

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E CLÍNICO-PATOLÓGICOS DAS
POXVIROSES DE BOVINOS NO ESTADO DE GOIÁS (2010-2018) E
SOROPREVALÊNCIA DE VACCÍNIA BOVINA EM BOVINOS NO
DISTRITO FEDERAL**

Lorena Ferreira Silva

Orientador: Prof. Dr. Fabiano José Ferreira de Sant'Ana

GOIÂNIA

2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação Tese

2. Nome completo do autor

Lorena Ferreira Silva

3. Título do trabalho

Aspectos epidemiológicos e clínico-patológicos das poxviroses de bovinos no Estado de Goiás (2010-2018) e soroprevalência de vaccínia bovina em bovinos no Distrito Federal

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

- a)** consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);
- b)** novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.

O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **Fabiano José Ferreira de Sant'Ana, Usuário Externo**, em 13/01/2021, às 09:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **LORENA FERREIRA SILVA, Discente**, em 13/01/2021, às 10:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1801719** e o código CRC **0E27EA61**.

LORENA FERREIRA SILVA

**ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E CLÍNICO-PATOLÓGICOS DAS
POXVIROSES DE BOVINOS NO ESTADO DE GOIÁS (2010-2018) E
SOROPREVALÊNCIA DE VACCÍNIA BOVINA EM BOVINOS NO
DISTRITO FEDERAL**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal junto à Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás.

Área de Concentração:

Cirurgia, Patologia Animal e Clínica Médica

Linha de Pesquisa:

Patobiologia e morfofisiologia animal, experimental e comparada

Orientador:

Prof. Dr. Fabiano José Ferreira de Sant’Ana –
UnB/FAV

Comitê de orientação:

Prof. Dr. Paulo Henrique Jorge da Cunha - EVZ/UFG
Prof^a. Dr^a. Juliana Felipetto Cargnelutti -
UFSM/CCR

Goiânia

2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Ferreira Silva, Lorena

ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E CLÍNICO-PATOLÓGICOS DAS
POXVIROSES DE BOVINOS NO ESTADO DE GOIÁS (2010-2018) E
SOROPREVALÊNCIA DE VACCÍNIA BOVINA EM BOVINOS NO
DISTRITO FEDERAL [manuscrito] / Lorena Ferreira Silva. - 2020.
xvi, 91 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Fabiano José Ferreira de Sant'Ana; co orientador Dr. Paulo Henrique Jorge da Cunha; co-orientador Juliana Felipetto Cargnelutti .

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ), Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Goiânia, 2020.

Bibliografia. Anexos.

Inclui siglas, abreviaturas, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Doenças vesiculares bovinas. 2. Centro-Oeste Brasileiro. 3. Orthopoxvírus bovino. 4. Parapoxvírus bovino. 5. Epidemiologia. I. José Ferreira de Sant'Ana, Fabiano, orient. II. Título.

CDU 639.09



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

ATA DE DEFESA DE TESE

Ata Nº **305** da sessão de Defesa de Tese de **Lorena Ferreira Silva** que confere o título de Doutor(a) em **Ciência Animal**, na área de concentração em **Cirurgia, Patologia animal e Clínica médica**.

Aos **dezesesseis dias do mês de dezembro de dois mil e vinte** a partir da(s) **14h00min**, por meio de videoconferência, realizou-se a sessão pública de Defesa de Tese intitulada **“Aspectos epidemiológicos e clínico-patológicos das poxviroses de bovinos no Estado de Goiás (2010-2018) e soroprevalência de vaccínia bovina em bovinos no Distrito Federal”**. Os trabalhos foram instalados pelo(a) Orientador(a), **Prof. Dr. Fabiano José Ferreira de Sant’Ana (PPGCA)** com a participação dos demais membros da Banca Examinadora, todos de forma remota: **Prof. Dr. Antônio Dionísio Feitosa Noronha Filho (EVZ/UFG)**, membro titular externo ao programa; **Prof.ª Dr.ª Luciana Sonne (UFRGS)**, membro titular externo; **Prof. Dr. Eduardo Furtado Flores (UFSM)**, membro titular externo; **Prof. Dr. José Renato Junqueira Borges (Unb)**, membro titular externo. Durante a arguição os membros da banca **não fizeram** sugestão de alteração do título do trabalho. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Tese tendo sido(a) o(a) candidato(a) **aprovado(a)** pelos seus membros. Proclamados os resultados pelo(a) **Prof. Dr. Fabiano José Ferreira de Sant’Ana**, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora e pela coordenação do PPGCA, em substituição da assinatura do membro externo Prof. Dr. José Renato Junqueira Borges, aos **dezesesseis dias do mês de dezembro de dois mil e vinte**.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA



Documento assinado eletronicamente por **Danieli Brolo Martins, Coordenadora de Pós-Graduação**, em 16/12/2020, às 16:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fabiano José Ferreira de Sant’Ana, Usuário Externo**, em 16/12/2020, às 16:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Eduardo Furtado Flores, Usuário Externo**, em 16/12/2020, às 16:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luciana Sonne, Usuário Externo**, em 16/12/2020, às 16:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Antonio Dionísio Feitosa Noronha Filho, Professor do Magistério Superior**, em 16/12/2020, às 16:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1758183** e o código CRC **9E368C9E**.

Dedico a Deus,
E aos meus pais

AGRADECIMENTOS

A autora agradece:

À Deus, por me guiar e me dar forças todos os dias.

Aos meus pais, Osvaldo e Valni, e minha irmã, Ana Carolina, por sempre me apoiarem, me ajudarem e estarem ao meu lado.

Ao meu marido, Felipe, por ter me acompanhado por todos esses anos e por me dar força e apoio em todas as minhas etapas.

A minha família, agregados e amigos, em especial a minha avó Gleds e a minha tia Eleusa, por sempre me acompanharem com grande carinho na minha trajetória.

Ao meu orientador, Fabiano José Ferreira de Sant'Ana, por ser um excelente orientador, orientando com paciência e compreensão, e por ter me dado grande apoio na realização desse trabalho.

Aos meus outros professores e tutores, por terem me ensinado e me guiado nesses anos de estudo. Agradeço a cada conhecimento recebido.

Aos laboratórios da Universidade Federal de Santa Maria e da Universidade de Brasília, incluindo professores, técnicos, estagiários, doutorandos, mestrandos, entre outros, por me apoiarem nesse projeto e me ajudarem na execução do trabalho.

Aos laboratórios e servidores que forneceram o material necessário para a realização desse trabalho.

E a todos que contribuíram, de alguma forma, com a realização deste trabalho e com meu conhecimento e crescimento profissional.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES INICIAIS	1
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Gênero <i>Orthopoxvirus</i>	5
2.1.1 Vaccínia bovina	7
a) Histórico da vaccínia bovina no Brasil.....	7
b) Epidemiologia do VACV	10
c) Patogenia e alterações macroscópicas em bovinos	15
d) Lesões clínicas em seres humanos	17
e) Lesões clínicas em outros animais	18
f) Diagnóstico	19
2.2 Gênero <i>Parapoxvirus</i>	21
2.2.1 Estomatite papular bovina	22
a) Histórico da estomatite papular bovina no Brasil	22
b) Epidemiologia da estomatite papular bovina	23
c) Lesões clínicas em bovinos	24
d) Lesões clínicas em seres humanos	25
e) Diagnóstico.....	25
2.2.2 Pseudovariola bovina.....	26
a) Histórico da pseudovariola no Brasil	27
b) Epidemiologia do PCPV	27
c) Lesões clínicas em bovinos	29
d) Lesões clínicas em seres humanos	30
e) Diagnóstico.....	31
2.3. Considerações finais da revisão bibliográfica	31
REFERÊNCIAS	33
CAPÍTULO 2 - Seroprevalence of bovine vaccinia in cows and its correlation with the productive profile of affected farms in the Distrito Federal, Brazil	44
ABSTRACT	44
1. INTRODUCTION	45
2. MATERIALS AND METHODS.....	46

2.1. Location and sampling	46
2.2. Cell line and virus.....	47
2.3. Virus-neutralization (VN).....	47
2.4. Statistics.....	48
3. RESULTS	49
4. DISCUSSION.....	52
ACKNOWLEDGMENTS	55
REFERENCES	56
CAPÍTULO 3 - Retrospective study of poxviruses diagnosed in cattle from Goiás State, Brazil (2010-2018)	61
SUMMARY	61
1. INTRODUCTION.....	62
2. MATERIALS AND METHODS	63
3. RESULTS.....	64
4. DISCUSSION.....	66
ACKNOWLEDGMENTS	69
REFERENCES	70
FIGURES	75
TABLES.....	77
CAPÍTULO 4 - CONSIDERAÇÕES FINAIS	81
ANEXOS.....	84

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

- FIGURA 1 – Lesões macroscópicas em bovinos associados ao vírus da pseudovariola no Distrito Federal. As lesões nos úberes consistiam de úlceras multifocais (A) a focalmente extensas (B), e pústulas multifocais (C). Foram observadas lesões ulcerativas e focalmente extensas na língua (D)..... 29
- FIGURA 2 - Progressão da lesão nodular na mão de uma mulher que teve o “nódulo do ordenhador”. A. Lesão nodular com 13 dias de evolução, apresentando-se eritematosa, bem delimitada, com um centro deprimido e esbranquiçado e com cerca de 2,5 de diâmetro. B. Lesão com 24 dias de evolução, em estado regenerativo e apresentando crostas hemorrágicas. C. Lesão com 32 dias de evolução, em estágio papilomatoso. D. Lesão om 41 dias de evolução, em fase cicatricial..... 30

Capítulo 3 (em inglês)

- FIGURE 1 - Poxviruses diagnosed in cattle in Goiás State, Brazil (2010-2018). Zoomed-in map shows the mesoregions with positive cases. Circle inside mesoregions indicate the confirmed poxviruses and number of cases..... 75
- FIGURE 2 - Number of cases according to distribution per year (2010-2018) of 25 outbreaks of poxviruses diagnosed in cattle in the Goiás state, Brazil. VACV – vaccinia virus, BPSV – bovine papular stomatitis virus, PCPV – pseudocowpoxvirus..... 76

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2 (em inglês)

TABLE 1 - Number of farms and cows analyzed in the seroprevalence study for VACV in the different operational units (OU) from Distrito Federal in 2015.....	49
TABLE 2 - Productive characteristics of 64 cattle farms sampled in DF, Brazil, in 2015.....	50
TABLE 3 - Analysis of potential risk factors for bovine vaccinia in farms from Federal District in 2015.....	51

Capítulo 3 (em inglês)

TABLE 1 - Mesoregion and county distribution of 25 outbreaks of poxviruses diagnosed in cattle, between 2010 and 2018, in the Goiás State, Brazil.....	77
TABLE 2 - Epidemiological, clinical and pathological findings of five outbreaks of bovine vaccinia in Goiás State, Brazil (2014-2018).....	78
TABLE 3 - Epidemiological, clinical and pathological findings of outbreaks of pseudocowpox virus (PCPV) from Goiás State, Brazil (2010-2018).....	80

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Capítulo 1

BPSV	- vírus da estomatite papular bovina
HA	- hemaglutinina
HE	- hematoxilina e eosina
MAPA	- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
PCR	- reação em cadeia da polimerase
PCVP	- vírus <i>pseudocowpox</i>
SN	- soroneutralização
VACV	- vírus da <i>Vaccinia</i>
VB	- vaccínia bovina

Capítulo 2 (em inglês)

BV	- bovine vaccinia
CI	- confidence interval
DF	- Distrito Federal
OU	- operational units
SEAGRI	- Secretary of Agriculture, Supply and Rural Development
VACV	- vaccinia virus
VN	- virus-neutralization

Capítulo 3 (em inglês)

BPS	- bovine papular stomatitis
BPSV	- bovine papular stomatitis virus
BV	- bovine vaccinia
FMD	- foot-and-mouth disease
GO	- Goiás
PCP	- pseudocowpox

PCPV	- pseudocowpox virus
VACV	- vaccinia virus
VS	- vesicular stomatitis

RESUMO

Considerando a importância e a literatura escassa sobre as poxviroses de bovinos do Centro-Oeste brasileiro, o presente trabalho teve como objetivos determinar a soroprevalência da infecção pelo vírus vaccínia (VACV) em bovinos no Distrito Federal (DF) (2015-2016) e descrever os aspectos epidemiológicos e clínico-patológicos de casos de poxviroses notificados oficialmente em bovinos no Estado de Goiás (GO) (2010-2018). As amostras utilizadas neste estudo do DF e de GO foram cedidas pela Secretaria de Agricultura, Abastecimento e Desenvolvimento Rural do DF (Seagri-DF) e pela Agência Goiana de Defesa Agropecuária (Agrodefesa), respectivamente. No primeiro estudo, amostras de soros de 312 vacas de 64 rebanhos foram testados por teste de vírus-neutralização (VN) para o anticorpo da vaccínia bovina (VB). Observou-se soro-prevalência de VB estimada em 33,3% dos rebanhos e 10,6% dos animais. Nenhum fator de risco de significado biológico foi associado à soropositividade à VB. No segundo estudo, durante o período de avaliação, foram notificados 33 casos/focos suspeitos de doenças vesiculares em bovinos, dos quais 25 foram confirmados como poxviroses: 13 VB, seis de pseudovariola (pseudocowpox), cinco de estomatite papular e uma coinfeção (VACV e parapoxvírus semelhante ao vírus da *Orf*). A maioria dos casos ocorreu no período seco dos respectivos anos, entre os meses de junho e setembro. As lesões afetaram principalmente as tetas e o úbere de vacas leiteiras, e incluíram vesículas, úlceras, crostas, pápulas e cicatrizes. As principais lesões em bezerros incluíram úlceras na boca e focinho. Na maioria dos casos, houve relatos concomitantes com lesões similares em humanos, que tinham contato com os bovinos afetados. Os resultados do estudo demonstraram que diferentes poxviroses, especialmente VB, afetam bovinos em parte do Centro-Oeste do Brasil, com potencial zoonótico e com maior frequência em propriedades leiteiras, mas presente também em algumas criações de corte. Com isso, essas doenças requerem vigilância por parte do serviço veterinário oficial e dos órgãos locais de saúde pública.

Palavras-chave: doenças vesiculares bovinas, Centro-Oeste Brasileiro, epidemiologia, orthopoxvírus bovino, parapoxvírus bovino.

ABSTRACT

Based on the importance and in the scarce literature about poxviruses in cattle in Brazilian Midwestern, the current study aimed to determine the seroprevalence of vaccinia virus (VACV) in cattle of Distrito Federal (DF) (2015-2016) and to describe the epidemiological, clinical and pathological aspects of officially notified cases of poxviruses in cattle of Goiás State (GO), Brazil (2010-2018). The samples used in this study from DF and GO were kindly provided by Secretaria de Agricultura, Abastecimento e Desenvolvimento Rural (Seagri-DF) from DF and by Agência Goiana de Defesa Agropecuária (Agrodefesa), respectively. In the first study, samples of sera of 312 cows from 64 herds were tested by virus-neutralizing test (VN) for bovine vaccinia (BV) antibodies. Estimated prevalences of 33.3% (herds) and 10.6% (animals) were observed. No risk factor with biological relevance was associated with seropositivity to BV. In the second study, during the evaluation period, 33 suspected cases/outbreaks of vesicular diseases in cattle were notified. Twenty-five out of these cases were confirmed as associated with poxviruses: 13 BV, 6 pseudocowpox, 5 bovine papular stomatitis and 1 coinfection (VACV and *Orf* virus-like parapoxvirus). Most cases occurred in the dry season of the respective years, between the months of June and September. Main lesions included vesicles, ulcers, crusts, papules and scars. These lesions affected mainly the teats and udder of dairy cows. Main lesions in calves consisted of ulcers in the mouth and muzzle. There were concomitant cases with similar lesions in humans that worked closely with the infected cattle. The results of this study demonstrate that different poxviruses (mainly BV) infect cattle in part of the Midwestern Brazil, with zoonotic potential, mainly in dairy farms, but also present on beef herds. As a result, these diseases require vigilance by the official veterinary and local public health service.

Keywords: bovine vesicular diseases, Brazilian Midwest, epidemiology, bovine orthopoxvirus, bovine parapoxvirus.

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1. INTRODUÇÃO

As poxviroses, causadas por vírus da família *Poxviridae*, são doenças que acometem bovinos e apresentam importância em saúde pública e podem resultar em prejuízos econômicos. Algumas dessas doenças são zoonóticas e podem afetar trabalhadores rurais, especialmente ordenhadores que mantêm contato próximo com bovinos infectados.

As poxviroses também têm importância no diagnóstico diferencial de doenças vesiculares e ulcerativas, dentre elas destacam-se a febre aftosa, estomatite vesicular, mamilite herpética, febre catarral maligna e a diarreia viral bovina (ou doença das mucosas). Dentre essas doenças, a febre aftosa é considerada a doença vesicular mais importante, devido às sérias restrições e embargos econômicos atribuídos aos países que possuem casos confirmados da enfermidade em seus plantéis¹. Por essa razão, existe preocupação inerente e diversas ações de controle, planejamento, fiscalização e vigilância que são realizadas constantemente pelos órgãos estaduais de defesa agropecuária, bem como pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

Surtos de infecções causadas por poxvírus têm sido descritos em bovinos em várias regiões do Brasil. O agente mais comumente identificado nestas infecções tem sido o vírus da *Vaccinia* (VACV), acometendo com maior frequência bovinos leiteiros e ordenhadores, especialmente na Região Sudeste²⁻⁵. Alguns desses estudos relatam a apresentação clínica da enfermidade nos bovinos e humanos, acompanhados da identificação molecular e caracterização dos isolados^{2,6-8}. Casos de coinfeções causadas por mais de um poxvírus também são descritos em surtos de doença vesicular bovina⁹⁻¹¹.

Apesar desses relatos, o que se observa é que há carência de dados oficiais relacionados à epidemiologia e manifestação clínica-patológica destas doenças, o que dificulta a adoção de medidas sanitárias por veterinários, produtores e órgãos governamentais¹². Ademais, são relatados casos de doença vesicular e/ou exantematosa com grande frequência por produtores rurais e veterinários que trabalham a campo, mas o diagnóstico e a comunicação oficial nem sempre são realizados.

Com isso, tem-se dado pouca importância a esses agentes, não sendo possível abranger a realidade dessas viroses no Brasil. Nota-se a necessidade evidente de junções desses conhecimentos sobre a epidemiologia, clínica e patologia destas enfermidades, para que assim,

além de se estabelecer um diagnóstico correto e aplicar a terapêutica adequada, possa se estabelecer medidas de vigilância para impedimento da disseminação destas viroses.

É necessário que se estabeleçam, durante os surtos, medidas específicas relacionadas ao controle e vigilância dessas infecções, devendo-se estar relacionada ao diagnóstico rápido e preciso de qualquer caso clínico suspeito de febre aftosa, para que sejam minimizados os impactos econômicos relacionados às restrições das propriedades com os surtos. Além disso, torna-se imprescindível diagnosticar corretamente estas doenças vesiculares, principalmente quando relacionada aos vírus da família *Poxviridae*, por serem agentes zoonóticos.

Diante deste impacto econômico e de saúde pública que esses vírus podem acarretar, tem-se como objetivo deste trabalho revisar os aspectos clínico-patológicos e epidemiológicos das poxviroses que acometem bovinos no Estado de Goiás, bem como determinar a prevalência e possíveis fatores de risco associados à infecção por VACV em bovinos do Distrito Federal.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Os membros da família *Poxviridae* são vírus que possuem DNA como material genético, mas que se multiplicam no citoplasma¹³, de células de hospedeiros vertebrados e invertebrados^{6,14} e compartilham antígenos de nucleoproteínas específicas do grupo¹⁵.

Os poxvírus dos animais estão incluídos na subfamília *Chordopoxvirinae*¹⁵ e apresentam vírions complexos. Geralmente seus formatos são retangulares, com até 450 x 260 nm, com moléculas lineares simples de DNA de duplo filamento e com peso molecular de 85 a 240 milhões de daltons¹⁶. Ao contrário da maioria dos vírus DNA, os poxvírus se replicam no citoplasma e codificam enzimas e outras proteínas que permitem a expressão e a replicação do genoma, a montagem dos vírions e a resistência às defesas do hospedeiro¹⁴.

A penetração desses vírus nas células ocorre pela transposição da membrana plasmática ou após endocitose, como é o caso do vírus protótipo da família, o VACV, que codifica quatro proteínas para a fixação e 11 proteínas para a fusão da membrana e a entrada do núcleo, enquanto que vários outros vírus codificam somente uma ou duas proteínas¹⁴. No caso dos poxvírus, a liberação dos vírions maduros ocorre de duas formas: pelo processo de brotamento, no caso dos vírus encapsulados, ou pela lise celular, quando os vírus não possuem invólucro¹⁶.

Os poxvírus são vírus intensamente epiteliotrópicos e causam doenças cutâneas e sistêmicas em mamíferos e aves. Usualmente a infecção ocorre por via subcutânea ou respiratória e os vírus geralmente obtêm acesso à circulação sistêmica por via linfática, entretanto, quando utilizado a injeção como forma de adquirir o vírus, a multiplicação pode levar à entrada direta no sangue e à viremia primária. A viremia secundária dissemina o vírus, que volta para a pele e dependendo a outros órgãos alvos. Estes vírus provocam no epitélio alterações inicialmente degenerativas e lesões vesiculares típicas, que podem, por vezes, levar à isquemia secundária devido ao dano vascular causado pela multiplicação viral nas células endoteliais. As infecções por alguns poxvírus podem também causar lesões proliferativas, que pode ser explicado devido a um gene, pertencente a vários destes vírus, que possui similaridade significativa com fatores de crescimento epiteliais¹⁵.

O que se observa na medicina veterinária é que o termo varíola tem sido empregado para agrupar doenças que são causadas por cepas similares de poxvírus¹⁷. Em relação à situação destas poxviroses no Brasil, existem relatos em diversos estados de surtos onde foram identificados mais de um vírus, demonstrando casos de coinfeções duplas ou até triplas^{11,18,19}. Essas investigações demonstram a necessidade da continuidade de estudos relacionados à

etiologia e a epidemiologia dessas poxviroses em todo o território nacional, pois estas doenças podem estar sendo negligenciadas em surtos de campo.

O vírus mais comumente identificado nessas infecções tem sido o VACV, que pertence ao gênero *Orthopoxvirus* e que causa doença vesicular principalmente em bovinos e em humanos^{2,20}. Já entre os vírus do gênero parapoxvírus que afetam bovinos, destacam-se o vírus da estomatite papular bovina (BPSV) e o vírus da pseudovariola (*Pseudocowpox* vírus - PCPV), todos zoonóticos²¹.

No Brasil, a apresentação clínica destas poxviroses é frequentemente confundível, por levar a lesões vesiculares e eruptivas, localizadas na pele e/ou mucosas externas de bovinos. Macroscopicamente, as lesões começam como máculas eritematosas, formando pápulas e vesículas e, após formar úlceras crostosas, progredem para a cura, muitas vezes causando cicatrizes residuais. Alguns autores citam que em mucosas estas lesões são mais brevemente vesiculares, e que geralmente formam úlceras em vez de pústulas¹⁵.

Contudo, para o diagnóstico das infecções por poxvírus se associa o quadro clínico e epidemiológico com as lesões histológicas características. Entretanto, o diferencial etiológico só é possível com a confirmação por isolamento viral, testes moleculares e/ou microscopia eletrônica, através da análise do soro e/ou de fragmentos de lesões dos animais através de suabes ou biópsias.

A histopatologia, portanto, é um exame que sugere se tratar de uma infecção por poxvírus, e as alterações observadas na microscopia se diferem de acordo com a progressão das lesões^{15,19}. Inicialmente, nota-se tumefação e vacuolização citoplasmática (degeneração hidrópica) nas células da epiderme, principalmente da camada espinhosa externa e após há a ruptura de muitos queratinócitos afetados, formando-se vesículas. Além disso, pode ser observada acantose e hiperqueratose e, às vezes, hiperplasia pseudocarcinomatosa do epitélio adjacente. Também pode se visualizar edema, vasodilatação, infiltrado perivascular mononuclear e neutrofílico variável. Os neutrófilos geralmente migram para a epiderme e se agregam às vesículas, formando microabscessos eventuais, que podem formar grandes pústulas intraepidérmicas e que, por vezes, se estendem para a derme superficial. Geralmente, mais tardiamente, a ruptura da pústula pode produzir crosta que usualmente é colonizada em sua superfície por bactérias oportunistas¹⁵.

Em 34 casos naturais de poxviroses no Brasil, os achados histológicos mais predominantes foram inflamação linfoplasma-histiocítica e/ou neutrofílica multifocal superficial discreta a moderada com acantose e hiperqueratose paraqueratótica. Por vezes, eram

notadas crostas serocelulares e espongiose e, nos casos com úlceras, havia áreas focalmente extensas de necrose com infiltrado acentuado de neutrófilos¹⁸.

Histologicamente também podem ser observados corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos, únicos ou múltiplos e de tamanho variável^{15,18}. Nos casos descritos de infecções naturais por poxvírus, dos 34 casos, seis apresentaram pequena a moderada quantidade de corpúsculos de inclusão intracitoplasmático e eosinofílico de 4-8 µm nos queratinócitos, especialmente nas áreas de acantose e próximo às áreas ulceradas^{18, 19}. Essas inclusões são designadas em dois tipos, do tipo A e do tipo B. O tipo A são as inclusões mais proeminentes e eosinofílicas, que refletem o alto teor de proteína e *Feulgen* fracamente positivo; e o tipo B são inclusões menores, basofílicas, *Feulgen* positivos e que representam o local da replicação do vírus¹⁵. A reação *Feulgen* é uma reação que ocorre devido a uma coloração especial que faz com que o DNA *in situ* seja especificamente corado, no qual a intensidade de coloração é proporcional à concentração de DNA, o que permite a demonstração específica de DNA nas estruturas celulares²².

Estes vírus, que constituem um risco para bovinos e humanos, estão emergindo uma relevante diversidade genética e fenotípica, e a circulação desses vírus em espécies de animais selvagens e semi domesticadas sugerem a persistência desses poxvírus como agentes patogênicos emergentes⁵. Com todos estes dados, é notório que a ocorrência da doença causada por VACV está associada à morbidade significativa, além de estar associado a perdas de produtividade e a demanda de métodos preventivos eficientes, como a vacinação. Caso as populações animais estivessem protegidas pela vacina, isso minimizaria significativamente o risco de transmissão dos poxvírus para os seres humanos e entre os animais¹³.

Serão descritas, a seguir, as principais poxviroses, relacionadas aos seus gêneros, que afetam bovinos no Brasil.

2.1. Gênero *Orthopoxvirus*

O gênero *Orthopoxvirus* da família *Poxviridae* compreende a espécie *smallpox* (vírus da varíola - VARV), sendo os humanos os únicos hospedeiros, e as espécies zoonóticas *monkeypox*, *cowpox*, VACV e o *camelpox*, além de vários outros^{6,23}. As espécies de *Orthopoxvirus* eram nomeadas com base no hospedeiro que era derivado²⁴. Sendo assim, o nome da espécie do orthopoxvírus não reflete ao verdadeiro hospedeiro, pois os orthopoxvírus zoonóticos foram isolados de animais próximos aos seres humanos, que são hospedeiros incidentais para o vírus²³.

Os vírions dos orthopoxvírus apresentam formato retangular, com 200 x 200 x 250 nm e o DNA genômico apresenta de 170 a 250 kbp. Em relação à composição, as células infectadas por este vírus sintetizam uma glicoproteína denominada hemaglutinina, e muitos contêm uma proteína de inclusão do tipo A²⁵, que são importantes para o diagnóstico viral.

A maioria das infecções causadas pelos orthopoxvírus são generalizadas e disseminadas²⁵. Tem-se como principal vírus desta família, o vírus da varíola humana (*Smallpox* vírus), que causa doença sistêmica que leva a erupção cutânea generalizada e que foi erradicada da população mundial em 1977, devido à vacinação usando o VACV. Esta vacinação só foi possível, pois no início do século XX, pesquisadores chineses e indianos haviam descoberto um método que proporcionava alguma proteção contra a varíola, que foi a inoculação de uma variedade do vírus da varíola, embora em muitas das vezes resultasse em doenças graves e morte. Com isso, em 1796 foi observado que um vírus inofensivo obtido de vacas poderia proteger o homem contra a varíola. Por meio dessa observação, Edward Jenner estabeleceu a vacinação, uma prática que foi disseminada por todo o mundo e que resultou na queda no número da varíola nos países industrializados²⁴.

Há vários anos na Inglaterra, após grande surto de varíola humana, houve uma grande campanha de erradicação da varíola, com investigação intensa de reservatórios não humanos que poderiam ter o *Smallpox*, sendo pressuposto de que não haveria mais animais reservatórios deste vírus²⁶. Com esta informação, no início da década de 1980, a vacinação em massa foi suspensa^{23,24}. Com a suspensão da vacinação neste período, o que se consta é que atualmente grande parte da população mundial não apresenta mais imunidade contra este vírus, e não apenas contra a varíola, mas também contra outros orthopoxvírus zoonóticos que causam infecções²³.

Após a erradicação da varíola e com a suspensão de programas de vacinação, surtos de infecção por VACV têm sido descritos em vários estados e regiões do Brasil, com isolamento e caracterização de diferentes tipos de vírus⁴. Esses surtos recentes têm acometido não somente animais domésticos, mas também seres humanos, e aparentam estar se tornando cada vez mais frequentes. Isso indica uma nova situação na ecologia e na evolução dos orthopoxvírus zoonóticos, no qual a análise de dados em relação à filogenética, ecologia e padrão evolutivo de uma gama de hospedeiros de orthopoxvírus, em agentes etiológicos como o *smallpox*, *monkeypox*, *cowpox*, VACV e *camelpox*, sugere que uma variante do vírus da varíola poderia emergir no curso da evolução natural desses poxvírus atuais²³.

Em relação ao Brasil, historicamente o primeiro surto descrito de poxvirose no país foi um surto de varíola bovina provocada pelo vírus *cowpox* em propriedades rurais e de exploração

leiteira no Estado de Minas Gerais em 1984²⁷. Entretanto, desde o final do século XX, grande parte dos surtos descritos no Brasil são referentes ao VACV e suas estirpes^{2, 4,6-9,11,28-32}.

A seguir, será descrito sobre o principal orthopoxvírus que afeta bovinos no Brasil, o VACV.

2.1.1 Vaccínia bovina

Como citado anteriormente, o agente mais comumente identificado nas infecções por poxvírus tem sido o VACV, um orthopoxvírus zoonótico que causa doença vesicular em bovinos^{2,20}. O VACV é capaz de infectar bovinos, equinos, suínos e humanos^{15,33}, além de coelhos, camundongos e macacos¹⁶. Há evidências que cães e gambás também são susceptíveis, mas com ausência de sinais clínicos³⁴. Entretanto, os hospedeiros naturais do VACV ainda não foram inequivocamente identificados, e há pesquisadores que acreditam que esse vírus foi derivado de forma natural de algum poxvírus nos séculos XVIII e XIX³⁵.

Existem muitas cepas de VACV com diferentes propriedades biológicas, entretanto elas apresentam muitas características em comum, como uma ampla gama de hospedeiros, crescimento rápido e distintos mapas do genoma²⁴. O VACV apresenta características especiais, como a capacidade de integrar de forma estável com mais de 25 mil pares de bases de DNA heterólogo no genoma viral sem perder a sua eficiência de replicação e, como já citado, um sítio citoplasmático de expressão gênica e uma variável quantidade de hospedeiros vertebrados³⁶.

a) Histórico da vaccínia bovina no Brasil

A primeira variante brasileira do VACV foi detectada e estudada na década de 1960 em um roedor selvagem do gênero *Oryzomys*, que foi capturado na bacia amazônica³⁷. Desde 1999, surtos exantematosos causados pelo VACV em vacas leiteiras e ordenadores têm sido descritos frequentemente em algumas regiões brasileiras^{4,6,8,9}. Ademais, há descrição de surtos em outras espécies produtivas, como os equinos³⁸. Atualmente, são necessários esforços científicos e notificações para se esclarecer a circulação, a virulência e a diversidade do VACV no Brasil³², e serão narrados a seguir em ordem cronológica os surtos publicados de vaccínia bovina (VB) no Brasil.

Inicialmente, em 1999, houve o isolamento do vírus Cantagalo, uma estirpe do VACV que foi descrita em bovinos leiteiros e ordenadores no Estado do Rio de Janeiro. Esta estirpe apresentou similaridades as do vírus utilizada na vacina contra varíola, fabricado pelo Instituto Oswaldo Cruz e utilizada na erradicação da varíola, há mais de vinte anos do relato, o que

sugere uma adaptação do vírus na natureza associado à sua longa persistência no Brasil⁶. Após este episódio, entre 2001 a 2003, foram diagnosticados casos de humanos infectados pelo Cantagalo vírus no Vale da Paraíba, Estado de São Paulo, e no Vale do São Patrício, em Goiás²⁸.

Posteriormente, outros surtos com diferentes estirpes foram observados em bovinos, incluindo os vírus Guarani P1 e Guarani P2 em Minas Gerais⁹, vírus Araçatuba em São Paulo⁷ e vírus Passatempo em Minas Gerais⁸. Todos estes surtos ocorreram em propriedades leiteiras com infecção em bovinos e humanos. No Espírito Santo, entre 2002 e 2005, foram diagnosticados 854 casos de poxviroses bovina, que foram causados por um *Orthopoxvirus*, provavelmente um *Vaccinia-like virus*, com alta morbidade e caráter epidêmico³⁹.

Em 2005, Abrahão et al.⁴⁰ relataram um caso de coinfeção por VACV e PCPV em bovinos e humanos no Estado de Minas Gerais. Entre 2006 e 2007, casos de poxvirose foram reportadas em 34 propriedades leiteiras na região sul do Rio de Janeiro, com identificação molecular de cepas muito similares às de VACV⁴¹.

Em 2007, foi realizado uma análise da diversidade e das origens de oito vírus isolados do VACV no Brasil, e como resultado, notou-se que as variações genéticas entre eles existiram antes do início das campanhas de vacinação da erradicação da varíola⁴². Outro estudo comparou sete cepas brasileiras do VACV com a linhagem de uma vacina brasileira, e as análises filogenéticas confirmaram a existência de grupos do VACV geneticamente distintos e sem relação com a linhagem da vacina, além de terem detectado polimorfismos genéticos na variedade de hospedeiros e nos genes de virulência, bem como diferenças nas sequências de aminoácidos entre os VACVs brasileiros. Segundo os autores, essa diversidade genética do VACV observado no Brasil pode resultar em diferenças na adaptação ao hospedeiro e nas propriedades patogênicas, e a cocirculação dessas cepas divergentes poderia aumentar a possibilidade de eventos de recombinação na natureza, que poderia levar à formação de novas variantes com potencial patogênico imprevisível⁴³. Com isso, embora existam autores que acreditem que as estirpes da VACV poderiam ter se espalhado de seres humanos para animais domésticos e adaptadas ao meio rural⁶, outros sugerem uma origem independente para os isolados do VACV no Brasil, por serem distintos de estirpes do VACV utilizados na região durante a campanha de vacinação^{42,43}.

Um surto de infecção por VACV foi observado em 2008 na região sudoeste do Estado de São Paulo, relatado em quatro fazendas leiteiras de pequeno porte, que praticavam ordenha manual, e que atingiram bovinos e humanos anteriormente vacinados e não-vacinados contra esse vírus. Este caso, por ter descrito o acometimento em humanos previamente vacinados

contra a varíola, reforçou a ausência de imunidade em humanos e o seu o risco para a saúde humana no Brasil⁴.

Em 2008 foi descrito um surto de doença cutânea em equinos no Estado do Rio Grande do Sul causado pelo VACV³³, que foi associada por co-infecção por duas estirpes virais, denominados Pelotas 1 e Pelotas 2³⁸. Em 2010, houve um surto em Minas Gerais, que ocorreu em propriedades leiteiras e que anteriormente ocorria em municípios vizinhos em estações secas de anos anteriores³². Entre 2008 e 2010 foi detectado a cepa Cantalago do VACV no bioma amazônico⁴⁴, e em 2010 foi isolada a estirpe vírus Pará em um surto zoonótico do VACV no Pará³⁰.

Foi descrito um surto em Minas Gerais em 2011, causado pela cepa Serro-2011, que afetou duas propriedades com o acometimento de 91 vacas leiteiras e três ordenhadores, e os autores que acompanharam o surto narraram a sequência cronológica das alterações. Na primeira propriedade, uma vaca apresentou sinais da doença e, dois dias após, o proprietário que teve contato direto com o animal apresentou lesões nas mãos. No sétimo dia, todas as 14 vacas dessa propriedade adoeceram. Este proprietário manipulou bovinos de uma outra propriedade, que após quatro dias apresentou algumas vacas doentes. Três dias depois, o proprietário e o ordenhador da segunda fazenda ficaram doentes, e esse último necessitou de hospitalização, permanecendo no leito por dez dias. Por fim, no 28º dia, todas as vacas apresentaram melhora do quadro clínico²⁹. Também em Minas Gerais, um outro estudo analisou 18 propriedades leiteiras entre 2010 e 2012, e foi constatado que de 103 animais analisados, 78 (75,7%) apresentavam anticorpos para orthopoxvírus, no qual todas as propriedades tinham pelo menos uma vaca positiva, com acometimento intra-rebanho variando de 20 a 100%. Das 78 vacas que apresentaram anticorpos contra o vírus, somente oito apresentavam histórico de lesões de VB⁴⁵.

Além de Minas Gerais, foi relatado em 2011 o VACV em amostras coletadas de bovinos no Estado da Bahia, com acometimento de bovinos e humanos em 81% das propriedades⁴⁶. Entre 2010 e 2012 foram confirmados oito surtos de doença vesicular causado pelo VACV em rebanhos leiteiros do Estado de Goiás, envolvendo um total de 122 vacas, 12 bezerras e 11 humanos³¹. Em 2011, um surto de coinfeção por VACV e um parapoxvírus similar ao *Orf* vírus foi descrito em vacas leiteiras no sudoeste de Goiás¹⁰.

Alguns estudos analisando orthopoxvírus em amostras por longos períodos já foram realizados. Amostras coletadas durante dez anos no Estado do Rio de Janeiro foram avaliadas, totalizando 77 amostras humanas, 346 bovinas, e 78 de roedores, e a análise sorológica confirmou infecções pela cepa Cantalago do VACV em 77,9% dos humanos, 49,2% do rebanho

bovino leiteiro e 17,9% dos roedores⁴⁷. Foram analisados no Instituto Biológico de São Paulo 471 amostras de epitélios bovinos coletados em 15 estados brasileiros entre 2007 a 2012 com suspeita de doença vesicular, no qual 45,1% eram positivas para VACV⁴⁸. Houve o acompanhamento de 33 surtos dessas enfermidades entre 2015 a 2016, nos Estados do Amazonas, Bahia, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Minas Gerais, Pará, Roraima, São Paulo e Tocantins, no qual a maioria foi referente à infecção por um único vírus, como o VACV, sendo todos em Minas Gerais, mas houveram casos de coinfeção com pseudocowpox e/ou estomatite papular bovina¹¹.

Já no período de 2012 a 2017 foram diagnosticados na Bahia surtos em 42 propriedades, afetando 273 bovinos, 15 equídeos e 19 tratadores, com o pico de surtos em 2012⁴⁹, e no período de 2015 a 2018 foram diagnosticados no Distrito Federal 27 casos de infecção por VACV em bovinos^{18,19}.

Além disso, estudos sorológicos para VACV foram realizados em países que fazem fronteira comercial com o Brasil^{50,51}. Na Argentina e no Uruguai, observou-se que 8%⁵⁰ e 22,4%⁵¹ dos bovinos analisados apresentaram anticorpos neutralizantes contra o VACV, respectivamente. Esses dados demonstram que esses países possuem risco potencial de infecções por esse vírus em seus rebanhos. Além disso, há indícios dessa infecção em bovinos na Colômbia, inclusive com confirmação por testes moleculares em lesões de ordenhadores⁵².

b) Epidemiologia do VACV

Dados epidemiológicos da infecção por VACV em bovinos leiteiros no Brasil são pouco relatados e relacionados. Sabe-se que a infecção pode ocorrer em qualquer faixa etária, predominantemente nas tetas de vacas leiteiras, e que as mãos dos ordenhadores ou as ventosas das ordenhadeiras contaminadas podem facilitar a disseminação nas propriedades.

De acordo com grande parte das descrições, a infecção por VACV geralmente ocorre em vacas em lactação e em propriedades que utilizavam ordenha manual^{2,7,8,41}. Este dado foi expressivo nos surtos da região da Zona da Mata mineira, em que 92% das propriedades com ocorrência da doença realizavam ordenha manual, no qual 80% a 100% das vacas em lactação dessas propriedades apresentaram-se doentes, em comparação com 25 e 30% das vacas acometidas em sistema de ordenha mecânica². Além disso, em outros surtos, apenas adoeceram clinicamente as vacas em lactação e os bezerros lactentes que mamavam diretamente nas vacas com lesão; vacas que não estavam sendo ordenhadas, e bezerros que eram alimentados com baldes e touros não apresentaram as lesões⁴¹. Silva et al.⁴⁸ constataram que a falta de instalações tecnológicas nas fazendas foi considerada um fator de risco para as infecções por VACV.

A maioria dos surtos de poxviroses apresentam tendência sazonal, com concentração no período de seca ou estiagem^{2,8,31,41,46,48}. Nos surtos acompanhados na Zona da Mata mineira, foram detectados a ocorrência da doença durante todo o ano, com exceção de dezembro, entretanto 72% dos casos ocorreram de julho a setembro². Há indícios que o caráter sazonal dessa poxvirose bovina é relacionado ao fato de que há maior possibilidade de traumatismo nos tetos em época secas, devido ao ressecamento da pele, que poderia aumentar o número de soluções de continuidade e abrir caminho para a infecção viral^{2,46}.

No surto estudado por Megid et al.⁴ não foi encontrado nenhum aspecto epidemiológico em comum entre as propriedades, e aparentemente a doença foi transmitida aos outros animais durante a ordenha. Este fato também foi observado em outra investigação em que 59,6% das propriedades que apresentavam a doença tinham apenas bovinos nativos em seus rebanhos⁴⁶.

Algumas hipóteses foram sugeridas para explicar a transmissão da doença entre as propriedades, como proposto por Lobato et al.², que indicaram uma provável veiculação do vírus em tarros de leite, pois apenas 26,6% das propriedades analisadas continham tanque de expansão. De oito surtos relatados em Goiás, três ocorreram em propriedades vizinhas, com até 3 km de distância, onde o leite era coletado diariamente pelo mesmo caminhão, indicando que este fator pode ser uma provável via de transmissão e disseminação do vírus³¹. Outro fator relacionado à positividade dos animais foi o destino do lixo, para um local de coleta pública, sendo provável que esta associação esteja indiretamente relacionada ao movimento dos humanos entre as fazendas⁵³. De acordo com um trabalho feito no bioma amazônico que investigou as causas de surtos de VACV na região, a principal causa de disseminação de vírus a distância foi o movimento de animais, enquanto que a migração de trabalhadores de laticínios estava envolvida na disseminação focal⁴⁴.

Manejo inadequado nas propriedades, incluindo falta de higiene e/ou de assepsia da ordenha geralmente está relacionada aos surtos^{4,8,41}. Em casos onde o aleitamento era feito por meio de baldes, os bezerros não apresentaram lesões, e, além disso, a utilização de soluções a base de iodo no tratamento das lesões dos tetos e a prática de ordenhar as vacas doentes por último, demonstraram ser práticas significativamente capazes de reduzir a disseminação da enfermidade em propriedades afetadas⁴¹. Foi observado nos surtos acompanhados por Lobato et al.² que a maioria dos funcionários realizavam a ordenha manual sem a utilização de luvas, e além disso, o risco de contaminação em humanos e animais foi mais baixo nas propriedades com ordenha mecânica, provavelmente atribuída às medidas de desinfecção dos tetos. Um trabalho observou que a prática de aplicação intravenosa de ocitocina para estimulação da

ejeção de leite foi associada a exposição ao vírus, provavelmente relacionada a reutilização de agulhas⁴⁵.

Além disso, já foram detectadas partículas infecciosas e/ou DNA do VACV no leite de vacas naturalmente⁵⁴ ou experimentalmente⁵⁵ infectadas, em leite experimentalmente infectado e submetido a tratamento térmico⁵⁶, e em produtos lácteos oriundos de animais infectados^{57,58}. Oliveira et al.⁵⁵ observaram a detecção do VACV no leite de tetas não infectadas e também a detecção do DNA e de partículas infecciosas do vírus no leite mesmo após a cicatrização das lesões, além de demonstrar que o VACV causa infecção sistêmica e crônica em bovinos.

Alguns estudos chamam a atenção para ao risco associado ao consumo de queijo, além de poder representar um risco ocupacional para os queijeiros que frequentemente manipulam coalhada de leite e queijo sem usar luvas^{57,58}. Um estudo demonstrou que queijos produzidos com leite contaminado e submetidos a maturação, embora apresentem redução na quantificação e na titulação viral no decorrer do processo, ainda podem manter partículas ativas do vírus. Este estudo também detectou DNA viral em 43 de 59 amostras de queijo produzidos de propriedades com presença e ausência do surto da VB; 11 destes queijos tinham partículas infecciosas de VACV e quatro destas amostras eram oriundas de propriedades sem casos de VB⁵⁷.

Foi realizado um experimento em que camundongos receberam leite experimentalmente contaminado por via oral, onde detectou-se DNA viral nas fezes, sangue, sistema nervoso e em outros tecidos desses animais. Além disso, alguns camundongos desenvolveram pneumonia linfo-histiocítica intersticial moderada a acentuada. Esses autores observaram que metade dos camundongos infectados apresentaram anticorpos neutralizantes 23 dias após a infecção. Estes resultados demonstram que o leite contaminado com VACV pode ser uma rota de transmissão viral em roedores, podendo pressupor que esta transmissão também ocorra em seres humanos através do consumo de leite contaminado, no qual lesões pré-formadas presentes no epitélio oral poderiam facilitar a entrada do vírus⁵⁹. Alguns autores relatam que durante os surtos da doença o leite não é descartado, e sim comercializado normalmente^{55,56}, entretanto alerta-se sobre o potencial risco para a saúde pública do consumo do leite e seus derivados.

Além do leite, há descrições de detecção do VACV nas fezes e no sangue de bovinos que poderiam propagar a doença entre indivíduos dessa espécie. Infecções experimentais de vacas por VACV resultaram na propagação viral nas fezes^{60,61}. Em um destes experimentos, dois dos seis animais infectados apresentaram DNA do VACV em amostras de sangue e fezes, começando no segundo e terceiro dia após a infecção, e durando de forma intermitente até o 36º dia após a infecção⁶⁰. Rivetti et al.⁶¹ detectaram além do DNA do VACV nas fezes por um período longo (durante 67 dias após infecção), o DNA viral também nos órgãos linfoides,

sugerindo que esta doença leva a infecção sistêmica e persistente. E o DNA viral já foi detectado, em infecções naturais, em amostras de leite, sangue e fezes de vacas leiteiras sintomáticas e assintomáticas e em amostras de sangue de outros bovinos em fazendas com e sem surto confirmado de VB⁶².

Há autores que citam que roedores silvestres são susceptíveis ao VACV e podem servir como reservatórios da doença e transmissor do vírus, principalmente pelas fezes, e são prováveis fatores de risco^{48,53,63-65}. Em experimentos, roedores expostos a fezes contaminadas se infectaram, sugerindo que a exposição às fezes bovinas pode ser considerada um fator de risco para a propagação do VACV^{63,64}. Um destes estudos experimentais demonstrou que murinos infectados experimentalmente via intranasal tiveram nas fezes partículas virais do VACV detectadas até vinte dias após a exposição ambiental, enquanto que o DNA viral foi detectado até sessenta dias após esta exposição⁶³. Em outro estudo, camundongos foram expostos a fezes de vacas experimentalmente infectadas com VACV por vinte dias, sendo detectado DNA viral nas fezes e nas amostras de sangue e partículas infecciosas do vírus nas fezes dos roedores vários dias após a exposição. Além disso, este trabalho observou anticorpos neutralizantes no soro dos animais, o que segundo os autores pode sugerir transmissão horizontal⁶⁴.

E em relação a realidade observada a campo dos roedores, já houve a detecção de VACV nas fezes e na urina dos roedores selvagens capturados em áreas florestais ao redor de fazendas de leite, no qual observou-se o VACV em 5,2% das amostras fecais e 1,8% das amostras de urina analisadas⁶⁵. Nos surtos da região da Zona da Mata mineira, foi descrito que 84% das propriedades continham roedores². Como vários estudos indicam que a exposição às fezes bovinas pode ser considerada um fator de risco para a propagação do VACV, o uso tradicional de esterco bovino como fertilizante pode estar promovendo a infecção dos roedores⁶⁴. Além disso, há relatos de correlação entre os surtos que ocorrerem na seca com o fato de que os roedores silvestres apresentam maior escassez de alimentos nesta época do ano⁴¹.

Há trabalhos que citam que mais de uma espécie de mamífero, selvagem ou doméstico, pode estar atuando como reservatório do VACV, apontando por exemplo a possível infecção por VACV em cães, indicando que eles são uma fonte potencial de exposição a VACV para humanos em áreas urbanas^{34,66}. Peres et al.³⁴ observaram a infecção subclínica em cães e gambás (*Didelphis albiventris*), e Costa et al.⁶⁶ relacionou o quati (*Nasua nasua*) como provável disseminador da doença, indicando que esses animais podem atuar como uma fonte de vírus para cães domésticos e humanos e servir como um elo entre os ambientes silvestre e urbano.

Ademais, Miranda et al.⁶⁷ indicaram a participação adicional de roedores e marsupiais no ciclo de transmissão do VACV.

Um trabalho que realizou um estudo sorológico de reservatórios do VACV em áreas com e sem relatos oficiais de surtos em bovinos e humanos no Estado de São Paulo, constatou que de 1.331 amostras de soro colhidas de diferentes espécies, 14% apresentaram títulos positivos, e destes casos os maiores índices eram em cães (22,8%), seguidos de suínos (18,2%), humanos (17%) e bovinos (15,3%). Dentre as espécies selvagens, 8,7% dos roedores selvagens e 8,2% dos gambás foram positivos. Houve neste estudo significância estatística entre os surtos da doença nos bovinos e em seres humanos e animais domésticos, mas não houve associação com resultados de testes positivos para animais selvagens⁵³.

Além disso, foi observado em um estudo que as propriedades com presença de gatos domésticos apresentam chances significativamente reduzidas de uma vaca ter anticorpos neutralizantes para o VACV⁴⁵. Diante desse fato, supõe-se que seja pelo fato que os gatos são predadores eficazes de roedores e porque sua urina pode impedir a habitação de roedores em locais como estábulos e celeiros^{45,68}. Ressalta-se que não há relatos no Brasil de gatos com a doença clínica, entretanto já foram observados gatos com sorologia positiva para VACV, inclusive gatos urbanos^{34,69}.

Grande parte dos surtos descritos no Brasil apresenta acometimento de humanos, principalmente em ordenhadores^{2,28-31,39,41}. Em relação à transmissão da doença, é descrito que alguns ordenhadores afetados pelo VACV trabalhavam em diferentes propriedades alternadamente, o que seria um fato responsável pela introdução do vírus em algumas fazendas^{2,39}. Megid et al.⁴, que analisaram um surto de VACV, observaram que pessoas foram infectadas devido ao contato com animais doentes, e estas pessoas eram as responsáveis pela disseminação viral para os outros animais.

Estudos demonstraram a ausência de títulos de anticorpos detectáveis ou poucos significativos em humanos, até mesmo vacinados, levantando questões sobre a proteção da vacina contra a varíola anos após a vacinação e reforçando a necessidade de vigilância dos poxvírus nas populações brasileiras^{4,70}. Em outros surtos, 50% dos humanos anteriormente vacinados apresentaram a doença clínica⁷¹. Contudo, foi identificado que a idade e a vacinação foram fatores de risco estatisticamente significantes em humanos na região Sudeste do Brasil⁷⁰.

Entre 2012 e 2013 foi realizado um estudo sorológico em humanos no estado de Minas Gerais, para determinar a soroprevalência dos anticorpos neutralizantes e os fatores de risco para o VACV. Foi observado que 53,1% dos indivíduos presumidos vacinados apresentaram anticorpos neutralizantes em comparação com 57,1% dos verdadeiramente vacinados

(representados por aqueles que tomaram a vacina), sendo que todos os indivíduos soropositivos não vacinados não apresentaram sinal de infecção, o que reforça a possibilidade da existência de alternativas de rotas de infecção por VACV que não sejam o contato direto com o bovino infectado⁷². Há relatos de casos com lesões semelhantes em outras pessoas da família, que viviam na mesma casa e que não tiveram contato com os animais doentes, caracterizando provável transmissão horizontal entre humanos². Por exemplo, houve o caso em que um ordenhador que apresentou lesões típicas de VACV, transmitiu a doença para o seu filho de 14 anos de idade que vivia no mesmo ambiente doméstico e a 24 km do local onde o pai teve contato com o bovino infectado⁷³. Além disso, há uma ocorrência de uma infecção vulvar em uma mulher que teve relação sexual com o parceiro após este ter lesões nas mãos típicas de poxvirose, indicando que a transmissão de humano para humano pode ocorrer em condições naturais⁷⁴.

Um estudo com pessoas no Estado do Rio de Janeiro analisou dois grupos: o primeiro era composto por 136 profissionais de diferentes instituições educacionais e de pesquisa que manipulava animais domésticos e selvagens, durante o período de 2008 a 2009; e o segundo era composto por 41 pacientes de oito municípios com notificação de casos suspeitos de infecção por poxvírus, durante o período de 1999 a 2011. Foi observado que 8,8% dos profissionais e 68,3% dos pacientes apresentaram sororeatividade, principalmente ao vírus Cantagalo, sugerindo que além dos ordenhadores, profissionais que manipulam animais também têm que compor o grupo de risco para as poxviroses, sendo necessário incluir essas pessoas como susceptíveis ocupacionais⁷⁵.

Um estudo recente analisou fatores de risco associado ao VACV em comunidades rurais da Colômbia. O vírus foi identificado em trabalhadores rurais entre 2014 e 2015, e foi observado que 52% dos trabalhadores rurais tinham anticorpos contra o vírus, mas que excluindo pessoas que teriam tomado a vacina na época da vacinação, esse percentual reduziu para 31%. Os principais fatores de risco para os humanos encontrados naquela região foram o município, a idade avançada, a presença da cicatriz da vacinação, o tempo de trabalho a campo e a presença de animais com lesões por VACV⁷⁶.

c) Patogenia e alterações macroscópicas em bovinos

Em bovinos, o VACV provoca lesões macroscópicas que incluem pápulas, vesículas, pústulas, eritema, edema, erosões, úlceras e crostas, usualmente nos tetos, úbere, boca, língua, focinho e casco^{1,8,31}. Alguns autores citam que as lesões são mais facilmente observadas em áreas glabras¹⁷ e geralmente são ulcerativas e nodulares, com cerca de dois a seis milímetros de

diâmetro⁷. Em 27 casos naturais de infecção por VACV, foram observados que as lesões macroscópicas predominantes eram úlceras focais ou multifocais moderadas, com menor frequência de pústulas, pápulas ou cicatrizes, e localizadas na gengiva, região periodontal, teto, região sublingual, lábio e língua. Também foi relatado uma vaca com lesões nos tetos e na vulva^{18,19}.

Em condições experimentais, as lesões começam entre o terceiro e quinto dia após a inoculação⁷⁷, e a evolução da enfermidade, em média dura três a quatro semanas^{2,6,8,78}. Este vírus não causa imunidade permanente nos animais infectados, visto que quando o VACV é reinoculado em bovinos previamente infectados, esses animais apresentam novamente as lesões, porém com manifestações mais brandas e rápidas, em comparação às observadas durante a primeira infecção⁷⁷.

A localização e a gravidade das lesões dependem da imunidade e da idade do animal acometido. Em animais adultos, as alterações geralmente ocorrem em vacas em lactação e em propriedades que utilizam ordenha manual, acometendo principalmente os tetos e o úbere^{2,7,8,41}. Em bezerros lactentes, as lesões geralmente ocorrem na comissura labial e no focinho⁴¹, sendo também relatados na boca e língua³⁰. Isso se deve pois, muitas vezes, os bezerros se infectam ao mamar em vacas que possuem lesões nos tetos. Em um surto em Minas Gerais, foram observadas lesões orais em bezerros em 21% das propriedades. Acredita-se que esse percentual poderia ter sido maior, pois nem sempre o proprietário realiza um exame detalhado da boca que possibilite a identificação de lesões².

Um estudo experimental observou manifestações clínicas típicas de VB com curso clínico médio de dez dias em vacas adultas. As lesões foram localizadas e iniciaram com pápulas dois dias após a infecção, evoluindo para vesículas, pústulas, úlceras e, por fim, para crostas e tecidos cicatriciais⁶⁰. Em outro estudo experimental, uma vaca permaneceu com úlceras no teto por 32 dias e alguns animais desenvolveram úlceras orais entre o sétimo e 22º dia após a infecção⁷⁷.

Em um surto natural de poxvirose no Estado do Rio de Janeiro, 64,7% das propriedades apresentaram vacas com lesões somente nos tetos, enquanto que lesões simultâneas em tetos e úberes foram observadas em 35,3% das propriedades⁴¹. Em outros surtos de VB, foi descrito que as lesões eram localizadas principalmente nos tetos e, eventualmente, no focinho das vacas. Essas lesões iniciavam como vesículas, com dois a sete milímetros, ou como pápulas doloridas e coalescentes, com três a oito milímetros, que progrediam para úlceras crostosas, variando de cinco a 25 milímetros³¹.

Estas lesões, por causarem dor intensa na região da glândula mamária, principalmente nos tetos, fazem com que os animais não permitam a ordenha completa, o que leva à diminuição da produção de leite e a interrupção da lactação em alguns casos, podendo ocasionar mastite secundária^{2,7,10,31,32,41}. Foi descrito em um surto que 68% das fazendas infectadas registraram queda na produção leiteira, sendo que em 66% delas, a queda variou de 30 a 50%². Há relatos também de vacas que apresentaram necrose extensa da mama devido a infecções secundárias, inclusive com perda dos tetos^{30,41}.

Aparentemente as vacas apresentam maior sensibilidade dolorosa na fase inicial das lesões, quando há formação de vesículas⁴¹. Em estudo experimental, vacas que já haviam sido inoculadas com o VACV, foram posteriormente imunossuprimidas e foi observado que desde o início da imunossupressão todas as vacas apresentaram mastite clínica e subclínica e oito dias após a imunossupressão, o leite apresentava-se amarelado e pastoso, havendo queda acentuada na produção de leite. Também foi observado aumento do número de células somáticas durante a infecção, o que sugere que a mastite possa ser causada por ação direta do vírus concomitante com bactérias⁷⁷.

Animais experimentalmente infectados não apresentam febre durante a infecção, nem mesmo com a reinoculação ou imunossupressão. Entretanto, os linfonodos mamários das vacas apresentaram-se tumefeitos a partir do 18º dia de infecção, aparentemente em associação à mastite⁷⁷.

Sobre a patogenia da VB, acredita-se que a infecção intradérmica do VACV nas tetas das vacas começa com a penetração do vírus por meio de uma solução de continuidade, até mesmo microscópica, que permite a passagem pela barreira da pele. Lá ocorre a multiplicação viral primária, que leva a formação das lesões vesiculares e exantemáticas. Após a replicação no local de entrada e penetração da derme, as partículas virais podem se espalhar rapidamente através dos vasos sanguíneos e linfáticos, atingindo tecidos linfoides, principalmente os linfonodos retromamários e mesentéricos e do íleo, mas também atingem baço, fígado, amígdalas e outros linfonodos. Um dos tecidos linfoides alcançados são as placas de Peyer, que a partir delas o vírus seria excretado nas fezes⁷⁹.

d) Lesões clínicas em seres humanos

Esta doença de caráter zoonótico frequentemente afeta ordenhadores que mantêm contato próximo com bovinos infectados^{2,29,30,39}. No homem, a infecção pelo VACV causa lesões cutâneas dolorosas que incluem inchaços nodulares, pápulas, pústulas, úlceras e crostas, principalmente nas mãos, mas também já foram descritas no vestíbulo nasal, áreas periorbitárias

e intra-orbitárias, face, pernas, braços, escroto, boca e vulva⁸⁰. Ocasionalmente é observada linfadenopatia, dor de cabeça e febre^{2,3,4,8,29,71}, sendo também relatados mialgia, anorexia, desidratação, artralgia, náusea, sudorese e infecções bacterianas secundárias⁸⁰. Em um grande surto no Estado do Rio de Janeiro, 97,3% dos humanos afetados pela poxvirose tiveram febre e linfadenopatia axilar⁴¹. O tempo médio entre o primeiro contato com a lesão na teta durante a ordenha até o início do aparecimento das lesões nas mãos é de uma a duas semanas⁴¹, mas pode alcançar quatro semanas⁹.

Foi reportado um surto em Minas Gerais com acometimento de 12 trabalhadores rurais que não haviam sido vacinados previamente contra varíola. Essas pessoas foram hospitalizadas com febre alta, linfadenopatia, prostração e lesões vesiculares e pustulares dolorosas nas mãos, braços, rostos e/ou joelhos. Todos estes trabalhadores adoeceram após ordenharem vacas com lesões nos tetos, e as primeiras lesões ocorreram nas mãos. Dos 12 trabalhadores, três tiveram complicações graves, incluindo convulsão, vômitos, diarreia e confusão mental³². Comumente, esses trabalhadores com lesões doloridas nas mãos e com indisposição e mal-estar geral precisam se afastar do trabalho por alguns dias, o que acarreta perdas laborais e econômicas por inabilidade destes trabalhadores de exercerem suas funções^{3,41}. Assim, a VB é considerada um problema de saúde pública no Brasil, devido ao seu caráter ocupacional, à alta frequência de transmissão e ao tratamento humano muitas vezes não ser o mais adequado⁷¹.

e) Lesões clínicas em outros animais

Além do homem e do bovino, o VACV foi relatado como causa de doença cutânea em equinos em um surto natural no Sul do Brasil. Neste caso, éguas e potros estabulados apresentaram pápulas e vesículas que progrediram para lesões proliferativas e exsudativas no focinho, narinas externas e lábios externos e internos, que eventualmente sangravam e progrediam para crostas e cicatrizes úmidas. Os sinais clínicos duraram entre seis a 12 dias e os animais se recuperaram progressivamente após este período³³. A partir deste estudo, foi realizado um trabalho experimental em equinos com inoculação dessas estirpes isoladas naturalmente e foi observado baixa intensidade e frequência de lesões nos locais inoculados⁸¹, quando comparadas ao surto natural de VACV em equinos³³. Apesar dos equinos serem susceptíveis a infecção pelo VACV, estes animais possivelmente apresentam baixo potencial de manutenção e de transmissão do vírus para outras espécies⁸¹. Esse vírus da infecção natural em equinos também foi inoculado em coelhos, e os animais inoculados apresentaram lesões cutâneas locais intensas como hiperemia, pápulas, vesículas, pústulas e úlceras, além de pneumonia intersticial fibrosante, demonstrando que os coelhos em condições experimentais,

diferentes dos equinos⁸¹, desenvolvem doença da pele acentuada acompanhada de sinais sistêmicos^{82,83}.

f) Diagnóstico

O diagnóstico em bovinos geralmente é realizado associando a clínica do animal, com os achados macroscópico e microscópicos das lesões, e confirmado com testes sorológicos associado ao isolamento e identificação viral ou testes moleculares.

Para auxílio das análises clínicas, podem ser realizados exames hematológicos. As alterações hematológicas observadas em vacas experimentalmente infectadas com o VACV incluíram leucocitose, neutrofilia, hiperproteinemia e hiperglobulinemia e, quando imunossuprimidos, notou-se leucocitose acentuada com neutrofilia e linfopenia, e aumento de enzimas hepáticas (AST e ALT)⁷⁷.

Histologicamente, as alterações descritas em surtos naturais foram dermatite perivascular superficial, com infiltrado de linfócitos, plasmócitos, neutrófilos e macrófagos e, na epiderme foram observados acantose, espongiose, hiperqueratose ortoqueratótica ou paraqueratótica, hipergranulose, úlceras e corpúsculos de inclusão eosinofílicos intracitoplasmáticos com três a oito micrômetros de diâmetro. Em um estudo de casos naturais da doença, os corpúsculos de inclusão não foram encontrados em algumas lesões com curso clínico superior a 15-20 dias³¹.

Entretanto, para diagnóstico definitivo, os principais métodos de diagnóstico de infecção por VACV em medicina veterinária incluem a detecção de anticorpos^{2,30,32,41,50}, isolamento viral^{20,29,32,41,78}, PCR (reação em cadeia da polimerase)^{2,20,29,30-32,41,50,78}, caracterização da morfologia em membrana corioalantóide de embrião de galinha^{2,7,8}, microscopia eletrônica^{7,8,20,41,78} e inoculação em camundongos para análise da virulência^{29,32}.

A técnica sorológica é um método que permite a detecção de anticorpos no soro, no qual permite não só a detecção, mas a quantificação dos anticorpos presentes no soro. Dentre essa técnica existe a soroneutralização (SN), que é um teste utilizado para detectar anticorpos que possuem a capacidade de neutralizar a infectividade do vírus, e que pode ser realizado para a obtenção de resultado qualitativo (positivo/negativo) e quantitativo (analisa a titulação de anticorpos)⁸⁴. Dependendo da técnica, considera títulos de anticorpos como a recíproca da maior diluição de soro capaz de inibir o efeito^{53, 82-84}, mas há técnicas que consideram como positivo, em relação ao teste de neutralização em placa, títulos de anticorpos somente acima de 1:10^{2,41}, 1:20³⁰ ou 1/40 unidades neutralizantes/mL³².

O PCR possibilita a detecção rápida, sensível e econômica de novos isolados do VACV, diretamente de amostras clínicas sem necessidade de isolamento do vírus⁸⁵. Quando utilizado o PCR como método de diagnóstico, geralmente os genes isolados foram hemaglutinina (HA) (gene A56R)^{2,7,29,30,50,85}, C11R^{30,32} e A26L²⁹. Abrahão et al.³² isolaram o vírus através de células BSC-40, com identificação do gene A56R e A26L. Há estudos em relação ao gene *ati*, no qual as cepas brasileiras apresentam polimorfismo genético dentro deste gene⁸⁶. Ressalta-se que foi demonstrado que algumas cepas do VACV isolado no Brasil têm apresentado deleção do gene A56R, pouca ou nenhuma deleção no gene *ati*, e baixa virulência em camundongos²⁹, o que pode interferir no meio para diagnóstico viral.

O PCR *semi-nested*, um método rápido, sensível e de baixo custo, aparenta ser uma alternativa para o diagnóstico viral em bovinos. Esse método foi altamente sensível para a detecção de DNA do VACV em sangue e excreções de camundongos. Segundo os autores, o PCR *semi-nested* poderá ser utilizado na triagem inicial de orthopoxvíroses e como método de diagnóstico em laboratório de rotina⁸⁷.

Alguns estudos compararam alguns dos métodos de diagnóstico disponíveis para infecção por VACV. Quando comparado o RT-PCR (reação em cadeia da polimerase da transcrição reversa), o isolamento viral, a microscopia eletrônica e o teste de neutralização, foram observados que as determinações de anticorpos, obtidas a partir do teste de neutralização, foram responsáveis pela maioria dos diagnósticos, no quais diluições acima de 1/10 foram consideradas positivas⁷⁸. Outro trabalho comparou os testes sorológicos com o isolamento viral e o PCR e, como resultado, observou-se que o exame sorológico aparenta ser um método bastante adequado para o diagnóstico, pois em animais nunca vacinados contra o poxvírus, o método foi capaz de detectar anticorpos neutralizantes que persistem por vários meses, ao contrário do isolamento e do PCR que resultam negativos após as crostas desaparecem⁴¹.

Já Matos⁸⁸ comparou dois testes, a imunoperoxidase em monocamada celular e a SN por redução do número de placas, e notou que ambas apresentaram elevados níveis de concordância nos resultados. No entanto, a imunoperoxidase em monocamada celular apresentou algumas vantagens como a não necessidade de inativação do soro teste, menor período de incubação, menor custo, maior rapidez de execução e leitura, e possibilidade de armazenamento de placas preparadas com o antígeno.

Em relação a melhor amostra que deve ser colhida e enviada para diagnóstico, foi constatado que amostras colhidas por suabes das lesões (91,6%) apresentaram o maior índice de confirmação por análises moleculares, seguidas de tecido de crostas (63,3%) e amostras de soro (30,5%)⁴⁶. Mas já foram diagnosticados o VACV, ou o seu DNA, em fezes e leite de vacas

infectadas naturalmente⁶². Ressalta-se também a importância do cuidado com o transporte das amostras, visto que o envio inadequado dos espécimes clínicos ao laboratório pode levar a resultados negativos pela perda de títulos de vírus e degradação do DNA³⁰.

2.2 Gênero *Parapoxvirus*

Os parapoxvírus são vírus epiteliotrópicos identificados em várias regiões do mundo, que levam a lesões localizadas de pele, como vesículas e erupções, em mamíferos domésticos e selvagens²¹. Acredita-se que as infecções por parapoxvírus ocorram em locais com lesão cutânea prévia⁸⁹.

Os parapoxvírus são ovoides, com 220-300 x 140-170 nm, e apresentam um filamento de superfície e o DNA com tamanho 130-150 kbp²⁵. As proteínas tubulares organizadas de forma cruzada na superfície do vírion é o que difere os parapoxvírus de outros gêneros de poxvírus⁸⁴.

O gênero *Parapoxvirus* da família *Poxviridae* compreende o vírus da *Orf* (vírus do ectima contagioso), vírus da pseudovariola (*Pseudocowpox* vírus - PCPV) (popularmente denominado “nódulo do ordenhador”), vírus da estomatite papilar bovina (BPSV) e o parapoxvírus do veado vermelho¹⁵. Entre os mais importantes do gênero e que afetam bovinos, observa-se o BPSV, mais descrito em bezerros, e o PCPV, geralmente observado em úberes de vacas, todos zoonóticos^{21,89}. Além disso, o vírus da *Orf* acomete pequenos ruminantes, entretanto um parapoxvirus “*Orf* virus-like” foi relatado associado ao VACV em um surto afetando bovinos no Estado de Goiás em 2011¹⁰.

Há consideravelmente menos informações disponíveis na literatura acerca das infecções causadas por parapoxvírus em comparação aos estudos feitos com orthopoxvírus, principalmente relacionados à epidemiologia. Além disso, há também menos casos relatados por parapoxvírus em bovinos do que em ovinos, que pode ser explicado pelo fato de que as lesões são geralmente leves em bovinos e normalmente apresentam baixo impacto sobre o bem-estar e a produção dos animais⁸⁹.

Há relatos de diagnóstico de infecções bovinas por parapoxvírus no Brasil, entretanto estes casos apresentam-se frequentemente associados a outros vírus. Por exemplo, em um estudo que avaliou nove amostras positivas para parapoxviroses em Mato Grosso, três destas eram positivas também para *bluetongue* vírus, cinco para herpesvírus bovino tipo 1, e uma para todos os três agentes⁹⁰.

As lesões causadas pelos PCPV e BPSV são clinicamente indistinguíveis e cursam com lesões vesiculares e pustulares, que podem evoluir para crostas e que geralmente ocorrem no

focinho, cavidade oral e tetos de bovinos^{12,89}. Em casos de coinfeção natural por PCPV e BPSV diagnosticados recentemente no Distrito Federal, em uma propriedade as lesões dos bovinos consistiram de pápulas com crostas multifocais a coalescentes acentuadas nos tetos e úbere, e em um desses animais havia lesões papulares e crostosas adicionais na orelha; e na outra propriedade, um único animal apresentou úlcera focalmente extensa única na língua¹⁸.

Em relação ao poder zoonótico dos parapoxvírus, as lesões em seres humanos são geralmente lentas e tendem a ser prolongadas, mas autolimitantes, o que faz com que muitas dessas pessoas não procurem atendimento médico em tempo hábil, apesar de que infecções graves podem ocorrer em indivíduos com outras alterações associadas. Contudo, os médicos devem considerar a infecção por parapoxvírus em indivíduos que tiveram contato com bovinos, cabras e ovelhas, que quando associadas a informações adicionais, como uma lesão simultânea ou próxima ao tempo de exposição animal, pode auxiliar no diagnóstico presuntivo desta infecção viral⁹¹.

Uma investigação recente demonstrou que, assim como o VACV já foi encontrado em amostras de leite, o DNA dos parapoxvírus também pode ser identificado no leite de vacas em propriedades que apresentam animais com lesões vesiculares, o que indica que os poxvírus podem estar presentes no leite e potencialmente contaminando produtos lácteos⁹².

2.2.1 Estomatite papular bovina

A estomatite papular bovina é uma doença causada por um vírus do gênero *Parapoxvirus* que afeta bovinos de todas as idades, especialmente animais jovens com menos de dois anos de idade.

O BPSV, que causa lesões exantematosas e papulares no focinho, gengivas e lábios⁹³, apresenta período de incubação de três a cinco dias, podendo alcançar 100% de morbidade e com período de recuperação total de quatro a sete dias^{1,93}. Este vírus apresenta latência e é excretado pelas secreções nasais e orais, e provavelmente a transmissão ocorre por contato direto ou indireto; principalmente através de lesões na pele^{15,93}.

a) Histórico da estomatite papular bovina no Brasil

A primeira publicação do vírus foi em 2005, no qual foi relatado um caso de coinfeção por VACV e PCPV em bovinos e humanos no Estado de Minas Gerais⁴⁰. Em 2010 foi descrito um surto de doença vesicular no Estado de Goiás que afetaram quatro pequenas propriedades rurais de produção leiteira, e de 43 vacas, vinte apresentaram os sinais clínicos da infecção por BPSV⁹⁴. Surtos acometendo 13 rebanhos de bovinos, em 2012, no Estado de Rondônia, foram

identificados como estomatite papular bovina em uma propriedade e pseudovariola em outras três¹².

Em 2015, foram relatados dois surtos do PCPV e BSPV no Estado de Mato Grosso^{95,96}. Um surto de doença vesicular foi relatado em bezerros desmamados com cinco a 12 meses de idade, e de nove amostras positivas para *Parapoxvirus*, seis bovinos estavam infectados pelo PCPV e uma pelo BPSV⁹⁵. E no outro surto, 21 bovinos machos apresentavam vesículas rompidas na língua, hipertermia e secreção nasal mucopurulenta, havendo um animal positivo para BPSV e oito animais para PCPV⁹⁶. Entre 2015 a 2016 foram observados 17 surtos de BPSV nos estados de Mato Grosso, Amazonas, Roraima, Minas Gerais, Bahia e São Paulo e seis desses surtos eram casos de coinfeção (associado ao PCPV e/ou ao VACV)¹¹. Também foram descritos outros surtos de estomatite papular bovina⁹⁷ e de coinfeção com pseudovariola no Centro-Oeste do Brasil^{18,19,98}.

b) Epidemiologia da estomatite papular bovina

Poucos são as informações acerca da epidemiologia da doença, e raros são os relatos que apresentam dados do BPSV sem a associação com outro vírus. Isto provavelmente ocorre devido a situações de estresse ou outras situações que deixem os bovinos imunocomprometidos e que aparentam predispor a enfermidade⁹³.

De acordo com uma descrição de estomatite papular bovina associada à pseudovariola no Norte do Brasil, os autores acreditam que são fatores de risco para disseminação dos agentes: a livre circulação entre bovinos de algumas propriedades, a idade dos animais que geralmente é inferior a seis meses, o manejo de animais adquiridos de diferentes propriedades em conjunto, a manipulação de animais com e sem lesões ao mesmo tempo e a alimentação grosseira¹². Alonso et al.¹⁹ encontraram lesões em bovinos por BSPV principalmente de fazendas de gado de corte, seguidos das propriedades mistas e por último em propriedades leiteiras.

Em um estudo realizado no Japão, observou-se que as taxas de anticorpos em bovinos chegam a 33,3%, entretanto esse índice foi significativamente maior em bovinos leiteiros criados em pastagens compartilhadas (chegando a 82,4%), sugerindo que o vírus pode persistir clinicamente ou o vírus apresenta a capacidade de infectar animais susceptíveis por ser mantida por longo período⁹⁹.

Aparentemente grande parte dos casos clínicos ocorrem na primavera ou no início do verão⁹³, no período da seca¹⁹, e não foram encontrados DNA do BPSV em amostras ambientais, como forragem comercial, lixo e conteúdo de armazém metálico¹⁰⁰.

c) Lesões clínicas em bovinos

Macroscopicamente, a estomatite papular se caracteriza inicialmente por apresentar máculas eritematosas, que variam de 0,2 a dois centímetros de diâmetro, progredindo para pápulas, que são posteriormente cobertas por crostas, com cerca de 0,5 a um centímetro de diâmetro, mas que podem coalescer e formar úlceras maiores. As lesões são inicialmente observadas na margem inferior das narinas e, ocasionalmente, no palato ou superfície interna dos lábios, mas podem ser encontradas também no focinho, gengiva, cavidade oral e língua e, com menor frequência, no esôfago, pré-estômagos e tetos de vacas em lactação^{16,17,101}. Em vacas em lactação, as lesões podem ser observadas na pele do úbere^{1,15}, com sinais clínicos geralmente brandos¹⁶. Geralmente apresentam o curso clínico entre quatro e seis dias¹⁰¹, mas há relatos de recuperação espontânea em até 14 dias¹⁰².

Em surtos naturais por estomatite papular bovina, já foram descritos surtos somente com lesões orais, consistindo de cicatrizes na língua, gengiva e lábios, e pápulas ulceradas na gengiva e na língua¹⁸. Entretanto há surtos que descrevem mais lesões nos tetos, como pápulas avermelhadas e dolorosas com três a dez milímetros de diâmetro, além de lesões proliferativas e descamativas que progrediam para úlceras e erosões, e que afetavam três ou mais tetos de cada vaca. Alguns animais apresentaram secreções serosas nas lesões e, além disso, as vacas não permitiam a completa ordenha, acarretando em mastite secundária. Neste surto, as lesões apresentaram curso clínico de sete a 12 dias, regredindo aproximadamente 12 a 16 dias após o início dos sinais clínicos⁹⁴.

Foi relatado um surto de estomatite papular bovina em bezerros com duas a seis semanas em Israel. Segundo os autores, nos casos agudos da doença, as lesões cutâneas consistiam inicialmente de máculas, com dois a quatro milímetros de diâmetro, no focinho, na boca e no interior das narinas. No focinho, essas lesões progrediram para pápulas arredondadas, vermelho escuro e elevadas, que se expandiram, apresentando centro deprimido e crostas. Na boca, as ulcerações foram vistas em todas a mucosa, com exceção do dorso da língua. Três destes animais apresentaram lesão crônica, sendo observado estomatite proliferativa e necrótica, sialorreia, apetite reduzido, temperaturas corporais elevadas e intensa hiperqueratose em torno da boca e ânus, e na cauda. Contudo, este estudo demonstrou a existência da forma aguda e crônica dessa enfermidade, que segundo os autores pode ser explicada por variações na relação hospedeiro-vírus, podendo refletir a falta de competência imunológica e incapacidade do hospedeiro em superar a infecção aguda¹⁰².

Esta doença pode passar despercebida em algumas situações, especialmente quando as lesões e o quadro clínico são discretos, conforme observado em um surto que dois bezerros

apresentaram lesões internas e brandas nos lábios e gengivas. Esses animais não apresentaram variação significativa do apetite, da temperatura corporal ou aumento significativo dos linfonodos superficiais¹⁰⁰.

Além disso, a estomatite papular bovina aparenta acometer principalmente animais imunossuprimidos, como por exemplo em infecções prévias pelo vírus da diarreia viral bovina^{17,101}. O estresse ou situações que causem imunossupressão aparentam precipitar a enfermidade⁹³. Em 2015, por exemplo, foi relatado uma coinfeção causada pelo PCPV e pelo BPSV que ocorreu em bezerros desmamados com cinco a 12 meses de idade com lesões na mucosa oral e nasal durante sete a dez dias. Os animais apresentaram lesões vesiculares e ulcerativas arredondadas, que mediam de meio a quatro centímetros de diâmetro, com bordos definidos, que por vezes encontrava-se em fase de cicatrização com crostas; e lesões papulares arredondadas de meio centímetro de diâmetro, com bordos elevados e coloração amarela a levemente avermelhada⁹⁵.

d) Lesões clínicas em seres humanos

Em humanos, a estomatite papular bovina é uma doença zoonótica caracterizada por pápulas nas mãos e nos braços^{16,17}, lesões comparáveis com as dos “nódulos dos ordenhadores”, causado pelo PCPV¹⁵. Em alguns surtos naturais os ordenhadores apresentaram lesões nas mãos alguns dias após ordenharem vacas afetadas, e as lesões começam com pápulas dolorosas que evoluíram para lesões ulcerativas e com crostas por quatro a sete dias⁹⁴.

Houve um surto há mais de trinta anos relatado em oito pessoas de uma escola de veterinária nos Estados Unidos, com lesões cutâneas de estomatite papular bovina. Inicialmente o surto ocorreu em cinco pessoas que manejaram um touro, que exigiu a colocação manual de um tubo de alimentação na boca, e os outros três casos ocorreram nos próximos 24 meses, em pessoas que manipularam bovinos sem lesões aparentes da estomatite papular bovina. As lesões eram indolores e não pruriginosas, entretanto uma pessoa se queixou de dor e inchaço associado a mordida¹⁰³. Em um surto observado no Distrito Federal, um veterinário que também manipulou a boca de um bovino com lesão cicatricial na gengiva, apresentou pústulas doloridas na mão, linfadenite regional, febre e mal-estar geral, dois dias após o procedimento^{18,19}. Portanto, o BSPV é um vírus zoonótico de caráter ocupacional, no qual sempre deve se ter cuidado ao manipular a boca ou a pele infectada de um ruminante.

e) Diagnóstico

O diagnóstico é feito com base no curso clínico brando associado aos aspectos macroscópico e histológico das lesões, e confirmado com o isolamento e/ou identificação molecular do vírus¹⁶. Arruda et al.⁹⁵, por exemplo, citam que a confirmação do diagnóstico só é possível devido à combinação do resultado laboratorial, da inspeção clínica, das características morfológicas das lesões e dos aspectos epidemiológicos.

As lesões microscópicas nos bovinos são típicas de outras infecções por poxvírus^{15,101} e consistem de hiperplasia de epiderme, com áreas focais de degeneração e necrose, núcleos picnóticos e, ocasionalmente, inclusões eosinofílicas intracitoplasmáticas^{16,101}, além de espongiase⁹⁴. Há autores que observaram as inclusões nas células epiteliais intactas adjacentes aos focos necróticos¹⁰², e outros que observaram numerosas inclusões nas regiões de acantose ou necrose⁹⁴. Há também relatos de necrose na derme, com infiltrado perivascular de linfócitos, neutrófilos e macrófagos^{94,102}.

Contudo, a técnica laboratorial de eleição para diagnóstico do BPSV é a microscopia eletrônica, sendo os parapoxvírus ultraestruturalmente distintos dos outros poxvírus quando vistos por este método^{15,93}. Na microscopia eletrônica são observadas partículas ovóides, com aproximadamente 320 nm por 190 nm e com padrão entrecruzado típico dos filamentos em suas superfícies¹⁰⁰. Mas também podem ser utilizados para diagnóstico de BPSV e de PCPV, o isolamento em cultivo celular, que analisa a produção do efeito citopático; o PCR, que utiliza iniciadores que tem como função amplificar fragmentos do gene *B2L*; e a análise filogenética¹². Contudo, grande parte dos trabalhos citados realizaram o diagnóstico definitivo de estomatite papular bovina utilizando o PCR, com detecção e sequenciamento do gene *B2L*^{94,98,100}.

Ressalta-se que nos casos do BPSV os testes sorológicos não são utilizados e que o BPSV não se replica em ovos embrionados de galinha ou em animais de laboratório. Entretanto esse vírus pode ser propagado em cultivos celulares de origem humana, bovina e ovina. Além disso, a amostra ideal coletada para diagnóstico deve ser, de preferência, obtida das crostas ou de raspados das lesões⁹³.

2.2.2 Pseudovariola bovina

A pseudovariola, também conhecida como *pseudocowpox*, é uma doença zoonótica causada pelo PCPV, do gênero *Parapoxvirus* e afeta principalmente bovinos leiteiros¹⁵. Há cerca de 20 anos, pensava-se que o BSPV era o mesmo que causava a pseudovariola bovina, pois ambos apresentam formação de pápulas e crostas na pele dos tetos e glândula mamária¹. Entretanto, hoje sabe-se que são vírus diferentes, e que o PCPV causa uma doença usualmente branda, e que apresenta distribuição mundial⁸⁴.

O curso clínico da infecção atinge até seis semanas¹⁵ e a infecção não confere imunidade permanente do animal¹⁶. A pseudovariola apresenta morbidade próxima de 100%; entretanto com apenas 5 a 15% das vacas afetadas de uma vez¹⁵.

a) Histórico da pseudovariola no Brasil

Nos últimos dez anos foram observados alguns surtos da doença no Brasil. Em 2011, uma propriedade no Rio Grande do Sul com 17 bovinos mestiços de seis a 48 meses de idade, 14 animais apresentaram lesões, sem acometimento humano¹⁰⁴. Também em 2011, foram relatados surtos de doenças vesiculares no Pará e Amazonas, onde bezerros com lesões na boca, por vezes associadas a diarreia, foram diagnosticados com PCPV associado ao vírus da diarreia viral bovina do tipo 1²¹. Ressalta-se que nesta mesma região do Pará, foi diagnosticado em 2010 um surto de VB³⁰. E em 2012 houve uma descrição de um surto de doença vesicular em bovinos no Estado de Rondônia, sendo que em treze rebanhos acometidos, três propriedades foram diagnosticadas com infecção bovina por PCPV¹².

Um estudo retrospectivo analisou 51 propriedades que tiveram doenças vesiculares oriundas dos Estados de Minas Gerais, Mato Grosso e Paraná, e que submeteram amostras para um laboratório entre 2009 a 2014. Nestas propriedades cinco foram positivas para pseudovariola bovina¹⁰⁵. Em 2014 foi relatado a ocorrência da pseudovariola em Goiás¹⁰⁶ e como já relatado anteriormente, em 2015 no Estado de Mato Grosso foram relatados surtos de coinfeção de BPSV e PCPV^{95,96}. Além disso, entre 2015 e 2016 foram diagnosticados 22 surtos de PCPV em diversos estados do país, incluindo Amazonas, Tocantins, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Roraima, Bahia, Minas Gerais, Maranhão, Pará e São Paulo, e nove desses surtos eram casos de coinfeção com outros poxvírus (VACV e/ou BPSV)¹¹. E entre 2015 a 2018, no Distrito Federal e entorno, um estudo observou nove casos de pseudovariola em bovino, sendo quatro casos identificados na linha de inspeção em um frigorífico oriundos de uma propriedade do entorno do DF^{18,19}.

Além do diagnóstico em bovinos, em 2016, no Estado de São Paulo, o PCPV também foi isolado em búfalos. Sessenta búfalos com menos de seis meses de idade desenvolveram úlceras e descamação generalizada no epitélio da língua¹⁰⁷. Em países vizinhos ao Brasil, a infecção por PCPV também já foi confirmada em ordenhadores e bovinos enfermos na Colômbia⁵².

b) Epidemiologia do PCPV

O vírus geralmente é introduzido nos rebanhos através de animais infectados, havendo transmissão por contato direto e indireto, e com disseminação lenta entre os animais⁹³. A transmissão ocorre principalmente quando há a amamentação pelos bezerros, por insetos, pelas mãos dos ordenhadores ou pelos equipamentos de ordenha⁹³, mas aparentemente é necessário que a pele esteja lesionada^{15,108}.

A infecção por PCPV é distribuída mundialmente, e apesar de afetar principalmente vacas leiteiras, esta doença apresenta pouca importância sanitária e econômica na maioria dos países⁹³, no entanto, em algumas regiões leiteiras, a infecção pode assumir alguma importância econômica quando associada a condições precárias de higiene¹⁰⁴. Ressalta-se que as condições de higiene e o manejo da ordenha, além de fatores ambientais susceptíveis de causar danos ao epitélio da teta, aparentam ser cruciais na disseminação do PCPV^{93,108}. Em um trabalho mais atual, a doença ocorreu mais comumente em propriedades de bovinos de aptidão exclusiva de corte, seguida de fazendas leiteiras e por propriedades de criações mistas, afetando similarmente machos e fêmeas¹⁹.

Em surtos que ocorreram na Inglaterra, foi relatado que o *pseudocowpox* apresentou maior incidência em propriedades de subsistência, principalmente na época do outono e da primavera. Acredita-se que o início da pseudovariola possa estar relacionado ao trauma do epitélio da teta pois em uma propriedade as estradas de acesso aos campos se tornaram excessivamente lamacentas e na outra propriedade foi relatado pastoreio de couve inteiras¹⁰⁸. Em um surto no Brasil, somente os bezerros que estavam em um grupo de pastagem semi-extensiva apresentaram as lesões, e o intervalo entre a aquisição do último animal com o início dos sinais clínicos foram de quatro meses¹⁰⁴. Adicionalmente, Alonso et al.¹⁹ observaram que dos nove casos de pseudocowpox, sete ocorreram na estação da seca. No caso incomum relatado de PVPC causando vulvovaginite pustular, os autores acreditam que a transmissão do vírus foi realizada por meio de equipamentos contaminados, em vez de transmissão entre animais. Uma escova mecânica verticalmente suspensa utilizada nas vacas foi sugerida como o fômite, o que explicaria a ampla disseminação da pseudovariola dentro do rebanho e a localização incomum da infecção¹⁰⁹.

Os humanos aparentam contribuir com a transmissão da doença, pois em uma propriedade sem históricos de casos de infecção, o rebanho foi infectado devido à presença de um ordenhador de outras regiões infectadas, que apresentava lesões nodulares em suas mãos¹⁰⁸. Por fim, a pseudovariola é uma doença ocupacional que afeta veterinários e ordenhadores, mas há relatos também de pessoas infectadas através da manipulação de carne fresca contaminada¹¹⁰.

c) Lesões clínicas em bovinos

Geralmente as lesões ocorrem nos tetos e úbere e, ocasionalmente, no períneo, coxas, escroto, focinho e junção mucocutânea oral. Usualmente essas alterações iniciam como máculas e pápulas eritematosas, que raramente ulceram^{15,104}. Em um surto natural no Rio Grande do Sul, os bezerros desenvolveram em torno do focinho e ao longo da junção mucocutânea pápulas e máculas que avançaram para vesículas, pústulas e crostas, que frequentemente sangraram, e que permaneceram por dez a 15 dias. Dois bezerros apresentaram secreção nasal mucopurulenta, mas estes foram relacionados à provável infecção bacteriana secundária¹⁰⁴.

Nos casos observados no Distrito Federal, as lesões clínicas ocorreram predominantemente em bovinos adultos de corte, que apresentavam úlceras multifocais ou focalmente extensas, por vezes com crostas, nos tetos, úbere, língua, espaço interdigital do casco e lábio (Fig. 1)^{18,19}. E em 2014, a doença foi diagnosticada em Goiás com o acometimento de dois bezerros que apresentavam lesões exclusivamente orais¹⁰⁶.



FIGURA 1 – Lesões macroscópicas em bovinos associados com o vírus da pseudovariola no Distrito Federal. As lesões nos úberes consistiam de úlceras multifocais (A) a focalmente extensas (B), e pústulas multifocais (C). Foram observadas lesões ulcerativas e focalmente extensas na língua (D).

Fonte: Alonso et al.¹⁸

Aparentemente, a infecção confere imunidade provisória de curta duração⁹³, havendo relatos de reinfecção que apresentaram lesões menos severas do que aquelas associadas à infecção primária¹⁰⁸. Esta doença, assim como os outros poxvírus, também predispõe a mastite bacteriana secundária devido a dor local nos tetos e interrupção da lactação¹⁵. Há fatos que sugerem que o PCPV pode induzir a mastite por causar danos no mecanismo de defesa mecânica do úbere¹¹¹. Assim, essa doença também apresenta importância econômica devido ao efeito sobre a produção de leite dos animais afetados¹⁵.

Ademais, um quadro clínico incomum de pseudovariola foi descrito em um rebanho leiteiro de aproximadamente 80 vacas, no qual aproximadamente 90% delas apresentaram vesículas, erosões, pápulas e crostas na vulva e mucosa vaginal. Esses casos foram confirmados por sequenciamento de DNA e descarte de outros agentes que causam vulvovaginite pustular¹⁰⁹.

d) Lesões clínicas em seres humanos

Este vírus é transmissível ao ser humano e a doença é conhecida como “nódulos dos ordenhadores”¹⁶. Clinicamente os pacientes manifestam lesões como pápulas eritematosas achatadas, que, depois de alguns dias, viram nódulos arroxeados e firmes, com crostas, úlceras e depressão central e, geralmente, há eritema em torno dos nódulos. Na maioria dos casos são descritos dois a cinco nódulos, frequentemente localizados nas mãos, particularmente nos dedos e ocasionalmente no rosto¹¹⁰. Contudo, em humanos, este parapoxvírus causa geralmente lesões brandas e restritas as mãos e aos dedos, mas que pode ser agravada por infecção bacteriana secundária^{89,112}.

Houve um caso de infecção no Estado do Rio de Janeiro em uma mulher que teve contato com bovinos e houve o acompanhamento da evolução da lesão na mão¹¹³, descrito na Fig. 2.



FIGURA 2 – Progressão da lesão nodular na mão de uma mulher que teve o “nódulo do ordenhador”. A. Lesão nodular com 13 dias de evolução, apresentando-se eritematosa, bem delimitada, com um centro deprimido e

esbranquiçado e com cerca de 2,5 de diâmetro. B. Lesão com 24 dias de evolução, em estado regenerativo e apresentando crostas hemorrágicas. C. Lesão com 32 dias de evolução, em estágio papilomatoso. D. Lesão om 41 dias de evolução, em fase cicatricial.

Fonte: Adriano et al.¹¹³

e) Diagnóstico

Os principais métodos utilizados para o diagnóstico da infecção por PCPV são a PCR^{90,107}, o isolamento viral, a histopatologia e a microscopia eletrônica¹⁰⁴. Aparentemente o diagnóstico indicado é a microscopia eletrônica sob coloração negativa de material colhido a partir das vesículas ou crostas⁹³, no qual pode-se observar partículas envelopadas com formato oval, de aproximadamente 260x160 nm, e com uma estrutura helicoidal¹⁰⁴.

No PCR, geralmente é analisado o gene *B2L*⁹⁸. Um trabalho recomendou a utilização do isolamento viral em cultivo de células e do PCR *semi-nested* para o diagnóstico da pseudovariola¹⁰⁵, entretanto uma desvantagem do isolamento viral é que ele geralmente requer vários dias⁹³. Além disso, testes sorológicos não são indicados e utilizados para o diagnóstico do PCPV⁹³.

A biópsia das lesões pode ser realizada, no qual histologicamente as lesões são típicas das outras infecções por poxvírus¹⁵, em que ocorre degeneração vesicular do epitélio e inclusão intracitoplasmática eosinofílica¹⁶. Em um dos surtos naturais pelo PCPV no Brasil, os achados histológicos em bovinos incluíram epiderme superficial coberta por crostas serocelulares espessas, hiperqueratose paraqueratótica, acantose e inflamação linfoplasmocítica¹⁰⁴.

2.3. Considerações finais da revisão bibliográfica

As poxviroses bovinas são relatadas em diversos estados do Brasil, causando doenças vesiculares, proliferativas e mucocutâneas¹⁵, mas em alguns casos, o diagnóstico etiológico não é realizado. Embora as lesões macroscópicas e microscópicas sejam semelhantes^{15,19}, é importante definir qual vírus realmente está afetando o rebanho por intermédio de exames laboratoriais.

Como os poxvírus podem causar lesões macroscópicas vesiculares, é necessário a notificação dos casos suspeitos, para que a vigilância possa pesquisar a etiologia e averiguar a possibilidade de febre aftosa, com base nos aspectos epidemiológicos, clínico-patológicos e laboratoriais. Portanto, o Programa Nacional de Erradicação e Prevenção da Febre Aftosa do MAPA é de extrema importância para obter conhecimento sobre as doenças vesiculares,

incluindo as poxviroses bovinas^{1,12,57}. Além disso, casos de coinfeções por diferentes poxvírus têm sido diagnosticados em algumas regiões do Brasil⁹⁻¹¹, demonstrando a necessidade de precisão do diagnóstico laboratorial em tempo hábil e reforçando a necessidade de vigilância dessas doenças.

Em função da escassez de informações relacionadas a algumas dessas doenças no território nacional, principalmente em relação aos parapoxviroses, observou-se a necessidade de mais estudos epidemiológicos e clínico-patológicos, para aumentar o conhecimento sobre a realidade dessas viroses na região central do Brasil.

REFERÊNCIAS

1. Riet-Correa F, Moojen V, Roehe PM, Weiblen R. Viroses confundíveis com febre aftosa. *Ciência Rural*. 1996; 26(2):323-332. ISSN 0103-8478.
2. Lobato ZIP, Trindade GS, Frois MCM, Ribeiro EBT, Dias GRC, Teixeira BM, Lima FA, Almeida GMF, Kroon EG. Surto de varíola bovina causada pelo vírus vaccínia na região da Zona da Mata Mineira. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*. 2005; 57(4):423-429.
3. Trindade GS, Drumond BP, Guedes MIMC, Leite JA, Mota BEF, Campos MA, Fonseca FG, Nogueira ML, Lobato ZIP, Bonjardim CA, Ferreira PCP, Kroon EG. Zoonotic *Vaccinia virus* infection in Brazil: Clinical description and implications for health professionals. *J. Clin. Microbiol*. 2007; 45(4):1370-1372. DOI:10.1128/JCM.00920-06.
4. Megid J, Appolinário CM, Langoni H, Pituco EM, Okuda LH. *Vaccinia virus* in humans and cattle in southwest region of São Paulo State, Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 2008; 79(5):647-651.
5. Kroon EG, Mota BE, Abraão JS, Fonseca FG, Trindade GS. Zoonotic Brazilian *Vaccinia virus*: from field to therapy. *Antiviral Res*. 2011; 92(2):150-163. DOI:10.1016/j.antiviral.2011.08.018.
6. Damaso CR, Esposito JJ, Condit RC, Moussatché N. An emergent poxvirus from humans and cattle in Rio de Janeiro State: Cantagalo virus may derive from Brazilian smallpox vaccine. *Virology*. 2000; 277(2):439-449. DOI:10.1006/viro.2000.0603.
7. Trindade GS, Fonseca FG, Marques JT, Nogueira ML, Mendes LCN, Borges AS, Peiró JR, Pituco EM, Bonjardim CA, Ferreira PCP, Kroon EG. Araçatuba virus: a vaccinia-like virus associated with infecton in humans and cattle. *Emerg. Infect. Dis*. 2003; 9(2):155-160.
8. Leite JA, Drumond BP, Trindade GS, Lobato ZIP, Fonseca FG, Santos JR, Madureira MC, Guedes MIMC, Ferreira JMS, Bonjardim CA, Ferreira PCP, Kroon EG. Passatempo virus, a vaccinia virus strain, Brazil. *Emerg. Infect. Dis*. 2005; 11(12):1935-1941.
9. Trindade GS, Lobato ZIP, Drumond BP, Leite JA, Trigueiro RC, Guedes MIMC, Fonseca FG, Santos JR, Bonjardim CA, Ferreira PCP, Kroon EG. Short report: Isolation of two vaccinia virus strains from a single bovine vaccinia outbreak in rural area from Brazil: Implications on the emergence of zoonotic orthopoxviruses. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 2006; 75(3):486-490.
10. Sant'Ana FJF, Leal FAA, Rabelo RE, Vulcani VAS, Moreira Jr CA, Cargnelutti JF, Flores EF. Coinfection by vaccinia virus and an orf viruslike parapoxvirus in an outbreak of vesicular disease in dairy cows in midwestern Brazil. *J. Vet. Diagn. Invest*. 2013; 25(2):267-272. DOI: 10.1177/1040638713475799

11. Laguardia-Nascimento M, de Oliveira APF, Azevedo IC, Rivetti Júnior AV, Camargos MF, Fonseca Júnior AA. Spread of poxviruses in livestock in Brazil associated with cases of double and triple infection. *Arch Virol*. 2017. DOI: 10.1007/s00705-017-3407-0.
12. Cargnelutti JF, Santos BS, Lebre SN, Sodre DNA, Silva RM, Weiblen R, Flores EF. Pseudovaríola e estomatite papular em bovinos no Estado de Rondônia, Brasil. *Ciência Rural*. 2014; 44(3):479-485. ISSN 0103-8478.
13. Bhanuprakash V, Hosamani M, Venkatesan G, Balamurugan V, Yogisharadhya R, Singh RK. Animal poxvirus vaccines: a comprehensive review. *Expert Rev. Vaccines*. 2012; 11(11):1355–1374. ISSN 1476-0584.
14. Moss B. Membrane fusion during poxvirus entry. *Seminar in Cell & Developmental Biology*. 2016; 60:89-96. <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.07.015>.
15. Mauldin EA, Kennedy P. Integumentary system. In: Jubb VF, Kennedy PC, Palmer NC. *Pathology of Domestic Animals*. 6 ed. Missouri: Elsevier; 2016. v. 1, p. 509-736
16. Jones STC, Hunt RD, King NW. *Patologia Veterinária*. 6 ed. Manole. 2000. 1415 p.
17. Zachary JF. Mecanismos das infecções microbianas. In: Zachary JF, McGavin MD. *Bases da Patologia Veterinária*. Elsevier; 2013. p. 147-241.
18. Alonso RC. Aspectos clínico-patológicos das poxviroses em bovinos no Distrito Federal (2015-2018). [Dissertação]. Brasília: Universidade de Brasília, Faculdade de Medicina Veterinária. 2018.
19. Alonso RC, Moura PP, Caldeira DF, Mendes MHAF, Pinto MFBP, Cargnelutti JF, Flores EF, Sant’Ana FJF. Poxviruses diagnosed in cattle from Distrito Federal, Brazil (2015-2018). *Transboundary and Emerging Diseases*. 2020, 67(4):1563-1573. <https://doi.org/10.1111/tbed.13490>
20. Schatzmayr HG, Costa RVC, Gonçalves MCR, Barreto DF, Batista VH, Silva MEV, Brust LAC, Barth OM. Human infections caused by vaccinia like poxviruses in Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*. 2009; 42(6):672-676.
21. Alves PA, Figueiredo PO, de Oliveira CHS, Barbosa JD, Lima DHS, Bomjardim HA, Silva NS, Campos KF, Oliveira CMC, Barbosa-Stancioli EF, Abrahão JS, Kroon EG, de Souza TG. Occurrence of Pseudocowpox virus associated to Bovine viral diarrhoea virus-1, Brazilian Amazon. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 2016; 49:70-75. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cimid.2016.09.005>.
22. Chieco P, Derenzini M. The Feulgen reaction 75 years on. Review. *Histochem Cell Biol*. 1999; 111(5):345–358.
23. Shchelkunov SN. An Increasing Danger of Zoonotic Orthopoxvirus Infections. *PLoS Pathog*. 2013; 9(12): e1003756. 2013. DOI:10.1371/journal.ppat.1003756.

24. Fenner F, Henderson DA, Arita I, Jezek Z, Ladnyi ID. Smallpox and its Eradication. World Health Organization. 1988; v.1., 1459 p.
25. King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ. Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. 2012. 1327 p.
26. Baxby D. Poxvirus Hosts and Reservoirs – Brief Review. Archives of Virology. 1977; 55(3):169-179.
27. Silva PL, Viana FC, Ribeiro SC, Coelho HE, Lúcio WF, de Oliveira PR. Surto de varíola bovina no município de Prata - MG. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 1986; 38:323-330.
28. Nagasse-Sugahara TK, Kisielius JJ, Ueda-Ito M, Curti SP, Figueiredo CA, Cruz AS, Silva MMJ, Ramos CH, Silva MCC, Sakurai T, Salles-Gomes LF, 2004. Human Vaccinia-like outbreaks in São Paulo and Goiás States, Brazil: virus detection, isolation and identification. Ver. Inst. Med. Trop. S. Paulo. 2004; 46:315–322.
29. Assis FL, Borges IA, Ferreira PCP, Bonjardim CA, Trindade GS, Lobato ZIP, Guedes MIM, Mesquita V, Kroon EG, Abrahão JS. Group 2 Vaccinia Virus, Brazil. Emerging Infectious Diseases. 2012; 18(12):2035-2038. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1812.120145>.
30. Assis FL, Vinhote WM, Barbosa JD, de Oliveira CHS, de Oliveira CMG, Campos KF, Silva NS, Trindade GS, Abrahão JS, Kroon EG. Reemergence of Vaccinia Virus during Zoonotic Outbreak, Pará State, Brazil. Emerging Infectious Diseases. 2013. 19(12):2017-2020. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1912.130589>.
31. Sant’Ana FJF, Leal AA, Rabelo RE, Vulcani VAS, Ferreira Jr JA, Cargnelutti JF, Flores EF. Outbreaks of vesicular disease caused by Vaccinia virus in dairy cattle from Goiás State, Brazil (2010-2012). Pesq. Vet. Bras. 2013; 33(7):860-866.
32. Abrahão JS, Campos RK, Trindade GS, Fonseca FG, Ferreira PCP, Kroon EG. Outbreak of Severe Zoonotic Vaccinia Virus Infection, Southeastern Brazil. Emerging Infectious Diseases. 2015; 21(4):695-698. <http://dx.doi.org/10.3201/eid2104.140351>.
33. Brum MCS, dos Anjos BL, Nogueira CEW, Amaral LA, Weiblen R, Flores EF. An outbreak of orthopoxvirus-associated disease in horses in southern Brazil. J Vet Diagn Invest. 2010; 22:143–147.
34. Peres MG, Barros CB, Appolinário CM, Antunes JMAP, MioniMSR, Bacchiega TS, Allendorf SD, Vicente AF, Fonseca CR, Megid J. Dogs and Opossums Positive for Vaccinia Virus during Outbreak Affecting Cattle and Humans, São Paulo State, Brazil. Emerging Infectious Diseases. 2016; 22(2):271-273. <http://dx.doi.org/10.3201/eid2202.140747>.
35. Baxby D. The Origins of Vaccinia Virus. The Journal of Infectious Diseases. 1977; 136(3):453-455.
36. Carroll MW, Moss B. Poxviruses as expression vectors. Expression systems. Current Opinion in Biotechnology. 1997; 8(5):573-577.

37. Fonseca FG, Lanna MCS, Campos MAS, Kitajima EW, Peres JN, Golgher RR, Ferreira PCP, Kroon EG. Morphological and molecular characterization of the poxvirus BeAn 58058. *Archives of Virology*. 1998; 143:1171–1186.
38. Campos RK, Brum MCS, Nogueira CEW, Drumond BR, Alves PA, Siqueira-Lima L, Assis FL, Trindade GS, Bonjardim CA, Ferreira PC, Weiblen R, Flores EF, Kroon EG, Abrahão JS. Assessing the variability of Brazilian Vaccinia virus isolates from a horse exanthematic lesion: coinfection with distinct viruses. *Arch. Virol.* 2011; 156(2):275–283. DOI: 10.1007/s00705-010-0857-z.
39. Donatelle DM, Travassos CEPF, Leite JA, Kroon EG. Epidemiologia da poxvirose bovina no Estado do Espírito Santo, Brasil. *Braz. J. vet. Res. anim. Sci.*, São Paulo. 2007; 44(4):275-282.
40. Abrahão JS, Silva-Fernandes AT, Assis FL, Guedes MI, Drumond BP, Leite JÁ, Coelho JFL, Turrini F, Fonseca FG, Lobato ZIP, Madureira M, Ferreira PC, Bonjardim CA, Trindade GS, Kroon EG. Human Vaccinia virus and Pseudocowpox virus co-infection: Clinical description and phylogenetic characterization. *Journal of Clinical Virology*. 2010; 48:69–72. DOI:10.1016/j.jcv.2010.02.001.
41. Costa RVC. Estudo Clínico-Epidemiológico de Surtos de Poxvirose Bovina e Humana na Região Sul do Estado do Rio de Janeiro. [Dissertação]. Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. 2008.
42. Trindade GS, Emerson GL, Carroll DS, Kroon EG, Damon IK. Brazilian Vaccinia viruses and their origins. *Emerg. Infec. Dis.* 2007; 13(7):965–972.
43. Drumond BP, Leite JA, da Fonseca FG, Bonjardim CA, Ferreira PC, Kroon EG. Brazilian vaccinia virus strains are genetically divergent and differ from the Lister vaccine strain. *Microbes Infect.* 2008; 10(2):185–197. DOI:10.1016/j.micinf.2007.11.005.
44. Quixabeira-Santos JC, Medaglia MLG, Pescador CA, Damaso CR. Animal movement and establishment of Vaccinia virus Cantagalo strain in Amazon biome, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*. 2011, 17, 726-729
45. Borges IA, McCollum AM, Mehal JM, Haberling D, Dutra LAL, Vieira FN, Andrade LAO, Kroon EG, Holman RC, Reynolds MG, Trindade GS. Dairy production practices and associated risks for bovine vaccinia exposure in cattle, Brazil. *New Microbes and New Infections*. 2017; 20 (C):43-50
46. Assis FL, Franco-Luiz AP, Paim LM, Oliveira GP, Pereira AF, de Almeida GMF, Figueiredo LB, Tanus A, Trindade GS, Ferreira PP, Kroon EG, Abrahão JS. Horizontal study of vaccinia virus infections in an endemic area: epidemiologic, phylogenetic and economic aspects. *Arch Virol.* 2015; 160(11):2703-2708. DOI: 10.1007/s00705-015-2549-1.
47. Schatzmayr HG, Costa RVC, Gonçalves MCR, Andréa PSD, Barth OM. Human and animal infections by vaccinia-like viruses in the state of Rio de Janeiro: A novel

- expanding zoonosis. *Vaccine*. 2011; 29S. D65– D69. DOI:10.1016/j.vaccine.2011.09.105.
48. Silva TG, Lima MS, de Castro AMMG, Martins MSN, Castiglioni VC, Fava CD, Okuda LH, Pituco EM. Bovine Vaccinia in dairy cattle and suspicion of vesicular disease on milkers in Brazil. *Ciência Rural*. 2018, 45(05):e20180723. ISSN 1678-4596
 49. Ferreira EC. Ocorrência da vaccínia no estado da Bahia entre 2012 a 2017. [Monografia]. Bahia: Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas da. 2018,
 50. Franco-Luiz APM, Fagundes-Pereira A, Costa GB, Alves PA, Oliveira DB, Bonjardim CA, Ferreira PCP, Trindade GS, Panei CJ, Galosi CM, Abrahão JS, Kroon EG. Spread of Vaccinia Virus to Cattle Herds, Argentina, 2011. *Emerging Infectious Diseases*. 2014; 20(9):1576-1578. <http://dx.doi.org/10.3201/eid2009.140154>.
 51. Franco-Luiz APM, Oliveira DB, Pereira AF, Gasparini MCS, Bonjardim CA, Ferreira PCP, Trindade GS, Puentes R, Furtado A, Abrahão JS, Kroon EG. Detection of Vaccinia Virus in Dairy Cattle Serum Samples from 2009, Uruguay. *Emerging Infectious Diseases*. 2016, 22(12):2174-2177
 52. Usme-Ciro JA, Paredes A, Walteros DM, Tolosa-Pérez EN, Laiton-Donato K, Pinzón MD, Petersen BW, Gallardo-Romero NF, Li Y, Wilkins K, Davidson W, Gao J, Patel N, Nakazawa Y, Reynolds MG, Satheshkumar PS, Emerson GL, Páez-Martínez A. Detection and Molecular Characterization of Zoonotic Poxviruses Circulating in the Amazon Region of Colombia, 2014. *Emerg. Infect. Dis.* 2017, 23, 649–653.
 53. Peres MG, Bacchiega TS, Appolinário CM, Vicente AF, Allendorf SD, Antunes JMAP, Moreira AS, Legatti E, Fonseca CR, Pituco EM, Okuda LH, Pantoja JCF, Ferreira F, Megid J. Serological study of vaccinia virus reservoirs in áreas with and without official reports of outbreaks in cattle and humans in São Paulo, Brazil. *Arch. Virol.* 2013; 158(12):2433–2441. DOI: 10.1007/s00705-013-1740-5.
 54. Abrahão JS, Oliveira TML, Campos RK, Madureira MC, Kroon EG, Lobato ZIP. Bovine Vaccinia Outbreaks: Detection and Isolation of Vaccinia Virus in Milk Samples. *Foodborne pathogens and disease*. 2009; 6(9):1141-1146. DOI: 10.1089/fpd.2009.0324.
 55. Oliveira TML, Guedes MIMC, Rehfeld IS, Matos ACD, Rivetti Júnior AV, Alves PA, Galinari GCF, Cerqueira MMOP, Abrahão JS, Lobato ZIP. Detection of Vaccinia Virus in Milk: Evidence of a Systemic and Persistent Infection in Experimentally Infected Cows. *Foodborne pathogens and disease*. 2015; 12(11):898-903. DOI: 10.1089/fpd.2015.1974.
 56. Oliveira TML, Rehfeld IS, Siqueira JMF, Abrahão JS, Campos RK, dos Santos AKR, Cerqueira MMOP, Kroon EG, Lobato ZIP. Vaccinia Virus Is Not Inactivated After Thermal Treatment and Cheese Production Using Experimentally Contaminated Milk. *Foodborne pathogens and disease*. 2010; 7(12):1491-1496. DOI: 10.1089/fpd.2010.0597.

57. Rehfeld IS. Transmissão de *Vaccinia vírus* pelo leite em modelo murino; detecção e viabilidade de poxvirus no queijo e leite. [Tese] Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária e Zootecnia. 2016. 107p.
58. Oliveira TML, Guedes MIMC, Rehfeld IS, Matos ACD, Rivetti Júnior AV, da Cunha AF, Cerqueira MMOP, Abrahão JS, Lobato ZIP. Vaccinia virus detection in dairy products made with milk from experimentally infected cows. *Transbound Emerg Dis.* 2017; 1–8. DOI: 10.1111/tbed.12666.
59. Rehfeld IS, Guedes MIMC, Fraiha ALS, Costa AG, Matos ACD, Flúza ATL, Lobato ZIP. Vaccinia virus Transmission through Experimentally Contaminated Milk Using a Murine Model – Research article. *PLoS ONE.* 2015; 10(5): e0127350. DOI: 10.1371/journal.pone.0127350.
60. Guedes MIMC, Rehfeld IS, Oliveira TML, Assis FL, Matos ACD, Abrahão JS, Kroon EG, Lobato ZIP. Detection of *Vaccinia virus* in blood and faeces of experimentally infected cows. *Transbound Emerg. Dis.* 2012; 60(6):552-555. DOI: 10.1111/j.1865-1682.2012.01372.x.
61. Rivetti Jr. AV, Guedes MIMC, Rehfeld IS, Oliveira TML, Matos ACD, Abrahão JS, Kroon EG, Lobato ZIP. Bovine vaccinia, a systemic infection: Evidence of fecal shedding, viremia and detection in lymphoid organs. *Vet. Microbiol.* 2013; 162(1):103-111. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.09.005>.
62. Rehfeld IS, Matos ACD, Guedes MIMC, Costa AG, Fraiha ALS, Lobato ZIP. Subclinical bovine vaccinia: An important risk factor in the epidemiology of this zoonosis in cattle. *Research in Veterinary Science.* 2017; 114:233–235. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.03.022>.
63. Abrahão JS, Trindade GS, Ferreira JMS, Campos RK, Bonjardim CA, Ferreira PCP, Kroon EG. Long-lasting stability of Vaccinia virus strains in murine feces: implications for virus circulation and environmental maintenance. *Arch. Virol.* 2009; 154:1551–1553. DOI: 10.1007/s00705-009-0470-1.
64. D’Anunciação L, Guedes MIM, Oliveira TL, Rehfeld I, Bonjardim CA, Ferreira PP, Trindade GS, Lobato ZIP, Kroon EG, Abrahão JS. Experimental evidence of horizontal transmission of *Vaccinia virus* between bovines and rodents. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2012; 12(1):61-64. DOI: 10.1089/vbz.2011.0671.
65. Peres MG, Bacchiega TS, Appolinário CM, Vicente AF, Mioni MSR, Ribeiro BLD, Fonseca CRS, Pelícia VC, Ferreira F, Abrahão JS, Megid J. Vaccinia virus in Feces and Urine of Wild Rodents from São Paulo State, Brazil. *Viruses.* 2018, 10, 51; doi:10.3390/v10020051
66. Costa GB, de Almeida LR, Cerqueira AGR, Mesquita WU, de Oliveira JS, Miranda JB, Saraiva-Silva AT, Abrahão JS, Drumond BP, Kroon EG, Pereira PLL, Soares DFM, Trindade GS. Vaccinia Virus among Domestic Dogs and Wild Coatis, Brazil, 2013–2015. *Emerging Infectious Diseases.* 2018, 24(12):2338-2342.

67. Miranda JB, Borges IA, Campos SPS, Vieira FN, de Ázara TMF, Marques FA, Costa GB, Luis APMF, de Oliveira JS, Ferreira PCP, Bonjardim CA, da Silva SLM, Eiras AE, Abrahão JS, Kroon EG, Drumond BP, Paglia AP, Trindade GS. Serologic and Molecular Evidence of Vaccinia Virus Circulation among Small Mammals from Different Biomes, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*. 2017, 23(6):931-938. DOI: <https://dx.doi.org/10.3201/eid2306.161643>
68. Voznessenskaya VV, Malanina TV. Effect of Chemical Signals from a Predator (*Felis catus*) on the Reproduction of *Mus musculus*., *Doklady Biological Sciences*, 2013, 453:362–364. ISSN 00124966
69. Costa GB, Miranda JB, Almeida GG, de Oliveira JS, Pinheiro MS, Gonçalves SA, dos Reis JKP, Gonçalves R, Ferreira PCP, Bonjardim CA, Abrahão JS, Kroon EG, Trindade GS. Detection of Vaccinia Virus in Urban Domestic Cats, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*. 2017, 23(2):360-362. DOI: <http://dx.doi.org/10.3201/eid2302.161341>
70. Figueiredo PO, Silva-Fernandes AT, Mota BEF, Costa GB, Borges IA, Ferreira PCP, Abrahão JS, Braga EM, Kroon EG, Trindade GS. Evaluating anti-Orthopoxvirus antibodies in individuals from Brazilian rural areas prior to the bovine vaccinia era. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*. 2015; 110(6):804-808. DOI: 10.1590/0074-02760150215.
71. Silva-Fernandes AT, Travassos CEPF, Ferreira JMS, Abrahão JS, Rocha ESO, Viana-Ferreira F, dos Santos JR, Bonjardim CA, Ferreira PCP, Kroon EG. Natural human infections with *Vaccinia virus* during bovine vaccinia outbreaks. *Journal of Clinical Virology*. 2009; 44(4):308–313. DOI: 10.1016/j.jcv.2009.01.007.
72. Costa GB, Augusto LTS, Leite JA, Ferreira PCP, Bonjardim CA, Abrahão JS, Kroon EG, Moreno EC, Trindade GS. Seroprevalence of Orthopoxvirus in rural Brazil: insights into anti-OPV immunity status and its implications for emergent zoonotic OPV. *Virology Journal*. 2016, 13:121. DOI 10.1186/s12985-016-0575-6
73. Oliveira GP, Fernandes ATS, de Assis FL, Alves PA, Luiz APMF, Figueiredo LB, de Almeida CMC, Travassos CEPF, Trindade GS, Abrahão JS, Kroon EG. Short Report: Intrafamilial Transmission of Vaccinia virus during a Bovine Vaccinia Outbreak in Brazil: A New Insight in Viral Transmission Chain. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 2014; 90(6):1021–1023.
74. Batista VH, Scremin J, Aguiar LM, Schatzmayr H. Vulvar infection and possible human-to-human transmission of bovine poxvirus disease – Case report. *Virus reviews and research*. 2009; 14(1)1-10.
75. Barth OM, Schatzmayr HG, Gonçalves MCR, Barreto-Vieira DF, Fernandes J, Lima MQ, de Oliveira RC, de Lemos ERS. Antibodies anti_orthopoxvirus in healthy workers who handle animals and in patients with cutaneous lesions compatible with poxvirus infection in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Virus Reviews and Research. Sociedade Brasileira de Virologia*. 2014; 19:4-8.
76. Styczynski A, Burgado J, Walteros D, Usme-Ciro J, Laiton K, Farias AP, Nakazawa Y, Chapman C, Davidson W, Mauldin M, Morgan C, Martínez-Cerón J, Patiña E, Sepúlveda

- LLL, Torres CP, Suarez AEC, Olaya GP, Riveros CE, Cepeda DY, Lopez LA, Espinosa DG, Lozada FAG, Li Y, Satheshkumar PS, Reynolds M, Gracia-Romero M, Petersen B. Seroprevalence and Risk Factors Possibly Associated with Emerging Zoonotic Vaccinia Virus in a Farming Community, Colombia. *Emerging Infectious Diseases*. 2019, 25(12):2169-2176.
77. Rehfeld IS, Guedes MIMS, Matos ACD, de Oliveira TML, Rivetti Júnior AV, Moura ACJ, Paes PRO, do Lago LA, Kroon EG, Lobato ZIP. Clinical, hematological and biochemical parameters of dairy cows experimentally infected with Vaccinia vírus. *Research in Veterinary Science*. 2013; 95(2):752–757.
 78. Simonetti BR, Abreu DC, Simonetti JP, Gonçalves MCR, Silva MEV, Barth OM, Schatzmayr HG. Animal infections by vaccinia-like viruses in the state of rio de janeiro: 1- northwestern region. *Vírus reviews & research*. 2007; 12, 12p. doi: <http://dx.doi.org/10.17525/vrr.v12i1-2.10>
 79. Matos ACD, Rehfeld IS, Guedes MIMCG, Lobato ZIP. Review - Bovine Vaccinia: Insights into the Disease in Cattle. *Viruses*. 2018, 10, 120. DOI:10.3390/v10030120
 80. Kroon EG, Abrahão JS, Trindade GS, Oliveira GP, Luiz APMF, Costa GB, Lima MT, Calixto RS, de Oliveira DB, Drumond BP. 2016. Natural *Vaccinia virus* infection: Diagnosis, isolation, and characterization. *Curr. Protoc. Microbiol*. 2016; 42:14A.5.1-14A.5.43.
 81. Barbosa CHG, Sant’Ana FJF, Cargnelutti JF, Flores EF, Neto ART, Santana RB, Reis Júnior JL. Experimental infection of horses with Vaccinia vírus. *Ciência Rural, Santa Maria*. 2016; 46(3):519-525. ISSN 0103-8478.
 82. Cargnelutti JF, Schmidt C, Masuda EK, Braum LD, Weiblen R, Flores EF. Vaccinia viruses isolated from cutaneous disease in horses are highly virulent for rabbits. *Microb. Pathog*. 2012; 52(3):192-9
 83. Cargnelutti JF, Schmidt C, Masuda EK, Nogueira PRK, Weiblen R, Flores EF. Vaccinia viruses isolated from skin infection in horses produced cutaneous and systemic disease in experimentally infected rabbits. *Research in Veterinary Science* 93. 2012; 1070–1075. DOI:10.1016/j.rvsc.2011.12.016
 84. Flores EF. *Virologia veterinária: virologia geral e doenças víricas*. 3 ed. Editora da UFSM. 2017. 1136p.
 85. Damaso CRA, Reis SA, Jesus DM, Lima PSF, Moussatché N. A PCR-based assay for detection of emerging vaccinia-like viroses isolated in Brazil. *Diagnostic Microbiology and Infectious disease*. 2007; 57:39-46.
 86. Leite JA, Drumond BP, Trindade GS, Bonjardim CA, Ferreira PCP, Kroon EG. Brazilian Vaccinia virus strains show genetic polymorphism at the *ati* gene. *Virus Genes*. 2007; 35:531-539. DOI: 10.1007/s11262-007-0133-9
 87. Abrahão JS, Drumond BP, Trindade GS, Silva-Fernandes AT, Ferreira JMS, Alves PA, Campos RK, Siqueira L, Bonjardim CA, Ferreira PCP, Kroon EG. Rapid Detection of

- Orthopoxvirus by Semi-Nested PCR Directly From Clinical Specimens: A Useful Alternative for Routine Laboratories. *Journal of Medical Virology*. 2010; 82:692–699
88. Matos ACD. Vaccinia virus: padronização de técnica para imunodiagnóstico e estudo da resposta imune humoral de bovinos. [Dissertação]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da. 2012.
 89. Buttner M, Rziha HJ. Parapoxviruses: From the lesion to the viral genome. *J. Vet. Med.* 2002; 49(1):7-16. ISSN 0931-1793.
 90. Laguardia-Nascimento M, Sales EB, Gasparini MR, de Souza NM, da Silva JAG, Souza GG, Carani FR, dos Santos AF, Rivetti Júnior AV, Camargos MF, Fonseca Júnior AA. Detection of multiple viral infections in cattle and buffalo with suspected vesicular disease in Brazil. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2016; 28(4):377–381. DOI: 10.1177/1040638716645836.
 91. MacNeil A, Lederman E, Reynolds MG, Ragade NJ, Talken R, Friedman D, Hall W, Shwe T, Zhao H, Smith S, Davidson W, Hughes C, Damon IK. Diagnosis of Bovine-Associated Parapoxvirus Infections in Humans: Molecular and Epidemiological Evidence. *Zoonoses and Public Health*. 2010; 57:e161-e164. DOI: 10.1111/j.1863-2378.2009.01317.x.
 92. Rehfeld IS, Fraiha ALS, Matos ACD, Costa AG, Gallinari GCF, Costa EA, Guedes MIMC, Lobato ZIP. *Short communication: Parapoxvirus and Orthopoxvirus coinfection in milk of naturally infected cows*. *Journal of Dairy Science*. 2018, 101(9):7801–7803. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-14000>
 93. Canal CW. Poxviridae. In: Flores EF. *Virologia veterinária*. Ed. da UFSM. 2007, v.1, p. 491-509.
 94. Sant’Ana FJF, Rabelo RE, Vulcani VAS, Cargnelutti JF, Flores EF. Bovine papular stomatitis affecting dairy cows and milkers in midwestern Brazil. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2012; 24(2):442-445. DOI: 10.1177/1040638711434799.
 95. Arruda EP, Silva JAG, Mutzenberg ER, Vieira AJD, Souza GG, Campesatto JCB, Souza MA, Negreiros RL. Surto de pseudovariola e estomatite papular em bovinos no estado de Mato Grosso, Brasil. Encontro Nacional de Defesa Sanitária Animal (ENDESA) 2015. Cuiabá, Brasil. 2015. p. 86.
 96. Silva JAG, Mutzenberg ER, Negreiros RL, Carani FR, Néspoli JMB, Souza GG, Campesatto JCB, Castilho ABB, Vieira AJD. Detecção de parapoxivírus pelo Serviço Veterinário Oficial (SVO) em bovinos com suspeita de doença vesicular (DV) em Mirassol D’Oeste - MT. Encontro Nacional de Defesa Sanitária Animal (ENDESA) 2015. Cuiabá, Brasil. 2015. p.79.
 97. Caetano AL, Araujo JM, Silva MO, Leal AA. Estomatite papular em bovinos no município de São Miguel do Araguaia, Estado de Goiás, Brasil. Encontro Nacional de Defesa Sanitária Animal (ENDESA) 2015. Cuiabá, Brasil. 2015. p. 65.

98. Okuda LH, Souza MN, Ribeiro CP, Stefano E, Nogueira AHC, Pituco EM. Pseudovariola bovina e estomatite papular bovina na região centro-oeste do Brasil. Encontro Nacional de Defesa Sanitária Animal (ENDESA) 2015. Cuiabá, Brasil. 2015. p. 76.
99. Ito M, Murakami T, Hayakawa Y, Shintani E, Inoshima Y. Serological and epidemiological studies of Parapoxvirus infection in cattle in Ishikawa Prefecture. JARQ. 2011; 45(1):123-127.
100. Pozzo FD, Martinelle L, Gallina L, Mast J, Sarradin P, Thiry E, Scagliarini A, Butter M, Saegerman C. Original findings associated with two cases of bovine papular stomatitis. Journal of Clinical Microbiology. 2011; 49(12):4397-4400. DOI: 10.1128/JCM.05281-11.
101. Guedes RMC, Brown CC, Sequeira JL, Reis Jr. JL. Sistema digestório. In: Santos RL, Alessi AC. Patologia Veterinária. 2 ed. Roca. 2016, p. 145.
102. Yeruham I, Abraham A, Nyska A. Clinical and pathological description of a chronic form of bovine papular stomatitis. J. Comp. Path. 1994; 111(3):279-286.
103. Bowman KF, Barbary RT, Swango LJ, Schnurrenberger PR. Cutaneous form of bovine papular stomatitis in man. The Journal of the American Medical Association. 1981; 246(24):2813-2818.
104. Cargnelutti JF, Flores MM, Teixeira FR, Weiblen, R, Flores EF. An outbreak of pseudocowpox in fattening calves in southern Brazil. J. Vet. Diagn. Invest. 2012; 24(2):437-441. DOI: 10.1177/1040638711435408.
105. Souza SF. Pseudovariola em bovinos no Brasil. [Dissertação]. São Paulo: Instituto Biológico, Pós-graduação em Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema. 2015.
106. Silva MGB, Silva SRA, Silva MOS, Leal AA. Ocorrência de pseudovariola bovina no município de Uruaçu, Estado de Goiás, Brasil. Encontro Nacional de Defesa Sanitária Animal (ENDESA) 2015. Cuiabá, Brasil. 2015. p.64-65.
107. Laguardia-Nascimento M, de Oliveira APF, Fernandes FRP, Rivetti Júnior AV, Camargos MF, Fonseca Júnior AA. Detection of pseudocowpox virus in water buffalo (*Bubalus bubalis*) with vesicular disease in the state of São Paulo, Brazil, in 2016. Veterinary Quarterly. 2016; 37(1):16-22. DOI: 10.1080/01652176.2016.1252479
108. Gibbs EPJ, Osborne AD. Observations on the Epidemiology of Pseudocowpox in South-West England and South Wales. British Veterinary Journal. 1974; 130(2):150-159.
109. Blomqvist G, Ullman K, Segall T, Hauzenberger E, Renstrom L, Persson-Waller K, Leijon M, Valarcher JF. An unusual presentation of pseudocowpox associated with an outbreak of pustular ulcerative vulvovaginitis in a Swedish dairy herd. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. 2018, Vol. 30(2):256–259.
110. Barraviera SRCS. Diseases caused by poxvirus - orf and milker's nodules – a review. J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis. 2005; 11(2):102-108. ISSN 1678-9199.

111. Wellemberg GJ, Poel WHMVD, Oirschot V. Viral infections and bovine mastitis: a review. *Veterinary Microbiology*. 2002; 88(1):27-47.
112. Lemos RAA, Riet-Correa F. Infecções víricas da pele do úbere em bovinos. In: *Doenças de ruminantes e equídeos*, ed. Riet-Correa F, Schild AL, Lemos RAA, Borges JRJ. Pallotti. 3ª edição. 2007, v.1, p. 147–152.
113. Adriano AR, Quiroz CD, Acosta ML, Jeunon T, Bonini F. Milker's nodule – Case report. *An. Bras. Dermatol*. 2015; 90(3):407-10.

CAPÍTULO 2

(Artigo a ser submetido a “Tropical Animal Health and Production”)

Seroprevalence of bovine vaccinia in cows and its correlation with the productive profile of affected farms in the Distrito Federal, Brazil

Lorena Ferreira Silva¹, Stephan Alberto Machado de Oliveira², Ana Lourdes Arrais de Alencar Mota³, Vitor Salvador Picão Gonçalves³, Carolina de Oliveira Freitas⁴, Juliana Felipetto Cargnelutti⁴, Eduardo Furtado Flores⁴, Fabiano José Ferreira de Sant’Ana⁵

1. *Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia, GO, Brazil*
2. *Centro Universitário ICESP, Brasília, DF, Brazil; Instituto de Biologia, Universidade de Brasília (UnB), Brasília, DF, Brazil*
3. *Epiplan, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, UnB, Brasília, DF, Brazil*
4. *Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil*
5. *Laboratório de Diagnóstico Patológico Veterinário, UnB, Brasília, DF, Brazil*

ABSTRACT

Bovine vaccinia (BV) is an infectious disease caused by *Vaccinia virus* (VACV) characterized by vesicular and exanthematic lesions, mainly in cattle. Although the disease has been described in some Brazilian regions in the last decades, official information regarding the current prevalence in bovine herds of Midwestern Brazil is lacking. Thus, the current study aimed to estimate the seroprevalence and risk factors associated with BV in cattle in the Distrito Federal (DF), Brazil. Sera of 312 cows of 64 herds were tested by virus-neutralizing test (VN) to VACV. The herd and cow seroprevalence was estimated to be 33.3% and 10.6%, respectively. Seropositive cows were detected in dairy, beef and mixed farms. The results of the epidemiological questionnaire showed that no risk factor analysed was associated with seropositivity to VACV. There was no significant association between type of milking and seropositivity to VACV, however most seroreagent cows were present in farms with high daily milk production and high number of lactating and adult cows. Our results suggest that VACV circulates in many regions of DF with considerable prevalence in dairy cows.

KEY WORDS: *Orthopoxvirus*, poxviruses, VACV, diseases of cattle.

1. INTRODUCTION

Bovine vaccinia (BV) is an infectious disease caused by *Vaccinia virus* (VACV), a zoonotic orthopoxvirus that causes vesicular and exanthematic lesions, mainly in cattle (Lobato et al. 2005; Schatzmayr et al. 2009; Alonso et al. 2020). VACV may also infect other species, such as horses, pigs, rabbits, mice, opossums, sheep and monkeys (Brum et al. 2010; Cargnelutti et al. 2012; Peres et al. 2013; Mauldin and Kennedy 2016). There is some evidence that wild rodents, dogs and cats are also susceptible to VACV, but apparently do not develop clinical signs (Schatzmayr et al. 2011; Peres et al. 2013; Peres et al. 2016; Borges et al. 2017; Silva et al. 2018).

Outbreaks and single cases of BV in cattle and milkers have been described in some Brazilian regions, such as Southeastern (Trindade et al. 2003; Leite et al. 2005; Lobato et al. 2005; Megid et al. 2008) and Midwestern (Sant'Ana et al. 2013; Alonso et al. 2020). Additionally, coinfections involving VACV and other poxviruses have been reported in cattle from Brazilian herds (Trindade et al. 2006; Campos et al. 2011; Sant'Ana et al. 2013; Laguardia-Nascimento et al. 2017; Alonso et al. 2020). These data are somewhat scaring and detrimental to the national dairy industry and public health services (Trindade et al. 2007; Kroon et al. 2011).

In cattle, BV courses with vesicles, papules, pustules, erythema, edema, erosions, ulcers, and crusts, usually on the teats, udder, mouth, tongue, muzzle and hoof (Riet-Correa et al. 1996; Sant'Ana et al. 2013; Alonso et al. 2020). VACV infection generally occurs in lactating cows and, especially, in farms that practice manual milking (Trindade et al. 2003; Leite et al. 2005; Lobato et al. 2005; Costa 2008). Virologic and molecular tests have been preferentially used to diagnose the disease. However, serological assays are useful to evaluate and quantitate the presence and circulation of VACV in bovine herds (Mota et al. 2010; Franco-Luiz et al. 2014), generating sero-epidemiological data of interest to design animal health programs (Bhanuprakash et al. 2012).

Although some studies have detailed important aspects of BV in Brazil in recent years, such as epidemiological interactions, clinical and pathological findings, diagnosis, no official data regarding to its seroprevalence in local bovine herds is available. Thereby, the current study aimed to estimate the seroprevalence and risk factors associated with BV in cattle in the Distrito Federal (DF), Brazil.

DF, located in the Brazil Midwest region, has some particularities, such as small farms and herds. In 2015, the DF herd was equivalent to 0.1% of the bovine population in the Midwest region (Nascimento 2016). The herds/farms are typically small and mostly devoted to milk

production or mixed exploration (Francisco 2008). Furthermore, it is an important route of animal transport among the Brazil Midwest, Southeast and Northeast (Alonso et al. 2020).

Given the relevance of studying this poxvirus in a place with important particularities and location, the objective of this work is to estimate seroprevalence and risk factors associated with BV in herds and animals in DF in 2015.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Location and sampling

The serum samples from cows used in this study were kindly provided by the Programa Nacional de Erradicação e Prevenção de Febre Aftosa of the Secretaria de Estado da Agricultura, Abastecimento e Desenvolvimento Rural (SEAGRI) from the DF, Brazil. The samples were collected during the seroepidemiological survey for bovine brucellosis and tuberculosis in 2015.

The target population of this study included farms with adult cows (over 24-month-old) in the DF. The age range was established due the fact that the cows were in reproductive period and, consequently, in dairy production.

The number of sampled farms was calculated using the software Epitools® (SERGEANT, 2018), in which was considered that in 2015 there were 2,727 herds in the DF with adult cows. The prevalence of herds affected by the VACV was estimated at 20%, with a sampling error of 10% and a confidence level of 95%. The calculation generated a minimum number of 62 farms selected in the DF. Thereby, samples of 64 out of 344 farms represented in the serum bank of SEAGRI were used. Samples of the five operational units (OU) of the animal health service from DF (Brazlândia, Gama, Planaltina, Rio Preto, and Sobradinho) were studied. As a result, the random sampling led to the analysis of 20 farms in Brazlândia, 17 in Sobradinho, 15 in Rio Preto, 8 in Planaltina, and 4 in Gama.

The number of selected cows in each farm was determined assuming an intra-herd prevalence of 40% in herds with more than 5 adult animals and 50% in smaller farms, and values of 92.7% sensitivity and 90.8% specificity for virus-neutralization (VN), using as reference the statistical bases observed previously (Borges et al. 2008). Using the Epitools®, simulations were performed with different sample sizes in order to define a minimum number of animals in the herd to be tested that would allow to rank the farm as positive or negative for VACV infection. The farm was considered positive when at least one cow was tested positive. The sample size chosen would yield values of sensitivity and specificity of the herd of at least

88% and 70%, respectively. Then, 1 to 7 cows were sampled per farm, totaling 312 sera, which represented approximately 20% (312/1565) of serum samples bank. These samples were stored in isothermal boxes and immediately sent to the laboratory, where they were stored at -20° C until performing the VN test. The samples were considered viable for analysis.

This study was approved according to the Ethical Principles of Animal Care and Research and under Ethics Committee on Animal Use (CEUA) (protocol number 122/17) of the Universidade Federal de Goiás, Brazil. The samples were thawed and incubated in a water bath at 56° C for 30 minutes, to inactivate the complement system, and subsequent performance of the VN.

2.2. Cell line and virus

Vero cells (*African Green Monkey* kidney) were used for viral amplification and quantification and for the VN test. Cells were cultured in RPMI medium supplemented with penicillin (10,000 IU/mL), streptomycin (10 mg/mL), amphotericin B (250 µg/mL), ciprofloxacin (1 mL/L) and 10% bovine fetal serum.

The *Vaccinia virus* Pelotas 2 (P2V) was used as the standard viral strain, which had been isolated from horses in southern Brazil (Brum et al. 2010; Campos et al. 2011). Cell cultures and virus growth were performed at 37°C with CO₂ at 5%.

2.3. Virus-neutralization (VN)

After inactivating the complement system, the serum samples were submitted to a standard virus neutralization (VN) assay in 96-well plates. For this, samples were diluted (1:10) in RPMI medium, tested against a fixed dose of virus (100-200 TCID₅₀/well), and incubated at 37°C for two hours. A suspension of Vero cells was added and the plates were incubated for 120 hours at 37°C with CO₂ at 5%. In all tests, fetal bovine serum was used as a negative control and a serum from a rabbit experimentally infected with the VACV as a positive control (Cargnelutti et al. 2012). The microplates were read in an inverted optical microscope. The test was considered valid when the control cells, the viral titration, the absence of serum cytotoxicity and the cytopathic effect of the virus on the control gave expected results. The samples were considered positive for antibodies when no cytopathic effect was observed.

Positive serum samples in the qualitative VN test were assigned to the quantitative VN to determine the antibody titer. For this, serial two-fold dilutions were tested against a fixed dose of the virus, as described in the qualitative test. VN titers were considered as the reciprocal

of the highest dilution of serum that prevented the production of the cytopathic effect indicator in Vero cells.

2.4. Statistics

Data analysis was performed with STATA[®] software, version 12 (STATACORP, 2011). The results of the VN and the epidemiological survey were used for statistical analysis. The farm was considered positive when at least one seropositive cow was detected.

The estimate herd and animal seroprevalence of BV was based on the ratio between farms or animals classified as positive in the sample and the total of samples in DF, considering the dimension of each OU. Since each primary and secondary sample unit represents respectively a set of farms and animals within the sample, weights were calculated as follows (formula 1 and 2).

In formula 1, the weight 1 (P1), exercised by each sampled farm in relation to its OU, for the purpose of calculating herd prevalence in DF, was given according to the expression:

$$P1 = \frac{\text{Total number of farms in the OU}}{\text{Number of sampled farms in the OU}}$$

For estimating the animal prevalence of BV, the calculation considered conglomerate sampling made in two stages. Therefore, in formula 2, a weighting was performed, considering the weight (P2) exercised by each sampled cow in relation to its herd and, posteriorly, to its respective OU.

$$P2 = \frac{\text{Females } \geq 24 \text{ months present on the farm}}{\text{Females } \geq 24 \text{ months sampled on the farm}} \times \frac{\text{Females } \geq 24 \text{ month in the OU}}{\text{Females } \geq 24 \text{ month present in the farms in the OU}}$$

The frequency of animals affected in each BV positive herd was estimated by the ratio of the number of positive samples to the total number of collected samples.

In addition to the serological analysis, we analyzed the results of an epidemiological questionnaire applied by the veterinarians of the SEAGRI in each farm. As a result, it was possible to obtain information on the type of exploration, raising and management practices employed, especially in relation to dairy management. In this study, variables such as number and breeds of cattle, milk production and disposal of subproducts, presence of other animals (domestic and wild), veterinary assistance, purchase and sale of animals, items or employees shares, physical characteristics of the property, among others factors were analyzed.

All the information generated by the field and laboratory study was inserted in a specific database. Thus, possible risk factors were studied after exploratory data analysis. Quantitative variables were converted into categorical variables for use in bivariate analysis.

Using the Chi-Square test (χ^2), a bivariate analysis of the variables in the questionnaire was performed, whose association with the presence or absence of VACV in the herd presented biological or epidemiological plausibility.

3. RESULTS

Out of the 64 farms sampled, 23 were positive, i.e. presented at least one animal seropositive for VACV. Thus, the herd prevalence for VACV in DF was 33.3% [CI 95%: 18.2 - 48.3%]. Table 1 shows the total and sampled drawn number of farms and cows used in this study by operational unit (OU).

Table 1 – Number of farms and cows analyzed in the seroprevalence study for VACV in the different operational units (OU) from Distrito Federal in 2015.

OU	Total number of farms	Number of sampled farms	Number (and percentage) of positive farms analyzed	Total number of cows	Number of sampled cows	Number (and percentage) of positive cows analyzed
Brazlândia	544	20	7 (35%)	8021	81	7 (8.6%)
Gama	700	4	1 (25%)	8651	26	3 (11.5%)
Planaltina	495	8	3 (37.5%)	8734	39	3 (7.6%)
Rio Preto	524	15	4 (26.6%)	12583	74	7 (9.4%)
Sobradinho	464	17	8 (47%)	5684	92	10 (10.8%)
DF	2727	64	23 (35.9%)	43673	312	30 (9.6%)

The animal prevalence was estimated at be 10.6% [CI 95%: 1.0 - 20.2%]. The confidence interval (CI) is quite wide, reflecting the type of cluster sampling and also due to the reduced number of farms and cows studied in some regions, such as in Gama.

Among the 23 positive farms, the percentage of seroreagent cows within the farms ranged from 14.2% to 66.6%, with an average intra-herd prevalence of 27.2%. In these 23 farms, 30 cows were seropositive for VACV. The number of positive sera in each farm varied from one to three animals. Virus titers between 1:2 and 1:256 were found, with a median of 1:8.

In relation to the characteristics of the analyzed farms, most of them were small-scale, since 50% of the properties (32/64) had a maximum of 18 cattle in the herd and seven adult cows. In addition, 40.6% (26/64) of the farms had only two cows.

Most evaluated farms were dairy (29/64) and mixed/dual-purpose (25/64) herds, followed by 10 beef herds (Tab. 2). In general, 49 farms performed milking (manual [45/49] or mechanized [4/49]). Forty-four farms (44/64) had lactating cows present in the herd in the last 12 months, in which half (22/44) had only three lactating cows and a daily dairy production up to 14.5 liters. Table 2 summarizes the distribution of farms according to the type of farm, type of breeding, type of milking and number of cows over 24 months old.

Table 2 – Productive characteristics of 64 cattle farms sampled in DF, Brazil, in 2015.

Variables	Amount	Frequency (%)
Production purpose		
Dairy	29	45.3
Mixed (dual-purpose)	25	39.1
Beef	10	15.6
Herd management		
Extensive	38	59.4
Semi-intensive	25	39.0
Intensive	1	1.6
Milking type		
Manual	45	70.3
Absent	15	23.4
Mechanic	4	6.3
Number of cows over 24 months		
3 or more cows	38	59.4
1 or 2 cows	26	40.6

Considering the consumption of raw milk or related dairy products, 29.69% (19/64) of the farmers claimed to consume these products. Most farmers did not deliver milk to industries (54/64), but they produced cheese, butter or other dairy products on-farm (38/64), for their own consumption (34/38) and/or for informal sale (8/38). Most of the mixed and dairy farms did not cool down the milk (45/54). Of those who cooled milk (9/64), eight used coolers or their own expansion tank, and only one utilized a collective tank.

In addition, 78.13% of the farms did not have veterinary assistance (50/64). In the other cases, nine and five farms were assisted by private and cooperative veterinarians, respectively. Most of the farms did not rent pasture (53/64), or shared items (56/64) nor drinking fountains with animals from another farm (60/64), did not concentrate cattle in any region (43/64) nor

had wetlands (52/64). Only eight farms shared items (8/64), mainly equipment and three also shared employees. Only 16 farms declared to have bought cattle and 21 properties to have sold animals in the last 12 months prior to the survey, and 46 properties did not slaughter animals (46/64). Most farms (57/64) did not use artificial insemination and had no abortions in the last 12 months (56/64).

In relation to other animals present in the properties, the domestic animals cited were dogs (55/64), poultry (52/64), horses (44/64), pigs (33/64), cats (33/64), and small ruminants (11/64). The described wild animals included primates (35/64), marsupials (32/64), deer (14/64), capybaras (14/64), and felids (5/64) (Tab. 3).

Table 3 shows the bivariate analysis of possible risk factors most discussed for BV in all 64 farms analyzed in the current study.

Table 3 – Analysis of potential risk factors for bovine vaccinia in farms from Federal District in 2015.

Variables and categories	Negative	Positive	Total	P
Exploration type				0.384
Mixed	5 (12.2%)	5 (21.7%)	10	
Milk	21 (51.2%)	8 (34.8%)	29	
Beef	15 (36.6%)	10 (43.5%)	25	
Creation type				0.728
Extensive	25 (61.0%)	13 (56.5%)	38	
Semi-containment / Confinement	16 (39.0%)	10 (43.5%)	26	
Farm classification				0.638
Rural	38 (92.7%)	22 (95.7%)	60	
Urban periphery	3 (7.3%)	1 (4.3%)	4	
Total number of cows over 24 months of age				0.068
≤ 7 females	24 (58.5%)	8 (34.8%)	32	
> 7 females	17 (41.5%)	15 (65.2%)	32	
Milking type				0.112
Absent	8 (19.5%)	7 (30.4%)	15	
Mechanics	1 (2.4%)	3 (13%)	4	
Manual	32 (78%)	13 (56%)	45	
Herd size				0.093
< 20 cattle	25 (61%)	9 (39%)	34	
≥ 20 cattle	16 (39%)	14 (61%)	30	
Daily milking number				0.536
No milking	9 (22%)	8 (34.8%)	17	
Once a day	30 (73.2%)	14 (60.9%)	44	
2 or 3 times a day	2 (4.8%)	1 (4.3%)	3	
Bovine breeds				0.349
Zebuine	4 (9.7%)	5 (21.7%)	9	
European	4 (9.7%)	3 (13.0%)	7	
Mixed	33 (80.5%)	15 (65.2%)	48	
Rent pasture				0.158
No	36 (87.8%)	17 (73.9%)	53	
Yes	5 (12.2%)	6 (26.1%)	11	
Shares an item with other farms				0.922
No	36 (87.8%)	20 (87%)	56	
Yes	5 (12.2%)	3 (13%)	8	

Veterinary assistance				0.201
No	30 (73.1%)	20 (87%)	50	
Yes	11 (26.8%)	3 (13%)	14	
Bought cattle in the last 12 months				0.880
No	31 (75.6%)	17 (73.9%)	48	
Yes	10 (24.4%)	6 (26.1%)	16	
Have areas where cattle remain grouped				0.762
No	27 (65.8%)	16 (69.6%)	43	
Yes	14 (34.2%)	7 (30.4%)	21	

The presence of others domestic or wild animals in the evaluated farms was analyzed as potential risk factors, such as horses ($p=0.504$), pigs ($p=0.552$), poultry ($p=0.835$), dogs ($p=0.861$), cats ($p=0.552$), cervids ($p=0.984$), capybaras ($p=0.201$), marsupials ($p=0.434$), wild felids ($p=0.844$) and primates ($p=0.409$), but no one of them were considered significant. Only sheep and goats were statistically relevant ($p=0.035$).

In addition, other analyzed factors were not significant, such as introduction of breeders animals ($p=0.855$), slaughter of animais at the end of reproductive life ($p=0.395$), use of artificial insemination ($p=0.203$), abortion of cows in the last 12 mouths ($p=0.111$), wetlands on the farms ($p=0.646$), sold cattle in the last 12 mouths ($p=0.801$), milk delivery and cooling in dairy and mixed farms ($p=0.313$ and 0.186 , respectively) and consumption of raw milk or dairy products made with raw milk ($p=0.297$). On the other hand, farms that did not produce cheese, butter or other dairy product showed significant risk ($p=0.032$).

Analyzing the milk production in mixed and dairy farms, the positive farms showed higher daily production (mean = 42.2 L, median = 30 L), higher number of lactating cows (mean = 8.2, median = 9), higher number of adult cows (mean = 16.6, median = 10) and higher total number of herd (mean = 40, median = 24) ($p>0.05$). Negative farms, on the other hand, showed an average daily milk production of 35.5 L and an average of 12 L, a number of lactating cows of an average of 6.3 and a median of 3, an average number of adult females of 12.5 and a median of 1 and total herd mean of 28.2 and median 14.

4. DISCUSSION

We studied the seroprevalence and epidemiology of BV in DF in Brazil, in order to know the possible risk factors related with this poxvirus in cattle in this region. A recent study showed that BV is the most common poxvirus of cattle in this Brazilian region (Alonso et al. 2020). Although this disease has been studied in some countries and in some Brazilian regions (mainly Southeast), few epidemiological investigations has been conducted, especially in the

Midwestern region of Brazil, including a serological evaluation of the herds. For the first time, a study with this scope was carried out in this region.

In the current study, a seroprevalence for VACV of 33% in farms and 10.6% in cattle was observed. Regardless of the farm, an intra-herd prevalence of 14.2% up to 66.6% was determined. A previous similar serological study was performed in another Brazilian state (Minas Gerais). The authors found a higher prevalence of 75.7% in dairy cattle, detecting antibodies against orthopoxvirus and intra-herd involvement of 20 to 100% (Borges et al. 2017). Possibly, the high prevalence found in this last investigation may be related to the target population of the study. In addition, this region appears to be endemic for VACV. Some limitations of the current study also need consideration, such as the restricted number of analysed samples and the expressive number of small farms with few cows.

According to some studies, BV is a disease commonly found in dairy cattle, mainly in lactation (Megid et al. 2008; Sant'Ana et al. 2013; Assis et al. 2015). The current investigation did not demonstrate significant difference of seropositivity to VACV between dairy and beef farms in DF. Similar data were obtained in another study describing the clinical and pathological aspects of 27 cases of BV in DF between 2015 and 2018 (Alonso et al. 2020). In an investigation performed in Minas Gerais, Brazil, of the 78 cows that presented antibodies against the VACV, only 8 had a history of lesions compatible with BV (Borges et al. 2017).

In the current study, there was no clinical history and/or officialy notified cases of BV in the herds of this region in 2015. However, Alonso et al. (2020) observed clinical cases of VACV with highest number of cases in the UO in Planaltina, followed by Brazlândia, between 2017 and 2018. Furthermore, some countries bordering Brazil, such as Argentina and Uruguay, have not reported outbreaks of vesicular clinical disease compatible to BV, however, antibodies against the VACV have already been detected in 8% and 22% of cattle in these countries, respectively (Franco-Luiz et al. 2014; Franco-Luiz et al. 2016). Possibly, BV can be underdiagnosed in beef cattle due the usual handling practices favor that the oral or cutaneous lesions, sometimes mild, are not identified by the farmers and rural workers. Oral lesions are generally reported in outbreaks of BV, especially affecting suckling calves (Lobato et al. 2005; Canal 2007; Assis et al. 2013; Sant'Ana et al. 2013; Alonso et al. 2020), and this percentage can be even higher, since the mouth is not evaluated clinically in details, in most cases (Lobato et al. 2005).

VACV infection occurs frequently in farms that use manual milking, because apparently milking is the main reason for the transmission of the virus between animals (Trindade et al. 2003; Leite et al. 2005; Lobato et al. 2005; Costa 2008). A study demonstrated that 92% and

25-30% of the farms that performed manual or mechanical milking were affected, respectively (Lobato et al. 2005). In other investigation, only lactating cows and calves that suckled directly on these cows became infected by VACV, while bulls, cows that were not being milked, and calves that were fed in buckets did not show lesions (Costa 2008). In the current study, there was no significant relation between type of milking and positivity to BV, although the serological diagnosis of VACV was predominant in farms that had the following characteristics: high milk production, high number of animals and high number of lactating cows.

Some studies indicated that VACV can be introduced in the farms by contaminated milkers who work in different properties (Lobato et al. 2005; Donatelle et al. 2007). Nevertheless, in the current study, the sharing of employers among farms was not a significant risk factor. Animal movement and migration of workers in dairy farms were considered as major causes of VACV spread in Brazilian Amazon biome (Quixabeira-Santos et al. 2011), whereas milk truck was indicated as a probable route of transmission and dissemination of this poxvirus in outbreaks diagnosed in Midwestern Brazil (Sant'Ana et al. 2013). Other authors showed that an inadequate destination of garbage in public collection site was associated to VACV-positive seroprevalence (Peres et al. 2013). In the current study, there were no significant associations between seropositivity and animal trade or delivery of milk. However, we observed higher positivity in large farms housing a high number of animals. Another recent study performed in DF indicated that the circulation and introduction of infected cattle of neighboring states can be an important epidemiological factor to the disease (Alonso et al. 2020). In addition, DF is an important route of animal transport among Brazilian states of the Southeast, Midwest and Northeast.

The current study has showed that consumption of raw milk is common in 30% of farms in DF. This situation represents an important risk to the local public health. Scientific evidence indicates a possible animal and human infection by ingestion of VACV contaminated milk (Rehfeld et al. 2015). Infectious particles and/or DNA of the VACV have already been detected in milk of cows naturally (Abrahão et al. 2009) and experimentally (Oliveira et al. 2015) infected, besides milk experimentally infected and subjected to heat treatment (Oliveira et al. 2010). Furthermore, there is a risk for humans associated with the consumption or manipulation of contaminated cheese (Rehfeld et al. 2017, Oliveira et al. 2017). In the current study, there was no significant relationship between the farm positivity and the manipulation of cheese and their derivatives by farmers. However, significant association between seropositivity and the

non-production of dairy derivatives was observed ($p < 0.05$), but this association does not seem to have biological significance.

Wild rodents have been considered as possible reservoirs and transmitters of the disease and risk factors to the infection (Abrahão et al. 2009; D'Anunciação et al. 2012; Peres et al. 2013; Peres et al. 2018; Silva et al. 2018). Moreover, other domestic and wild animals, such as dogs, cats, horses, opossums, coati, marsupials, pigs, rabbits, sheep, and monkeys also appear to be linked to the VACV transmission cycle (Brum et al. 2010; Peres et al. 2013; Peres et al. 2016; Borges et al. 2017; Miranda et al. 2017; Costa et al. 2018). In the present study, there was correlation only between seropositivity and the presence of sheep and goats ($p < 0.05$), but this significance does not seem to have biological relevance, since these animals do not seem to act as reservoirs or hosts to BV. In addition, there are no prevalence data related to bovine poxviruses in small ruminants of the region.

The current study showed that veterinary assistance is not common in cattle farms in DF. No beef and mixed positive farms claimed to have at the moment of study this kind of assistance. When veterinary assistance occurs on the farms, management and prophylaxis are generally more appropriate, and according to Megid et al. (2008), the percentage of infection by VACV is directly correlated with the introduction of control measures in the property. The technification of the farms, including mechanized milking, is another factor considered positive for minimizing infections by VACV (Borges et al. 2017).

The serological results of the current study indicate the circulation of VACV in the cattle herds from DF, although no clinical case of BV had been officially notified in the region in 2015 (Alonso et al. 2020). Thus, according to the considerable seropositivity for VACV and current viral circulation in the region, more epidemiological studies are needed to provide additional data that elucidate the origin, zoonotic potential, dissemination dynamics of BV and possible domestic and wild reservoirs, as has been studied in other regions (Abrahão et al. 2009).

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the veterinary team from SEAGRI for their excellent technical support, and to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for the doctoral scholarship of the first author. Financial support was provided by Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAP-DF) (Grant 0193.001584/2017). E.F. Flores and

V.S.P. Gonçalves are Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) research fellows.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declared that there is no potential conflict of interest.

REFERENCES

- Abrahão, J.S., Oliveira, T.M.L., Campos, R.K., Madureira, M.C., Kroon, E.G., Lobato, Z.I.P. 2009. Bovine Vaccinia Outbreaks: Detection and Isolation of Vaccinia Virus in Milk Samples. *Foodborne pathogens and disease*. 6(9):1141-1146. DOI: 10.1089/fpd.2009.0324.
- Alonso, R.C., Moura, P.P., Caldeira, D.F., Mendes, M.H.A.F., Pinto, M.F.B.P., Cargnelutti, J.F., Flores, E.F., Sant’Ana, F.J.F. 2020. Poxviruses diagnosed in cattle from Distrito Federal, Brazil (2015-2018). *Transboundary and Emerging Diseases*. 67(4):1563-1573. <https://doi.org/10.1111/tbed.13490>
- Assis, F.L., Vinhote, W.M., Barbosa, J.D., de Oliveira, C.H.S., de Oliveira, C.M.G., Campos, K.F., Silva, N.S., Trindade, G.S., Abrahão, J.S., Kroon, E.G. 2013. Reemergence of Vaccinia Virus during Zoonotic Outbreak, Pará State, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*. 19(12):2017-2020. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1912.130589>.
- Assis, F.L., Franco-Luiz, A.P., Paim, L.M., Oliveira, G.P., Pereira, A.F., de Almeida, G.M.F., Figueiredo, L.B., Tanus, A., Trindade, G.S., Ferreira, P.P., Kroon, E.G., Abrahão, J.S. 2015. Horizontal study of vaccinia virus infections in an endemic area: epidemiologic, phylogenetic and economic aspects. *Archives of Virology*. 160(11):2703-2708. DOI: 10.1007/s00705-015-2549-1.
- Bhanuprakash, V., Hosamani, M., Venkatesan, G., Balamurugan, V., Yogisharadhya, R., Singh, R.K. 2012. Animal poxvirus vaccines: a comprehensive review. *Expert Review of Vaccines*. 11(11):1355–1374. DOI: 10.1586/erv.12.116
- Borges, I.A., McCollum, A.M., Mehal, J.M., Haberling, D., Dutra, L.A.L., Vieira, F.N., Andrade, L.A.O., Kroon, E.G., Holman, R.C., Reynolds, M.G., Trindade, G.S. 2017. Dairy production practices and associated risks for bovine vaccinia exposure in cattle, Brazil. *New Microbes and New Infections*. 20(C):43-50. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2017.08.004>
- Borges, M.B., Kato, S.E.M., Damaso, C.R.A., Moussatché, N., Freire, M.S., Passos, S.R.L., do Nascimento, J.P. 2008. Accuracy and repeatability of a micro plaque reduction neutralization test for vaccinia antibodies. *Biologicals*. 36(2):105-110. DOI: 10.1016/j.biologicals.2007.07.001
- Brum, M.C.S., Anjos, B.L., Nogueira, C.E.W., Amaral, L.A., Weiblen, R., Flores, E.F. 2010. An outbreak of orthopoxvirus-associated disease in horses in southern Brazil. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 22:143–147. DOI: 10.1177/104063871002200132

Campos, R.K., Brum, M.C.S., Nogueira, C.E.W., Drumond, B.R., Alves, P.A., Siqueira-Lima, L., Assis, F.L., Trindade, G.S., Bonjardim, C.A., Ferreira, P.C., Weiblen, R., Flores, E.F., Kroon, E.G., Abrahão, J.S. 2011. Assessing the variability of Brazilian Vaccinia virus isolates from a horse exanthematic lesion: coinfection with distinct viruses. *Archives of Virology*. 156(2):275–283. DOI: 10.1007/s00705-010-0857-z.

Canal, C.W. 2007. Poxviridae. In: Flores, E.F. *Virologia veterinária*. Editora da Universidade Federal de Santa Maria. v.1, p. 491-509.

Cargnelutti, J.F., Schmidt, C., Masuda, E.K., Braum, L.D., Weiblen, R., Flores, E.F. 2012. Vaccinia viruses isolated from cutaneous disease in horses are highly virulent for rabbits. *Microbial Pathogenesis*. 52(3):192-9. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2011.12.005>

Costa, G.B., de Almeida, L.R., Cerqueira, A.G.R., Mesquita, W.U., de Oliveira, J.S., Miranda, J.B., Saraiva-Silva, A.T., Abrahão, J.S., Drumond, B.P., Kroon, E.G., Pereira, P.L.L., Soares, D.F.M., Trindade, G.S. 2018. Vaccinia Virus among Domestic Dogs and Wild Coatis, Brazil, 2013–2015. *Emerging Infectious Diseases*. 24(12):2338-2342. DOI: 10.3201/eid2412.171584

Costa, R.V.C. 2008. Estudo Clínico-Epidemiológico de Surtos de Poxvirose Bovina e Humana na Região Sul do Estado do Rio de Janeiro. [Dissertação]. Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. 78f.

D’Anunciação, L., Guedes, M.I.M., Oliveira, T.L., Rehfeld, I., Bonjardim, C.A., Ferreira, P.P., Trindade, G.S., Lobato, Z.I.P., Kroon, E.G., Abrahão, J.S. 2012. Experimental evidence of horizontal transmission of *Vaccinia virus* between bovines and rodents. *Vector-Borne and Zoonotic Disease*. 12(1):61-64. DOI: 10.1089/vbz.2011.0671.

Donatelle, D.M., Travassos, C.E.P.F., Leite, J.A., Kroon, E.G. 2007. Epidemiologia da poxvirose bovina no Estado do Espírito Santo, Brasil. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. São Paulo. 44(4):275-282. <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2007.26628>

Francisco, P.F.C. 2008. Caracterização do ambiente pecuário e análise de prevalência de brucelose e tuberculose bovinas no Distrito Federal. [Monografia]. Brasília: Universidade de Brasília, Brasília. Curso de Graduação em Medicina Veterinária. 36p.

Franco-Luiz, A.P.M., Fagundes-Pereira, A., Costa, G.B., Alves, P.A., Oliveira, D.B., Bonjardim, C.A., Ferreira, P.C.P., Trindade, G.S., Panei, C.J., Galosi, C.M., Abrahão, J.S., Kroon, E.G. 2014. Spread of Vaccinia Virus to Cattle Herds, Argentina, 2011. *Emerging Infectious Diseases*. 20(9):1576-1578. <http://dx.doi.org/10.3201/eid2009.140154>.

Franco-Luiz, A.P.M., Oliveira, D.B., Pereira, A.F., Gasparini, M.C.S., Bonjardim, C.A., Ferreira, P.C.P., Trindade, G.S., Puentes, R., Furtado, A., Abrahão, J.S., Kroon, E.G. 2016. Detection of Vaccinia Virus in Dairy Cattle Serum Samples from 2009, Uruguay. *Emerging Infectious Diseases*. 22(12):2174-2177. DOI: 10.3201/eid2212.160447

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). 2015. Pesquisa Pecuária Municipal. Tabela 3939: efetivo dos rebanhos, por tipo de rebanho. Available in <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3939>, accessed in 24/01/2020.

Kroon, E.G., Mota, B.E., Abrahão, J.S., Fonseca, F.G., Trindade, G.S. 2011. Zoonotic Brazilian Vaccinia virus: from field to therapy. *Antiviral Research*. 92(2):150-163. DOI:10.1016/j.antiviral.2011.08.018.

Laguardia-Nascimento, M., de Oliveira, A.P.F., Azevedo, I.C., Rivetti Júnior, A.V., Camargos, M.F., Fonseca Júnior, A.A. 2017. Spread of poxviruses in livestock in Brazil associated with cases of double and triple infection. *Archives of Virology*. 162(9):2797-2801. DOI: 10.1007/s00705-017-3407-0.

Leite, J.A., Drumond, B.P., Trindade, G.S., Lobato, Z.I.P., Fonseca, F.G., Santos, J.R., Madureira, M.C., Guedes, M.I.M.C., Ferreira, J.M.S., Bonjardim, C.A., Ferreira, P.C.P., Kroon, E.G. 2005. Passatempo virus, a vaccinia virus strain, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*. 11(12):1935-1941. DOI: 10.3201/eid1112.050773

Lobato, Z.I.P., Trindade, G.S., Frois, M.C.M., Ribeiro, E.B.T., Dias, G.R.C., Teixeira, B.M., Lima, F.A., Almeida, G.M.F., Kroon, E.G. 2005. Surto de varíola bovina causada pelo vírus vaccínia na região da Zona da Mata Mineira. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 57(4):423-429. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352005000400001>

Mauldin, E.A., Kennedy, P. 2016. Integumentary system. In: Jubb VF, Kennedy PC, Palmer NC. *Pathology of Domestic Animals*. 6 ed. Missouri: Elsevier, v. 1, p. 509-736

Megid, J., Appolinário, C.M., Langoni, H., Pituco, E.M., Okuda, L.H. 2008. Vaccinia virus in humans and cattle in southwest region of São Paulo State, Brazil. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 79(5):647-651. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2008.79.647>

Miranda, J.B., Borges, I.A., Campos, S.P.S., Vieira, F.N., de Ázara, T.M.F., Marques, F.A., Costa, G.B., Luis, A.P.M.F., de Oliveira, J.S., Ferreira, P.C.P., Bonjardim, C.A., da Silva, S.L.M., Eiras, A.E., Abrahão, J.S., Kroon, E.G., Drumond, B.P., Paglia, A.P., Trindade, G.S. 2017. Serologic and Molecular Evidence of Vaccinia Virus Circulation among Small Mammals from Different Biomes, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*. 23(6):931-938. DOI: <https://dx.doi.org/10.3201/eid2306.161643>

Mota, B.E.F., Trindade, G.S., Diniz, T.C., da Silva-Nunes, M., Braga, E. M., Urbano-Ferreira, M., Rodrigues, G.O.L., Bonjardim, C.A., Ferreira, P.C.P., Kroon, E.G. 2010. Seroprevalence of orthopoxvirus in an Amazonian rural village, Acre, Brazil. *Archives of Virology*. 155:1139–1144. <https://doi.org/10.1007/s00705-010-0675-3>

Nascimento, G.T. 2015. Prevalência e Fatores de Risco da Tuberculose Bovina no Distrito Federal, Brasil. [Dissertação]. Brasília: Universidade de Brasília. Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. 66p.

Oliveira, T.M.L., Rehfeld, I.S., Siqueira, J.M.F., Abrahão, J.S., Campos, R.K., dos Santos, A.K.R., Cerqueira, M.M.O.P., Kroon, E.G., Lobato, Z.I.P. 2010. Vaccinia Virus Is Not Inactivated After Thermal Treatment and Cheese Production Using Experimentally Contaminated Milk. *Foodborne pathogens and disease*. 7(12):1491-1496. DOI: 10.1089/fpd.2010.0597.

Oliveira, T.M.L., Guedes, M.I.M.C., Rehfeld, I.S., Matos, A.C.D., Rivetti Júnior, A.V., Alves, P.A., Galinari, G.C.F., Cerqueira, M.M.O.P., Abrahão, J.S., Lobato, Z.I.P. 2015. Detection of

Vaccinia Virus in Milk: Evidence of a Systemic and Persistent Infection in Experimentally Infected Cows. *Foodborne pathogens and disease*. 12(11):898-903. DOI: 10.1089/fpd.2015.1974.

Oliveira, T.M.L., Guedes, M.I.M.C., Rehfeld, I.S., Matos, A.C.D., Rivetti Júnior, A.V., da Cunha, A.F., Cerqueira, M.M.O.P., Abrahão, J.S., Lobato, Z.I.P. 2017. Vaccinia virus detection in dairy products made with milk from experimentally infected cows. *Transboundary and Emerging Diseases*. 1–8. DOI: 10.1111/tbed.12666.

Peres, M.G., Bacchiega, T.S., Appolinário, C.M., Vicente, A.F., Allendorf, S.D., Antunes, J.M.A.P., Moreira, A.S., Legatti, E., Fonseca, C.R., Pituco, E.M., Okuda, L.H., Pantoja, J.C.F., Ferreira, F., Megid, J. 2013. Serological study of vaccinia virus reservoirs in áreas with and without official reports of outbreaks in cattle and humans in São Paulo, Brazil. *Archives of Virology*. 158(12):2433–2441. DOI: 10.1007/s00705-013-1740-5.

Peres, M.G., Barros, C.B., Appolinário, C.M., Antunes, J.M.A.P., Mioni, M.S.R., Bacchiega, T.S., Allendorf, S.D., Vicente, A.F., Fonseca, C.R., Megid, J. 2016. Dogs and Opossums Positive for Vaccinia Virus during Outbreak Affecting Cattle and Humans, São Paulo State, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*. 22(2):271-273. <http://dx.doi.org/10.3201/eid2202.140747>.

Peres, M.G., Bacchiega, T.S., Appolinário, C.M., Vicente, A.F., Mioni, M.S.R., Ribeiro, B.L.D., Fonseca, C.R.S., Pelícia, V.C., Ferreira, F., Abrahão, J.S., Megid, J. 2018. Vaccinia virus in Feces and Urine of Wild Rodents from São Paulo State, Brazil. *Viruses*. 10(2):51; doi:10.3390/v10020051

Quixabeira-Santos, J.C., Medaglia, M.L.G., Pescador, C.A., Damaso, C.R. 2011. Animal movement and establishment of Vaccinia virus Cantagalo strain in Amazon biome, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*. 17, 726-729. DOI: 10.3201/eid1704.101581

Rehfeld, I.S., Guedes, M.I.M.C., Fraiha, A.L.S., Costa, A.G., Matos, A.C.D., Flúza, A.T.L., Lobato, Z.I.P. 2015. Vaccinia virus Transmission through Experimentally Contaminated Milk Using a Murine Model – Researche article. *PLoS ONE*. 10(5): e0127350. DOI: 10.1371/journal.pone.0127350.

Rehfeld, I.S., Matos, A.C.D., Guedes, M.I.M.C., Costa, A.G., Fraiha, A.L.S., Lobato, Z.I.P. 2017. Subclinical bovine vaccinia: An important risk factor in the epidemiology of this zoonosis in cattle. *Research in Veterinary Science*. 114:233–235. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.03.022>.

Riet-Correa, F., Moojen, V., Roehe, P.M., Weiblen, R. 1996, Viroses confundíveis com febre aftosa. *Ciência Rural*. 26(2):323-332. ISSN 0103-8478.

Sant’Ana, F.J.F., Leal, A.A., Rabelo, R.E., Vulcani, V.A.S., Ferreira Jr., J.A., Cargnelutti, J.F., Flores, E.F. 2013. Outbreaks of vesicular disease caused by *Vaccinia virus* in dairy cattle from Goiás State, Brazil (2010-2012). *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 33(7):860-866. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2013000700006>

Schatzmayr, H.G., Costa, R.V.C., Gonçalves, M.C.R., Barreto, D.F., Batista, V.H., Silva, M.E.V., Brust, L.A.C., Barth, O.M. 2009. Human infections caused by vaccinia like poxviruses

in Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 42(6):672-676. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822009000600012>

Schatzmayr, H.G., Costa, R.V.C., Gonçalves, M.C.R., Andréa, P.S.D., Barth, O.M. 2011. Human and animal infections by vaccinia-like viruses in the state of Rio de Janeiro: A novel expanding zoonosis. *Vaccine*. 29S. 4:D65– D69. DOI:10.1016/j.vaccine.2011.09.105.

Silva, T.G., Lima, M.S., de Castro, A.M.M.G., Martins, M.S.N., Castiglioni, V.C., Fava, C.D., Okuda, L.H., Pituco E.M. 2018. Bovine Vaccinia in dairy cattle and suspicion of vesicular disease on milkers in Brazil. *Ciência Rural*. 45(05):e20180723. <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20170723>

Trindade, G.S., Fonseca, F.G., Marques, J.T., Nogueira, M.L., Mendes, L.C.N., Borges, A.S., Peiró, J.R., Pituco, E.M., Bonjardim, C.A., Ferreira, P.C.P., Kroon, E.G. 2003. Araçatuba virus: a vaccinia-like virus associated with infecton in humans and cattle. *Emerging Infectious Diseases*. 9(2):155-160. DOI: 10.3201/eid0902.020244

Trindade, G.S., Lobato, Z.I.P., Drumond, B.P., Leite, J.A., Trigueiro, R.C., Guedes, M.I.M.C., Kroon, E.G. 2006. Short report: Isolation of two vaccinia virus strains from a single bovine vaccinia outbreak in rural area from Brazil: Implications on the emergence of zoonotic orthopoxviruses. *The American Journal of Tropical. Medicine and Hygiene*. 75(3):486–490. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2006.75.486>

Trindade, G.S., Drumond, B.P., Guedes, M.I.M.C., Leite, J.A., Mota, B.E.F., Campos, M.A., Fonseca, F.G., Nogueira, M.L., Lobato, Z.I.P., Bonjardim, C.A., Ferreira, P.C.P., Kroon, E.G. 2007. Zoonotic *Vaccinia virus* infection in Brazil: Clinical description and implications for health professionals. *Journal of Clinical Microbiology*. 45(4):1370-1372. DOI:10.1128/JCM.00920-06.

CAPÍTULO 3

(Artigo a ser submetido a “Transboundary and Emerging Diseases”)

Retrospective study of poxviruses diagnosed in cattle from Goiás State, Brazil (2010-2018)

Lorena Ferreira Silva¹, Antônio do Amaral Leal², Paulo Henrique Jorge da Cunha³, Juliana Felipetto

Cargnelutti⁴, Eduardo Furtado Flores⁴, Fabiano José Ferreira de Sant’Ana⁵

1. Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia, GO, Brazil

2. Agência Goiana de Defesa Agropecuária, Goiânia, GO, Brazil

3. Escola de Veterinária e Zootecnia, UFG, Goiânia, GO, Brazil

4. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil

5. Laboratório de Diagnóstico Patológico Veterinário, UnB, Brasília, DF, Brazil

SUMMARY

A retrospective study of poxvirus infections diagnosed in cattle from Goiás (GO), Brazil, between 2010 and 2018 was performed. All cases have been investigated by the GO Official Veterinary Service (Agrodefesa), from which technical forms and protocols of laboratories of veterinary diagnosis were reviewed. In the most cases, samples of oral or cutaneous tissues and/or swabs were submitted to virological diagnosis by PCR. Thirty-seven outbreaks of suspected vesicular disease in cattle were notified in 25 counties of the state, and 33 cases presented lesions clinically compatible with poxviruses. The etiology of 25 out of 33 outbreaks was confirmed as poxviruses by PCR and viral isolation: 13 as bovine vaccinia (BV), 6 as pseudocowpox (PCP), 5 as bovine papular stomatitis (BPS) and 1 coinfection (VACV and Orf virus-like parapoxvirus). The laboratory confirmed cases were observed mainly in dairy cattle (19/25) and during the dry season (22/25). In adult cattle, gross changes were observed mainly in the teats and udder. The lesions included vesicles, ulcers, crusts, papules and scars and varied of type, severity and affected region, depending on the poxvirus species. The main lesions in calves included ulcers in the mouth and muzzle. Human infections compatible with poxviruses were observed in all reported poxvirus species, particularly affecting the hands of milkers and other farm workers. Our data demonstrate the sanitary and economic relevance of these diseases and the wide circulation of different poxviruses in cattle from GO.

INDEX TERMS: diseases of cattle, PCPV, BPSV, poxviruses, VACV.

1. INTRODUCTION

Vesicular diseases affecting cattle are caused by a group of viruses that present relevant sanitary and economic importance around the world, such as foot-and-mouth disease (FMD), vesicular stomatitis (VS), bovine vaccinia (BV), bovine papular stomatitis (BPS), herpetic mammillitis (BHM) and pseudocowpox (PCP). Malignant catarrhal fever and bovine viral diarrhea (mucosal disease) should also be included in the differential diagnosis, because they may cause similar cutaneous, mucous and mucocutaneous lesions (Riet-Correa et al., 1996; Mauldin & Kennedy, 2016). Among these diseases, FMD is considered the most important vesicular disease, due to the serious restrictions and economic embargoes imposed to countries that have confirmed cases of the infection in their herds (Riet-Correa et al., 1996; Lubroth, 2002).

Among vesicular diseases, outbreaks of poxvirus associated disease have been reported in recent years, affecting usually dairy cows and milkers, in some Brazilian regions, mainly BV in Southeast (Trindade et al., 2003; Leite et al., 2005; Lobato et al., 2005; Trindade et al., 2007; Schatzmayr et al., 2009), PCP in Northern (Cargnelutti et al., 2014) and Southern (Cargnelutti et al., 2012), and BPS in Northern (Cargnelutti et al., 2014). Furthermore, cases of coinfection with two or three distinct poxviruses have been reported in some regions of the country (Trindade et al., 2006; Campos et al., 2011; Laguardia-Nascimento et al., 2017).

At the beginning of the current century, the first isolated studies confirming infections by poxvirus in cattle from Brazilian Midwestern were published (Nagasse-Sugahara et al., 2004). Recently, an additional study performed in Distrito Federal demonstrated that vaccinia virus (VACV) is the most common poxvirus of cattle in this region, followed by pseudocowpox virus (PCPV), bovine papular stomatitis virus (BPSV), and coinfection by PCPV and BPSV (Alonso et al., 2020).

Goiás is a Brazilian Midwestern state that currently has more than 22 million of cattle and it is considered the fourth largest dairy producer of Brazil (IBGE, 2020). In addition to the public health and economic importance, the lack of field and laboratorial data affects the knowledge about the epidemiology of these infections in the state. Furthermore, official data about the occurrence, morbidity and epidemiology of poxviruses affecting cattle in Goiás state is scarce. Thus, the current study aimed to characterize the epidemiological, clinical and pathological aspects of poxviruses diagnosed in cattle in Goiás State, Brazil, during nine years (2010-2018).

2. MATERIALS AND METHODS

A retrospective and descriptive study of cases of bovine poxviruses diagnosed and notified in Goiás, between 2010 and 2018, was performed. These data were kindly provided by the Program of Animal Sanity of Agência Goiana de Defesa Agropecuária (Agrodefesa), from Goiás, Brazil. The cases were diagnosed by notification of farmers, veterinarians or general population to Agrodefesa (passive surveillance). After official communication, technical visits were performed in farms to investigate and confirm vesicular lesions in cattle. In addition, protocols and reports of Laboratório de Patologia Veterinária (LPV) of Universidade Federal de Jataí (UFJ), of Laboratório de Diagnóstico Patológico Veterinário (LDPV) of Universidade de Brasília (UnB), and technical forms of Agrodefesa were reviewed. These documents had detailed information about each case/outbreak occurring in Goiás, such as species, age, sex, breed, clinical signs, epidemiological data [locality, period of the year, type of activity (dairy, beef and mixed) and morbidity data], laboratorial findings, gross changes, definitive diagnosis and human involvement.

During the technical visits to farms, at least 5-8% of the herd was clinically examined. When animals presented gross lesions compatible with poxviruses (vesicles, papules, pustules, ulcers, scabs or scars), swabs and fragments of the lesions (approx. 0.8cm²) were collected, after physical restraint and local anesthesia (2-5 mg/kg of lidocaine chloride 2%). These samples were stored in isothermal boxes and immediately sent to the laboratory to perform virological diagnosis, where they were stored at -80°C. All collected cases were evaluated by Agrodefesa veterinarians who did not consider a probable case of target vesicular disease, such as FMD and VS.

Seventeen cases were submitted to quantitative conventional PCR in the Laboratório de Virose de Bovídeos (LVB) of the Instituto Biológico (BI), in São Paulo, Brazil, according to Silva et al. (2018). Virological diagnosis was performed by multiplex PCR in eight cases, for simultaneous detection of bovine papular stomatitis virus (BPSV), pseudocowpox virus (PCPV), VACV and bovine alphaherpesvirus 2 (BoHV-2), in the Setor de Virologia of the Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brazil, according to Cargnelutti et al. (2017).

This study was approved according to the Ethical Principles of Animal Care and Research and under Ethics Committee on Animal Use (CEUA) (protocol number 122/17) and by the Ethics and Research Committee (CEP) (number report 2.509.406), Federal University of Goiás, Brazil.

All form-ins (Agrodefesa) and protocols / reports from the archives of the two laboratories (LPV/UFJ and LDPV/UnB) in the above-mentioned period were reviewed. With this, information was acquired for each case/outbreak, corresponding to age, sex, clinical signs, epidemiological data (county, time of the year, type of breeding, morbidity rates, among others), macroscopic lesions and definitive diagnosis. In addition, data referring to humans (milkers) who have developed similar vesicular / pustular lesions were also analyzed (number of susceptible and affected, age, sex, location and type of lesions, evolution and symptoms).

3. RESULTS

Thirty-seven outbreaks of vesicular disease in cattle were notified in 25 counties of the state, during the evaluation period. Twenty-five outbreaks were diagnosed as associated with poxviruses: 13 as VACV, 6 as PCPV, 5 as BPSV and one coinfection (VACV and Orf virus-like parapoxvirus). Eight outbreaks presented epidemiological, clinical and pathological findings highly compatible with poxviruses, including concomitant human infection, however there were no virological/molecular etiologic confirmation. In addition, other four cases were interpreted as associated to some mechanical/traumatic factor.

The positive cases were identified mainly in the South mesoregion (16/25), followed by Center (4/25), Northwest (3/25), East (1/25), and North (1/25) (Fig. 1) (Tab. 1). Figure 2 shows the distribution of these diseases per evaluated year. During the technical visits to the farms, other domestic animals (such as pigs, goats, sheep, and horses), were clinically evaluated and none presented oral and/or cutaneous lesions. Considering general data, independently of the diagnosed poxvirus, dairy cattle were more affected (19/25), followed by mixed (3/25) and beef (1/25). In two cases (2/25), the breeding system was not informed. Furthermore, the positive cases were concentrated mainly in the dry season (22/25), which occurs approximately between April and October.

Eight out of 13 outbreaks of BV were published previously (Sant'Ana et al., 2013a). Table 2 presents the epidemiological and clinical data of the additional outbreaks (five) of these poxviruses. The cases occurred in the mesoregions Center (Iporá, Ouro Verde de Goiás, Uruanã), Northwest (Santa Fé de Goiás), and South (Joviânia), with one outbreak in each county. Breeding systems of the farms with positive cases included three dairy and two mixed activity. Four outbreaks occurred in the dry season and another one in the rainy season.

In all outbreaks of BV, some epidemiological factors could be associated with the disease, such as the transit of milk trucks and people that simultaneously worked in many farms. In one outbreak, cattle presented lesions after the introduction of a new pelleted food to the

animals. Cows (3-10 years) and calves (1-8 months) represented the affected categories. Gross changes consisted mainly on focal or multifocal lesions, such as ulcers (4/5), vesicles (3/5), and crusts (3/5) and, less commonly, macules, in the teat and udder. Ulcers restricted to the mouth, tongue or muzzle were observed in calves, with clinical course ranging from 12 to 20 days.

Cases of human infection in milkers or other farm's workers were detected in three out of five outbreaks of BV, making up nine human cases. The symptoms included body pain, general malaise, headache, fever and localized lesions in hands, fingers, mouth and arms, such as ulcers and crusts. In one outbreak, the farm was notified and investigated only after the affected milkers sought to medical assistance in the municipality. In this outbreak, the wife of one sick milker also presented ulcerative lesions in her mouth. In some cases, these workers remained 2-4 days away from work.

Six outbreaks of PCPV-associated disease were diagnosed in all mesoregions: two in Northwest (São Miguel do Araguaia, Faina), one in North (Uruaçu), one in Center (Ceres), one in East (Cocalzinho de Goiás), and another one in South (Piracanjuba) (Table 3). Most cases (4/6) occurred in the dry season. Three outbreaks (3/6) were diagnosed in dairy cattle affecting cows and calves, and only one occurrence was observed in beef steers. There was no information of the breeding system in two outbreaks. Vehicles, including milk truck, transit of workers among farms and proximity with highway were implicated with possible sources of infection in one outbreak. The gross lesions observed were ulcers (1/6), scars (2/6) and crust (2/6) in the teat and udder of cows and ulcers in the muzzle and mouth of calves. Multifocal ulcers affecting the gum and the ventral aspect of the tongue were detected in an outbreak in beef cattle. Human infection was observed only a one outbreak, in which one milker presented pustules in his finger after contact with affected cattle.

Four out of five outbreaks of BPS were reported previously (Sant'Ana et al., 2012). The fifth outbreak occurred in the mesoregion South (Jataí), in October 2014 (dry season). Only one adult cow of a farm with mixed activity presented multifocal crusted ulcers affecting udder and teat, for 12 days. There were no human cases in this outbreak.

In addition, one additional outbreak of coinfection by two poxvirus (VACV and Orf virus-like parapoxvirus) was confirmed in dairy cows with human infection in Jataí (South mesoregion). This last outbreak have been published previously (Sant'Ana et al., 2013b).

In 13 out of 37 cases notified, some of which were suspected (5/13) and others confirmed (8/13) poxviruses, the measures adopted on the property by the local official veterinary service included temporary interdiction of the farms, isolation of animals with clinical lesions and disinfection and/or cleaning of the teats.

4. DISCUSSION

A retrospective study of cases of bovine poxviruses that occurred in a Brazilian state with high importance for livestock and dairy and beef industry was carried out. Some cases have already been published, but due to the great relevance to the data of the study, they were included in the discussion.

The epidemiological, clinical and pathological findings of the 37 investigated notifications of vesicular and exanthematic disease in cattle were compatible with the suspicion of poxviruses, yet the virological diagnosis was confirmed in 67.57% (25/37) of the outbreaks. Eight outbreaks with highly similar epidemiological and pathological characteristics, including human infections, had no virological confirmation. Possibly, some problem related to sample collection and/or conservation may have compromised the laboratory diagnosis. In addition, other infectious diseases could be involved in these cases, such as malignant catarrhal fever, bovine viral diarrhea (mucosal disease) and infection by BoHV-2.

In the last decades, cases/outbreaks of poxvirus infections have been diagnosed in cattle in various countries, including Brazil. In this country, scattered outbreaks of these diseases affecting one or few farms have been reported, especially in Southeast region (Trindade et al., 2003; Leite et al., 2005; Lobato et al., 2005; Megid et al., 2008). Recent study demonstrated the presence of these poxviruses in cattle from a region of Brazil Midwestern, Distrito Federal (Alonso et al., 2020). VACV was the most common poxvirus diagnosed in this region, between 2015 and 2018 (Alonso et al., 2020). For the first time, a large investigation evaluating epidemiological and pathological aspects of bovine poxviruses was performed in Goiás state using official data and results of passive surveillance in all mesoregions of the state. Considering the general data, dairy cattle was the more affected category (76%), followed by mixed (12%) and beef (4%).

Out of the cases with etiologic confirmation in the current study, VACV was the most frequent poxvirus (52%), followed by PCPV (24%) and BPSV (20%). Other additional cases of mixed infection by VACV and Orf virus-like parapoxvirus (4%) were identified. A recent study performed in a neighboring Brazilian federative unit showed that the same poxvirus infect cattle of the region with very similar frequencies: 51.92% to VACV, 17.31% to PCPV, 15.38% to BPSV and 9.62% to coinfection (PCPV/BPSV) (Alonso et al., 2020). Outbreaks of bovine parapoxviruses have also been diagnosed in other Brazilian regions (Cargnelutti et al., 2012; Cargnelutti et al., 2014) and in other countries, such as United States (Moeller Jr. et al., 2018),

Japan (Inoshima et al., 2009), Turkey (Şevik, 2019), South Korea (Oem et al., 2013) and Bangladesh (Lederman et al., 2014).

In the current study, the positive cases were observed in all mesoregions of the state, demonstrating that these poxviruses circulate widely in the local bovine herds, but most cases were concentrated in South mesoregion. Similar data were detected in a study performed in a federative unit neighbor to Goiás (Alonso et al., 2020). Probably, highest notification of cases in the southern mesoregion occurred because this zone is one of the regions with the highest dairy productivity in the state. In the last years, the southern and eastern mesoregions had the greatest growth in the dairy activity, and the central and southern regions were the ones that obtained the greatest productivity per cow between 2002 and 2011 (Silva and Silva, 2014). Other important aspect is that there is frequent circulation and transport of cattle to other neighboring states to Goiás, such as Minas Gerais, Bahia, São Paulo and Distrito Federal, where spontaneous outbreaks of these poxviruses were notified in the last decades (Lobato et al., 2005; Assis et al., 2015; Laguardia-Nascimento et al., 2017; Alonso et al., 2020).

In all poxviruses, a greater number of cases were observed during the dry season. Probably, this seasonal character is related to greater possibility of trauma in the teats in dry season, due to the dryness of the skin (Lobato et al., 2005; Assis et al., 2015). BV was diagnosed in three mesoregions, but predominantly in South. Most cases was observed in dairy cattle (11/13) in the dry season (12/13), as detected by other (Leite et al., 2005; Lobato et al., 2005; Assis et al., 2015; Silva et al., 2018; Alonso et al., 2020). The clinical course varied of 12 to 45 days and the lesions consisted mainly of vesicles, ulcers and crusts affecting the teat and udder of cows. In calves, crusted ulcerative lesions predominated in muzzle and mouth (palate and gum). In eleven outbreaks (11/13), milkers that had close contact with the affected animals developed concomitant vesicular disease. Very similar clinical and pathological findings were also detected previously in cattle and humans of other regions (Trindade et al., 2003; Lobato et al., 2005; Schatzmayr et al., 2009). In a recent study, cows and heifers presented predominantly VACV-associated oral lesions (Alonso et al., 2020), and occasionally, vulvar papular lesions have been described in cows infected by VACV (Moeller Jr et al., 2018; Alonso et al., 2020).

In the current study, the transit of milk trucks among farms and people that simultaneously worked in many affected farms were considered important risk factors to BV, as noticed previously (Lobato et al., 2005). Other studies have noted a relation between VACV infection and the probable transmission of the virus in milk tanks (Lobato et al., 2005) and waste transportation to a public collection site (Peres et al., 2013). According to a study

performed in Amazon biome investigating the causes of VACV outbreaks in the region, the main cause of the spread of viruses at a distance was the movement of animals, while the migration of dairy workers was involved in focal dissemination (Quixabeira-Santos et al., 2011).

Humans, mainly milkers (in some cases, its close relatives), presented classic poxvirus lesions in 11 out of 13 outbreaks of VACV, totaling 20 affected people. Main symptoms included painful lesions in the hands, neck and face. Similar symptomatology has been described in other outbreaks with human involvement (Nagasse-Sugahara et al., 2004; Megid et al., 2008; Silva et al., 2008; Schatzmayr et al., 2009). In comparison with other zoonotic vesicular diseases, BV appears to affect more severely humans having contact with affected cattle (Büttner & Rziha, 2002; Silva-Fernandes et al., 2009). In the current study, the affected milkers stayed two or four days out of work under medical care. These data shows the zoonotic importance of this disease in this Brazilian region. In addition, VACV appears to have a horizontal transmission capacity between humans. This horizontal transmission had already been reported in other studies (Lobato et al., 2005; Batista et al., 2009; Oliveira et al., 2014), and was noted in two outbreaks of the current study.

PCPV infection was the unique poxvirus diagnosed in all mesoregions of the state. The disease occurred predominantly in the dry season, specially affecting dairy cows and, less frequently, calves and steers. Gross changes included ulcerative and crusted lesions in the teat and udder of cows and oral ulcers in calves. Similar lesions have been observed in other investigations (Cargnelutti et al., 2014; Lederman et al., 2014). In some cases, chronic inter-digital ulcerative changes can occur (Alonso et al., 2020). In addition, ulcers affecting the gum and tongue of beef steers were noted in an outbreak of the current study.

There was only one outbreak with PCPV-associated human cases. Zoonotic lesions caused by bovine parapoxviruses appear to be less severe comparing with VACV. Usually, local injuries on the hands and fingers which can be aggravated by secondary bacterial infection are observed (Buttner and Rziha, 2002; Lemos and Riet-Correa, 2007).

In the current study, the five outbreaks of BPS were diagnosed in a same county (Jataí) of the mesoregion South, during the dry season, in 2010 and 2014. Dairy cows were affected in all outbreaks presenting painful, papular and ulcerative lesions mainly on the teats. Usually, this disease is more common in calves and the lesions consist of papules (often ulcerative) on the muzzle, lips and mouth (Brown et al., 2007; Oem et al., 2013; Alonso et al., 2020).

BPS is considered a disease of low sanitary relevance by some authors (Brown et al., 2007). Nevertheless, in four out five outbreaks of this study the infection was economically

important, because there was decrease of milk production and interruption of the lactation in the herds. In Northern Brazil, some risk factors for BPSV and PCPV infections were observed, such as free circulation among cattle of some farms, early age of the affected animals (less than six months) and the management of animals acquired from different properties together (Cargnelutti et al., 2014).

Human cases with similar lesions in the hands were detected in four out of five outbreaks of BPS. Nodules and pustules on the hands can be observed in infected human beings (Bowman et al., 1981; Alonso et al., 2020). Additionally, regional lymphadenitis, fever and general malaise can be noted in occasional cases (Alonso et al., 2020).

Sporadic cases of coinfection by two or three poxviruses have been described in cattle (Laguardia-Nascimento et al., 2017; Alonso et al., 2020). In the current study, one mixed infection by two distinct poxvirus (VACV and Orf virus-like parapoxvirus) was identified mainly in dairy cows from mesoregion South. The animals presented numerous vesicles, painful papules and scabby proliferative lesions in the teats and udder. Milker's involvement was also identified in this outbreak. Very similar epidemiological findings and lesions were observed previously in cows in a coinfection by PCPV and BPSV (Alonso et al., 2020). Coinfections by distinct poxvirus have been confirmed also affecting horses in South (Campos et al., 2011) and humans in Southeast Brazil (Abrahão et al., 2010).

In all cases evaluated in the current study, the diagnosis of poxvirus was established by PCR and, in some cases, additionally by virological isolation. Other complementary techniques can help the diagnosis of these viruses, such as histopathology (Alonso et al., 2020), serology (Mota et al., 2010; Franco-Luiz et al., 2014; Borges et al., 2017) and electronic microscopy (Trindade et al., 2003; Leite et al., 2005; Schatzmayr et al., 2009; Brum et al., 2010).

Possibly, more cases occur in field situations and the notifications are not informed clearly and directly to the local official veterinary service. The diagnosis and notification of these diseases is reinforced, for greater control and consequently less dissemination of these diseases. It is noteworthy that after diagnosis, hygiene measures and temporary interdiction of properties are generally carried out, so that we can thus reduce the spread of the disease between the properties and the animals.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the veterinary team from AGRODEFESA for their excellent technical support and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for the PhD scholarship of the first author. Financial support was provided by Fundação de Apoio à

Pesquisa do Distrito Federal (FAP-DF) (Grant 0193.001584/2017). E.F. Flores is a Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) research fellow.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declared that there is no potential conflict of interest.

REFERENCES

- Abrahão, J. S., Silva-Fernandes, A. T., Assis, F. L., Guedes, M. I., Drumond, B. P., Leite, J. A., Coelho, J. F. L., Turrini, F., Fonseca, F. G., Lobato, Z. I. P., Madureira, M., Ferreira, P. C., Bonjardim, C. A., Trindade, G. S. & Kroon, E. G. (2010) Human Vaccinia virus and Pseudocowpox virus co-infection: Clinical description and phylogenetic characterization. *Journal of Clinical Virology*. 48:69–72. doi:10.1016/j.jcv.2010.02.001
- Alonso, R. C., Moura, P. P., Caldeira, D. F., Mendes, M. H. A. F., Pinto, M. F. B. P., Cargnelutti, J. F., Flores, E. F. & Sant'Ana, F. J. F. (2020). Poxviruses diagnosed in cattle from Distrito Federal, Brazil (2015-2018). *Transboundary and Emerging Diseases*. 67(1). <https://doi.org/10.1111/tbed.13490>
- Assis, F. L., Franco-Luiz, A. P., Paim, L. M., Oliveira, G. P., Pereira, A. F., de Almeida, G. M. F., Figueiredo, L. B., Tanus, A., Trindade, G. S., Ferreira, P. P., Kroon, E. G. & Abrahão, J. S. (2015). Horizontal study of vaccinia virus infections in an endemic area: epidemiologic, phylogenetic and economic aspects. *Archives Virology* 160(11):2703-2708. doi: 10.1007/s00705-015-2549-1.
- Batista, V. H., Scremin, J., Aguiar, L. M. & Schatzmayr, H. (2009). Vulvar infection and possible human-to-human transmission of bovine poxvirus disease – Case report. *Virus reviews and research*. 14(1)1-10. doi: 10.17525/vrr.v14i1.27
- Borges, I. A., McCollum, A. M., Mehal, J. M., Haberling, D., Dutra, L. A. L., Vieira, F. N., Andrade, L. A. O., Kroon, E. G., Holman, R. C., Reynolds, M. G. & Trindade, G. S. (2017). Dairy production practices and associated risks for bovine vaccinia exposure in cattle, Brazil. *New Microbes and New Infections*. 20 (C):43-50. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2017.08.004>
- Bowman, K. F., Barbery, R. T., Swango, L. J. & Schnurrenberger, P. R. (1981). Cutaneous form of bovine papular stomatitis in man. *The Journal of the American Medical Association*. 246(24):2813-2818.
- Brown, C. C., Baker, D. C., & Barker, I. K. (2007). Alimentary system, p.1-296. In: Maxie M.G. (Ed), *Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of domestic animals*. Vol.2. 5th ed. W.B. Saunders, Edinburgh. 771p.
- Brum, M. C. S., dos Anjos, B. L., Nogueira, C. E. W., Amaral, L. A., Weiblen, R. & Flores, E. F. (2010). An outbreak of orthopoxvirus-associated disease in horses in southern Brazil. *J. Vet. Diagn. Invest*. 22:143–147. doi: 10.1177/104063871002200132.
- Buttner, M. & Rziha, H. J. (2002). Parapoxviruses: From the lesion to the viral genome. *J. Vet. Med*. 49(1):7-16. ISSN 0931-1793. doi: 10.1046/j.1439-0450.2002.00539.x.

- Campos, R. K., Brum, M. C. S., Nogueira, C. E. W., Drumond, B. R., Alves, P. A., Siqueira-Lima, L., Assis, F. L., Trindade, G. S., Bonjardim, C. A., Ferreira, P. C., Weiblen, R., Flores, E. F., Kroon, E. G. & Abrahão, J. S. (2011). Assessing the variability of Brazilian Vaccinia virus isolates from a horse exanthematic lesion: coinfection with distinct viruses. *Archives Virology*. 156(2):275–283. doi: 10.1007/s00705-010-0857-z.
- Cargnelutti, J. F., Flores, M. M., Teixeira, F. R., Weiblen, R. & Flores, E. F. (2012). An outbreak of pseudocowpox in fattening calves in southern Brazil. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 24(2):437-441. doi: 10.1177/1040638711435408.
- Cargnelutti, J. F., Santos, B. S., Lebre, S. N., Sodre, D. N. A., Silva, R. M., Weiblen, R. & Flores, E. F. (2014). Pseudovariola e estomatite popular em bovinos no Estado de Rondônia, Brasil. *Ciência Rural*. 44(3):479-485. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782014000300015>.
- Cargnelutti, J. F., Weiblen, R., & Flores, E. F. (2017). A multiplex PCR for viruses associated with exanthematic and vesicular disease in cattle. *Journal of Virological Methods*. 239:38-41.
- Franco-Luiz, A. P. M., Fagundes-Pereira, A., Costa, G. B., Alves, P. A., Oliveira, D. B., Bonjardim, C. A., Ferreira, P. C. P., Trindade, G. S., Panei, C. J., Galosi, C. M., Abrahão, J. S. & Kroon, E. G. (2014). Spread of Vaccinia Virus to Cattle Herds, Argentina, 2011. *Emerging Infectious Diseases*. 20(9):1576-1578. <http://dx.doi.org/10.3201/eid2009.140154>.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Estatística e Geografia [homepage na internet]. (2020). Censo agropecuário. Retrieved from <https://www.ibge.gov.br/>
- Inoshima, Y., Nakane, T., & Sentsui, H. (2009). Severe dermatitis on cattle teats caused by bovine papular stomatitis virus. *Veterinary Record*. 164, 311-312. <http://dx.doi.org/10.1136/vr.164.10.311-b>
- Laguardia-Nascimento, M., de Oliveira, A. P. F., Azevedo, I. C., Rivetti Júnior, A. V., Camargos, M. F., & Fonseca Júnior, A. A. (2017). Spread of poxviruses in livestock in Brazil associated with cases of double and triple infection. *Archives. Virology*. doi: 10.1007/s00705-017-3407-0.
- Lederman, E., Khan, S. U., Luby, S., Zhao, H., Braden, Z., Gao, J., Karem, K., Damon, I., Reynolds, M., & Li, Y. (2014). Zoonotic parapoxviruses detected in symptomatic cattle in Bangladesh. *BMC Research Notes*. 7, 816. <http://doi.org/10.1186/1756-0500-7-816>
- Leite, J. A., Drumond, B. P., Trindade, G. S., Lobato, Z. I. P., Fonseca, F. G., Santos, J. R., Madureira, M. C., Guedes, M. I. M. C., Ferreira, J. M. S., Bonjardim, C. A., Ferreira, P. C. P. & Kroon, E. G. (2005). Passatempo virus, a vaccinia virus strain, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*. 11(12):1935-1941. doi: 10.3201/eid1112.050773
- Lemos, R. A. A. & Riet-Correa, F. (2007). Infecções víricas da pele do úbere em bovinos. In: Riet-Correa, F., Schild, A. L., Lemos, R. A. A. & Borges, J. R. J. *Doenças de ruminantes e equídeos*. 3ª ed. 1:147–152.
- Lobato, Z. I. P., Trindade, G. S., Frois, M. C. M., Ribeiro, E. B. T., Dias, G. R. C., Teixeira, B. M., Lima, F. A., Almeida, G. M. F. & Kroon, E. G. (2005). Surto de varíola bovina causada pelo vírus vaccínia na região da Zona da Mata Mineira. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 57(4):423-429. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352005000400001>

- Lubroth, J. (2002). Foot-and-mouth disease: A review for the practitioner. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 18(3):475-499. doi: 10.1016/s0749-0720(02)00036-1.
- Mauldin, E. A. & Kennedy, P. (2016). Integumentary system. In: Jubb, V. F., Kennedy, P. C., Palmer, N. C. *Pathology of Domestic Animals*. 6 ed. Missouri: Elsevier. 1:509-736
- Megid, J., Appolinário, C. M., Langoni, H., Pituco, E. M. & Okuda, L. H. (2008). Vaccinia virus in humans and cattle in southwest region of São Paulo State, Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 79(5):647-651.
- Moeller Jr, R. B., Crossley, B., Adaska, J. M., Hsia, G., Kahn, R., & Blanchard, P. C. (2018). Parapoxviral vulvovaginitis in Holstein cows. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 30:464-467. <http://doi.org/10.1177/1040638718758829>
- Mota, B. E. F., Trindade, G. S., Diniz, T. C., da Silva-Nunes, M., Braga, E. M., Urbano-Ferreira, M., Rodrigues, G. O. L., Bonjardim, C. A., Ferreira, P. C. P., & Kroon, E. G. (2010). Seroprevalence of orthopoxvirus in an Amazonian rural village, Acre, Brazil. *Archives Virology*. 155:1139–1144. <https://doi.org/10.1007/s00705-010-0675-3>
- Nagasse-Sugahara, T. K., Kisielius, J. J., Ueda-Ito, M., Curti, S. P., Figueiredo, C. A., Cruz, A. S., Silva, M. M. J., Ramos, C. H., Silva, M. C. C., Sakurai, T. & Salles-Gomes, L. F. (2004). Human Vaccinia-like outbreaks in São Paulo and Goiás States, Brazil: virus detection, isolation and identification. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 46:315–322. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652004000600004>
- Oem, J. K., Lee, E. Y., Lee, K. K., Kim, S. H., Lee, M. H., & Hyun, B. H. (2013). Bovine papular stomatitis virus (BPSV) infections in Korean native cattle. *Journal of Veterinary Medical Science*, 75, 675-678. <https://doi.org/10.1292/jvms.12-0312>
- Oliveira, G. P., Fernandes, A. T. S., de Assis, F. L., Alves, P. A., Luiz, A. P. M. F., Figueiredo, L. B., de Almeida, C. M. C., Travassos, C. E. P. F., Trindade, G. S., Abrahão, J. S. & Kroon, E. G. (2014). Short Report: Intrafamilial Transmission of Vaccinia virus during a Bovine Vaccinia Outbreak in Brazil: A New Insight in Viral Transmission Chain. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 90(6):1021–1023. doi: 10.4269/ajtmh.13-0621
- Peres, M. G., Bacchiega, T. S., Appolinário, C. M., Vicente, A. F., Allendorf, S. D., Antunes, J. M. A. P., Moreira, A. S., Legatti, E., Fonseca, C. R., Pituco, E. M., Okuda, L. H., Pantoja, J. C. F., Ferreira, F., & Megid, J. (2013). Serological study of vaccinia virus reservoirs in areas with and without official reports of outbreaks in cattle and humans in São Paulo, Brazil. *Archives Virology*. 158(12):2433–2441. doi: 10.1007/s00705-013-1740-5.
- Quixabeira-Santos, J. C., Medaglia, M. L. G., Pescador, C. A., & Damaso, C. R. (2011). Animal movement and establishment of Vaccinia virus Cantagalo strain in Amazon biome, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*. 17, 726-729. doi: 10.3201/eid1704.101581
- Riet-Correa, F., Moojen, V., Roehe, P. M. & Weiblen, R. (1996). Viroses confundíveis com febre aftosa. *Ciência Rural*. 26(2):323-332. <https://doi.org/10.1590/S0103-84781996000200027>.

- Sant'Ana, F. J. F., Rabelo, R. E., Vulcani, V. A. S., Cargnelutti, J. F. & Flores, E. F. (2012). Bovine papular stomatitis affecting dairy cows and milkers in midwestern Brazil. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 24(2):442-445. doi: 10.1177/1040638711434799.
- Sant'Ana, F. J. F., Leal, A. A., Rabelo, R. E., Vulcani, V. A. S., Ferreira Jr, J. A., Cargnelutti, J. F. & Flores, E. F. (2013a). Outbreaks of vesicular disease caused by Vaccinia virus in dairy cattle from Goiás State, Brazil (2010-2012). *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 33(7):860-866. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2013000700006>
- Sant'Ana, F. J. F., Leal, F. A. A., Rabelo, R. E., Vulcani, V. A. S., Moreira Jr, C. A., Cargnelutti, J. F. & Flores, E. F. (2013b). Coinfection by vaccinia virus and an orf viruslike parapoxvirus in an outbreak of vesicular disease in dairy cows in midwestern Brazil. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 25(2):267-272. doi: 10.1177/1040638713475799.
- Schatzmayr, H. G., Costa, R. V. C., Gonçalves, M. C. R., Barreto, D. F., Batista, V. H., Silva, M. E. V., Brust, L. A. C. & Barth, O. M. (2009). Infecções humanas causadas por poxvirus relacionados ao vírus vaccinia no Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 42(6):672-676. <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822009000600012>
- Şevik, M. (2019). Orf virus circulation in cattle in Turkey. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Disease*. 65:1-6. doi: 10.1016/j.cimid.2019.03.013
- Silva, A. C., Reis, B. B., Ricci Junior, J. E. R., Fernandes, F. S., Côrrea, J.F., & Schatzmayr, H.G. (2008). Infecção em humanos por varíola bovina na microrregião de Itajubá, Estado de Minas Gerais: relato de caso. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 41:507-511. <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822008000500015>
- Silva, M. F. & Silva, A. C. (2014). Análise da produtividade do rebanho leiteiro no Estado de Goiás. *Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável (RBAS)*, 4(2):66-74. <https://doi.org/10.21206/rbas.v4i2.260>
- Silva, T. G., Lima, M. S., de Castro, A. M. M. G., Martins, M. S. N., Castiglioni, V. C., Fava, C. D., Okuda, L. H. & Pituco, E. M. (2018). Bovine Vaccinia in dairy cattle and suspicion of vesicular disease on milkers in Brazil. *Ciência Rural*. 45(05):e20180723. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20170723>
- Silva-Fernandes, A. T., Travassos, C. E. P. F., Ferreira, J. M. S., Abrahão, J. S., Rocha, E. S. O., Viana-Ferreira, F., dos Santos, J. R., Bonjardim, C. A., Ferreira, P. C. P., & Kroon E. G. (2009). Natural human infections with *Vaccinia virus* during bovine vaccinia outbreaks. *Journal of Clinical Virology*. 44(4):308–313. doi: 10.1016/j.jcv.2009.01.007.
- Trindade, G. S., Drumond, B. P., Guedes, M. I. M. C., Leite, J. A., Mota, B. E. F., Campos, M. A., Fonseca, F. G., Nogueira, M. L., Lobato, Z. I. P., Bonjardim, C. A., Ferreira, P. C. P., & Kroon, E. G. (2007). Zoonotic *Vaccinia virus* infection in Brazil: Clinical description and implications for health professionals. *Journal of Clinical Microbiology*. 45(4):1370-1372. doi:10.1128/JCM.00920-06
- Trindade, G. S., Fonseca, F. G., Marques, J. T., Nogueira, M. L., Mendes, L. C. N., Borges, A. S., Peiró, J. R., Pituco, E. M., Bonjardim, C. A., Ferreira, P. C. P., & Kroon, E. G. (2003). Araçatuba virus: a vaccinia-like virus associated with infecton in humans and cattle. *Emerging Infectious Disease*. 9(2):155-160. doi: 10.3201/eid0902.020244

Trindade, G. S., Lobato, Z. I. P., Drumond, B. P., Leite, J. A., Trigueiro, R. C., Guedes, M. I. M. C., Fonseca, F. G., Santos, J. R., Bonjardim, C. A., Ferreira, P. C. P., & Kroon, E. G. (2006). Short report: Isolation of two vaccinia virus strains from a single bovine vaccinia outbreak in rural area from Brazil: Implications on the emergence of zoonotic orthopoxviruses. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 75(3):486-490.

FIGURES

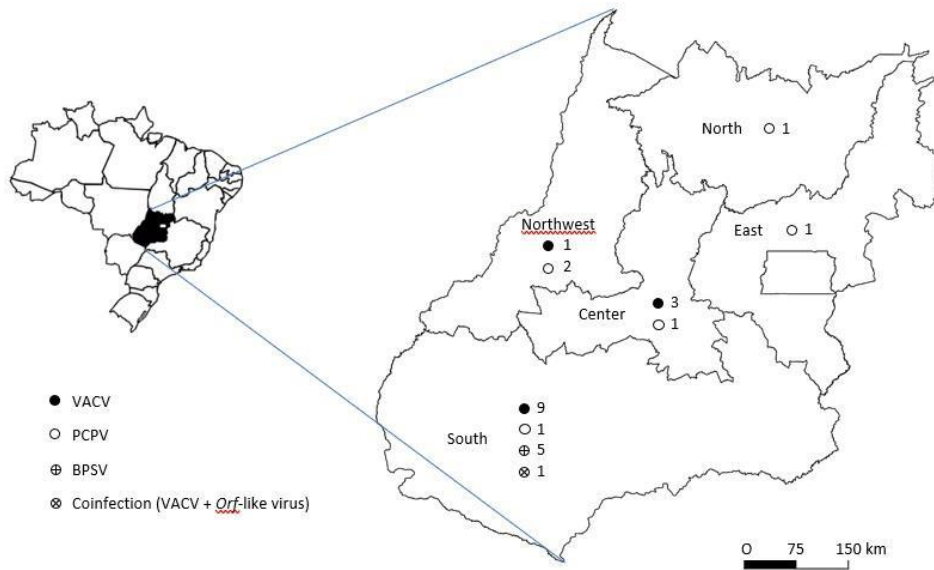


Figure 1. Poxviruses diagnosed in cattle in Goiás State, Brazil (2010-2018). Zoomed-in map shows the mesoregions with positive cases. Circle inside mesoregions indicate the confirmed poxviruses and number of cases. VACV – vaccinia virus; PCPV – pseudocowpox virus; BPSV – bovine papular stomatitis virus.

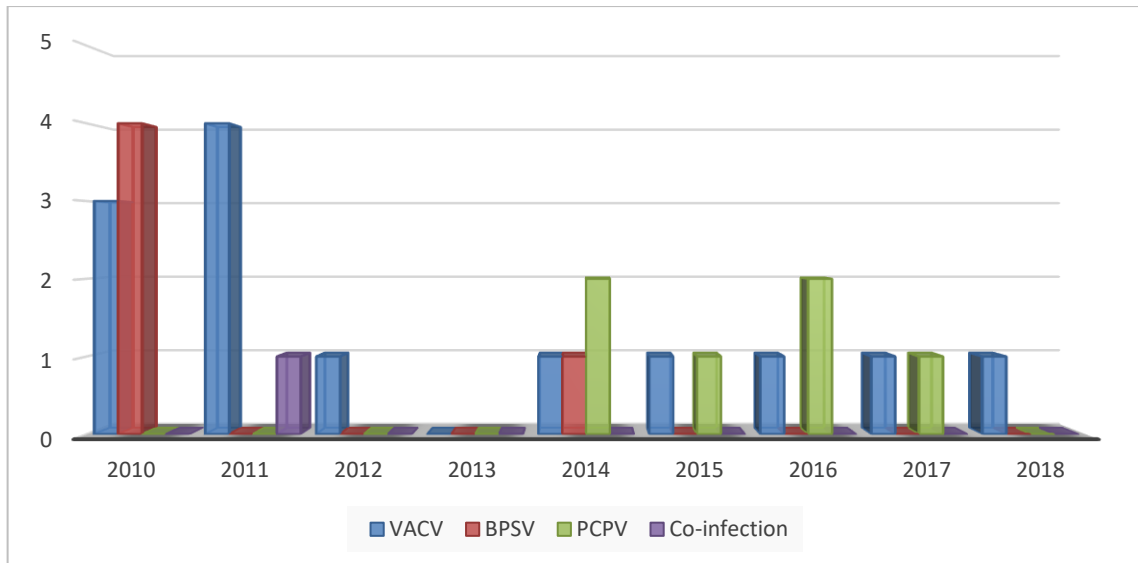


Figure 2. Number of cases according to distribution per year (2010-2018) of 25 outbreaks of poxviruses diagnosed in cattle in the Goiás state, Brazil. VACV – vaccinia virus, BPSV – bovine papular stomatitis virus, PCPV – pseudocowpoxvirus.

TABLES

Table 1. Mesoregion and county distribution of 25 outbreaks of poxviruses diagnosed in cattle, between 2010 and 2018, in the Goiás State, Brazil.

Mesoregion and county	Number of cases			
	VACV	PCPV	BPSV	CI
Center				
Ceres	-	1	-	-
Iporá	1	-	-	-
Ouro Verde de Goiás	1	-	-	-
Uruanã	1	-	-	-
East				
Cocalzinho de Goiás	-	1	-	-
North				
Uruaçu	-	1	-	-
Northwest				
Faina	-	1	-	-
Santa Fé de Goiás	1	-	-	-
São Miguel do Araguaia	-	1	-	-
South				
Buriti Alegre	1	-	-	-
Edéia	1	-	-	-
Jataí	-	-	5	1
Joviânia	1	-	-	-
Mineiros	1	-	-	-
Piracanjuba	-	1	-	-
Pontalina	1	-	-	-
São João da Paraúna	1	-	-	-
Varjão	3	-	-	-
Total		25		

VACV – vaccinia virus; PCPV – pseudocowpox virus; BPSV – bovine papular stomatitis virus; CI – coinfection VACV and Orf virus-like parapoxvirus

Table 2. Epidemiological, clinical and pathological findings of five outbreaks of bovine vaccinia in Goiás State, Brazil (2014-2018).

N°	Month/year and county	Total herd	Affected herd	Clinical course (days)	Possible source of infection	Type of exploration	Gross findings	Human involvement
1	June/2014, Uruanã	Calves – 24 Heifers/steers – 15 Cows – 23 Bulls – 1	Calves – 0 Heifers/steers – 0 Cows – 16 (3-6 years) Bulls – 0	15	Milk trucks, transit of people among farms	Dairy	Dry vesicles, teat	No
2	August/2015 Iporá	Calves – 19 Heifers/steers – 7 Cows – 34 Bulls – 1	Calves – 5 Heifers/steers – 0 Cows – 33 (3-7 years) Bulls – 0	NI	Transit of cattle, milk trucks, transit of people/workers among farms	Mixed	Cows - Macules, vesicles, ulcers, and dark crusts, teat and udder. Calves – ulcers, mouth and muzzle	Yes, two milkers
3	July/2016, Joviânia	Calves – 52 Heifers/steers – 40 Cows – 76 Bulls – 2	Calves – 4 Heifers/steers – 0 Cows – 10 (3-6 years) Bulls – 0	NI	Milk trucks, transit of people/workers among farms	Dairy	Cows - ulcers and crusts, teat. Calves – ulcers, tongue	Yes, six workers and/or milkers
4	July/2017, Santa Fé de Goiás	Calves – 35 Heifers/steers – 0 Cows – 40 Bulls – 1	Calves – 3 Heifers/steers – 0 Cow – 30 (4-10 years) Bulls – 0	20	Introduction of a new ration	Mixed	Cows – ulcers and crusts, teat.	Yes, one milker

						Calves – ulcers, muzzle	
5	February/ 2018, Ouro Verde de Goiás	Calves – 9 Heifers/steers – 13 Cows – 20 Bulls – 1	Calves – 0 Heifers/steers – 0 Cows – 1 (5 years) Bulls – 0	12	Milk trucks, transit of people/ workers between farms, proximity with highway	Dairy Vesicles and ulcers, teat and udder	No

NI – No informed

Table 3. Epidemiological, clinical and pathological findings of outbreaks of pseudocowpox virus (PCPV) from Goiás State, Brazil (2010-2018).

Nº	Month/year and county	Total herd	Affected herd	Clinical course (days)	Possible source of infection	Type of exploration	Gross findings	Human involvement
1	July/2014, São Miguel do Araguaia	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
2	September/2014, Uruaçu	Calves – 123 Heifers/steers – 720 Cows – 0 Bulls – 22	Calves – 0 Heifers – 0 Steers – 2 Cows – 0 Bulls – 0	7	NI	Beef	Ulcers, gum and tongue (ventral aspect)	No
3	January/2015, Cocalzinho de Goiás	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
4	October/2016, Faina	Calves – 16 Heifers/steers – 10 Cows – 34 Bulls – 1	Calves – 5 Heifers/steers – 0 Cow – 8 (4-10 years) Bulls – 0	30	Milk trucks	Dairy	Cows – ulcers and crusts, udder and teat. Calves – ulcers, muzzle and mouth	Yes, one milker – pustule in finger
5	December/2016, Piracanjuba	Calves – 3 Heifers/steers – 5 Cows – 5 Bulls – 0	Calves – 0 Heifers/steers – 0 Cows – 1 (6 years) Bulls – 0	15	NI	Dairy	Crusts and scars, teat	No
6	July/2017, Ceres	Calves – 16 Heifers/steers – 8 Cows – 18 Bulls – 0	Calves – 0 Heifers/steers – 0 Cows – 1 (8 years) Bulls – 0	8	Vehicles, transit of workers, proximity with highway	Dairy	Crusts and scars, teat	No

NI – No informed

CAPÍTULO 4 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nas últimas décadas, as poxviroses bovinas têm sido diagnosticadas no Brasil com frequências relevantes de casos de VB, mas também com descrições de estomatite papular bovina, de pseudovariola e, menos frequentemente, de infecções mistas por diferentes poxvírus.

O presente trabalho é oriundo de uma linha de pesquisa com estudos naturais e experimentais de poxviroses no Centro-Oeste brasileiro, que há aproximadamente dez anos analisa os aspectos epidemiológicos, clínicos e anatomopatológicos dessas enfermidades em animais de produção da região, especialmente bovinos. Nessa tese, foram utilizadas duas metodologias distintas de pesquisa dessas doenças: a primeira analisou o perfil soropidemiológico da VB em bovinos do Distrito Federal e, a segunda, a partir do diagnóstico clínico e laboratorial de casos naturais de poxviroses bovinas, caracterizou os aspectos epidemiológicos e clínico-patológicos dessas viroses em um período de nove anos. Cabe ressaltar que ambos os estudos foram realizados a partir de amostras do serviço veterinário oficial de duas unidades federativas, demonstrando a realidade dessas infecções nos rebanhos locais. Além disso, pretende-se continuar o estudo dessas doenças, investigando outros aspectos e características ainda não determinadas até o momento.

Na presente tese, observou-se que as poxviroses estão presentes infectando bovinos de um dos maiores estados produtores de leite e carne do Brasil, o estado de Goiás. Além disso, o Distrito Federal que serve de importante rota de ligação, especialmente entre as regiões Norte, Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste do país, apresentou rebanhos de bovinos leiteiros com expressiva positividade sorológica para o mais relevante poxvírus detectado no Brasil, o VACV.

Dados obtidos nessa tese e outros de nosso grupo demonstram que essas doenças, tradicionalmente associada a propriedades leiteiras, têm sido também confirmadas em propriedades de sistema misto ou exclusivo de corte. Assim, torna-se necessário para o maior conhecimento dessas doenças incluir propriedades pecuárias de corte em estudos futuros.

Os poxvírus causam lesões proliferativas e necróticas em bovinos, principalmente na região dos tetos, úbere e cavidade oral. Eles acometem tanto bovinos adultos como jovens, sendo mais relatados nos tetos e úbere de vacas em lactação, e na cavidade oral de bezerros lactentes. O que chama a atenção é que se tem sido cada vez mais observados casos de coinfeção viral, até mesmo com subtipos virais nunca observados nos bovinos, mas que aparentemente causam as mesmas manifestações clínicas.

Acredita-se que casos de poxviroses possam estar sendo subnotificados, principalmente por serem doenças vesiculares de notificação obrigatória, o que faz com que alguns pecuaristas não realizem a notificação pelo temor dos embargos econômicos e sanitários às propriedades. Provavelmente o receio na notificação dessas doenças clínicas ocorram por serem lesões diferenciais da febre aftosa, mas apesar de ser considerada uma doença vesicular, as lesões manifestadas nas poxviroses infreqüentemente são vesiculares, sendo geralmente alterações proliferativas e ulcerativas, observadas principalmente como pápulas e úlceras. Com isso, caso haja essas lesões na propriedade não é necessário temor, já que as condutas geralmente incluem interdição temporária da propriedade (enquanto durarem as lesões clínicas) com isolamento dos animais, para que não haja disseminação da doença.

Por serem as lesões macroscópicas e microscópicas muito semelhantes entre as poxviroses bovinas, torna-se necessário realizar o diagnóstico etiológico associando a clínica, a epidemiologia e os exames laboratoriais, especialmente virológicos e moleculares. Recomenda-se que caso ocorram lesões clínicas, deve-se coletar o soro e fragmentos de lesões dos animais e encaminhá-los para realização de técnicas sorológicas, moleculares e/ou de isolamento viral. E na ausência de sinais clínicos, torna-se interessante a realização do exame sorológico, na qual pode-se investigar se os animais já tiveram contato prévio com o vírus, e que auxilia futuras análises epidemiológicas. Ressalta-se que a investigação epidemiológica acurada, aliada à confiança aos serviços veterinários e à classe produtora contribuem para que o diagnóstico etiológico seja cada vez mais rápido e preciso.

Salienta-se que essas doenças são zoonóticas, e aparentemente a vaccínia apresenta um quadro clínico mais grave e debilitante em humanos do que as outras poxviroses aqui analisadas. Mas todas possuem potencial de impacto econômico por freqüente inabilidade dos trabalhos rurais de trabalharem quando há manifestações dos sintomas. E este não é o único fator que causa prejuízos econômicos às propriedades, visto que quando os animais estão doentes são relatados a interrupção da ordenha por conta de manifestação clínica de dor na região do úbere e diminuição da produção leiteira, inclusive com casos de mastite bacteriana secundária.

Por fim, os dados gerados por essa pesquisa fornecem informações relevantes para os órgãos de saúde pública e vigilância epidemiológica, ressaltando a necessidade da vigilância ativa das doenças vesiculares. Com a realização dos diagnósticos diferenciais e análises desses dados podemos cada vez mais ter maior conhecimento sobre a epidemiologia e clínica dessas poxviroses, que estão ocorrendo no Centro-Oeste do país. E com base no conhecimento sobre

a realidade da região podemos realizar mudanças de manejo, controle e profilaxia que visam tanto a saúde pública como também minimizar possíveis impactos econômicos aos criatórios.

ANEXOS



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



Goiânia, 05 de fevereiro de 2018.

**PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO ATENDIMENTO DE
PENDÊNCIA DO PROTOCOLO N. 122/17**

I - Finalidade do projeto de pesquisa: Doutorado

II - Identificação:

- ❑ Data de apresentação a CEUA: 09/11/17
- ❑ Título do projeto: Doenças vesiculares em bovinos leiteiros no estado de Goiás (GO) e no Distrito Federal (DF): estudos etiológico e clínico-patológico em GO e soropidemiológico no DF
- ❑ Pesquisador Coordenador no SAP: Fabiano José Ferreira de Sant'Ana
- ❑ Pesquisador Responsável/ Unidade: Lorena Ferreira Silva/EVZ
- ❑ Pesquisadores Participantes: Paulo Henrique Jorge da Cunha
- ❑ Médico Veterinário/CRMV: Paulo Henrique Jorge da Cunha/CRMV-GO 2450 e Lorena Ferreira Silva/CRMV-DF 3001
- ❑ Unidade onde será realizado: EVZ/UFV

III - Objetivos e justificativa do projeto:

De acordo com os autores:

Objetivo geral

Realizar estudo de soroprevalência da infecção pelo vírus vaccínia (VACV) em bovinos leiteiros no Distrito Federal (2015-2016) e caracterizar os aspectos etiológicos e clínico-patológicos das doenças vesiculares de bovinos leiteiros do Estado de Goiás (2010-2019).

Objetivos específicos

- Verificar a possível circulação do VACV em bovinos leiteiros no Distrito Federal (2015-2016) através da soroneutralização de amostras de soro;
- Realizar estudo retrospectivo (2010-2016) e prospectivo (2017-2019) de casos de doenças vesiculares diagnosticados em bovinos leiteiros do Estado de Goiás;
- Relacionar os achados à etiologia de cada doença vesicular bovina diagnosticada;
- Avaliar o impacto zoonótico e ocupacional das doenças vesiculares bovinas em trabalhadores humanos das regiões afetadas do Estado de Goiás.

Justificativa:

Doenças vesiculares em bovinos incluem um grupo amplo de enfermidades virais que apresentam relevância significativa do ponto de vista econômico e de saúde pública. Algumas dessas doenças vesiculares são zoonoses e podem afetar trabalhadores rurais, especialmente ordenhadores que lidam proximamente com bovinos enfermos.

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA

Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFV, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso 1, Campus Samambaia (Campus II) -
CEP:74001-970, Goiânia – Goiás, Fone: (55-62) 3521-1876.
Email: ceua.ufv@gmail.com



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



Dentre as principais enfermidades desse grupo, destacam-se a febre aftosa, estomatite vesicular, vaccínia (variola) bovina, estomatite papular bovina, mamilite herpética e pseudovariola, além da febre catarral maligna e diarreia viral bovina/doença das mucosas que devem ser incluídas no diagnóstico diferencial.

A febre aftosa é considerada a doença vesicular mais importante, devido às sérias restrições e embargos econômicos atribuídos aos países que possuem casos confirmados da enfermidade em seus plantéis. Por essa razão, existe preocupação inerente e diversas ações de controle, planejamento, fiscalização e vigilância que são realizadas constantemente pelos órgãos estaduais de defesa agropecuária, bem como pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

Surtos dessas enfermidades são descritos em algumas regiões do Brasil. Embora casos de estomatite vesicular tenham sido recentemente observados em Mato Grosso e no Nordeste brasileiro, essa doença não é diagnosticada comumente no Brasil. De forma semelhante, surtos esporádicos de estomatite papular bovina foram confirmados ultimamente no Norte e Centro-Oeste brasileiros e de pseudovariola foram identificados em Rondônia. Infecções por poxvírus têm sido descritas em bovinos no Brasil, associadas com lesões vesiculares confundíveis com febre aftosa e estomatite vesicular.

O agente mais comumente identificado nessas infecções tem sido o vírus da vaccínia (VACV), um ortopoxvírus zoonótico que também causa doença vesicular em bovinos. Casos de coinfeções causadas por poxvírus de diferentes genótipos ou gêneros também já foram descritos em surtos de doença vesicular de bovinos.

O diagnóstico etiológico de doenças vesiculares similares às poxviroses nem sempre é realizado, o que dificulta o conhecimento acerca dos vírus que circulam em determinadas regiões do país. Embora as lesões causadas por esses poxvírus sejam confundíveis com febre aftosa e estomatite vesicular, pouca importância tem sido dada a esses agentes. Por outro lado, casos de doença vesicular clinicamente compatíveis com essas doenças têm sido relatados com grande frequência por produtores rurais e veterinários de campo.

No Brasil, numerosos casos de doença vesicular e/ou exantemática associada ao VACV têm sido descritos ultimamente em bovinos leiteiros e ordenhadores, especialmente na Região Sudeste. Usualmente, esses trabalhos detalham a apresentação clínica da enfermidade nos bovinos e humanos, acompanhados da identificação molecular e caracterização dos isolados.

Apesar de muitas informações estarem disponíveis na literatura acerca das enfermidades vesiculares que ocorrem no Brasil, especialmente vaccínia bovina, poucos são os dados disponíveis relativos à frequência, status sorológico, epidemiologia, etiologia e aspectos clínicos-patológicos de infecções virais no Centro-Oeste, especialmente no Estado de Goiás e no Distrito Federal.

O Estado de Goiás é reconhecidamente um grande produtor agropecuário nacional, com destaque para as bovinoculturas de corte e de leite. Atualmente o estado possui aproximadamente 10,2% do efetivo bovino nacional e ocupa o quarto lugar na produção de carne bovina e de leite, com aproximadamente 2,6 milhões de vacas ordenhadas e 11% da produção nacional de leite. O Distrito Federal possui números estatísticos e produtivos mais modestos, principalmente em função de sua limitação geográfica em comparação com outras unidades da federação, contudo representa um importante mercado consumidor de produtos lácteos e cárneos.

Diante do impacto econômico, social e de saúde pública que as enfermidades vesiculares podem causar nos plantéis leiteiros da região Centro-Oeste, é fundamental que estudos com as propostas elencadas no presente projeto sejam desenvolvidas para que a realidade regional relacionada a essas enfermidades vesiculares sejam conhecidas e para que medidas de controle e profilaxia sejam efetivamente e eficazmente implementadas pelos órgãos governamentais de defesa agropecuária.

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA

Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFV, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso 1, Campus Samambaia (Campus II) -
CEP:74001-970, Goiânia – Goiás, Fone: (55-62) 3521-1876.

Email: ceua.ufv@gmail.com



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA**



IV - Sumário do projeto:

- ❑ **Discussão sobre a possibilidade de métodos alternativos e necessidade do número de animais:**
Segundo os autores não há métodos alternativos conhecidos
- ❑ **Prevê Projeto Piloto:** Não
- ❑ **Espécie animal utilizada/ número total de animais/ Número de animais por tratamento ou grupo experimental:** Bovina/60 animais. Considerando os dois estudos (retrospectivo – n=40 e prospectivo – =20), espera-se obter amostras/dados de 60 animais entre 2018 e 2019.
- ❑ **Descrição do animal utilizado (Explicitar: espécie/ linhagem/ sexo (informar número por sexo)/ peso e/ou idade etc):** Bovinos/Leiteiros/10 machos e 50 fêmeas/ 400kg/ acima de 3 anos
- ❑ **Fonte de obtenção do animal:** Fazendas Leiteiras do Estado de Goiás
- ❑ **Descrição das instalações utilizadas e número de animais/área/qualidade do ambiente (ar, temperatura, umidade), alimentação/hidratação:** Os animais são alojados e manejados de acordo com a propriedade originária
- ❑ **Utilização de agente infeccioso/gravidade da infecção a ser observada e análise dos riscos aos pesquisadores/alunos:** Não
- ❑ **Procedimentos experimentais do projeto de pesquisa:** Em cada surto, serão coletadas duas amostras biológicas de sangue, para amostra virológica, e duas amostras das lesões orais ou cutâneas, uma para avaliação virológica e outra para histopatologia. Após contenção do bovino com o auxílio de brete, peias e cordas, será coletado 10 mL de sangue via jugular de cada bovino afetado, para obtenção de soro, e armazenado em 2 tubos sem anticoagulantes. Será realizado também anestesia local com lidocaina injetável (7-10 mg/kg) e coleta das lesões com punch 6-8 mm, pinças e/ou bisturi. Após esse procedimento, será aplicada uma dose de dipirona por via IV na veia jugular (25 mg/kg). As amostras de pele/boca para virologia serão colocadas em ependorfs ou tubos estéreis, mantidas em caixas isotérmicas (2-4°C) e posteriormente serão enviadas ao laboratório para congelamento a -70°C. As amostras de soro serão mantidas congeladas a -20°C. Para histopatologia, os fragmentos serão fixados em formol neutro e tamponado a 10% por 24 horas, processados rotineiramente, incluídas em parafina e corados por hematoxilina-eosina (HE).
- ❑ **Métodos utilizados para minimizar o sofrimento e aumentar o bem-estar dos animais antes, durante e após a pesquisa. Pontos Finais Humanitários:** De acordo com os autores, durante as coletas de sangue e de lesões orais/cutâneas, os animais serão avaliados individualmente em ambiente calmo e silencioso, com manipulação cuidadosa para minimizar o estresse.
- ❑ **Grau de invasividade:** G2
- ❑ **Material utilizado em outros projetos:** Não
- ❑ **Método de eutanásia:** Não se aplica
- ❑ **Destino do animal:** Permanecerão nas propriedades de origem

V – Comentários do relator frente às orientações da CEUA:

- ❑ **Quanto aos documentos exigidos pela CEUA/UFPG:** Os documentos estão de acordo o exigido, sendo composta pela Ficha de Protocolo do Projeto (p. 1-11), Certidão de ata (p. 12), Termo de

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA

Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFPG, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso 1, Campus Samambaia (Campus II) - CEP:74001-970, Goiânia – Goiás, Fone: (55-62) 3521-1876.

Email: ceua.ufg@gmail.com



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA**



responsabilidade assinado por todos os pesquisadores (p. 13), Termo de consentimento livre e esclarecido (p.14-15), Parecer consubstanciado da CEUA (p.16-20), Termo de atendimento de pendência (p.21-22) e CD com os itens do protocolo físico gravados em mídia digital.

- ❑ **Quanto aos cuidados e manejo dos animais e riscos aos pesquisadores:** Riscos de acidentes no momento da coleta nos animais.

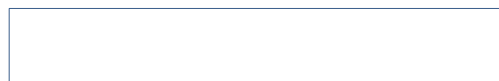
VI - Parecer da CEUA:

De acordo com a documentação apresentada à CEUA, consideramos o projeto **APROVADO**.

Informação aos pesquisadores:

Reiteramos a importância deste Parecer Consubstanciado, e lembramos que a pesquisadora responsável deverá encaminhar à CEUA-PRPI-UFG o Relatório Final baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Lei nº. 11.794 de 08/10/2008, e Resolução Normativa nº. 01, de 09/07/2010 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-CONCEA. O prazo para entrega do Relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa, a qual está prevista para finalizar suas ações até **31 de dezembro de 2020**

VII - Data da reunião: 05/02/18.



Dra. Líliana Borges de Menezes Leite
Vice-Coordenadora da CEUA/PRPI/UFG



UFG - UNIVERSIDADE
FEDERAL DE GOIÁS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: DOENÇAS VESICULARES EM BOVINOS LEITEIROS NO ESTADO DE GOIÁS (GO) E NO DISTRITO FEDERAL (DF)

Pesquisador: LORENA FERREIRA SILVA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 79911317.0.0000.5083

Instituição Proponente: Escola de Veterinária e Zootecnia

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE APOIO A PESQUISA DO DISTRITO FEDERAL FAPDF

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.509.406

Apresentação do Projeto:

O Presente Protocolo de Pesquisa intitulado "DOENÇAS VESICULARES EM BOVINOS LEITEIROS NO ESTADO DE GOIÁS (GO) E NO DISTRITO FEDERAL (DF)". Tem como pesquisadora responsável, LORENA FERREIRA SILVA.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo geral: Realizar estudo de soroprevalência da infecção pelo VACV em bovinos leiteiros no Distrito Federal (2015-2016) e caracterizar os aspectos etiológicos e clínico-patológicos das doenças vesiculares de bovinos leiteiros do Estado de Goiás (2010-2019).

Objetivos específicos: - Verificar a possível circulação do VACV em bovinos leiteiros no Distrito Federal (2015-2016) através da soroneutralização de amostras de soro;

- Realizar estudo retrospectivo (2010-2016) e prospectivo (2017-2019) de casos de doenças vesiculares diagnosticados em bovinos leiteiros do Estado de Goiás;

- Relacionar os achados à etiologia de cada doença vesicular bovina diagnosticada;

- Avaliar o impacto zoonótico e ocupacional das doenças vesiculares bovinas em trabalhadores humanos das regiões afetadas do Estado de Goiás;

Endereço: Prédio da Reitoria Térreo Cx. Postal 131

Bairro: Campus Samambala **CEP:** 74.001-970

UF: GO **Município:** GOIANIA

Telefone: (62)3521-1215 **Fax:** (62)3521-1163 **E-mail:** cep.prpl.ufg@gmail.com



Continuação do Parecer: 2.509.406

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Como benefícios: Espera-se com esse estudo caracterizar as doenças vesiculares em bovinos já notificadas em Goiás, dando ênfase em relação as doenças e as alterações clínicas e anatomopatológicas em bovinos e humanos, além de histológicas em bovinos, diferenciando os surtos em variados aspectos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto será realizado em duas etapas. Na primeira, será realizado estudo descritivo, retrospectivo (2010-2016) e prospectivo (2017-2019), de todos os casos de doenças vesiculares em bovinos leiteiros diagnosticados e/ou notificados no Estado de Goiás. Os dados serão gentilmente cedidos pela Gerência de Sanidade Animal da Agência Goiana de Defesa Agropecuária (AGRODEFESA), pelo Laboratório de Patologia Veterinária (LPV) da Universidade Federal de Goiás (UFG), Regional Jataí (RJ), e pelo Laboratório de Diagnóstico Patológico Veterinário (LDPV) da Universidade de Brasília (UnB).

Serão investigadas todas as informações disponíveis nos form-ins, form-cons e laudos, incluindo dados clínicos, patológicos e diagnósticos em bovinos e humanos acometidos por enfermidades vesiculares. Além disso, será realizado estudo sorológico por soroneutralização em amostras sanguíneas coletadas, entre 2015 e 2016, de bovinos leiteiros com idade igual ou superior a 24 meses no Distrito Federal.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados: informações básicas sobre o projeto, folha de rosto, projeto contendo metodologia e cronograma, a anuência da instituição, o TCLE e o questionário a ser aplicado para obtenção de informações a respeito dos animais e dos humanos.

Recomendações:

não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto aprovado, s.m.j. deste Comitê.

Considerações Finais a critério do CEP:

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa/CEP-UFG considera o presente protocolo APROVADO, o mesmo foi considerado em acordo com os princípios éticos vigentes. Reiteramos a importância deste Parecer Consubstanciado, e lembramos que o(a) pesquisador(a) responsável

Endereço: Prédio da Reitoria Térreo Cx. Postal 131
 Bairro: Campus Samambaia CEP: 74.001-970
 UF: GO Município: GOIANIA
 Telefone: (62)3521-1215 Fax: (62)3521-1163 E-mail: cep.prpl.ufg@gmail.com



Continuação do Parecer: 2.509.406

deverá encaminhar ao CEP-UFG o Relatório Final baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Resolução CNS n. 466/12 e Resolução CNS n. 510/16. O prazo para entrega do Relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa, previsto dezembro/2020.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1027739.pdf	06/02/2018 18:34:07		Aceito
Parecer Anterior	RespostaPendencia.pdf	06/02/2018 18:33:37	LORENA FERREIRA SILVA	Aceito
Folha de Rosto	folhaderostoassinada.pdf	07/11/2017 15:16:36	LORENA FERREIRA SILVA	Aceito
Outros	Compromissoassinado.pdf	07/11/2017 14:28:13	LORENA FERREIRA SILVA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Anuencia.pdf	07/11/2017 14:27:20	LORENA FERREIRA SILVA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	07/11/2017 14:25:46	LORENA FERREIRA SILVA	Aceito
Outros	Questionario.pdf	07/11/2017 14:13:28	LORENA FERREIRA SILVA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	07/11/2017 14:12:03	LORENA FERREIRA SILVA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

GOIANIA, 23 de Fevereiro de 2018

Assinado por:
Geisa Mozzer
(Coordenador)

Endereço: Prédio da Reitoria Térreo Cx. Postal 131
 Bairro: Campus Samambala CEP: 74.001-970
 UF: GO Município: GOIANIA
 Telefone: (62)3521-1215 Fax: (62)3521-1163 E-mail: cep.prpl.ufg@gmail.com



Continuação do Parecer: 2.509-406

Endereço: Prédio da Reitoria Térreo Cx. Postal 131
Bairro: Campus Samambaia CEP: 74.001-970
UF: GO Município: GOIÂNIA
Telefone: (62)3521-1215 Fax: (62)3521-1163 E-mail: cep_prpi.ufg@gmail.com