasivas podem causar lesões de continuidade e favorecer a penetração e disseminação do vírus (SALLES et al., 1992) e, principalmente, características do agente, como os fatores de virulência e as proteínas virais envolvidas na evasão da resposta imune do hospedeiro, podem influenciar nas diferentes manifestações clínicas (HAIG, 2006).

Alguns genes dos ORFV codificam proteínas que estão envolvidas nos mecanismos de evasão da resposta imune do hospedeiro e na patogenia viral (DELHON et al., 2004). Entre esses genes, destacam-se o fator de crescimento endotelial e vascular (VEGF), a proteína que confere resistência ao interferon (VIR) e a interleucina 10 viral homóloga à ovina (IL-10v). O VEGF desempenha papel fundamental na infecção e desenvolvimento das lesões proliferativas causadas pelo ORFV (LYTTLE et al., 1994), e sua função foi comprovada pela construção de vírus deletados nesse gene, que se tornaram atenuados, produzindo lesões de baixa severidade em ovinos (SAVORY et al., 2000). O produto do gene VIR também está envolvido na patogenia do ORFV, pois na fase inicial da infecção esta proteína bloqueia a produção de interferon facilitando a infecção e a replicação viral nos queratinócitos. O gene da IL-10v pode promover a imunossupressão do hospedeiro e facilitar a replicação viral (HAIG et al., 2002). Além disso, ORFV com deleção parcial ou completa neste gene são comprovadamente atenuados em ovinos, produzindo lesões pequenas e de rápida resolução (FLEMING et al., 2007). Assim, variações encontradas na composição molecular destes genes podem resultar na alteração conformacional das proteínas codificadas e interferir na apresentação da infecção *in vivo* (COTTONE et al., 1998).

Diversos surtos de ectima contagioso em ovinos tem sido identificados no Rio Grande do Sul (SCHMIDT, 2012), sendo que, em alguns casos, a apresentação clínica e o grau de severidade das lesões divergem marcadamente. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi investigar o fenótipo *in vivo* e caracterizar genes de virulência de quatro amostras de ORFV oriundas de surtos ocorridos no Estado do Rio Grande do Sul.

2. CAPÍTULO 1

Caracterização genética e fenotípica de amostras do vírus do ectima contagioso

Mathias Martins, Juliana F. Cargnelutti, Eduardo F. Flores, Rudi Weiblen

(Artigo submetido a revista *Pesquisa Veterinária Brasileira* – 2014)

Caracterização genética e fenotípica de amostras do vírus do ectima contagioso¹

Mathias Martins², Juliana F. Cargnelutti², Eduardo F. Flores^{2*}, Rudi Weiblen²

ABSTRACT. - Mathias Martins, Juliana F. Cargnelutti, Eduardo F. Flores, Rudi Weiblen. 2014 [Genetic and phenotypic characterization of contagious ecthyma virus isolates.] *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Setor de Virologia, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP), Centro de Ciências Rurais (CCR), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Av. Roraima, 1000. Bairro Camobi, Santa Maria, RS, Brasil. CEP 97105-900. E-mail: eduardofurtadoflores@gmail.com.br

Contagious ecthyma is a muco-cutaneous, debilitating disease caused by orf virus (ORFV) that affects mainly sheep and goats. The objective of this study was to investigate the phenotype *in vivo* and to characterize virulence genes of four ORFV isolates recovered from outbreaks in Rio Grande do Sul State, Brazil. For this, 20 lambs, aging between 6 and 8 months, were allocated in five groups of four animals. The animals of four groups were inoculated in the labial commissure with scab homogenates (viral titer $10^{5.6}$ TCID₅₀/ml) from each of the following outbreaks: SV269/11, SV252/11, SV581/11 and SV820/10-Cangucu. A fifth group was inoculated with minimal essential medium. The lambs were evaluated during 30 days regarding to clinical and virological aspects, by clinical inspection and swab collection for virus isolation. All inoculated animals developed typical lesions of contagious ecthyma, characterized by macules, papules, vesicles, pustules and extensive scab formation. The animals inoculated with SV269/11 and SV820/10-Cangucu isolates developed more severe lesions, resulting in highest clinical scores, and of longer duration. Sheep inoculated with SV581/11 isolate developed milder lesions than the other groups yet shed virus for a longer period of time. For genetic

² Setor de Virologia, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, sala 4200, prédio 20, Av. Roraima, 1000, bairro Camobi, Santa Maria, RS, Brasil. CEP 97105-900.

*Autor para correspondência: Eduardo Furtado 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

characterization, three virulence genes (VEGF, VIR and IL-10v) of the ORFV isolates were amplified by PCR and submitted to nucleotide sequencing and bioinformatics analysis. Important amino acid deletions and mutation were identified in VEGF and IL-10v genes of SV581/11 and SV252/11 isolates. The identity of amino acids was variable among the viruses, but the lower homology was identified in VEGF gene of SV581/11 isolate in comparison with other viruses and ORFV standard strain (OV-IA82). Thus, the results demonstrated that SV581/11 and SV252/11 displayed lower virulence in sheep than SV269/11 and SV820/10-Canguçu, possibly associated with the changes observed in virulence genes.

INDEX TERMS: *orf*, ORFV, virulence, phenotype *in vivo*, immunomodulation, virulence factor, VEGF, VIR, IL-10.

RESUMO. - O ectima contagioso é uma doença mucocutânea debilitante causada pelo vírus da orf (ORFV) que afeta principalmente ovinos e caprinos. O objetivo deste estudo foi investigar que o fenótipo *in vivo* e caracterizar genes de virulência de quatro amostras de ORFV oriundas de surtos no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Para isto, 20 ovinos, com idade entre 6 e 8 meses, foram distribuídos em cinco grupos de quatro animais cada. Os animais de quatro grupos foram inoculados na comissura labial com homogêneos de crostas (título viral $10^{5.6}$ DICC₅₀/ml) obtidas de cada um dos seguintes surtos: SV269/11, SV252/11, SV581/11 e SV820/10-Canguçu. Um quinto grupo foi inoculado com meio essencial mínimo. Os cordeiros foram avaliados durante 30 dias em relação aos aspectos clínicos e virológicos por inspeção clínica e coleta de suabe para isolamento viral. Todos os animais inoculados desenvolveram lesões típicas de ectima contagioso, caracterizadas por máculas, pápulas, vesículas, pústulas e extensiva formação de crostas. Os animais inoculados com as amostras SV269/11 e SV820/10-Canguçu desenvolveram lesões mais severas, resultando em um escore clínico mais alto e maior duração. Ovinos inoculados com a amostra SV581/11 desenvolveram lesões mais brandas que os outros grupos, porém excretaram o vírus por período mais longo. Para caracterização genética, três genes de virulência (VEGF, VIR e IL-10v) foram amplificados por PCR e submetidos a sequenciamento de nucleotídeos e análise de bioinformática. Deleções e mutações de nucleotídeos foram identificadas nos genes VEGF e IL-10v das amostras SV581/11 e SV252/11. A identidade de aminoácidos foi variável entre as amostras virais, mas a homologia mais baixa foi observada no gene VEGF da amostra SV581/11 em comparação com as outras amostras e a cepa padrão de ORFV (OV-IA82). Assim, os resultados demonstram que as amostras SV581/11 e SV252/11 apresentam menor virulência em ovinos do que as amostras

SV269/11 e SV820/10-Canguçu, possivelmente associada às mudanças observadas nos genes de virulência.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: *orf*, ORFV, virulência, fenótipo *in vivo*, imunomodulação, fator de virulência, VEGF, VIR, IL-10.

INTRODUÇÃO

O vírus da orf (ORFV) pertence à família *Poxviridae*, subfamília *Chordopoxvirinae*, gênero *Parapoxvirus*, e é o agente etiológico do ectima contagioso, uma enfermidade mucocutânea debilitante que afeta principalmente ovinos e caprinos. Ocasionalmente, o ORFV pode causar uma forma mais branda em pequenos ruminantes silvestres e humanos (Haig & Mercer 1998). Outros membros do gênero *Parapoxvirus* incluem o vírus da pseudovariola (PCPV), o vírus da estomatite papular bovina (BPSV) e os parapoxvírus dos veados na Nova Zelândia (PVNZ) (Murphy et al. 1999). Os parapoxvírus (PPVs) são genética e antigenicamente relacionados entre si e apresentam grande similaridade na organização genômica e mecanismos de virulência (Fleming et al. 1993).

O ectima contagioso afeta principalmente animais jovens caracterizando-se por lesões inflamatórias proliferativas, mais comumente 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 associada com a doença seja geralmente baixa, a morbidade pode chegar próximo de 100% (Mazur & Machado 1989, Gumbrell & McGregor 1997). A disseminação da infecção no rebanho é rápida e ocorre pelo contato direto entre animais ou por contato com crostas das lesões que permanecem no ambiente (Fleming & Mercer 2007).

O ORFV possui distribuição mundial e está amplamente difundido nos rebanhos ovinos e caprinos do Brasil, ocorrendo em surtos de doença cutânea com apresentações clínicas variáveis (Salles et al. 1992, Langoni et al. 1995, Catroxo et al. 2002, Nobrega et al. 2008). Essas lesões variam desde hiperemia e discretas pústulas e crostas ao redor da boca e das narinas (Schmidt 2012), até a presença de lesões crostosas e exsudativas multifocais, com envolvimento de regiões mucocutâneas e pele (Salles et al. 1992, de Oliveira et al. 2012, Schmidt 2012). Há

também, a descrição de casos graves, quando os animais desenvolvem lesões de longa duração no esôfago, no intestino e no trato respiratório (Leite-Browning 2008).

Diversos fatores do hospedeiro, do meio e do agente podem influenciar nas diferentes manifestações clínicas do ectima contagioso, como o caráter de infecção (infecção primária ou reinfecções), a idade dos animais, susceptibilidade genética, raça, estresse e *status* imunológico do hospedeiro, entre outras (Haig & Mercer 1998, Yeruham et al. 2000, De La Concha-Bermejillo et al. 2003, Haig 2006). Também influenciam o curso clínico e a apresentação das lesões a presença de lesões de continuidade ocasionados pelas vegetações mais abrasivas (Salles et al. 1992) e, principalmente, características virais, como os fatores de virulência e as proteínas virais envolvidas na evasão da resposta imune do hospedeiro (Haig 2006).

Genes que codificam proteínas envolvidas na modulação do sistema imune e na virulência viral foram identificados no genoma dos ORFVs (Delhon et al. 2004, Fleming & Mercer 2006, Mercer et al. 2006). Entre estes genes, destacam-se o gene codificante do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF; *ORF132*), que produz a principal proteína viral relacionada com a virulência do ORFV *in vivo* (Lyttle et al. 1994), e os genes da interleucina 10 ortóloga à ovina (IL-10v; *ORF127*) e do fator de resistência ao interferon (VIR; *ORF020*) que codificam proteínas que interferem com a resposta imune do hospedeiro em benefício da replicação viral (Fleming et al. 1997, Haig & Mercer 1998). O envolvimento desses genes na virulência e na patogenia do ORFV foi comprovado pela produção de vírus mutantes, com deleções completas ou parciais nesses genes, que se tornaram altamente atenuados *in vivo*, produzindo lesões localizadas, sem caráter proliferativo e de rápida resolução em ovinos e caprinos. Assim, deleções/mutações nesses genes podem ser cruciais para a replicação e patogenia do ORFV no hospedeiro (Cottone et al. 1998).

Vários surtos de ectima contagioso tem sido identificados em ovinos no Rio Grande do Sul (Schmidt 2012), sendo que, em alguns casos, a apresentação clínica e o grau de severidade das lesões divergem marcadamente. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi investigar o fenótipo *in vivo* e caracterizar genes de virulência de quatro amostras de ORFV oriundas de surtos ocorridos em diferentes municípios do Estado do Rio Grande do Sul.

MATERIAL E MÉTODOS

Desenho experimental. Vinte ovinos da raça Ideal, com idade entre seis e oito meses, provenientes de uma propriedade sem histórico clínico de ectima contagioso há pelo menos oito

anos, foram alocados em cinco grupos de quatro animais e inoculados com cada uma das quatro amostras virais ou com meio essencial mínimo (MEM). Após a inoculação, os animais foram avaliados nos aspectos clínicos e virológicos por 30 dias. A caracterização molecular de três genes de virulência (VEGF, VIR e IL-10v) foi realizada após a amplificação parcial ou total dos genes e o sequenciamento de nucleotídeos. Todos os procedimentos realizados com animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (Parecer 101/2010).

Células e vírus. O isolamento, amplificação e quantificação viral foram realizados em células de cultivo primário de corneto etmoidal ovino (CEO) cultivadas em meio essencial mínimo (MEM) contendo penicilina ($1,6\text{mg.L}^{-1}$), estreptomicina ($0,4\text{mg.L}^{-1}$) e anfotericina B ($2,25\text{mg.L}^{-1}$) e suplementadas com 10% de soro fetal bovino (SFB). Os vírus utilizados no experimento (SV269/11, SV 252/11, SV 581/11 e SV820/10-Canguçu) foram isolados de surtos de ectima ocorridos em ovinos de quatro municípios do Rio Grande do Sul (Schmidt 2012). Crostas provenientes dos surtos foram maceradas com auxílio de cadinho e pistilo em uma proporção de 1:10 (peso/volume). Os macerados foram centrifugados e o sobrenadante foi coletado e serviu como inóculo. A quantificação viral foi realizada por diluição limitante e os títulos calculados de acordo com Reed & Muench (1938).

Inoculação e monitoramento dos animais. Os ovinos foram inoculados com $300\mu\text{L}$ de uma suspensão viral com título de $10^{5,6}$ doses infectantes para 50% dos cultivos celulares (DICC_{50})/mL na comissura labial, pelo gotejamento sobre uma área previamente escarificada com agulha hipodérmica, seguido de fricção com suabe. Os animais do grupo controle foram inoculados com $300\mu\text{L}$ de MEM. Os grupos foram mantidos separadamente em campo nativo sem contato entre os grupos durante o período do experimento, recebendo feno de alfafa uma vez ao dia e água *ad libitum*.

Os animais foram monitorados durante 30 dias em relação aos aspectos clínicos e virológicos. A cada dois dias foram realizadas inspeções visuais das áreas de inoculação por dois avaliadores que desconheciam a distribuição dos grupos. Foram avaliados quatro parâmetros: hiperemia, vesículas e/ou pústulas, crostas, exsudação e/ou sangramento. Para cada parâmetro estabeleceu-se o escore que variou entre ausência (0), leve ou pequeno número (1), moderada ou em número moderado (2), severa ou em grande número (3). A partir deste critério, foram obtidos os escores clínicos diários por animal através da soma dos escores para cada parâmetro. Foi realizada a soma dos escores clínicos acumulados para cada animal, obtida a média do escore de cada grupo e calculado o erro padrão da média ($\text{média} \pm \text{EPM}$).

Suabes das lesões coletados a cada dois dias até o dia 30 pós-inoculação (pi) foram submetidos ao isolamento viral em cultivos de CEO. Os suabes foram drenados, centrifugados por 5 min a 3000 rpm, e 150 µl do sobrenadante foram inoculados em cultivo celular de 24 h em placas de 24 cavidades. Os cultivos foram monitorados diariamente para a observação de efeito citopático durante três passagens de cinco dias cada.

Análise estatística. Os escores clínicos diários observados para cada grupo e o tempo de excreção viral foram comparados pela Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo Teste t de Student. As análises foram realizadas utilizando o programa ASSISTAT (2013).

Reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento de nucleotídeos. Três genes de virulência dos ORFVs (VEGF, VIR e IL-10v) foram analisados. Para isso, DNA total extraído de células de corneto etmoidal ovino infectadas com cada isolado foi submetido à amplificação por PCR com oligonucleotídeos iniciadores descritos no Quadro 1. Cada reação de PCR foi realizada com, aproximadamente 8 µl (100-200 ng/µl) do DNA total adicionado a 92 µl de uma solução contendo 2 µM dos iniciadores, 10 mM de dNTPs, 10 µl de tampão de reação 10x, 0,4 mM de MgCl₂ e 1 U da enzima Taq polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), sob as seguintes condições: um ciclo de 95°C por 9 minutos (min), seguidos por 30 ciclos de denaturação (95°C, 1 min), anelamento dos iniciadores (1 min, temperatura dependente de cada gene) e extensão (72°C, 1 min), com uma extensão final de 10 min (72°C). A temperatura de anelamento dos iniciadores foi de 40 °C para o gene VEGF, 58 °C para o VIR e 60 °C para o gene da IL-10v. Os produtos de PCR (5 µl) foram analisados em gel de agarose a 1,5%, corados com o reagente Gel Red® (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), sob luz ultravioleta.

Para o sequenciamento de nucleotídeos (nt), 90 µl do produto de PCR de cada amostra foi purificado utilizando o PureLink® Quick Gel Extration and PCR Purification Combo Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), conforme instruções do fabricante. As amostras foram encaminhadas para sequenciamento no Laboratório ACTGene Análises Moleculares (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil) em quadruplicatas e processadas em sequenciador automático *ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer* armado com capilares de 50 cm e polímero POP6 (Applied Biosystems). As sequências obtidas foram analisadas pelo programa Staden (STADEN, 1996), para obtenção da sequência consenso. O alinhamento e a matriz de identidade foram realizados utilizando o programa BioEdit Sequence Alignment Editor Software suíte, versão 7.0.5.3. As sequências dos isolados utilizados no estudo foram comparadas entre elas e com o genoma da cepa de referência OV-IA82 disponível no Genbank (acesso AY386263).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram analisadas quatro amostras de ORFV oriundas de surtos de ectima contagioso ocorridos no Estado do Rio Grande do Sul, cujos ovinos apresentaram manifestações clínicas e severidade de infecção variáveis (Schmidt 2012). Alguns animais apresentaram lesões leves e restritas à comissura labial (SV581/11) e tetos (SV252/11), e lesões disseminadas no organismo (SV820/10-Canguçu e SV269/11). No presente trabalho, os animais pertencentes aos quatro grupos inoculados desenvolveram lesões características de ectima a partir dos dias 2 a 4 pi. As lesões iniciaram com hiperemia, seguida pelo desenvolvimento de pápulas, vesículas e pela formação de crostas. A resolução das lesões ocorreu em um período semelhante nos quatro grupos (grupo SV269/11 = 23 dias \pm 1; grupo SV252/11 = 22 dias \pm 1,6; grupo SV581/11 = 22,5 dias \pm 1,7 e grupo SV820/10-Canguçu = 24 dias \pm 0,8 [média \pm EPM]), semelhante ao período descrito em estudos de patogenia do ORFV (McKeever et al. 1988, Cargnelutti et al. 2011). Os animais do grupo controle (MEM) desenvolveram apenas hiperemia leve no local, com duração aproximada de 2 dias.

Nos grupos SV269/11, SV252/11 e SV820/10-Canguçu, as médias dos escores clínicos de cada grupo foram semelhantes (32,7 \pm 1,5; 30,7 \pm 2,4; 34,5 \pm 1,6 [média \pm erro padrão], respectivamente). Embora inoculados com a mesma dose viral, foi observada menor severidade nas lesões desenvolvidas pelos animais do grupo SV581/11 (média dos escores = 19 \pm 3,5), sugerindo que esse isolado é menos virulento que os demais (Fig. 1). Além disso, as médias aritméticas diárias dos escores clínicos (soma dos escores clínicos de cada animal do grupo dividido pelo n° de animais) foram significativamente menores neste grupo do que nos demais grupos, entre os dias 4 e 18 pi ($P < 0,05$) (com exceção do dia 14pi) (Fig. 2).

Todos os animais inoculados excretaram o vírus por um período que se estendeu até os dias 18 e 30 pi (Quadro 2). As médias de duração da excreção viral dos grupos SV269/11 e SV252/11 foram semelhantes (23,5 dias \pm 1,5 e 21,5 dias \pm 2,1, respectivamente). Apesar das lesões apresentadas pelos animais do grupo SV581/11 terem sido brandas, foi possível recuperar vírus desses animais por um período mais longo (média de 27 dias \pm 1,3 [média \pm EPM]) do que nos demais grupos. Neste sentido, já foi demonstrado que animais infectados pelo ORFV podem continuar excretando o vírus mesmo após a resolução das lesões (Schmidt 2012). Além disso, é possível que animais infectados, mesmo saudáveis, possam ser portadores do vírus e excretá-lo de forma intermitente (Nettleton et al. 1996). A média de dias de excreção viral no grupo SV820/10-Canguçu foi de 26,5 \pm 1,5 [média \pm EPM]). Mesmo que o tempo de

excreção viral tenha variado entre os grupos, não houve diferença significativa na duração da excreção viral entre os diferentes grupos.

Diferentes formas clínicas e severidade variável do ectima contagioso já foram descritas, como infecções crônicas em caprinos (De La Concha-Bermejillo et al. 2003), lesões verrucosas atípicas na face e nos membros de ovinos (Yeruham et al. 2000), lesões vesiculares na mucosa oral (McElroy & Bassett 2007), lesões proliferativas e crostosas na cabeça, pescoço e flanco de caprinos (Coates & Hoff 1990). Estas diferentes apresentações clínicas podem estar relacionadas com variações genéticas no vírus, principalmente nos fatores de virulência (Savory et al. 2000).

Para investigar a base genética das diferenças fenotípicas observadas, os genes de virulência VEGF, VIR e IL-10v das quatro amostras foram amplificados por PCR e as sequências de nucleotídeos e aminoácidos foram analisadas. As sequências obtidas foram depositadas no GenBank (Quadro 3). As sequências de aminoácidos dos quatro isolados foram comparadas entre si e com cepas de referências de ORFV, tendo como padrão a cepa OV-IA82 (Delhon et al. 2004).

Em relação ao gene VEGF, a identidade de aminoácidos (aa) variou de 69 e 94% entre os isolados e a cepa padrão OV-IA82 (Quadro 4). As amostras com maior identidade entre si (94%) foram a SV269/11 e a SV820/10, coincidindo com o grau de severidade da doença apresentada pelos animais inoculados com esses vírus. A análise das sequências de aa do gene VEGF revelou que, quando comparados com a cepa de referência OV-IA82, as amostras virais analisadas nesse trabalho apresentaram deleção de três aa nas posições 101, 102 e 103 (serina-valina-serina). É pouco provável que esta deleção esteja envolvida no fenótipo dos vírus, uma vez que as quatro amostras apresentaram essa alteração. Essa alteração também está presente em outros isolados de ORFV que induzem diferentes manifestações clínicas (Cottone et al. 1998, Mercer et al. 2006). No entanto, a amostra SV581/11, que se mostrou menos virulenta do que as demais, apresentou menor grau de identidade de aminoácidos no gene VEGF com a cepa de ORFV OV-IA82 (69%) e com os isolados mais virulentos (SV269/11 – identidade de 83%, e SV820/10 – identidade de 79%). Além disso, foram detectadas uma deleção (posição 23) e mutações incomuns nas amostras SV581/11 e SV252/11. Essas mutações foram observadas principalmente na amostra SV581/11, sendo que nas posições de aa 43, 44, 46 e 48 do gene VEGF, ocorreram substituições por aa de diferentes composições químicas e funções quando comparados com a cepa de referência (aa VPST por FRHE) (Fig. 3). Mutações importantes também foram observadas na região carboxi-terminal do gene VEGF (posições 89, 97, 108, 120 e 121) nas amostras SV581/11 e/ou SV252/11. Alterações semelhantes foram verificadas

na cepa vacinal D1701 (GenBank HM133903.1) que é conhecida pela sua atenuação *in vivo* (Cottone et al. 1998). Embora não seja possível inferir que essas substituições determinem as diferenças de fenótipo observadas nesse estudo, é digno de nota o fato de ocorrerem nas amostras cuja manifestação clínica foi marcadamente mais branda. Já foi comprovado que o gene VEGF está envolvido na patogenia e na virulência dos ORFVs (Lyttle et al. 1994) e que mutantes deletados neste genes produzem lesões menos vascularizadas do que a cepa parental (Savory et al. 2000). Assim, considerando que a proteína codificada pelo gene VEGF tem um papel crítico na virulência do ORFV (Savory et al. 2000), é possível que a deleção e/ou substituições de aa tenham modificado a função da proteína, contribuindo para a menor virulência das amostras SV581/11 e SV252/11.

O alinhamento de aminoácidos codificados pelo gene VEGF de isolados de ORFV originados de diferentes países demonstrou uma marcada divergência entre os resultados. Semelhante ao encontrado nas amostras do presente estudo, a ampla variabilidade de aa no gene VEGF já foi demonstrada em isolados de ORFV oriundos da Nova Zelândia e Itália, incluindo amostras de ovinos, caprinos, humanos e cepas vacinais (Mercer et al. 2002). Surpreendentemente, embora o gene VEGF esteja localizado em uma região do genoma do ORFV altamente variável, já foi demonstrada a conservação deste gene em isolados de ORFV de uma espécie de pequenos ruminantes selvagens (*Capricornis crispus*) e de ovinos oriundos do Japão, onde apenas duas trocas de aminoácidos foram observadas (Inoshima, Ito & Ishiguro 2010). Além disso, Inoshima & Ishiguro (2010) identificaram 100% de identidade de nucleotídeos no gene VEGF de quatro isolados de ORFV oriundos de lesões de pequenos ruminantes selvagens do Japão (*Capricornis crispus*).

Em relação ao gene VIR, que codifica uma proteína que bloqueia a ação do interferon, modulando a resposta do hospedeiro à infecção viral, a identidade de aminoácidos entre as amostras deste estudo foi elevada, variando de 96 a 99% (Quadro 4). Resultados semelhantes já haviam sido identificados por Kottaridi et al. (2006), em que a identidade de aminoácidos de 13 isolados de ORFV de ovinos e caprinos oriundos da Grécia e da Itália variou de 87 a 100%. Além disso, poucas mutações significativas (que potencialmente podem interferir na estrutura da proteína) foram identificadas nas sequências das amostras analisadas, demonstrando que é pouco provável que mutações nesse gene interfiram no fenótipo *in vivo*.

No gene da IL-10v, que codifica uma proteína viral semelhante à interleucina 10 dos ovinos, que atua reduzindo a resposta inflamatória do hospedeiro (Fleming et al. 1997), a identidade de aa entre os isolados variou de 89 a 100% (Quadro 4). Embora a identidade entre os isolados tenha sido elevada, a análise das sequências de aa indicou mutações pouco comuns

nas amostras SV581/11 e SV252/11, justamente as que apresentaram a menor virulência *in vivo*.

Já foi demonstrado que os genes localizados na região central do genoma dos parapoxvírus são conservados (Gassmann et al. 1985, Delhon et al. 2004). Em contrapartida, existe variabilidade nas extremidades do genoma, onde se localizam os genes ligados ao espectro de hospedeiro, à imunomodulação e à virulência viral (Mercer et al. 2006). A variabilidade nos genes analisados neste estudo era esperada, uma vez que eles se localizam nas regiões flangeadoras do genoma (VEGF; *ORF132*) (IL-10v; *ORF127*) (VIR; *ORF020*). O grau de identidade e as mutações apresentadas pelos isolados nos genes de virulência VEGF e IL-10v esteve de acordo com os aspectos fenotípicos resultantes da infecção experimental. As principais alterações moleculares (deleções/mutações) foram observadas nas amostras SV581/11 e SV252/11, justamente aquelas que produziram lesões mais leves e de curso clínico inferiores aos demais isolados analisados. A deleção completa ou parcial do gene VEGF é capaz de atenuar cepas de ORFV (Savory et al. 2000) e tem sido utilizada como alvo para a produção de vacinas recombinantes (Rhiza et al., 1999, 2000). Além disso, já foi comprovado que deleções no gene IL-10v de ORFV atenuam o vírus tanto na infecção aguda como em reinfecções (Fleming et al. 2007). Por isso, as deleções/mutações observadas nos genes VEGF e IL-10v nas duas amostras, especialmente na SV581/11, podem ser responsáveis pela menor virulência desses isolados. Embora os poxvírus possam apresentar alterações no genoma, como duplicações, transposições e deleções, decorrentes da extensiva propagação em cultivo celular (Fleming et al. 1995), descarta-se que as mutações observadas nos genes analisados neste estudo sejam decorrentes desse procedimento, pois os vírus foram submetidos a apenas uma passagem em cultivo antes da extração do DNA viral para análise.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que as amostras SV581/11 e SV252/11 foram menos virulentas em ovinos do que as SV269/11 e SV820/10-Canguçu. Essas amostras apresentaram deleção e mutações em genes de virulência (VEGF e IL-10v) que podem estar relacionadas com a menor virulência *in vivo*.

REFERÊNCIAS

- 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. *Arquivos do Instituto Biológico* 69:37-37.
- Cargnelutti J.F., Masuda E.K., Martins M., Diel D.G., Rock D.L., Weiblen R. & Flores E.F. 2011. Virological and clinico-pathological features of orf virus infection in experimentally infected rabbits and mice. *Microbial Pathogenesis* 50:56-62.
- Coates J.W. & Hoff S. 1990. Contagious ecthyma: an unusual distribution in of lesions in goats. *Canadian Veterinary Journal* 31:209-210.
- Cottone R., Büttner M., Bauer B., Henkel M., Hettich E. & Rziha H. 1998. Analysis of genomic rearrangement and subsequent gene deletion of the attenuated Orf virus strain D1701. *Virus Research* 56:53-67.
- De La Concha-Bermejillo A., Guo J., Zhang Z. & Waldron D. 2003. Severe persistent orf in young goats. *Journal Veterinary Diagnostic Investigation*. 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. *Journal of Virology*. 78:168-177.
- De Oliveira C.H.S., Assis F.L., Neto J.D.B, Oliveira C.M.C., Lopes C.T.A, Bomjardim H.A, Vinhote W.M.S., Silva A.G.M., Abrahão J.S. & Kroon E.G. 2012. Multifocal cutaneous orf virus infection in goats in the Amazon Region, Brazil. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 12:336-340.
- 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.
- Fleming S.B., Lyttle D. J., Sullivan J.T., Mercer A.A. & Robinson A.J. 1995. Genomic analysis of a transposition-deletion variant of orf virus reveals a 3.3 kbp region of non-essential DNA. 76:2969-2978.
- Fleming S.B. & Mercer A.A. 2007. Genus Parapoxvirus, p.127-166. In: Mercer A.A., Schmidt A., Weber O. (Eds.), *Parapoxviruses*. 1st ed. Birkauser, Berlin.
- Fleming S.B., Anderson I.E., Thomson J., Deane D.L., McInnes C.J., McCaughan C.A., Mercer A.A. & Haig D.M. 2007. Infection with recombinant orf viruses demonstrates that the viral interleukin-10 is a virulence factor. *Journal of General Virology* 88:1922–1927.

- Fleming S.B., McCaughan C.A, Andrews A.E., Nash A.D. & Mercer A.A.. 1997. A homolog of interleukin-10 is encoded by the poxvirus orf virus. *Journal of Virology* 71:4857-4861.
- Gassmann U. Wyler R. & Wittek R. 1985. Analysis of parapoxvirus genomes. *Archives of Virology*. 83:17-31.
- Gumbrell R.C. & McGregor D.A. 1997. Outbreak of severe fatal orf in lambs. *Veterinary Record* 141:150-151.
- Guo J., Zhang Z., Edwards J.F., Ermel R.W., Taylor C.Jr. & De La Concha-Bermejillo A. 2003. Genetic characterization of orf viruses isolated from various ruminant species of a zoo. *Veterinary Microbiology* 99:81-92.
- Haig D.M. & Mercer A. A. 1998. Ovine diseases. Orf. *Veterinary Research* 29:311-326.
- Haig D.M. 2006. Orf virus infection and host immunity. *Current Opinion in Infectious Disease* 19:127-131.
- Inoshima Y. & Ishiguro N. 2010. Molecular and biological characterization of vascular endothelial growth factor of parapoxviruses isolated from wild Japanese serows (*Capricornis crispus*). *Veterinary Microbiology* 140:63-71.
- Inoshima Y., Ito M. & Ishiguro N. 2010. Spatial and temporal genetic homogeneity of orf viruses infecting japedes serows (*Capricornis crispus*). *Journal Veterinary Medicine Science* 72:701-707.
- Klein J. & Tryland M. 2005. Characterisation of parapoxviruses isolated from Norwegian semi-domesticated reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*). *Virology Journal* 2:79.
- Kottaridi C., Nomikou K., Lelli R., Markoulatos P. & Mangan O. 2006. Phylogenetic correlation of Greek and Italian orf virus isolates based on VIR gene. *Veterinary Microbiology*. 116:310-316.
- 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 Veterinária* v.14:60-62.
- Leite-Browning M. 2008. Contagious ecthyma (orf/soremouth) in sheep and goats. Alabama Cooperative Extension System. Available: <http://www.aces.edu/pubs/docs/U/UNP-0063/UNP-0063.pdf>
- Lyttle D.J., Fraser K.M, Fleming S.B., Mercer A.A. & Robinson A.J. 1994. Homologs of vascular endothelial growth factor are encoded by the poxvirus orf virus. *Journal of virology* 68:84-92.
- Mazur C. & Machado R.D. 1989. Detection of contagious pustular dermatitis virus of goats in a severe outbreak. *Veterinary Record* 125:419-420.

- McElroy M.C. & Bassett H.F. 2007. The development of oral lesions in lambs naturally infected with orf virus. *Veterinary Journal* 174:663-664.
- McKeever D.J., Jenkinson D.M., Hutchison G. & Reid H.W. 1988. Studies of the pathogenesis of orf virus infection in sheep. *Journal of Comparative Pathology* 99:318-327.
- Mercer A.A., Wise L.M., Scagliarini A., McInnes C. J., Büttner M., Rziha H.J., McCaughan C.A., Fleming S.B., Ueda N. & Nettleton P.F. 2002. Vascular endothelial growth factors encoded by Orf virus show surprising sequence variation but have a conserved, functionally relevant structure. *Journal of General Virology* 83:2845-2855.
- Mercer A.A. 2006. Comparative analysis of genome sequences of three isolates of Orf virus reveals unexpected sequence variation. *Virus Research* 116:146-158.
- Murphy F.A., Gibbs E.P.J., Horzinek M.C. & Studdert M.J.. 1999. *Poxviridae*. p.277-291. In: *Ibid* (Eds), *Veterinary virology*. 3rd ed. Academic Press, New York.
- Nettleton P.F., Brebner J., Pow I., Gilray J.A., Bell G.D. & Reid H.W. 1996. Tissue culture-propagated orf virus vaccine protects lambs from orf virus challenge. *Veterinary Research* 138:184-186.
- Nóbrega Jr. J.E., Macedo 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. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 28:135-139.
- Rhiza H.J., Henkel M., Cottone R., Meyer M., Dehio C. & Büttner M.. 1999. Parapoxviruses: potential alternative vectors for directing the immune response in permissive and non-permissive hosts. *Journal of Biotechnology* 73:235-242.
- Rhiza H.J., Henkel M., Cottone R., Bauer B., Auge U., Götz F., Pfaff E., Röttgen M., Dehio C. & Büttner M.. 2000. Generation of recombinant parapoxviruses: non-essential genes suitable for insertion and expression of foreign genes. *Journal of Biotechnology* 83:137-145.
- Salles M.W.S., Barros C.L.S., Lemos R.A.A. & Weiblen R. 1992. Ectima contagioso (dermatite pustular) dos ovinos. *Ciência Rural* 22:319-324.
- Savory L.J., Stacker S.A., Fleming S.B., Niven B.E. & Mercer A.A. 2000. Viral vascular endothelial growth factor plays a critical role in Orf virus infection. *Journal of Virology* 74:10699-10706.
- Schmidt, C. 2012. Vírus do ectima contagioso (orfv): avaliação de vacina produzida em cultivo celular, investigação de persistência viral e filogenia de amostras brasileiras. Dissertação de Mestrado, Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS. 66p.

Yeruham I., Perl S. & Abraham A. 2000. Orf infection in four sheep flocks. *Veterinary Journal* 160:74-75.

Quadro 1. Sequências dos iniciadores utilizados para a amplificação dos genes de virulência

Gene	Primer	Sequência (5' - 3')	Referência
VEGF	D27F	AAT GTA AAT WMT AAC GCC	Inoshima & Ishiguro 2010
	D2R	CGT TTG GAT MTG CGG TCC	
VIR	VIR1	TTA GAA GCT GAT GCC GCA G	Guo et al. 2004
	VIR2	ACA ATG GCC TGC GAG TG	
IL-10v	IL10F	ATG CTA CTC ACA CAG TCG CTC C	Klein & Tryland 2005
	IL10R	TAT GTC GAA CTC GCT CAT GGC C	

Quadro 2. Detecção de vírus em suabes coletados da comissura labial de ovinos inoculados com amostras do vírus do ectima contagioso (ORFV)

Grupo	Dias pós-inoculação															Dias (médias \pm EPM)
	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	
SV269/11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	23,5 \pm 1,5
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	
SV252/11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	21,5 \pm 2,1
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	
SV581/11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	27 \pm 1,3
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	
	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
SV820/10	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	26,5 \pm 1,5
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	
MEM	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

+ Amostra positiva; - Amostra negativa.

Quadro 3. Números de acesso ao GenBank para as sequências de nucleotídeos dos genes de virulência das amostras de ORFV analisadas neste estudo

Identificação	VEGF	VIR	IL-10v
SV269/11	KF927100	KF927104	KF927108
SV252/11	KF927101	KF927105	KF927109
SV581/11	KF927102	KF927106	KF927110
SV820/10	KF927103	KF927107	KF927111

Quadro 4. Percentual de identidade das sequências completas e parciais de aminoácidos dos genes de virulência entre as amostras analisadas neste estudo e com a cepa de referência OV-IA82¹

Isolated	VEGF					VIR					IL-10v				
	OV-IA82	SV269/11	SV252/11	SV581/11	SV820/10	OV-IA82	SV269/11	SV252/11	SV581/11	SV820/10	OV-IA82	SV269/11	SV252/11	SV581/11	SV820/10
OV-IA82		78	70	69	75		97	97	96	97		100	95	94	100
SV269/11	78		83	83	94	97		98	98	99	100		95	94	100
SV252/11	70	83		89	79	97	98		98	98	95	95		89	95
SV581/11	69	83	89		79	96	98	98		98	94	94	89		94
SV820/10	75	94	79	79		97	99	98	98		100	100	95	94	

¹A identidade das sequências foram obtidas pelo método *Cluster W* do programa Bioedit.

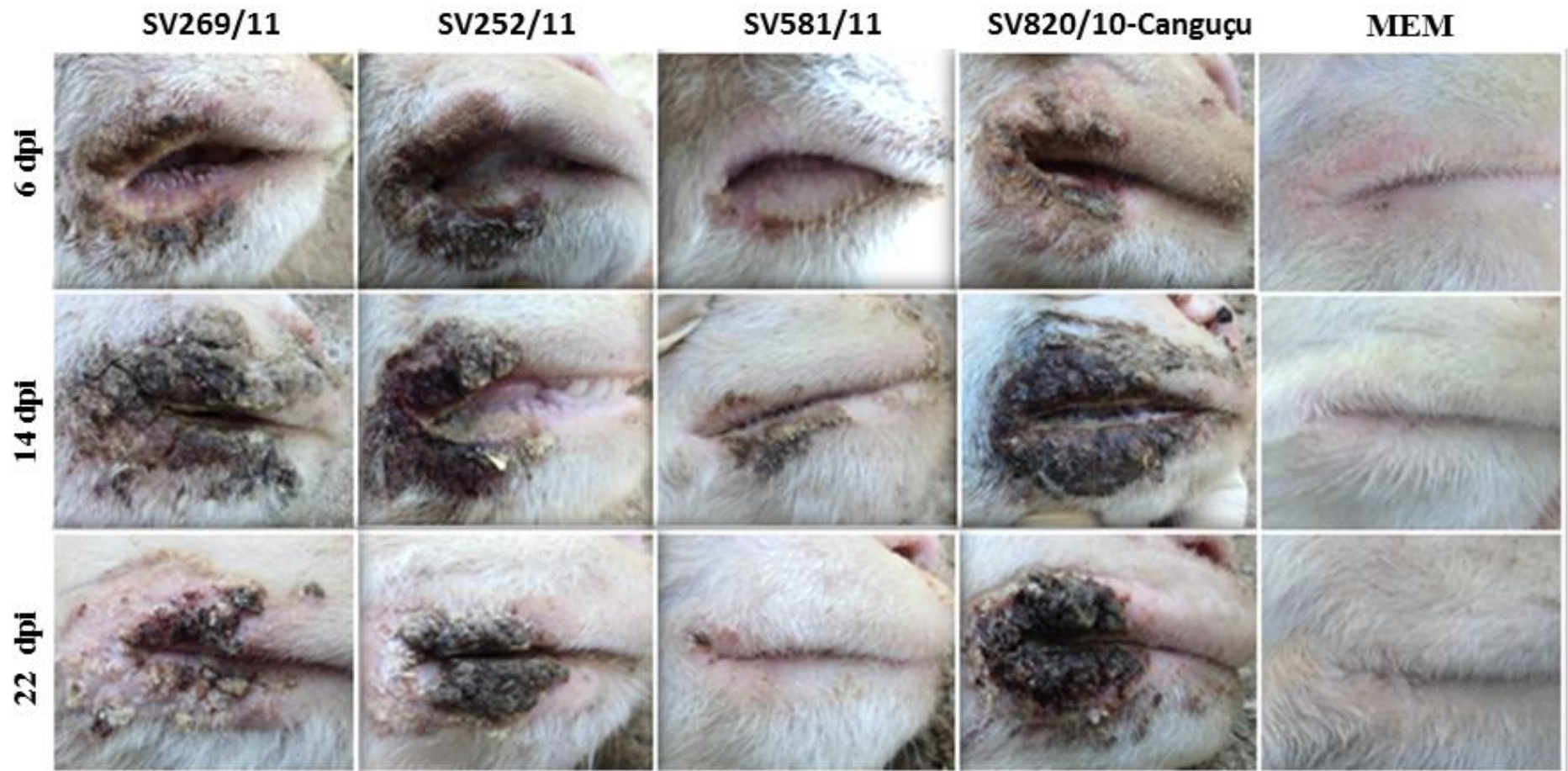


Fig. 1. Lesões apresentadas pelos ovinos experimentalmente infectados por quatro amostras do vírus do ectima contagioso (ORFV) nos dias 6, 14 e 22 pós-inoculação (pi). *dpi: dias pós-inoculação

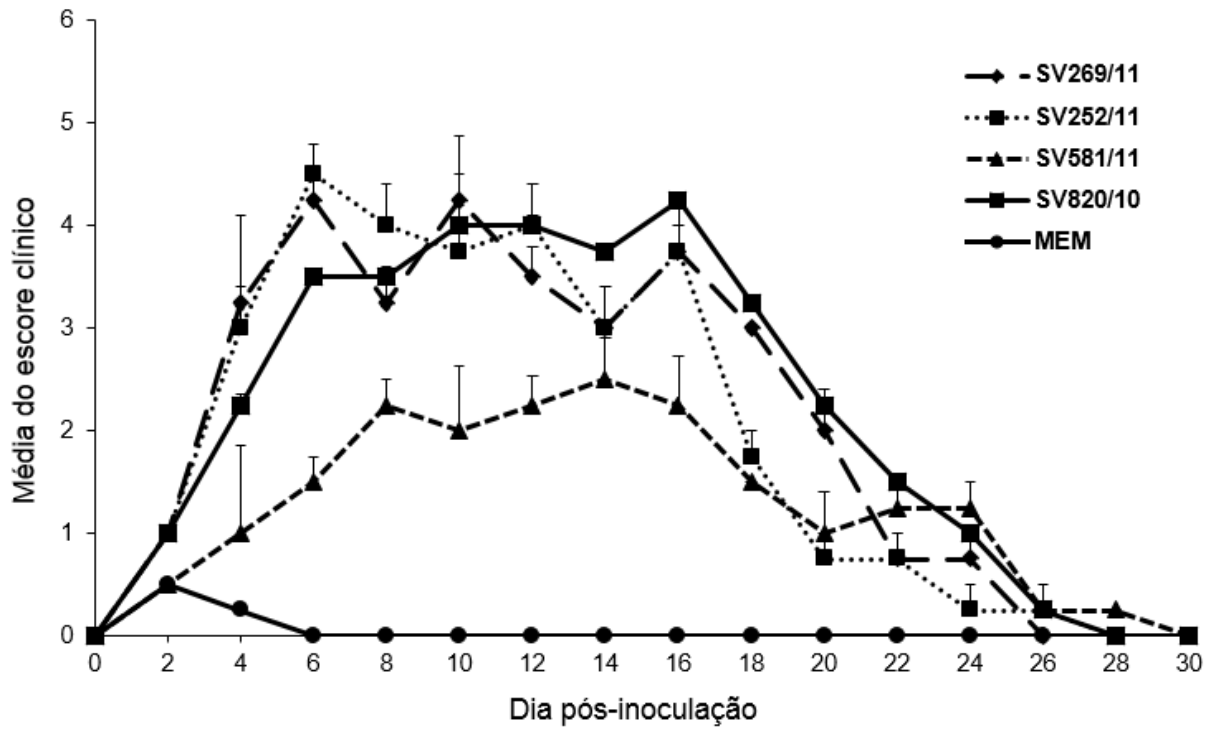


Fig. 2. Médias diárias dos escores clínicos dos grupos inoculados com quatro amostras do vírus do ectima contagioso, entre os dias 0 e 30 pós-inoculação (pi). As barras verticais demonstram o erro padrão da média (EPM)

3. CONCLUSÃO

Os resultados do presente trabalho permitem concluir que:

- As amostras SV581/11 e SV252/11 foram menos virulentas em ovinos do que as amostras SV269/11 e SV820/10-Canguçu;
- Os animais pertencentes ao grupo SV581/11 excretaram vírus por mais tempo, mesmo esta amostra tendo sido menos virulenta;
- O menor grau de identidade de aminoácidos entre os isolados utilizados neste estudo e a cepa padrão OV-IA82 foi apresentada pela amostra SV581/11;
- As amostras SV581/11 e SV252/11 apresentaram deleção e mutações importantes em genes de virulência (VEGF e IL-10v) que podem estar relacionadas a menor virulência destas amostras *in vivo*.

4. REFERÊNCIAS

BUTTNER, M.; RZIHA, H.J. Parapoxvirus: from 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.

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.; 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 2002.

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

HOUSAWI, F.M.T. et al. Sero-surveillance for orf antibodies in sheep and goats in Saudi Arabia employing the ELISA technique. **Journal of Comparative Pathology**, Liverpool, v. 106, n. 2, p. 153-156, February 1992.

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.

MAVROGIANNI, V.S. et al. Teat disorders predispose ewes to clinical mastitis after challenge with *Mannheimia haemolytica*. **Veterinary Research**, Paris, v. 37, n. 1, p. 127-130, May 2006.

McKEEVER, D. J.; REID, H. W. Survival of orf virus under British winter conditions. **Veterinary Record**, London, v. 118, n. 22, p. 613-614, May 1986.

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

_____. Prevalence of contagious pustular dermatitis (orf) in six million lambs at slaughter: a three-year study. **New Zealand Veterinary Journal**, Wellington, v. 31, n. 99, p. 161-163, September 1983.

SMITH, G.W. et al. Atypical parapoxvirus infection in sheep. **Journal Veterinary Internal Medicine**, Philadelphia, v. 16, p. 287-292, January 2002.

YIRRELL, D.L. et al. Immune response of lambs to experimental infection with Orf Virus. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 22, p. 321-332, February 1989.