

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

GILIANE S. TRINDADE, ZÉLIA I. P. LOBATO, BETÂNIA P. DRUMOND, JULIANA A. LEITE,
RICARDO C. TRIGUEIRO, MARIA I. M. C. GUEDES, FLÁVIO G. DA FONSECA, JOÃO R. DOS SANTOS,
CLÁUDIO A. BONJARDIM, PAULO C. P. FERREIRA, AND ERNA G. KROON*

Laboratório de Vírus, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil; Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil; Laboratório de Imunologia Celular e Molecular, Centro de Pesquisas René Rachou-FIOCRUZ, Belo Horizonte, Brazil

Abstract. Outbreaks of bovine vaccinia disease caused by circulation of *Vaccinia virus* (VACV) strains have been a common occurrence in Brazil in the recent years, being an important emergent zoonosis. During a single outbreak that took place in 2001, two genetically different VACV strains were isolated and named Guarani P1 virus (GP1V) and Guarani P2 virus (GP2V). Molecular diagnosis was done through restriction fragment length polymorphism (RFLP) of *ati* gene (*A26L*) and by sequence analysis of a group of five VACV genes including the *C11R*, *J2R*, *A56R*, *B18R*, and *E3L* genes. These findings confirmed the co-circulation of two different *Vaccinia virus* strains during the same outbreak, raising important questions about the origin, emergence, and circulation of VACV strains in Brazil.

Since 1999, an increasing number of episodes of eruptive skin disease affecting dairy cattle and humans have been reported in Brazil.^{1–6} Our research team has been working on these zoonotic outbreaks, and in October of 2001, we studied an outbreak that occurred in Guarani town, Minas Gerais State, in the southeast region of the country.

An epidemiologic study was conducted on the affected area involving 72 visited properties, which comprised an area covered by ~5,700 km of roads. The study revealed that a total of 1,020 lactating cows presented lesions on the teats characterized by the presence of papules that evolved to ulcers. After some time, most of these lesions naturally progressed to healing. In 83% of the farms, human cases were registered, and ~110 persons were infected. Most sick humans were milkers that were contaminated after contact with lesions on cow's teats. These milkers presented pleiomorphic lesions on the hands (mainly papules and painful ulcers), fever, lymphadenitis with enlarged lymph nodes, and eventually secondary bacterial infection on the lesions. Also, in some farms, milkers reported transmission from person to person. The time-course of the infection was between 15 and 30 days. Initial diagnosis was done based on the observed clinical and epidemiologic features.³

To attempt laboratory diagnosis and virus isolation, two samples of dried scabs from two affected cows were collected. Each cow belonged to a different neighboring farm, and these farms were localized 10 km apart from each other. To avoid any possibility of laboratory cross-contamination, the different samples were never manipulated simultaneously. Two viral isolates were obtained and named Guarani P1 virus (GP1V) and Guarani P2 virus (GP2V). Virus isolation was performed using conventional methods including inoculation onto chorioallantoic membrane (CAM) of chicken embryonated eggs and plaque purification cloning on Vero cells to

assure genetic homogeneity. These viruses were grown and purified in sucrose gradient as described elsewhere.^{2,3}

Biologic diagnosis was based on pock morphology in CAM and a serum neutralization test using anti-VACV polyclonal rabbit serum as a positive control.^{2,3} In addition, atomic force microscopy was also used to look for typical poxviruses particles on the samples (data not shown).⁷

Molecular diagnosis of the isolated viruses was performed by polymerase chain reaction (PCR) amplification of the A type inclusion body gene (*A26L*). The *A26L* gene analysis, based on partial amplification of this gene followed by digestion using *Xba*I, has been widely used as a tool for rapid screening and taxonomic differentiation of *Orthopoxvirus*.^{8,9} The GP2V *A26L* gene was amplified, and the amplicon was similar in size to those described for Araçatuba virus (ARAV) and Passatempo virus (PSTV), other VACV strains isolated under similar circumstances in 1999 and 2003, respectively.^{2,6} When the *A26L* amplicon of GP2V was digested with *Xba*I, it presented the same restriction pattern as in ARAV, which was also similar but not identical to those patterns obtained for known VACV strains, such as Western Reserve (WR) and Lister (LST) (Figure 1A). The main difference observed for the GP2V and ARAV *A26L* gene amplicon digests was that the larger fragment generated after *Xba*I digestion migrated faster on the agarose gel than the VACV-WR and VACV-LST analogous fragments (Figure 1A). Attempts to amplify the *A26L* gene of GP1V, using the ATI up and ATI low primers, were unsuccessful (data not shown).⁸ The lack of this amplicon could be caused by a deletion at the *A26L* gene of the GP1V, a fact previously observed for other Brazilian VACV strains, such as BeAn58058 virus (BAV) and Belo Horizonte Virus (VBH).^{10,11} To verify the extension of the probable GP1V *A26L* deletion, we performed a PCR amplification using oligonucleotides P4c1 (located within the *p4c1* gene) and RNAPol, designed based on *Cowpox virus* Brighton Red (CPXV BR) as described elsewhere.¹¹ For CPXV, VACV-WR, and GP2V, a product of ~4,300 bp was obtained. However, for GP1V, a fragment of 300 bp (Figure 1B) was generated and sequenced (GenBank accession no. DQ363383), and it proved that, in GP1V, as well in VBH and BAV, a

* Address correspondence to Erna Geessien Kroon, Laboratório de Vírus, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, caixa postal 486, CEP 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil. E-mail: kroone@icb.ufmg.br

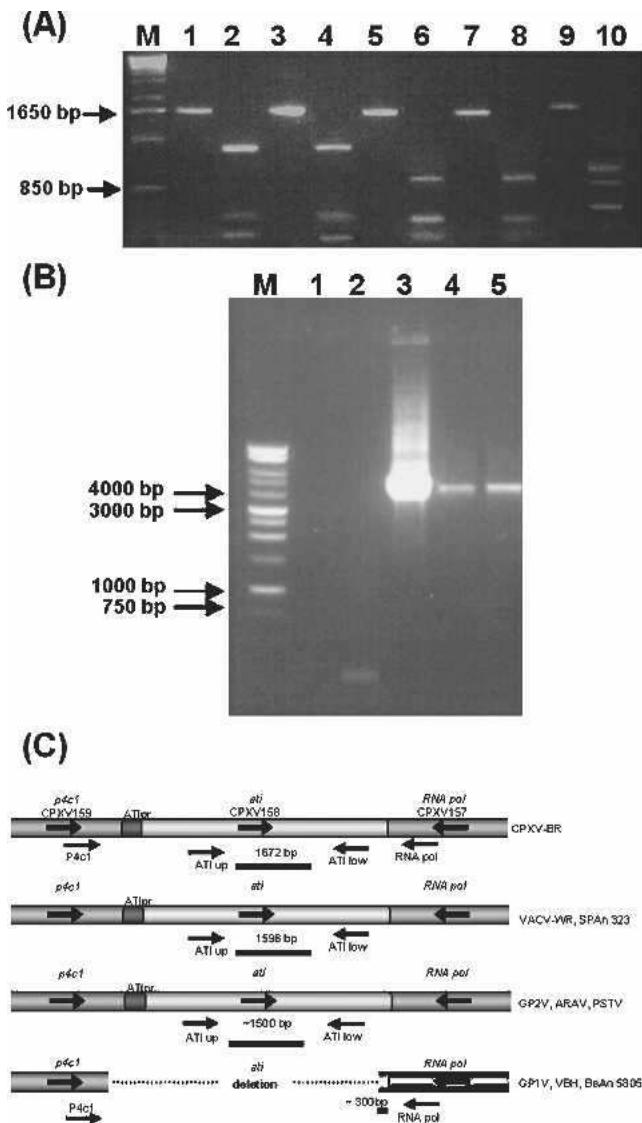


FIGURE 1. **(A)**, PCR-RFLP analysis of A26L gene amplicons of VACVs isolated in Brazil. Lanes were grouped: odd numbers correspond to non-digested PCR and even numbers to RFLP (M, molecular size marker); 1–2, VACV-WR; 3–4, VACV-LST; 5–6, GP2V; 7–8, ARAV; 9–10, CPXV-BR. PCR amplicons digestions were performed using *Xba*I endonuclease. PCR and PCR-PFLP fragments were separated by electrophoresis in a 1% agarose gel stained with EtBr. **(B)**, PCR amplification employing P4c1 and RNAPol primers. Products were fractionated by electrophoresis in a 1% agarose gel stained with EtBr. Lanes (M, molecular size marker; 1-Kb DNA ladder; Promega): 1, negative control; 2, GP1V; 3, GP2V; 4, VACV-WR; 5, CPXV-BR. **(C)**, Schematic comparison of sequenced regions of VAC-WR, GP2V, GP1V, VBH, and CPXV-BR based on work by Meyer and others.⁸ Boxes, genes; thin arrows, primer positions; bold arrows, orientation of genes; dashed lines, deletion.

major portion of the A26L gene is missing (Figure 1C). Additionally, it is important to point out the usefulness of the A26L PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) as a molecular diagnosis approach and for differentiation of Brazilian *Orthopoxvirus* species.^{10,11}

Because GP1V and GP2V presented extensive differences in their A26L ORF, we decided to study other genes to evaluate genomic differences between GP1V and GP2V and other Brazilian VACV strains, such as ARAV, PSTV, Cantagalo virus (CTGV), BAV, and VBH.^{1,2,6,11–13} The thymidine ki-

nase (J2R), vaccinia growth factor (C11R), hemagglutinin (A56R), soluble alpha/beta interferon (IFN) receptor (B18R), and dsRNA-binding protein of VACV (E3L) were chosen for sequencing and analysis. J2R, C11R, and A56R are conserved genes in the *Orthopoxvirus* genus and have been used before as a taxonomic tool to study ungrouped poxviruses.^{11,12,14} B18R and E3L genes, both involved in the viral mechanism of pathogenesis, were also amplified from GP1V, GP2V, and other Brazilian VACV strains.^{15,16} Primers and the reactions conditions to amplify the B18R gene were those described by Marques and others.¹⁰ The primers based on the E3L nucleotide sequence of VACV-WR were E3L sense (5'-AGGCGGATCCATGTCTAAAATCTATATC-3') and E3L anti-sense (5'-TCGCAAGCTTCAGAACATCTAAGTGAC-3'), containing restriction sites for *Bam*H I and *Hind* III (underlined), respectively, and they were used to amplify a 589-bp DNA fragment. Annealing was carried out at 45°C, and PCR reactions were performed as described by Marques and others.¹⁰

Amplicons were cloned into pGEM-T vector (Promega Corp., Madison, WI) and sequenced in both orientations by the dideoxynucleoside method, using M13 universal primers and ET Dynamic Terminator for MegaBACE (GE HEALTHCARE, UK).¹⁷ Nucleotide sequences were assembled using the CAP3 Sequence Assembling Program and deposited in GenBank.¹⁸ Nucleotide and inferred amino acids sequences were aligned with other *Orthopoxvirus* sequences using CLUSTAL W and LALIGN.^{19,20} J2R sequences of GP1V and GP2V (GenBank accession no. DQ206438 and DQ206439, respectively) were identical to each other, presenting high levels of similarity with VACV sequences. These sequences were also identical to VACV-WR and other Brazilian VACV strains, such as BAV, SPAn232, ARAV, and PSTV (data not shown).^{2,6,12,13} C11R sequences of GP1V and GP2V (GenBank accession no. DQ206440 and DQ206441, respectively) presented 99.4% of identity compared with each other and high levels of similarity among other VACV strains.

B18R, E3L, and A56R sequences of GP1V and GP2V were also similar to other VACV strains sequences, although there was a higher level of genetic variance among them. GP1V and GP2V B18R sequences presented seven nucleotide substitutions that resulted in the two amino acid modifications in the inferred amino acid sequences. For GP1V, GP2V, ARAV, and BAV, in the position 346 of the B18R protein, a serine was found, whereas in VACV-WR, VACV-IOC, and CTGV, there was a threonine in the same position (data not shown). The GP1V and GP2V E3L genes presented 98.6% of identity to each other, with substitutions in eight nucleotide positions (Table 1). These mutations led to six amino acid differences observed between the GP1V and GP2V inferred amino acid sequences (data not shown).

However, when the GP1V and GP2V A56R sequences were compared, relatively lower levels of similarity were observed in both nucleotide (95.7%) and amino acid (92.9%) levels. Comparing the GP2V A56R sequence to other Brazilian VACVs, similarity values ranging from 99.1% to 99.3% were obtained (Table 1). As observed for ARAV, PSTV, CTGV, and VACV-IOC, GP2V also presented the same 18-nucleotide deletion signature showed previously at the A56R gene of those VACV strains. This 18-nucleotide deletion has been found in all Brazilian VACV strains isolated to date,

TABLE 1
Nucleotide and amino acid percentage of identities* among sequences of *Vaccinia virus* strains

<i>A56R</i> gene sequences/hemagglutinin protein sequences†										
WR	GP1V	GP2V	ARAV	PSTV	CTGV	VBH	IOC	COP	LST	Wyeth
WR	100	92.9	94.2	93.9	93.9	99.3	96.6	97.6	99.0	95.9
GP1V	100	92.9	94.2	93.9	93.9	99.3	96.6	97.6	99.0	95.9
GP2V	95.7	95.1	98.6	98.3	99.0	92.2	95.5	92.5	93.2	94.5
ARAV	96.3	96.3	99.2	99.7	99.7	93.5	96.9	93.9	94.6	95.5
PSTV	96.1	96.1	99.1	99.9	99.3	92.9	96.5	93.6	94.2	94.8
CTGV	96.1	96.1	99.3	99.9	99.7	93.2	96.5	93.6	94.2	95.5
VBH	99.4	99.4	95.1	95.7	95.5	96.1	95.9	96.9	98.3	95.2
IOC	97.1	97.1	97.9	98.7	98.5	98.6	96.5	96.9	96.9	95.8
COP	98.2	98.2	95.0	95.8	95.6	95.7	97.5	96.8	98.6	95.6
LST	98.9	98.9	95.5	96.3	96.0	96.2	98.3	97.1	99.1	95.6
Wyeth	96.7	96.7	96.8	97.6	97.5	96.1	97.5	96.4	96.3	
<i>E3L</i> gene sequences/dsRNA-binding protein sequences‡										
WR	GP1V	GP2V	ARAV	PSTV	CTGV	VBH	IOC	COP	LST	Wyeth¶
WR	100	96.8	96.8	100	96.8	100	97.9	96.8	98.4	
GP1V	100	96.8	96.8	100	96.8	100	97.9	96.8	98.4	
GP2V	98.6	98.6	100	96.8	100	96.8	96.8	98.9	97.4	
ARAV	98.8	98.8	98.8	96.8	100	96.8	96.8	98.9	97.4	
PSTV	100	100	98.6	98.8	96.8	100	97.9	96.8	98.4	
CTGV	98.4	98.4	99.5	99.6	98.4	96.8	96.8	98.9	97.4	
VBH	99.8	99.8	98.4	98.6	99.8	98.2	97.9	96.8	98.4	
IOC	98.8	98.8	98.2	98.4	98.8	98.8	98.8	96.8	97.4	
COP	98.2	98.2	98.6	98.8	98.2	99.1	98.1	98.6	98.4	
LST	98.8	98.8	98.1	98.2	98.8	98.2	98.6	98.4	99.1	
<i>B18R</i> gene sequences/soluble alpha/beta interferon receptor protein sequences§										
WR	GP1V	GP2V	ARAV	PSTV	CTGV	VBH	IOC	COP	LST**	Wyeth
WR	100	99.4	99.7	99.7	99.7	100	99.0	99.0		
GP1V	99.8	99.4	99.7	99.7	99.7	100	99.0	99.0		
GP2V	99.2	99.2	99.7	99.7	99.7	99.4	99.0	99.0		
ARAV	99.4	99.4	99.9	100	100	99.7	99.4	99.4		
PSTV	99.4	99.4	99.9	100	100	99.7	99.4	99.4		
CTGV	99.4	99.4	99.9	100	100	99.7	99.4	99.4		
VBH	99.8	100	99.2	99.4	99.4	99.4	99.0	99.0		
IOC	99.1	99.1	99.0	99.1	99.1	99.1	99.1	98.7		
COP	99.1	99.1	99.2	99.4	99.4	99.4	99.1	98.9		

* Identities were calculated as the percentage of nucleotide or amino acid substitution on two by two comparison of strains sequences. Sequences alignments and the percentage of identity were calculated by the software LALIGN. Nucleotide sequence identities are shown on the down left side of the table. Amino acid identities are presented in gray on the right side of the table. The compared nucleotide sequences correspond to positions †162207–163089, ‡47780–48349 and §179193–180124 of *A56R*, *E3L*, and *B18R* regions, respectively, according to the published sequence of VACV-WR genome (GenBank accession no. AY243312). *Vaccinia virus* strains: WR, Western Reserve; IOC, Instituto Oswaldo Cruz; COP, Copenhagen; LST, Lister. Brazilian *Vaccinia virus* strains: GP1V, Guarani P1; GP2V, Guarani P2; ARAV, Araçatuba; PSTV, Passatempo; CTGV, Cantagalo; VBH, Belo Horizonte.

†*E3L* and *B18R* sequences of *Vaccinia virus* Wyeth are not available.

** The *B18R* gene is not present in the *Vaccinia virus* Lister genome.

and it has been proposed as a molecular signature of new world VACV strains. However, GP1V and VBH did not present this deletion. Additionally, the lack of this deletion in the GP1V and VBH sequences points out the necessity to review the 18-nucleotide deletion as a molecular signature of new world VACV strains.

To establish a phylogenetic relationship among GP1V, GP2V, and other VACV strains, alignments of the *A56R*, *B18R*, and *E3L* genes were used to construct a concatenated phylogenetic tree by the neighbor-joining method using the Tamura Nei model of nucleotide substitutions implemented in MEGA3.^{21,22} The tree was midpoint-rooted, and 1,000 bootstrap replicates were performed (Figure 2A).

As expected, the concatenated phenogram tree grouped GP1V and GP2V within VACV strains. Although isolated from the same outbreak, at the same time, and from neighboring farms, GP1V and GP2V presented enough genetic divergence to place them in different branches of the phylogenetic tree. Whereas GP2V was clustered with Brazilian VACV strains isolated in previous bovine vaccinia outbreaks

(ARAV, CTGV, and PSTV), GP1V was grouped together with VACV-WR and VBH. Neither GP1V nor GP2V were clustered with VACV strains LST and IOC that were used in Brazil during the smallpox vaccination campaign.^{1,2}

Our findings show that there are genetically different populations of VACV circulating in the country and even in the same outbreak. It has been proposed that the Brazilian VACV isolates obtained from cowpox-like outbreaks form a genetically homogenous population that could have been originated from the spread of a smallpox vaccine strains, particularly the VACV IOC.¹ According to this theory, these strains could have escaped to wild and established circulation in some unknown host, becoming feral during this process.^{1,2,6} However, the characterization of two different VACV strains isolated from a single outbreak, co-circulating in Brazil, points in a different direction. One hypothesis to explain this virus diversity is that different samples, from different sources, and under different circumstances, could have established circulation in nature. Thus, these viruses would have not one but multiple origins. This does not entirely exclude

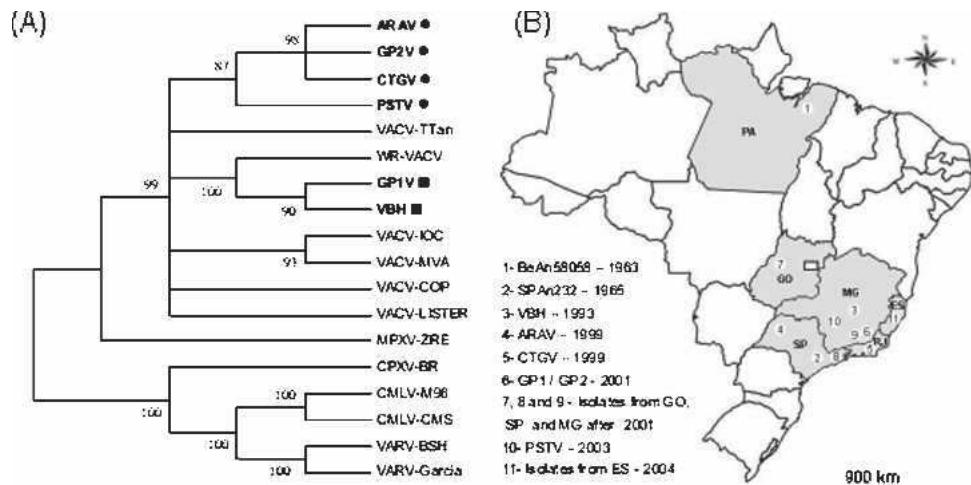


FIGURE 2. **A**, Consensus concatenated phylogenetic tree based on the nucleotide sequences of *Orthopoxvirus A56R*, *B18R*, and *E3L* genes. The tree was constructed by the neighbor-joining method using the Tamura Nei model of nucleotide substitutions implemented in MEGA3. The tree was midpoint-rooted, 1,000 bootstrap replicates were performed, and values > 70% are shown. Nucleotide sequences were obtained from GenBank. The GenBank accession numbers of *A56R*, *B18R*, and *E3L* sequences are GP1V (DQ206436, DQ194380, and DQ194385), GP2V (DQ206437, DQ194381, and DQ194386), ARAV (AY523994, DQ194382, and DQ194389), PSTV (DQ070848, DQ530239, and DQ530240), and VBH (DQ206435, DQ194383, and DQ194390), respectively. Brazilian VACV strains are shown in bold. ■, Brazilian strains that presented partial A26L gene deletion; ●, Brazilian strains that presented 18 nt deletion in the *A56R* gene. **B**, Brazilian states where and when Brazilian VACV strains were isolated. ES, Espírito Santo; GO, Goiás; MG, Minas Gerais; PA, Pará; RJ, Rio de Janeiro; SP, São Paulo. 1, BeAn 58058 virus in 1963; 2, SPAn232 virus in 1965; 3, Belo Horizonte virus in 1993; 4, ARAV in 1999; 5, CTGV in 1999; 6, GP1V and GP2V in 2001; 7, GO isolates after 2001; 8, SP isolates after 2001; 9, MG isolates after 2001; 10, PSTV in 2003; 11, ES isolates in 2004 (unpublished data).

the possibility that the viruses could have evolved from a common origin, derived from a escapee vaccine strain, and differentiated by means of mutation and/or recombination events during circulation in nature. However, our results suggest that multi-factor events may be the best explanation for the VACV genetic diversity observed in Brazil, including the pre-existence and circulation of a possible autochthonous poxvirus.

Received February 15, 2006. Accepted for publication May 10, 2006.

Acknowledgments: The authors thank Dr. Marieta Cristina Madureira from Instituto Mineiro de Agropecuária for support during the epidemiologic investigation. We also thank Dr. José Mário Vilela and Dr. Margareth Spangler Andrade from Nanoscopy Laboratory, Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais, for the AFM analysis. The aid of Dr. Fabrício dos Santos, Rodrigo Redondo, and Laboratório de Biodiversidade e Evolução Molecular where all sequences were made is gratefully acknowledged.

Financial support: The CNPq, CAPES, and FAPEMIG provided financial support. E. G. Kroon, C. A. Bonjardim, P. C. P. Ferreira, F. G. Da Fonseca, and J. R. Santos received fellowship from CNPq. M. I. M. C. Guedes received fellowship from FAPEMIG.

Authors' addresses: Giliane de Souza Trindade, Betânia Paiva Drumond, Juliana Almeida Leite, Ricardo Campos Trigueiro, Maria Isabel Maldonado Coelho Guedes, João Rodrigues dos Santos, Cláudio Antônio Bonjardim, Paulo César Peregrino Ferreira, and Erna Geessien Kroon, Laboratório de Vírus, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, caixa postal 486, CEP 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brasil, Fax: 55 31 3443-6482, E-mails: gitrindade@yahoo.com.br, betaniadrumond@uol.com.br, ju@icb.ufmg.br, rictrigueiro@yahoo.com.br, isabelgueudes@icb.ufmg.br, santosjr@icb.ufmg.br, claubonj@icb.ufmg.br, paulocpf@icb.ufmg.br, and kroone@icb.ufmg.br. Zélia Inês Portela Lobato, Departamento de Medicina Preventiva, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, CEP 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brasil, Fax: 55 31 3443-6482, E-mail: ziplobat@vet.ufmg.br. Flávio Guimarães da Fonseca,

Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, caixa postal 486, CEP 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brasil, Fax: 55 31 3443-6482, E-mail: fdafonseca@cpqrr.fiocruz.br.

REFERENCES

- Damaso CRA, Esposito JJ, Condit R, Moussatché N, 2000. An emergent poxvirus from humans and cattle in Rio de Janeiro state: Cantagalo virus may derive from Brazilian smallpox vaccine. *Virology* 277: 439–449.
- Leite JA, Drumond BP, Trindade GS, Lobato ZIP, da Fonseca FG, dos Santos JR, Madureira MC, Guedes MIMC, Ferreira JMS, Bonjardim CA, Ferreira PC, Kroon EG, 2005. Passatempo virus: a novel *Vaccinia* virus isolated during a zoonotic outbreak in Brazil. *Emerg Infect Dis* 11: 1935–1938.
- Lobato ZIP, Trindade GS, Frois MCM, Ribeiro EBT, Dias GRC, Teixeira BM, Lima FA, Almeida GMF, Kroon EG, 2005. Outbreak of exantemal disease caused by *Vaccinia* virus in human and cattle in Zona da Mata Region, Minas Gerais. *Arq Bras Med Vet Zootech* 57: 423–429.
- Nagasse-Sugahara TK, Kisielius JJ, Ueda-Ito M, & 8 other authors 2004. Human vaccinia-like virus outbreaks in São Paulo and Goiás States, Brazil: Virus detection, isolation and identification. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 46: 315–322.
- Schatzmayr HG, Lemos ER, Mazur C, Schubach A, Majerowicz S, Rozental T, Schubach TM, Bustamante MC, Barth OM, 2000. Detection of poxvirus in cattle associated with human cases in the State of Rio de Janeiro: Preliminary report. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95: 625–627.
- Trindade GS, Fonseca FG, Marques JT, Nogueira ML, Mendes LC, Borges AS, Pituco EM, Bonjardim CA, Ferreira PC, Kroon EG, 2003. Araçatuba virus: A vaccinia-like virus associated with cattle and human infection. *Emerg Infect Dis* 9: 155–160.
- Malkin AJ, McPherson A, Gershon PD, 2003. Structure of intracellular mature vaccinia virus visualized by in situ atomic force microscopy. *J Virol* 77: 6332–6340.
- Meyer H, Roop SL, Esposito JJ, 1997. Gene for A-type inclusion

- body protein is useful for a polymerase chain reaction assay to differentiate orthopoxvirus. *J Virol Meth* 64: 217–221.
- 9. Neubauer H, Pfeffer M, Meyer H, 1997. Specific detection of mousepox virus by polymerase chain reaction. *Lab Anim Sci* 31: 201–205.
 - 10. Marques JT, Trindade GS, da Fonseca FG, dos Santos JR, Bonjardim CA, Ferreira PCP, Kroon EG, 2001. Characterization of ATI, TK and IFN-alpha/betaR genes in the genome of the BeAn 58058 virus, a naturally attenuated wild Orthopoxvirus. *Virus Genes* 23: 291–301.
 - 11. Trindade GS, da Fonseca FG, Marques JT, Diniz S, Leite JA, De Bodt S, Van der Peer Y, Bonjardim CA, Ferreira PCP, Kroon EG, 2004. Belo Horizonte virus: A vaccinia-like virus lacking the A-type inclusion body gene isolated from infected mice. *J Gen Virol* 85: 2015–2021.
 - 12. da Fonseca FG, Trindade GS, Silva RLA, Bonjardim CA, Ferreira PCP, Kroon EG, 2002. Characterization of a vaccinia-like virus isolated in a Brazilian forest. *J Gen Virol* 83: 223–228.
 - 13. Fonseca FG, Lanna MCS, Campos MAS, Kitajima EW, Peres JN, Golgher RR, Ferreira PCP, Kroon EG, 1998. Morphological and molecular characterization of the poxvirus BeAn 58058. *Arch Virol* 143: 1171–1186.
 - 14. Roop SL, Jin QI, Knight JC, Massung RF, Esposito JJ, 1995. PCR strategy for identification and differentiation of smallpox and other Orthopoxviruses. *J Clin Microbiol* 33: 2069–2076.
 - 15. Goebel SJ, Johnson GP, Perkus ME, Davis SW, Winslow JP, Paoletti E, 1990. The complete DNA sequence of vaccinia virus. *Virology* 179: 247–266.
 - 16. Johnson GP, Goebel SJ, Paoletti E, 1993. An update on the Vaccinia virus genome. *Virology* 381: 381–401.
 - 17. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR, 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463–5467.
 - 18. Huang X, Madan A, 1999. CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Res* 9: 868–877.
 - 19. Pearson W. LALIGN-find multiple matching subsegments in two sequences. http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html. Accessed January 2006.
 - 20. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ, 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22: 4673–4680.
 - 21. Tamura K, Nei M, 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol* 10: 512–526.
 - 22. Kumar S, Tamura K, Nei M, 2004. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform* 5: 150–163.

The elution of foot-and-mouth disease virus from vaccines adjuvanted with aluminium hydroxide and with saponin*

T. R. Doel[†] and R. F. Stapleton[†]

The elution of 146S particles of foot-and-mouth disease virus from aluminium hydroxide was found to be dependent on the strain of virus used and whether saponin was included in the preparation. Saponin used at 1.7 mg ml⁻¹ made little difference to the elution of C Noville virus, but inhibited almost completely the elution of SAT 3 Bec 1/65. Experiments with radioactive virus demonstrated that, with the exception of SAT 2 Bot 3/77, 146S particles did not elute in a degraded or aggregated form.

INTRODUCTION

The first practicable adsorbed vaccine for the control of foot-and-mouth disease was developed by Waldmann and his colleagues in the late 1930s. Vaccine was prepared by adsorbing foot-and-mouth disease virus (FMDV) to aluminium hydroxide gel and then inactivating under defined conditions with formalin (Waldmann & Köbe, 1938). Modern aqueous vaccines are still formulated with aluminium hydroxide but are usually supplemented with saponin for improved adjuvancy. Other developments have included the use of aziridines such as acetyleneimine (AEI) to inactivate virus prior to adsorption.

Inactivated vaccines are usually monitored for residual infective virus by inoculation into susceptible cattle. However, there are several disadvantages with the cattle innocuity test, not the least of which are the cost of the animals and the relatively small

* Received for publication 18 November 1981.

† Animal Virus Research Institute, Pirbright, Surrey GU24 0NF, U.K.

volumes of vaccine (approximately 0·1 ml per inoculation site) which can be tested by the recommended intradermolingual route (Henderson, 1952).

An alternative procedure has been used by some workers (for example, Fernandez, Sondahl, Abaraon & Ferreira, 1979), in which virus is eluted from vaccine and assessed for infectivity in cultured cells. The sensitivity of the procedure may be increased by testing the concentrated eluate from a relatively large volume of vaccine. Nevertheless, the validity of this approach relies greatly on the efficiency of the elution process.

An elution procedure could also be of considerable value in assessing vaccines prior to potency testing in cattle. Thus, it should be possible to measure the concentration per vaccine dose of the 146S particles of FMDV which are considered essential for inducing immunity to the disease (Wild & Brown, 1968).

In the work reported here, we have examined the elution of different strains from conventional vaccines, with particular reference to the influence of saponin on the elution process. Experiments were also conducted with radioactive virus preparations in order to assess the degree of aggregation or degradation of eluted 146S particles and thus determine overall recoveries of virus from vaccine.

MATERIALS AND METHODS

Production of viruses

Viruses were grown at 37°C in BHK 21 cell monolayers maintained with Eagle's medium containing 10% (v/v) tryptose phosphate broth and 1% (v/v) ox serum. For the production of radioactive virus, a BHK 21 cell monolayer was infected with a high titre (*c.* 10¹⁰ p.f.u.) of virus and incubated at 37°C for 30 min. The inoculum was removed, the cell sheet washed and covered with methionine-free Eagle's medium and incubation continued for a further hour. The cell sheet was washed once more and incubation continued with methionine-free Eagle's medium containing [³⁵S]methionine until the cell sheet disintegrated.

Inactivation of infectivity

All virus preparations were inactivated by incubating at 37°C for 24 h with 0·05% (v/v) final concentration of acetylethyleneimine.

Purification of viruses

Virus suspensions were clarified by centrifugation at 2000 r min⁻¹ for 20 min. Radioactive preparations were clarified and centrifuged at 30 000 r min⁻¹ for 90 min and the pellets resuspended in 0·05 M Tris-HCl, 0·15 M NaCl, pH 7·6. Following centrifugation at 2000 r min⁻¹ for 30 min, the supernatants were made 2% with Nonidet NP40 and applied to 5–30% (w/v) sucrose gradients in Tris-HCl, NaCl buffer. Gradients were centrifuged at 40 000 r min⁻¹ for 65 min and 146S particles identified by their absorbance at 260 nm.

Preparation of vaccine

Adsorbed vaccine was prepared by adding two volumes of 2% aluminium hydroxide gel (made by Cooper-Zeltia, Spain, and kindly provided by the Wellcome Laboratory, Pirbright) to 10 volumes of clarified virus suspension and mixing continuously for 16 h at 4°C. The volume of the mixture was adjusted to 16 volumes with 0·04 M

phosphate buffer, pH 7·6, and saponin (Food Industries Ltd., P3 grade, kindly provided by the Wellcome Laboratory, Pirbright) or Quil A (Superfos Export Company a/s, Vedbaek, Denmark) added to a final concentration of 1·7 or 1·5 mg ml⁻¹ respectively.

Elution of virus

An elution procedure described by Matheka (1959) was used as a basis for most of the experiments described here. Ten millilitres of vaccine was centrifuged at 2000 r min⁻¹ for 30 min, the supernatant discarded and the deposit washed with 0·04 M phosphate buffer. The aluminium hydroxide was recovered by a second cycle of centrifugation and mixed with 3·3 ml of 0·3 M sodium phosphate buffer, pH 7·6. The supernatant from a third cycle of centrifugation was retained for measurement of 146S particles. In some experiments, two more cycles of elution were carried out and the 146S particle concentration of the pool measured.

Complement fixation tests were conducted throughout adsorption and elution procedures. With most vaccines no evidence was found either of incomplete adsorption or of elution of virus prior to treatment with 0·3 M phosphate buffer.

Quantification of 146S particles

This was as described by Doel, Fletton & Staple (1982). Briefly, 1–2 ml of eluted virus was applied to a 5–30% (w/v) sucrose gradient and centrifuged either at 25 000 r min⁻¹ for 165 min, 12°C, in an MSE 6 × 16 rotor or at 40 000 r min⁻¹ for 65 min, 12°C, in a Beckman SW40 rotor. The contents of the centrifuge tube were pumped through a flow cell of a spectrophotometer and the concentration of 146S particles in the original sample calculated from the area of the 146S peak on the spectrophotometer chart record.

Radioactive virus eluted from aluminium hydroxide was applied to a 10–35% (w/v) sucrose gradient in 0·05 M Tris-HCl, 0·3 M NaCl, 1% Nonidet NP40, supported on a 2 ml CsCl cushion ($D_{20} = 1·6 \text{ g cm}^{-3}$) and centrifuged at 40 000 r min⁻¹ for 65 min, 12°C. Gradients were fractionated and the fractions counted in a liquid scintillation spectrometer.

Protein estimation

Protein was estimated by the TCA-Lowry procedure described by Bensadoun & Weinstein (1976).

RESULTS

Elution of 146S particles from conventional vaccines

The results in Table 1 indicate the quantities of 146S particles eluted from vaccines with 0·3 M phosphate buffer. With the exception of C Noville, the use of saponin inhibited the elution of 146S particles. This was particularly marked with SAT 3 Bec 1/65. Experiment 3 demonstrated significant levels of inhibition with two other batches of saponin. If saponin was omitted from the formulation, recoveries of 146S particles of all the viruses usually exceeded 50%. The use of 1·5 mg ml⁻¹ Quil A in vaccines had little or no inhibitory effect on the elution of 146S particles. The

TABLE 1. Elution of 146S particles of five strains of foot-and-mouth disease virus from aluminium hydroxide vaccines

Virus strain	Number of elutions	Percentage of 146S particles eluted from vaccine containing		
		No saponin	1.7 mg ml ⁻¹	1.5 mg ml ⁻¹
Experiment 1				
O BFS 1860 (serum-free)	3	58	<10	50
O BFS 1860	3	64	16	54
C Noville	3	51	54	52
A Cruzeiro	3	47	<10	58
SAT 3 Bec 1/65	3	55	0	76
Experiment 2				
O BFS 1860	1, 3	59, 72	11, 19	—
O BFS 1860	1	59	19	—
O Lausanne	1	68	21	—
C Noville	1, 3	46, 67	46, 52	—
C Noville	1, 3	51, 47	31, 39	—
Experiment 3				
O BFS 1860	3	69	30, 25*, 30†	60

Saponin used throughout was Batch 3089/79 except for (*) Batch 1220, (†) Batch 308/79.

three-stage elution procedure allowed the recovery of slightly higher concentrations of 146S particles from saponin-treated vaccines.

Elution of radioactive 146S, 75S and 12S particles

Because the sucrose gradient procedure used in the above-mentioned work only detects soluble 146S particles, a series of experiments was conducted with [³⁵S]-methionine labelled viruses to assess the extent of degradation or aggregation of 146S particles in vaccine eluates. Radioactive 146S particles of 7 viruses and 75S particles of A Cruzeiro were purified from AEI-inactivated monolayer preparations and mixed with the appropriate non-radioactive clarified virus suspensions.

Three types of vaccine were prepared. These were (i) virus adsorbed to aluminium hydroxide, (ii) virus adsorbed and supplemented with 1.7 mg ml⁻¹ saponin (Batch 3089/79), (iii) virus heated at 56°C for 90 min to convert 146S particles to 12S particles and adsorbed and supplemented with saponin as before. Non-absorbed control preparations were included to allow the measurement of eluted versus bound radioactivity and the detection of spontaneous degradation of 146S particles to 12S particles. Elution was carried out with 0.3 M phosphate, pH 7.6, by the one-stage procedure and both eluates and control preparations were centrifuged in sucrose density gradients incorporating a CsCl cushion.

Prior to elution, it was found that the adsorption to aluminium hydroxide was complete in all but two of the vaccines. Approximately 10% of the total radioactivity of

the unheated C Noville 146S preparation did not adsorb to the aluminium hydroxide and aluminium hydroxide/saponin vaccines.

Figure 1 shows the results of the elution experiments. With the type of gradient used, aggregated 146S or 75S particles would be detected at the sucrose-CsCl interface (fraction 2), degraded particles would be detected in fractions 9 to 10 and soluble 146S or 75S particles would be detected usually in fractions 4 to 6. The relative levels of radioactivity among the four gradients of each virus may be taken as a reliable indication of the quantities of radioactivity adsorbed to and eluted from the vaccines. With the exception of SAT 2 Bot 3/77, the gradient profiles in Fig. 1 indicate that the only eluted virus products from 146S vaccine were soluble 146S particles. None of the control preparations showed evidence of degraded 146S particles. The eluate from each of the 12S vaccines gave a radioactive peak in the predicted position in the gradient. The eluate from the Bot 3/77 aluminium hydroxide/saponin vaccine contained, in addition to soluble 146S particles, a significant though relatively small amount of degraded virus. When the elution experiments were repeated with a radioactive preparation of SAT 2 Bot 3/77 which had been stored at 4°C for seven days prior to formulation, the levels of radioactivity eluted from the aluminium hydroxide/saponin vaccine were similar to those in Fig. 1, although a greater proportion of the radioactivity was recovered from the 12S position of the gradient. The gradient profile of the non-adsorbed virus once again showed no evidence of degradation or aggregation of 146S particles (results not shown).

Table 2 summarizes the elution characteristics of the radioactive viruses calculated from the areas of the peaks depicted in Fig. 1. Although saponin clearly inhibited the elution of 146S particles and 75S particles, C Noville, SAT 1 Bot 1/68 and Asia 1 Iran 1/73 were least affected. Whereas the results in Table 2 were derived from single sucrose gradients, other elution work in this paper was conducted with duplicate or triplicate gradients. Nevertheless, there is reasonable agreement with the data in Table

TABLE 2. Elution of radioactive 146S and 12S particles of seven strains of foot-and-mouth disease virus from aluminium hydroxide vaccines

Virus	No saponin 146S	Percentage* of particles eluted from vaccines containing	
		1·7 mg ml ⁻¹ saponin 146S	12S
A Cruzeiro	61 (51)†	30 (17)†	15
Asia 1 Iran 1/73	62	48	11
C Noville	54	43	19
O BFS 1860	54	28	6
SAT 1 Bot 1/68	33	26	7
SAT 2 Bot 3/77	39	8 as 146S 2 as 12S	1·5
SAT 3 Bec 1/65	59	10	19

* Expressed as a percentage of the radioactivity in control (non-absorbed) gradients and calculated from the areas under the radioactive peaks in Fig. 1.

† Values in brackets refer to 75S particles of A Cruzeiro.

1. With the exception of SAT 3 Bec 1/65 12S vaccine, the results in Table 2 emphasize the very low levels of radioactivity which eluted from the 12S vaccines. This last

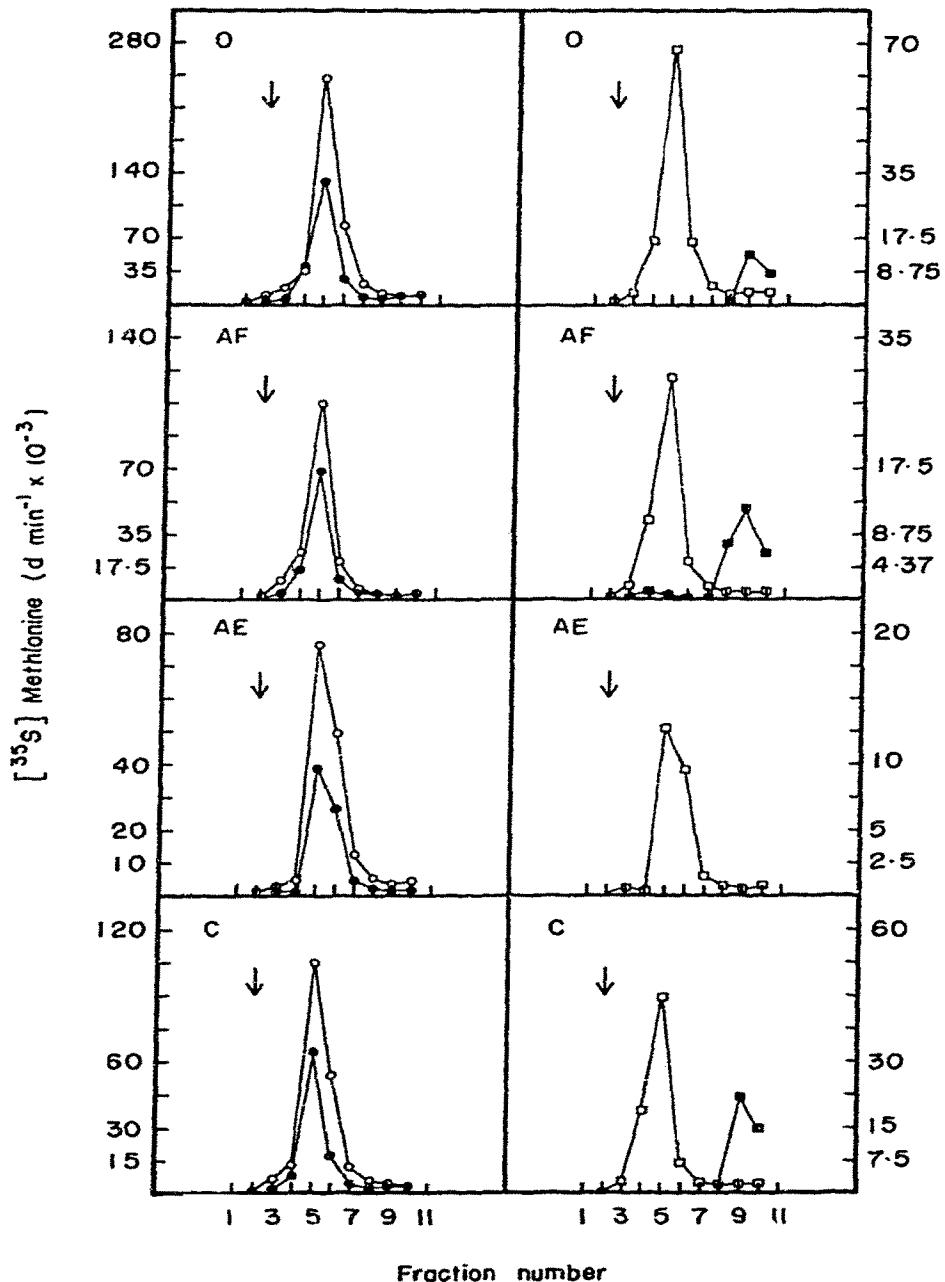
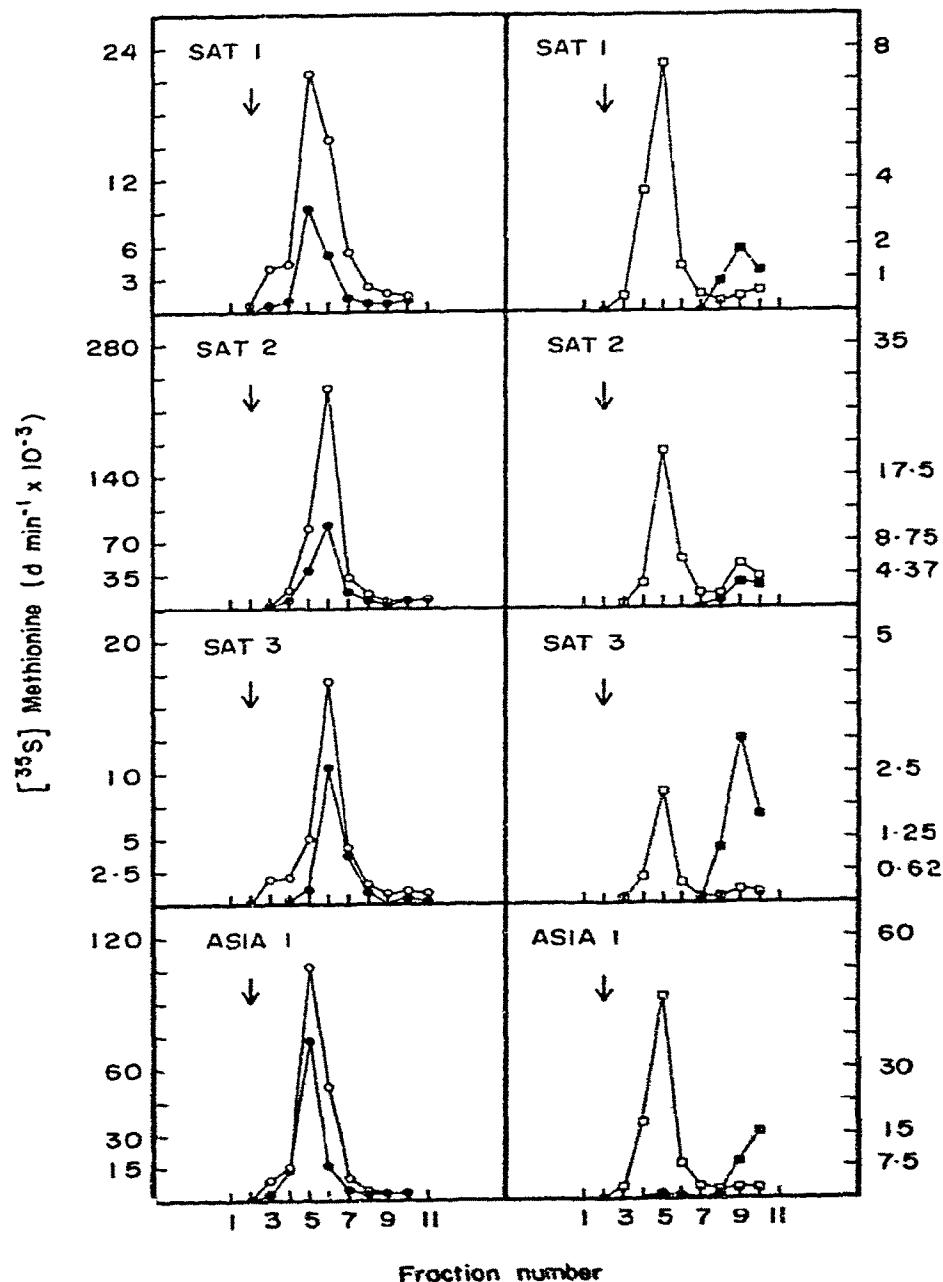


Fig. 1. Sucrose density gradient analysis of 146S, 75S and 12S particles of seven strains of FMDV eluted from aluminium hydroxide vaccines. Viruses were: O BFS 1860 (O); A Cruzeiro 146S particles (AF) and 75S particles (AE); C Noville (C); Asia 1 Iran 1/73 (Asia 1); SAT 1 Bot 1/68 (SAT 1); SAT 2 Bot

observation has important implications for the Bot 3/77 146S aluminium hydroxide/saponin vaccine, in which 2% of the 10% radioactivity eluted was detected at the top of



3/77 (SAT 2); SAT 3 Bec 1/65 (SAT 3). ○, control non-adsorbed 146S particles; ●, aluminium hydroxide adsorbed 146S particles; □, aluminium hydroxide/saponin adsorbed 146S particles; ■, aluminium hydroxide/saponin adsorbed 12S particles. The position of the CsCl cushion is indicated by the arrow.

the gradient in the 12S position. Thus, even low levels of eluted, degraded 146S particles with this vaccine are probably indicative of higher levels of strongly bound degraded 146S particles.

Further experiments with radioactive O BFS 1860 confirmed the results in Fig. 2 and indicated that 12S particles were strongly bound to aluminium hydroxide in the absence of saponin. This series of experiments also indicated that the inhibitory effect of saponin on elution was exacerbated by omission of serum from the medium (results not shown).

Experimental elution procedures

The low levels of 146S particles recovered from some aluminium hydroxide/saponin vaccines prompted a series of elution experiments in which a range of buffers and other reagents were evaluated. In the first experiment, 1% ox serum was adsorbed to aluminium hydroxide gel and the elution of serum proteins by various solutions measured by a modified Lowry procedure (Bensadoun & Weinstein, 1976). Table 3 indicates that similar levels of protein were recovered from the saponin-free gel, regardless of the elution conditions. In contrast to elution of 146S particles, saponin had a relatively insignificant influence on the elution of ox serum proteins, although the level of elution with sodium phosphate was slightly lower than with ammonium phosphate.

TABLE 3. Elution of ox serum proteins from aluminium hydroxide gel

Elution buffer	Protein eluted from*	
	Al(OH) ₃	Al(OH) ₃ + 1.7 mg ml ⁻¹ saponin
0.3 M Sodium phosphate, pH 7.6	24	23
0.3 M Sodium phosphate, pH 9.0	25	20
0.3 M Sodium phosphate, pH 9.5	24	21
0.3 M Sodium phosphate, pH 10.0	24	21
0.3 M Ammonium phosphate, pH 9.0	23	24
0.3 M Ammonium phosphate, pH 9.5	25	25
0.3 M Ammonium phosphate, pH 10.0	25	27

* Expressed as a percentage of total protein adsorbed by Al(OH)₃ gel and measured by the TCA-Lowry procedure. Single-step elution procedure.

A range of buffer solutions was used to elute O BFS 1860 from a vaccine containing saponin (Table 4). The highest level of eluted virus was obtained with 0.3 M sodium phosphate containing 0.01 M EDTA and 1% mercaptoethanol. An interesting feature of the experiment was the cooperative nature of this elution buffer. Replacement or omission of one of the components—for example, 0.3 M sodium phosphate replaced by 0.04 M sodium/potassium phosphate—gave significantly reduced recoveries of virus. Experiments with [³⁵S]methionine labelled O BFS 1860 indicated that the highest concentration of mercaptoethanol used had no significant effect on the integrity of 146S particles. The poor recoveries of virus with the higher concentrations of EDTA (Table 4) were probably due to degradation of 146S particles during elution.

TABLE 4. Elution of 146S particles of O BFS 1860 from aluminium hydroxide vaccine containing $1\cdot7 \text{ mg ml}^{-1}$ saponin

Elution buffer*	Percentage of 146S particles eluted
0·3 M PO_4	12·5
0·3 M PO_4 + 1% mercaptoethanol	17·0
0·3 M PO_4 + 2% mercaptoethanol	19·5
0·3 M PO_4 + 4% mercaptoethanol	17·0
0·3 M PO_4 + 8% mercaptoethanol	17·0
0·3 M PO_4 + 0·01 M EDTA	13·0
0·3 M PO_4 + 0·02 M EDTA	10·0
0·3 M PO_4 + 0·04 M EDTA	0
0·3 M PO_4 + 1% mercaptoethanol + 0·01 M EDTA	26·0
0·04 M PO_4 + 2% mercaptoethanol	0
0·04 M PO_4 + 0·02 M EDTA	0
0·04 M PO_4 + 1% mercaptoethanol + 0·01 M EDTA	0

*0·3 M PO_4 was prepared from sodium salts, pH 7·6, 0·04 M PO_4 was mixed potassium and sodium salts, pH 7·6. Single-step elution procedure.

A number of other reagents and procedures were also evaluated in an attempt to elute larger quantities of 146S particles. These included elution with detergents such as sodium dodecyl sulphate and Nonidet NP40, pre-treatment of the vaccine with trichloroethylene, ether, aqueous ethanol and acetone solutions prior to elution with 0·3 M sodium phosphate, and cycles of freeze-thawing combined with ultrasonication. None of these experimental conditions produced levels of eluted virus comparable with 0·3 M sodium phosphate elution (results not shown).

DISCUSSION

In this study we have shown that up to 70% of 146S particles of most strains of FMDV may be recovered from saponin-free aluminium hydroxide vaccine by elution with 0·3 M phosphate, pH 7·6. Experiments with radioactive 146S and 12S particles indicated that, with the exception of Bot 3/77, 146S did not elute in a degraded or aggregated form. Thus, with saponin-free vaccine, the elution and innocuity testing procedure prescribed by the European Pharmacopoeia (1975) would appear to be applicable to most strains of FMDV. However, the validity of the procedure when applied to saponin-treated vaccines is questionable. Whereas the recoveries of C Noville and Asia 1 Iran 1/73 from saponin/aluminium hydroxide vaccines would probably be high enough to ensure a statistically representative sample for innocuity testing, the often poor levels of recovered 146S particles of viruses such as SAT 3 Bec 1/65 make the procedure of doubtful value. It should be mentioned that Fernandez, Sondahl, Abar-acon & Ferreira (1979) have reported innocuity testing of virus eluted from saponin/aluminium hydroxide vaccine. However, their work was carried out with C Indaial at a saponin concentration of 1 mg ml^{-1} . Our observations with C Noville would suggest that these authors were fortunate in their choice of virus strain. We have also shown (Staple & Doel, 1982) that four strains of the C serotype are unaffected by $1\cdot7 \text{ mg ml}^{-1}$ saponin in the non-adsorbed state, whereas other viruses such as O BFS 1860 are

aggregated under the same conditions. In this respect, there appears to be a correlation between elution of virus and saponin sensitivity. Thus, virus strains which elute poorly from vaccine containing saponin are readily aggregated in the free state by similar concentrations of saponin (Staple & Doel, 1982).

At the beginning of our work we had anticipated that the binding of 146S particles to aluminium hydroxide would have a disruptive effect with some viruses. In addition to the general phenomenon of protein denaturation on surfaces such as glass, Meloen & Briaire (1980) have demonstrated the exposure of internal antigens when 146S particles are adsorbed to plastic microtitre plates. Our results indicate that saponin facilitates the degradation of SAT 2 Bot 3/77 virus on saponin/aluminium hydroxide vaccines. Because of the poor recoveries of 146S particles of O BFS 1860 and SAT 1 Bot 1/68 from, and the strong binding of 12S particles (Table 2) to this type of vaccine, the possibility cannot be ruled out that these viruses also degrade significantly when adsorbed. In similar experiments with non-adsorbed radioactive 146S particles, we were unable to detect significant degradation of O BFS 1860, C Noville and SAT 3 Bec 1/65 by saponin (Staple & Doel, 1982).

Despite the complex situation that exists with the elution of FMDV from vaccines containing saponin, it is appropriate to consider possible approaches to a standardized elution procedure. At the very least, it could be used to eliminate inadequately inactivated vaccines prior to innocuity testing in cattle. Furthermore, as more information on the relationship between potency in cattle and concentration of 146S particles becomes available for each vaccine strain, a similar screening procedure could be used to reject vaccines with inadequate concentrations of 146S particles.

On the basis of both the present observations and more recent experiments in our laboratory, we are not optimistic that the efficiency of elution of 146S particles from vaccines containing saponin can be significantly improved. An alternative approach would be to carry out elution prior to addition of saponin. However, this would not always be a practicable measure, particularly in situations where a control laboratory wished to check a commercial vaccine. Such a situation has occurred in our own laboratory, where a number of unsuccessful attempts have been made to elute useful quantities of 146S particles from time-expired vaccines prior to potency testing.

Another approach would be to formulate vaccines with appropriate levels of either Quil A, the purified adjuvant component of saponin (Dalsgaard, 1978), or a semi-purified fraction of saponin from which the component responsible for inhibition of elution was removed. Although the use of Quil A would increase the costs of vaccine production, this advantage would be offset to some extent by the ease of elution of virus for the purposes of innocuity testing and biochemical and biophysical evaluation of 146S particles in vaccines. Given sufficient data, it is not unreasonable to suggest that laboratory procedures could eventually replace costly experiments in large animals.

Acknowledgements

We wish to thank Janet Lee and Bridie Clinch for excellent technical assistance and Trevor Collen for the preparation of Fig. 1.

REFERENCES

- Bensadoun, A. & Weinstein, L. (1976). Assay of proteins in the presence of interfering materials. *Analytical Biochemistry* 70, 241-250.

- Dalsgaard, K. (1978). A study of the isolation and characterisation of the saponin Quil A. Evaluation of its adjuvant activity with special reference to the application in the vaccination of cattle against foot-and-mouth disease. *Acta Veterinaria Scandinavica* 19, Suppl. 69, 7–40.
- Doel, T. R., Fletton, B. W. & Staple, R. F. (1982). Further developments in the quantification of small RNA viruses by u.v. photometry of sucrose density gradients. In: Proceedings of the joint ESCAT-IABS meeting on the use of heteroploid and other cell substrates for the production of biologicals, Heidelberg, 1981. *Developments in Biological Standardization* 50, 209–219.
- Fernandez, A. A., Sondahl, M. S., Abaracon, D. & Ferreira, Maria E. (1979). Innocuity control of aluminium hydroxide saponin foot-and-mouth disease vaccines by elution and concentration of the antigen. *Boletin del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa* 33–34, 57–59.
- Henderson, W. M. (1952). A comparison of different routes of inoculation of cattle for detection of the virus of foot-and-mouth disease. *Journal of Hygiene, Cambridge* 50, 182–194.
- Matheka, H-D. (1959). Ueber das Verhalten des Maul- und Klauenseuche-Virus bei Adsorption an Aluminiumhydroxyd und nachfolgender Elution. Mit. 1: Untersuchung der Faktoren, die die Adsorption und Elution beeinflussen. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasiten- und Infektionskrankheiten und Hygiene. I. Originale* 174, 473–492.
- Meloen, R. H. & Briaire, J. (1980). A study of the cross-reacting antigens on the intact foot-and-mouth disease virus and its 12S subunits with antisera against the structural proteins. *Journal of General Virology* 51, 107–116.
- Pharmacopée Européenne (1975). Groupe d'Experts No. 15V. Fièvre Aphthuse. Document PA/PH/Exp. 15V/T(75)4. Conseil d'Europe: Strasbourg.
- Staple, R. F. & Doel, T. R. (1982). Interactions between saponin and 146S particles of foot-and-mouth disease virus. *Journal of Biological Standardization* 10, 147–156.
- Waldmann, O. & Köbe, K. (1938). Die aktive Immunisierung des Rindes gegen Maul- und Klauenseuche. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* 22, 317–320.
- Wild, T. F. & Brown, F. (1968). A study of the physical properties of the immunising antigen of foot-and-mouth disease virus and the effect of various inactivating agents on its structure. *Archiv für die gesamte Virusforschung* 24, 86–103.

Inactivated smallpox vaccine. A comparison of inactivation methods

By G. S. TURNER, E. J. SQUIRES AND H. G. S. MURRAY

*The Lister Institute of Preventive Medicine,
Elstree, Hertfordshire*

(Received 6 November 1969)

SUMMARY

Vaccines were prepared from a single pool of high-titred vaccinia virus and inactivated by six methods, namely heat, formalin, hydroxylamine, β -propiolactone, ultraviolet irradiation, and visible light and methylene blue. Large doses of the vaccines were required to protect mice against intracerebral challenge. Differences in protection were not attributable to the method of their inactivation. The vaccines also induced similar degrees of skin immunity in rabbits which showed no severe dermal reactions when challenged with either homologous killed vaccine or live virus. The virus-neutralizing, haemagglutinin-inhibiting and complement fixing antibody responses to the vaccines differed; heat-inactivation preserved these antigens least well and β -propiolactone apparently the best. In both rabbits and mice there was little association between the different antibody responses to each vaccine or between the degrees of antibody response and the protection they induced. The relation of these findings to pox-virus immunity and the use of inactivated smallpox vaccine in man is discussed.

INTRODUCTION

There have been many attempts to produce an inactivated smallpox vaccine that would obviate the inherent hazards of conventional Jennerian vaccination. However, differences in preparation and in the assessment of their efficacy as antigens, either in man or animals, have produced many conflicting results (Janson, 1891; Parker & Rivers, 1936; Donally & Weil, 1940; Weil & Gall, 1940; Collier, McClean & Vallet, 1955; Herrlich, 1959; Beunders, Driessens & van den Hoek, 1960; Mahnel, 1960; Amies, 1961; von Epp, 1961; Lindenman & Buser, 1962; Kaplan, McClean & Vallet, 1962; Ramano Rao, 1962; Kaplan, Benson & Butler, 1965; Turner & Kaplan, 1965; McNeill, 1965; Madeley, 1968). Vaccines prepared from virus grown on different hosts have varied in antigen content, some were incompletely inactivated, and others may have lost immunogenicity as the result of the chemical or physical treatment used for inactivation. In the present study six commonly used methods of inactivation were used to make vaccines from a single batch of high titred virus. Immunogenicity was assessed by antibody response and skin immunity in rabbits, and by protection tests in mice. Immunization schedules and dosage were limited to those thought to be practicable when translated for use in man.

MATERIALS AND METHODS

Viruses

The Lister Institute strain of vaccinia virus was used for the preparation of vaccines. It was extracted from sheep dermal pulp in 0·015M phosphate buffered saline at pH 7·0, purified by treatment with 'Arcton 113' (trifluorotrichloroethane I.C.I.) and differential centrifugation. A stock suspension containing 10^9 to 10^{10} pock-forming units (pk.f.u.)/ml. was stored at -160° C. in 20 ml. volumes. Virus for the dermal challenge of rabbits was derived from chick chorioallantoic membranes (CAM) infected with the same strain. It was prepared and stored similarly, contained 3×10^9 pk.f.u./ml. and was bacteriologically sterile. The neurotropic strain of vaccinia virus (W.R.) used for intracerebral (i.e.) challenge of mice was a freeze-dried preparation of mouse brain. It was stored at 0-4° C.; when reconstituted and titrated in 16-20 g. mice it contained 10^4 LD₅₀/0·02 ml.

Virus assay

0·1 ml. volumes of suitable dilutions of samples were inoculated on the CAM of 12-day chick embryos. Virus was estimated from the mean pock counts of 4-6 membranes after 48 hr. incubation. Titres are expressed in pk.f.u./ml.

Inactivation procedures

Dye and visible light. Virus suspensions were illuminated with a Philips Photolita bulb at 50 ft.c. intensity for 45 min. in the presence of methylene blue (3×10^{-5} M) (Turner & Kaplan, 1965).

Ultraviolet light. Virus suspensions were exposed for 30 min. in open Petri dishes 30 cm. distant from a UV tube (Philips 30 watt).

Heat. Virus sealed in suitable containers was completely immersed in a water bath at 60° C. for 40 min.

Formalin. Virus was stirred for 24 hr. at 18-20° C. in a dark container in the presence of formaldehyde (0·03M) (B.D.H.A.R.) and glycine (0·04M) (Gard, 1957).

Hydroxylamine. Hydroxylamine hydrochloride (Hopkins & Williams A.R.) was freshly prepared as a 2M solution. The free acid was neutralized with NaOH before dilution to a final concentration of 0·1M in the virus mixture. Inactivation was erratic and was only complete after long exposure (60-72 hr.) at 18-20° C. in the dark.

β-propiolactone (B.P.L.). Concentrations ranging between 1/250 and 1/500 were used, the mixture being held either at 0-4° C. or mechanically stirred for 24 hr. at 18° C. Free acid produced during the hydrolysis of the inactivator was neutralized with a few drops of Na₂CO₃ (0·5M). The inactivation of most of the virus was rapid, but there were often traces of viable virus left that required more agent to ensure complete inactivation.

Preparation of vaccines

Stock virus was thawed, diluted fivefold, given approximately 30 sec. ultrasonic treatment to disperse aggregates and mixed in 20 ml. lots with an equal volume of

inactivator. Each mixture was exposed for the required time and temperature to effect just complete inactivation. The virus was sedimented from the mixture at 20,000 g for 30 min. and resuspended in the original volume of 0·015M phosphate buffered saline (pH 7·0). The suspensions were again treated ultrasonically, and tested for inactivation. Stock virus submitted to similar procedures in the absence of inactivator controlled the efficacy of virus recovery, and provided virus for comparison with inactivated virus. All the inactivated vaccines contained virus equivalent to $10^{8.7}$ to 10^9 pk.f.u./ml. They were stored at -160°C . and thawed for immediate use, all unused material being discarded.

Tests for inactivation of vaccines

All the killed vaccines were submitted to the series of rigorous tests described by Madeley (1968), to determine whether viable or reactivable virus was still present. These were briefly

- (1) Two successive chorioallantoic passages in eggs to detect virus survival or multiplicity reactivation.
- (2) Inoculation on the chorioallantoic membrane in the presence of a known quantity of live virus to detect interference by large quantities of dead virus or the reactivation of dead by live virus.
- (3) Intradermal inoculation into the shaved flanks of rabbits to detect dermal toxicity or viable virus.

In our hands, however, the intradermal inoculation of rabbits proved to be an unreliable test for complete inactivation. Some samples negative in rabbits yielded viable virus after two passages in eggs. A total volume of 1·0–2·0 ml. of each vaccine was tested. Vaccines were not used if any evidence of viable virus was obtained.

Immunogenicity of the vaccines

Mouse protection

Subcutaneous injection of large doses of most strains of vaccinia virus produces neither lesions nor illness in adult mice although transient infection occurs with live virus (Rosenau & Andervont, 1931; Briody, 1959; Turner, 1967). Male T.O. strain mice (Scientific Animal Service, Elstree) were used at an initial weight of 11–14 g. The methods of immunization and challenge are similar to those used in the NIH potency test for rabies vaccines (Seligmann, 1966). Three serial tenfold dilutions were prepared from each vaccine in dilute (0·015M) phosphate buffered saline (pH 7·0). Each dilution of vaccine was used to immunize a group of 10–20 mice; a similar group received undiluted vaccine. Two subcutaneous injections of 0·5 ml. were given at intervals of 1 week. Similar groups of mice were immunized with dilutions of live virus. One week after the second dose 5–10 mice from each group receiving the undiluted vaccine were killed and bled for antibody assay. The remaining mice were challenged intracerebrally with an estimated 5–50 LD₅₀ of the neurotropic vaccinia strain W.R., which was titrated with each test in normal mice of the same batch. Mice dying within 48 hr. of challenge were discarded and the remainder were observed for 21 days. The 50% effective dose

(ED₅₀) of each vaccine was calculated as the number of pock-forming units of virus, live or inactive, protecting 50% of the mice against the lethal challenge. Each vaccine was tested twice in this way.

Interferon in mice

Thirty mice were immunized with live virus; 10 were killed, bled and their brains removed. The remainder were challenged as above, and 24 hr. later blood and brains were taken from 10 of them. The 10 remaining mice, observed for 21 days, all survived. Control mice challenged in the same way were similarly sampled. Interferon was assayed in 10% (w/v) brain homogenates by the methods of Gifford (1963) and Subrahmanyam & Mims (1966). Virus-neutralizing (VN) antibody in sera and brain homogenates was estimated (see below).

Immunization of rabbits

New Zealand Red male rabbits weighing approximately 2 kg. were selected for skin areas free from pigmentation, hyperaemia and abnormal rates of hair growth. Each undiluted vaccine was tested in four rabbits in two intramuscular 1·0 ml. doses given 1 week apart. Four uninoculated rabbits served as controls. Four rabbits were vaccinated with live virus and housed in an area remote from those receiving either inactivated or no vaccine. The animals were bled before and 7 days after immunization and again 16 days after challenge.

Skin sensitivity

McNeill (1966) suggests that exaggerated skin reactivity may be induced by virus treated with particular inactivators. Accordingly two rabbits from each group were tested with 0·1 ml. intradermal doses of serial tenfold dilutions of killed virus 1 week after their second immunizing dose. In each case the immunizing and test material had been inactivated by the same method. To avoid any reactions due to sensitization by host components, the test material was made from virus grown in CAM and not in sheep. Two rabbits immunized with live virus were at the same time tested with a 1/10 dilution of all the variously inactivated preparations. Saline was used as a control. Photographic records as well as visual estimates of any dermal reactions were made after a few hours, and daily for 1 week. The animals were bled 16 days after the skin test, and challenged dermally with live virus.

Dermal challenge

One week after their second immunizing dose, 0·1 ml. of serial fivefold dilutions of live, bacteriologically sterile, CAM virus was applied to the scarified skin of the two remaining rabbits in each group. The animals were inspected daily, and the degree of skin resistance determined from readings on the fifth day, as in potency assays of smallpox vaccine. Photographic records as well as visual estimates of the lesions were made during the 14 days following challenge.

Antibody assays

Serum samples were inactivated at 56° C. for 45 min. and stored at -15° C.

Virus neutralizing antibody

This antibody was assayed as described by Turner & Kaplan (1965). Neutralizing potencies are expressed in international units (i.u.) calculated by reference to the potency of the international standard smallpox antiserum titrated with each assay. Each sample was assayed at least twice.

Haemagglutination inhibition

Vaccinia haemagglutinin was prepared from chorioallantoic membranes infected with Lister strain virus. They were extracted in saline and gross particles sedimented by low speed centrifugation. Haemagglutinin in the supernatant fluid was estimated with sensitive fowl cells. It was stored without further purification at -160° C. Dilutions of the sera were tested against eight agglutinating doses of haemagglutinin with 0.5% fowl cells as indicator; unit volumes were 0.2 ml., and serum-saline was used as diluent (McCarthy & Helbert, 1960).

Complement fixation

Soluble antigen was prepared from a 10% (w/v) suspension of sheep dermal pulp in phosphate buffered saline (pH 7.0). It was centrifuged at 20,000 g for 1 hr., and the supernatant fluid filtered through a millipore filter (pore size 0.22 μ). The filtrate was distributed in convenient volumes and stored at -15° C. When titrated against a hyperimmune sheep antivaccinial serum it had a titre of > 1/640 and was not anti-complementary when used in tests at a 1/20 dilution. The testing techniques and other reagents have been described (Madeley, 1968).

Gel precipitin tests

Undiluted 'soluble antigen' prepared for the complement fixation tests above was tested against undiluted and suitable dilutions of sera by gel diffusion in agar plates (Rondle & Dumbell, 1962). Hyperimmune sheep, normal rabbit and mouse serum were used as controls.

RESULTS

Immunogenicity in mice

The inactivated vaccines protected the mice only with doses 1000- to 10,000-fold larger than the protective dose of live virus. The dose response to all vaccines was linear and with one exception the slopes were parallel (Fig. 1). The small protective dose of live virus probably indicates the amount of Lister strain virus which establishes infection and viral multiplication in mice. The differences between the inactivated vaccines are not statistically significant.

Antibody response in mice

The antibody responses of mice are unrelated to protection (Table 1). No significant amounts of complement-fixing (CF) antibody were produced by any vaccine; as an index of an immune response to vaccinia in mice it appears to have little value. Neither was haemagglutinin-inhibiting (HI) antibody induced by most of the vaccines, it appeared irregularly after live virus and BPL-inactivated vaccine.

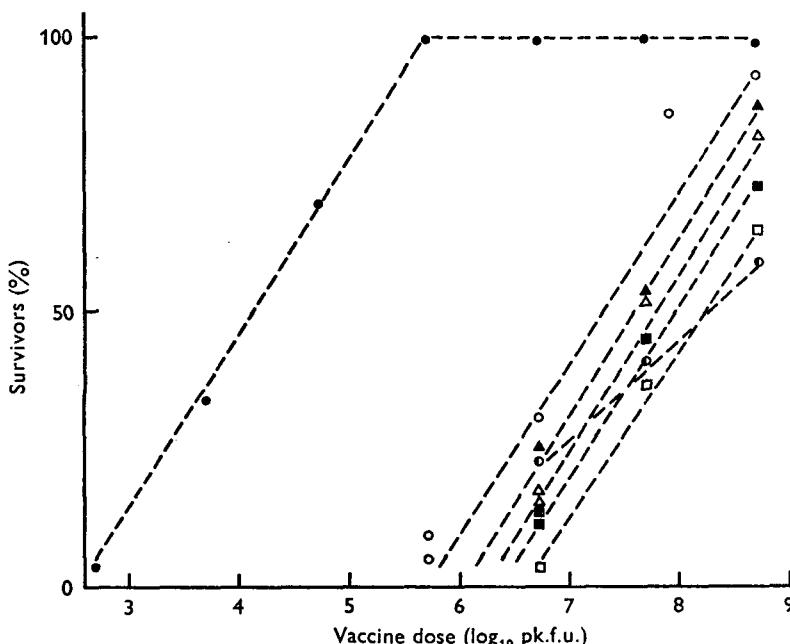


Fig. 1. Protection of mice with live and inactivated vaccines against intracerebral challenge (Av. 19 LD50). ●, Live vaccine; ○, vaccine inactivated by heat; ▲, formalin; △, β -propiolactone; ■, hydroxylamine; □, ultraviolet irradiation; ○, photoinactivation.

Table 1. *Response of mice to live and inactivated vaccines*

Method of inactivation of vaccine	Mean ED ₅₀ (log ₁₀ pk.f.u.)	Antibodies* at time of challenge		
		VN	HI	CF
Heat	7.4	0.3	< 5.0	< 20
β -Propiolactone	7.5	25	40	25
Formalin	7.7	7.2	< 5.0	< 20
Photodynamic	8.5	0.9	< 5.0	< 20
Ultraviolet	7.7	16.0	< 5.0	NT
Hydroxylamine	8.1	0.9	< 5.0	25
None (live virus)	3.9	1.2 to 90	< 5 to 40	< 20
No vaccine	—	< 0.05	< 5	< 20

* VN = Virus neutralization (International Units).

HI = Haemagglutinin inhibition (reciprocal titre).

CF = Complement fixation (reciprocal titre).

NT = Not tested.

Although the inactivated vaccines were equally protective, that inactivated by BPL induced comparatively high titres of virus-neutralizing (VN) and HI antibody, suggesting either that BPL preserved these antigens or that traces of live virus escaped detection in this vaccine (Kaplan, 1962). The ED₅₀ of live virus makes this unlikely (Table 1) although vaccine treated more vigorously with this reagent gave an almost negative response.

Most of the vaccines induced VN antibodies, but in extremely variable amounts even in mice fully protected by live virus. None of the mouse sera produced precipitates in gel diffusion tests with the soluble antigen of vaccinia virus.

Interferon in mice

Although VN antibody was present in the blood of mice receiving protective doses of live virus none was detected in 10% brain homogenates of the same mice either before or 24 hr. after intracerebral (i.c.) challenge. However, interferon-like substances were found in the brain homogenates after challenge, at a dilution of 1/18 in normal mice and 1/120 in vaccinated mice. In both cases the titres in pre-challenge samples were < 1/5. The results suggest that interferon is probably involved in protection.

Immunogenicity in rabbits

The challenge virus doses causing confluent or semiconfluent lesions on the skin of control animals produced only scanty or single lesions in animals immunized with most of the inactivated vaccines, indicating that they conferred a considerable degree of skin immunity, both 1 and 3 weeks after immunization (Table 2). Except for one rabbit receiving heat-inactivated vaccine, the responses to all inactivated vaccines were similar.

Lesions in immunized animals developed like those in the unimmunized up to the 5th day, but thereafter their evolution was accelerated. The individual pocks remained circumscribed, with moderate erythema surrounding them. There was no secondary spread, their mildly necrotic centres developed eschars by the 7th day, and healing preceded that of control animals by several days. In no case was there any evidence of the severe necrosis described in similar experiments by McNeill (1966). No lesions were produced in rabbits immunized with live virus.

Induction of dermal sensitivity

In rabbits injected with inactivated vaccines and tested intradermally with vaccine killed by the same method, the reactions were either trivial or absent. β -Propiolactone-inactivated vaccine induced early reactions in homologously immunized and unimmunized rabbits, but none of these developed into typical vaccinial lesions. Apart from this reaction, there were none with the other killed vaccines that could be associated with the use of a particular inactivator.

However, marked erythema and induration were produced by all the killed vaccines on the skins of rabbits previously immunized with live virus. They appeared after 24 hr. and persisted for almost 5 days before fading. Similar reactions are reported in man with killed vaccine administered to already vaccinated

individuals (Ehrengut, 1968). The reactions must be due to viral components in the test vaccine, since any host protein in the immunizing vaccine was different from that in the challenge vaccine.

Table 2. *Dermal response of individual rabbits immunized with live and inactivated vaccines*

Inactivation method for immunizing vaccine	Dose of live CAM virus (pk.f.u. by 10^{-3})			
	30	6	1·2	0·24
Heat	C	Sc	2	0
	3	2	0	0
	8	1	0	0
	2	0	0	0
β -Propiolactone	3	1	0	0
	2	0	0	0
	1	0	0	0
	1	0	0	0
Formalin	3	1	0	0
	1	0	1	0
	2	1	0	0
Fur overgrown				
Photodynamic	3	1	0	0
	3	1	0	0
	6	2	0	0
	2	0	0	0
Ultraviolet	5	0	1	0
	1	0	0	0
	1	0	0	0
	2	0	0	0
Hydroxylamine	3	1	0	0
	2	0	0	0
	1	0	0	0
	1	0	0	0
None (live virus)	0	0	0	0
	0	0	0	0
NT				
NT				
No vaccine	C	Sc	1	0
	C	Sc	Sc	4
	C	C	3	1
	C	Sc	7	0

C, Sc = Confluent or semi-confluent lesions.

Numerals = Numbers of discrete pocks.

NT = Not tested.

The first two rabbits in each group challenged 1 week, the second two rabbits 3 weeks, after immunization.

Antibody responses

Antibodies were absent from all preimmunization sera. The virus-neutralizing antibody response to the killed vaccines was substantial, except after heat-treated

virus. The CF antibody response was moderate. HI antibody was usually absent (Table 3). HI antibody is considered to be a response to viral replication (Kaplan, 1962); with some anomalies, the present results confirm this, though large doses of inactivated vaccine can induce HI responses (Madeley, 1968).

There is little correlation between serum antibody concentration measured by the three methods; they are unrelated to the skin immunity induced in the same rabbits (Table 2), nor do they indicate the superiority of a particular inactivator, except perhaps BPL, in preserving the antigens that elicit them. The antibody

Table 3. *Antibody responses of individual rabbits to live and inactivated vaccines**

Inactivation method for immunizing vaccine	After immunization			After challenge†		
	VN‡	HI‡	CF‡	VN	HI	CF
Heat	0·7	< 10	40	1882	160	300
	11·0	< 10	40	8710	80	300
	1·3	< 10	< 10	9·6	< 10	30
	3·0	< 10	80	5·6	10	60
β -Propiolactone	50	< 10	100	3040	80	320
	1064	40	120	5548	320	180
	513	20	—	515	10	120
	355	< 10	80	427	20	80
Formalin	76	< 10	100	9772	160	180
	68	< 10	50	724	40	160
	32	< 10	40	80	< 10	60
	25	< 10	40	45	< 10	60
Photodynamic	21	< 10	40	1000	80	180
	69	< 10	60	760	10	120
	13	< 10	40	14	< 10	60
	3·2	< 10	30	4·6	< 10	40
Ultraviolet	69	40	40	5495	320	300
	87	10	30	1445	40	120
	29	20	80	275	20	140
	550	< 10	80	392	10	60
Hydroxylamine	115	< 10	< 10	1178	20	120
	38	< 10	30	119	< 10	60
	72	< 10	30	105	< 10	60
	19	< 10	30	101	< 10	50
None (live virus)	263	< 10	120	2970	160	240
	263	40	—	747	40	240
	1148	160	240	1995	40	240
	631	160	180	2098	20	240
No vaccine	< 0·05	< 10	< 10	903	160	240
	< 0·05	< 10	< 10	3706	160	320
	< 0·05	< 10	< 10	5·9	< 10	< 10
	< 0·05	< 10	< 10	0·6	< 10	< 10
Standard antibody	1000	80	300	1000	40	300

* The responses refer to the same rabbits as in Table 2.

† The first two rabbits in each group were challenged by dermal scarification with live virus, the second two by intradermal injection of homologous killed vaccine.

‡ See Table 1.

response obtained with BPL-inactivated virus was comparable with that of live virus. However consistent inactivation was difficult to achieve with BPL and, as described for mice, more vigorous treatment destroyed antigenicity.

Gel precipitation

Pooled sera from the groups of rabbits immunized with the inactivated vaccines gave no precipitates with soluble antigen in agar gel diffusion tests. A single broad line occurred with serum pools diluted 1/2 from rabbits immunized with live virus, and with 1/8 hyperimmune sheep serum. The production of visible precipitates thus requires serum of high antibody content. Such sera were obviously not produced by inactivated vaccines using the immunization schedule described here. The effect of any particular inactivation method on precipitating antigen cannot therefore be inferred from these results.

DISCUSSION

The kinetics of inactivation of viruses by heat, formalin, ultra-violet irradiation and dye-sensitized photoinactivation is already well documented (Woese, 1960; Gard, 1960; Taylor, 1960; Wallis & Melnick, 1965). β -Propiolactone reacts with all protein radicals and is commonly used to kill viruses for vaccines (Lo Grippo, 1960). It has seldom been used with vaccinia virus (Dostal, 1962). In our hands, inactivation was not easily controlled and requires further investigation.

Experimental vaccines inactivated by hydroxylamine have been prepared from fowl pest, influenza and foot and mouth disease viruses (Schäfer & Rott, 1962; Fellowes, 1966). Viruses differ considerably in their susceptibility to this reagent (Franklin & Wecker, 1959), and that of vaccinia virus has rarely been tested (Friedberger & Yamamoto, 1909; McNeill, 1965). We were unable to inactivate our virus suspensions completely at the concentration and exposure times recorded by McNeill. Hydroxylamine activity varies with electrolyte content and, in our hands, required approximately 0.1 M of the neutral salt for complete inactivation (Freese, Bautz-Freese & Bautz, 1961).

Heat, formalin and β -propiolactone can be considered as predominantly affecting the protein envelope of vaccinia virus. Ultraviolet inactivation, dye-sensitized photoinactivation and hydroxylamine inactivation of many viruses results principally from damage to the viral nucleic acid or nucleoprotein rather than the envelope protein, although it is doubtful whether this is always so (Turner & Kaplan, 1965; Kimes & Bussell, 1968). Absolute specificity of the site of action of the reagents is unlikely and the complex interrelated architecture of the pox viruses makes it doubtful that one site could be attacked without other modification of the whole structure (Gard, 1960). Pox virus inactivated by many of the commonly used methods can be reactivated after apparent loss of viability (Fenner, 1962; Abel, 1963; Kim & Sharp, 1967) and strains vary in resistance to some of the reagents (Sitnikov & Ghendon, 1968). Complete inactivation implies some irreversible change in nucleic acid since viral multiplication ultimately depends upon the integrity of this component. The antibody responses do not

illuminate these modes of action, apart from that of heat treatment, nor do they show the superiority of any particular inactivant.

Attempts to devise a mouse protection test for inactivated smallpox vaccine with a respiratory challenge were unsatisfactory (G. S. Turner, unpublished observations). The intracerebral challenge route used in the present experiments is fairly remote from natural infection and immunity to it is induced only by very large immunizing doses of killed vaccines (Bronson & Parker, 1944). The host factors that determine the resistance of mice against vaccinia infection are complex. Our observations offer no means of relating humoral antibody response to protection against intracerebral challenge. The suggestion that mechanisms other than orthodox specific immunity reactions are involved (Andrewes, Elford & Niven, 1948) are supported by observations of the role of interferon in vaccinia infection of mice (Finter, 1966). Our experiments suggest that intracerebral challenge may recall previously stimulated interferon (Baron, Buckler, Friedman & McCloskey, 1966); and since interferon is commonly elicited with inactivated virus it is likely that at least some of the protection afforded by the killed virus vaccines is due to this mechanism. Cellular immunity to vaccinia infection is demonstrable in mice (Hochstein-Mintzel, 1969) and is independent of antibody or interferon production. Its effects on intracerebrally injected virus are doubtful (Hirsch, Nahmias, Murphy & Kramer, 1968). We did not examine cell-mediated immune responses to our killed vaccines, but their importance in protection against pox virus infection is stressed by Boulter (1969).

We found no hypersensitivity to the killed vaccines in rabbits. The response to live virus after killed vaccine was accelerated, as in man on revaccination, but the severe necrotizing lesions described by Ramano Rao (1962) and McNeill (1966) were not observed. This may have been due to our use of bacteriologically sterile challenge virus or to the time interval between immunization and live vaccination. No such severe reactions have been reported when live vaccine follows killed smallpox vaccine in man (Beunders *et al.* 1960; Herrlich, 1959; Kaplan *et al.* 1965; Ehrengut, 1969). The element of hypersensitivity in the responses to both primary and secondary vaccination is well known (Allison, 1967) and indeed the response to revaccination is used as an index of immunity in man. Sensitivity and immunity to vaccinia virus however are not necessarily related apart from their common antigenic origin (Craigie & Wishart, 1933). Our results differ from those of Boulter (1969) in that we have always obtained strong evidence of dermal immunity in rabbits immunized with killed vaccine when challenged with homologous virus although it was unrelated to the magnitude of the humoral antibody responses. There is a similar absence of a relationship in man (von Epp, 1961; Beunders *et al.* 1960; Kaplan *et al.* 1965; Mannweiler & Geister, 1967), although the established value of hyperimmune globulin in the protection of smallpox contacts cannot be ignored (Kempe *et al.* 1961). It has been suggested that cellular mechanisms are more important in pox virus immunity than circulating antibodies (Boulter, 1969) and it is possible that the estimation of antibody is of little value in determining the immunogenicity of killed smallpox vaccine. Boulter also showed that antibody to killed vaccine differed qualitatively from that evoked by live virus. Nevertheless

rabbits immunized with killed vaccinia virus, while not protected from infection, survived challenge with lethal doses of rabbit pox (Boulter, Zwartouw & Titmuss, 1964; Madeley, 1968). We were also able to protect mice from similar challenge with adequate doses of killed vaccines.

Formalin-inactivated vaccine is used routinely in Germany for primary vaccination at 3 years or more. At the end of 1968 there had been some 250,000 recipients; dermal reaction and general symptoms on subsequent vaccination were little modified (A. Herrlich, personal communication) and though the incidence of post-vaccinial encephalitis was little affected its mortality was substantially decreased (Ehrengut, 1969; Rohde, 1968). The efficacy of inactivated vaccines in preventing subsequent vaccination accidents in man has yet to be adequately assessed in this country.

REFERENCES

- ABEL, P. (1963). Reactivation of heated vaccinia virus *in vitro*. *Zeitschrift für Vererbungslehre* **94**, 249.
- ALLISON, A. C. (1967). Cell-mediated immune responses to virus infections and virus induced tumours. *British Medical Bulletin* **23**, 60.
- AMIES, C. (1961). Loss of immunogenic properties of vaccinia virus inactivated by formaldehyde. *Canadian Journal of Microbiology* **7**, 141.
- ANDREWES, C. H., ELFORD, W. J. & NIVEN, J. S. F. (1948). Vaccinia and ectromelia in the mouse. *British Journal of Experimental Pathology* **29**, 329.
- BARON, S., BUCKLER, C. E., FRIEDMAN, R. M. & MCCLOSKEY, R. V. (1966). Role of interferon during viremia. II. Protective action of circulating interferon. *Journal of Immunology* **96**, 17.
- BEUNDERS, B. W. J., DRIESSEN, J. H. & VAN DEN HOEK, C. (1960). Clinical picture and serological response to vaccination with formalinized vaccinia virus followed by scarification with active vaccine in military personnel. *Archiv für die gesamte Virusforschung* **10**, 382.
- BOULTER, E. A. (1969). Protection against poxviruses. *Proceedings of the Royal Society of Medicine* **62**, 295.
- BOULTER, E. A., ZWARTOUW, H. T. & TITMUSS, D. H. (1964). The immunization of rabbits with inactivated vaccinia virus. *Journal of General Microbiology* **37**, iv.
- BRIODY, B. A. (1959). Response of mice to ectromelia and vaccinia viruses. *Bacteriological Reviews* **23**, 61.
- BRONSON, L. H. & PARKER, R. F. (1944). Vaccinal infection in the mouse. *Journal of Immunology* **49**, 193.
- COLLIER, L. H., McCLEAN, D. & VALLET, L. (1955). The antigenicity of ultraviolet irradiated vaccinia virus. *Journal of Hygiene* **53**, 513.
- CRAIGIE, J. & WISHART, F. O. (1933). Skin sensitivity to the elementary bodies of vaccinia. *Canadian Journal of Public Health* **24**, 72.
- DONALLY, H. H. & WEIL, A. J. (1940). Formalised vaccinia virus. Results of its use with children who had never been vaccinated previously. *Journal of Pediatrics* **17**, 639.
- DOSTAL, V. (1962). Problems related to the inactivation of vaccinia virus. In *Symposium International sur la Vaccination Antivariolique*, Lyon 7–8 Dec. 1962. Lyon: Merieux.
- EHRENGUT, W. (1968). Impfreaktionen und Pockenimpfschutz. *Deutsche medizinische Wochenschrift* **93**, 948.
- EHRENGUT, W. (1969). Non-infectious smallpox vaccines. In: *Symposium on Smallpox*. Zagreb 2–3 September 1969.
- EPP, C. von (1961). Über das Antikörperbild des Menschen bei normalem und gestortem Verlauf einer Pockenschutzimpfung. *Archiv für Hygiene und Bakteriologie* **145**, 256.
- FELLOWES, O. N. (1966). Hydroxylamine as an inactivating agent for foot-and-mouth disease virus. *Journal of Immunology* **96**, 772.
- FENNER, F. (1962). The reactivation of animal viruses. *British Medical Journal* ii, 135.
- FINTER, N. B. (1966). Interferons. In *Frontiers of Biology* 2. Amsterdam: North Holland Pub. Co.

- FRANKLIN, R. M. & WECKER, E. (1959). Inactivation of some animal viruses by hydroxylamine and the structure of ribonucleic acid. *Nature, London* **184**, 383.
- FRESE, E., BAUTZ-FRESE, E. & BAUTZ, E. (1961). Hydroxylamine as a mutagenic and inactivating agent. *Journal of Molecular Biology* **3**, 133.
- FRIEDBERGER, E. & YAMAMOTO, J. (1909). Zur Desinfektion und experimentellen Therapie bei Vaccine. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten Abt. 1, Ref. 44* (suppl.), 81.
- GARD, S. (1957). In *The Nature of Viruses*, p. 121. Ed. G. E. W. Wolstenholme and E. C. P. Millar, London: J. & A. Churchill Ltd.
- GARD, S. (1960). Theoretical considerations in the inactivation of viruses by chemical means. *Annals of the New York Academy of Sciences* **83**, 638.
- GIFFORD, G. E. (1963). Studies on the specificity of Interferon. Estimation of mouse interferon. *Journal of General Microbiology* **33**, 437.
- HERRLICH, A. (1959). Über Vakzine Antigen, Versuche einer Prophylaxe neuraler Impfschaden. *Münchener medizinische Wochenschrift* **101**, 12.
- HIRSCH, M. S., NAHMIAS, A. J., MURPHY, F. A. & KRAMER, J. H. (1968). Cellular immunity in vaccinia infection of mice. Antithymocyte serum effects on primary and secondary responsiveness. *Journal of Experimental Medicine* **128**, 121.
- HOCHSTEIN-MINTZEL, V. (1969). Passive und adoptive Immunisierung der Säuglingsmaus gegen Poxvirus vaccinae und variolae. Ein Beitrag zur Wertigkeitsprüfung von Pockenimpfstoffen. *Zeitschrift für Immunitätsforschung und experimentelle Therapie* **138**, 71.
- JANSON, C. (1891). Versuche zur Erlangung künstlicher Immunität bei Variola vaccina. *Zentralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde* **10**, 40.
- KAPLAN, C. (1962). A non-infectious smallpox vaccine. *Lancet* ii, 1027.
- KAPLAN, C., BENSON, P. F. & BUTLER, N. R. (1965). Immunogenicity of ultraviolet-irradiated non-infectious vaccinia virus-vaccine in infants and young children. *Lancet* i, 573.
- KAPLAN, C., McCLEAN, D. & VALLET, L. (1962). A note on the immunogenicity of ultraviolet irradiated vaccinia-virus in man. *Journal of Hygiene* **60**, 79.
- KEMPE, C. H., BOWLES, C., MEIKLEJOHN, G., BERGE, T. O., ST VINCENT, L., SUNDARA BABU, B. V., GOVINDARAJAN, S., RATNAKANNAN, N. R., DOWNE, A. W. & MURTHY, V. R. (1961). The use of vaccinia hyperimmune gamma-globulin in the prophylaxis of smallpox. *Bulletin of the World Health Organization* **25**, 41.
- KIM, K. S. & SHARP, D. G. (1967). Influence of the physical state of formalinised vaccinia virus particles on surviving plaque titre: Evidence for multiplicity reactivation. *Journal of Immunology* **99**, 1221.
- KIMES, R. C. & BUSSELL, R. H. (1968). Nucleic acid type and effect of pH and hydroxylamine on canine distemper virus. *Archiv für die gesamte Virusforschung* **24**, 387.
- LINDENMAN, J. VON & BUSER, F. (1962). Das inaktivierte Vakzine-Antigen nach Herrlich: Versuch einer serologischen Antigenitätsprüfung am Menschen. *Pathologia et Microbiologia* **25**, 478.
- LO GRIPPO, G. A. (1960). Investigations of the use of β -propiolactone in virus inactivation. *Annals of the New York Academy of Sciences* **83**, 578.
- MCCARTHY, K. & HELBERT, D. (1960). A comparison of the haemagglutinins of variola, alastrim, vaccinia, cowpox and ectromelia viruses. *Journal of Pathology and Bacteriology*, **79**, 416.
- MCNEILL, T. A. (1965). The antibody response of rabbits to inactivated vaccinia virus. *Journal of Hygiene* **63**, 525.
- MCNEILL, T. A. (1966). The development of skin resistance and hypersensitivity following inactivated virus vaccines in rabbits. *Journal of Hygiene* **64**, 23.
- MADELEY, C. R. (1968). The immunogenicity of heat-inactivated vaccinia virus in rabbits. *Journal of Hygiene* **66**, 89.
- MAHNEL, H. (1960). Tierexperimentelle Untersuchungen mit Vakzine-Antigen. *Archiv für die gesamte Virusforschung* **10**, 529.
- MANNWEILER, E. & GEISTER, R. (1967). Das Verhalten der Serumantikörper bei Wiederimpfung mit Vakzinevirus. *Deutsche medizinische Wochenschrift* **92**, 2168.
- PARKER, R. F. & RIVERS, T. M. (1936). Immunological and chemical investigations of vaccine virus. III. Response of rabbits to inactive elementary bodies of vaccinia and to virus-free extracts of vaccinia virus. *Journal of Experimental Medicine* **63**, 69.

- RAMANO RAO, A. V. (1962). The immunogenicity of inactivated vaccinia virus. *Journal of Pathology and Bacteriology* **84**, 367.
- ROHDE, W. (1968). Versuch einer Gegenüberstellung bisheriger Unterlagen einer Einschätzung der Enzephalitis-prophylaxe mittels Vakzineantigen in der D.D.R. *Zeitschrift für ärztliche Fortbildung* **62**, 177.
- RONDLE, C. J. M. & DUMBLELL, K. R. (1962). Antigens of cowpox virus. *Journal of Hygiene* **60**, 41.
- ROSENAU, M. J. & ANDERVONT, H. B. (1931). Vaccinia: susceptibility of mice and immunologic studies. *American Journal of Hygiene* **13**, 728.
- SCHÄFER, W. & ROTT, R. (1962). Herstellung von Virus Vaccinen mit Hydroxylamine; verlauf des Inaktivierungs und Wirkung des Hydroxylamins auf verschiedene biologische Eigenschaften einiger Viren. *Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten* **148**, 256.
- SELIGMANN, E. B. JR (1966). *World Health Organization Monograph Series No. 23*, p. 146.
- SITNIKOV, B. S. & GHENDON, YU Z. (1968). Resistance of variola-vaccinia subgroup of viruses to treatments predominantly damaging the protein envelope or the nucleic component of the virus. *Voprosy Virusologii* **13**, 554.
- SUBRAHMANYAN, T. P. & MIMS, C. A. (1966). Fate of intravenously administered interferon and the distribution of interferon during virus infections of mice. *British Journal of Experimental Pathology* **47**, 168.
- TAYLOR, A. R. (1960). Effects of non-ionizing radiations on animal viruses. *Annals of the New York Academy of Sciences* **83**, 670.
- TURNER, G. S. (1967). Respiratory infection of mice with vaccinia virus. *Journal of General Virology* **1**, 399.
- TURNER, G. S. & KAPLAN, C. (1965). Observations on photodynamic inactivation of vaccinia virus and its effect on immunogenicity. *Journal of Hygiene* **63**, 395.
- WALLIS, C. & MELNICK, J. L. (1965). Photodynamic inactivation of animal viruses: A Review. *Photochemistry & Photobiology* **4**, 159.
- WEIL, A. J. & GALL, L. S. (1940). Studies on the immunization of rabbits with formalinized vaccine virus. *Journal of Immunology* **38**, 1.
- WOESE, C. (1960). Thermal inactivation of animal viruses. *Annals of the New York Academy of Sciences* **83**, 741.

7
29/16

JAQUELINE MARIA SIQUEIRA FERREIRA

TESE DE DOUTORADO

**VACCINIA VIRUS:
VIRULÊNCIA DE AMOSTRAS
BRASILEIRAS EM CAMUNDONGOS
BALB/C E RESPOSTA IMUNE
HUMORAL AO IMUNÓGENO
INATIVADO *BeAn58058***

U.F.M.G. - BIBLIOTECA UNIVERSITÁRIA



321310809

NÃO DANIFIQUE ESTA ETIQUETA



UFMG
2008

JAQUELINE MARIA SIQUEIRA FERREIRA

**VACCINIA VIRUS:
VIRULÊNCIA DE AMOSTRAS
BRASILEIRAS EM CAMUNDONGOS
BALB/C E RESPOSTA IMUNE
HUMORAL AO IMUNÓGENO
INATIVADO *BeAn58058***

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas (ênfase Microbiologia).

Orientadora: Profa. Dra. Erna Geessien Kroon

Co-orientadora: Profa. Dra. Zélia I. P. Lobato

Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais
Fevereiro - 2008





**Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia**

ALUNA: JAQUELINE MARIA SIQUEIRA FERREIRA

Nº matrícula: 2004235513

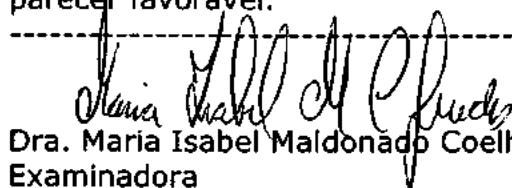
Programa de Pós-graduação em Microbiologia - NÍVEL DOUTORADO

Defesa de Tese: 18 de fevereiro de 2008

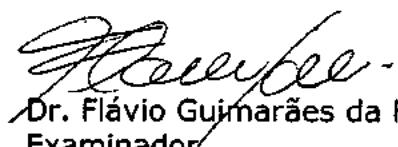
Título: "Vaccinia virus: virulência de amostras brasileiras em camundongos Balb/C e resposta imune ao imunógeno inativado"

Co-orientadora: Profa. Zélia Inês Portela Lobato

A Tese foi submetida à apreciação do Dr. Marco Antônio da Silva Campos que emitiu parecer favorável.


Dra. Maria Isabel Maldonado Coelho Guedes
Examinadora

Aprovada: Sim


Dr. Flávio Guimarães da Fonseca
Examinador

Aprovada: SIM


Dra. Jaqueline Germano de Oliveira
Examinadora

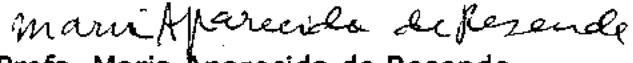
Aprovada: SIM


Dr. Rodrigo Corrêa de Oliveira
Examinador

Aprovada: SIM


Profa. Erna Geessien Kroon
Orientadora

Aprovada: SIM


Profa. Maria Aparecida de Resende
Coordenadora

Aos meus pais, Nonô e Imaculada,
a quem orgulhosamente dedico esta
conquista.

"Alicerce de tudo que construí"

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Erna Geessien Kroon, pela orientação no desenvolvimento da tese, pela marcante presença na minha formação científica, pelo apoio seguro nos momentos difíceis e, especialmente pelo carinho da convivência e exemplo de responsabilidade no cumprimento do dever;

A Profa. Dra. Zélia Inês Portela Lobato, pela inestimável colaboração e auxílios prestados como co-orientadora deste trabalho;

Aos Professores Dr. Paulo César Peregrino Ferreira e Dr. Cláudio Antônio Bonjardim, pelo ótimo convívio, pelo apoio e incentivos a mim dispensados:

Ao Mestre João Rodrigues dos Santos, pelo auxílio, presteza e pela inestimável colaboração para o enriquecimento do meu aprendizado. sem Ele o Laboratório de Vírus não funcionaria tão bem;

Aos funcionários do Laboratório de Vírus: Ângela, pela eficiência em resolver os problemas do Laboratório, além de sua sabedoria e delicadeza; Andreza e Ilda, pelo apoio e carinho;

Ao Douglas, pela competência e atenção dispensada junto à Secretaria da Pós-graduação; à Fatinha, pelos lanchinhos e à Tatiana, por ter deixar a nossa cantina tão limpa;

Aos meus companheiros e ex-companheiros do laboratório de Vírus: Flavinha, Lu Bessa, Lelê, Gustavo, Gisele (Gi), Ana P., Mari e Marcelão, Gabriel, Daniel, Bruninho, Lu Garcia, Graciela, Guilherme, Thiago, Ana Celi, Danilo, Débora, Bárbara, Geraldo, Leandro, Eliseu, Léo, Alice, Débora, Bruno (i.c), Rafael, Bráulio, Ruiz, pelo convívio e carinho; e também a todos os colegas de Laboratórios adjacentes: Laboratório da Veterinária: Térsia, Fábia, Cintia, Graziela, Doracir, Eduardo...; Laboratório de Recombinantes: Léo, Bruninha, Marisa, Cris; Laboratório de Bacteriologia: Renatinha, Rodrião, Daniela...pela ótima convivência e papos de corredor e cantina, indispensáveis para aliviar o estresse;

Aos colaboradores Dra. Maria Isabel M. C. Guedes, Dra. Camila M. A. Leite, Dra. Rosa Maria E. Arantes e ao mestre Marcelo A. P. Xavier nas análises de histopatologia e imunohistoquímica e aos pesquisadores Margareth Spandler Andrade, José Mário C. Vilela e Maria Ivonete N. Silva no auxílio para obtenção das imagens de Microscopia de Força Atômica;

Aos pesquisadores Flavinho, Jaqueline Germano e Isabel, por estarem sempre dispostos a discutir Ciência e a me auxiliarem sempre que preciso, além de terem aceito o convite para participarem desta banca; ao Pesquisador Rodrigo Corrêa, por ter aceito este convite e por me aceitar como futura aluna de Pós-doutorado!

Aos poxvirologistas Giliane, Isabel (de novo), Kelé, Betânia, Jonatas e André por me ensinarem cada vez mais sobre este apaixonante mundo dos poxvírus; Gi, mesmo de longe, é uma grande amiga: obrigada pelos artigos, por me ceder um "teto" por quase 2 anos e, apesar de longe, continua tão presente em nos auxiliar; Jonatas, você, para mim, é um "geniozinho" com quem sempre posso contar e tenho a absoluta certeza de que será um grande Pesquisador, obrigada pela amizade e por ter confiado em mim a sua co-orientação na dissertação de mestrado; André, a minha admiração por você é imensa (se ausentar da família para fazer uma tese elaborada!) e também te agradeço pela co-orientação!!! Kelé, obrigada pela amizade e por me ajudar em todos os momentos em que preciso!

Betânia, como você faz falta no Laboratório! Obrigada pelo auxílio na escrita dos artigos, sem a sua colaboração, dedicação e idéias maravilhosas, este trabalho não seria tão completo, além da correção como relatora desta tese! Te admiro pela sabedoria, pelo caráter e pela alegria!!! Rs Obrigada por sua amizade!!!

Aos meus ex-alunos de Iniciação Científica Amanda, Fernando e atual, Pedro: sem vocês, estas páginas de resultados não seriam tão extensas! A colaboração efetiva de vocês com toda sapiência e carinho em me ajudar foi essencial! Obrigada, meus queridos!

A minha mestra Cris, com quem eu aprendi a dar os primeiros passos no Laboratório de Virus, por ter me auxiliado com solicitude, paciência e competência nas técnicas inerentes aos experimentos. Por ser verdadeira amiga, com quem posso sempre confidenciar conflitos, anseios e projetos de vida!

Durante estes 5 anos de convívio do Laboratório de Vírus, fui abençoada com amigas muito, mas muito especiais que, com certeza, serão eternas e estiveram sempre ao meu lado quando precisei: nos momentos difíceis, de auxílios, de cachaça, de "Calcinhas".... obrigada por serem minhas amigas: Cintia e Katinha: vocês, para mim, se tornaram irmãs e, assim, foram meu ponto de apoio em TUDO que precisei desde que cheguei em BH e, além de tudo, me arrumaram um futuro marido (rs): Renaton, Chris, Leozinha, Jamas (saudades!). Paty, a amizade verdadeira de vocês foi imprescindível nestes anos, não me abandonem

nunca!!! Pelo carinho, total apoio e esforço conjunto no dia-a-dia, possibilitando a realização deste trabalho;

Aos meus pais, pelo carinho e apoio incondicional, não encontro palavras para descrever o seu valor e o quanto lhes sou grata; vocês, que se pudessem, me dariam o mundo, mas saibam que vocês já me deram o seu EXEMPLO e ele me basta para eu ser uma pessoa honesta, simples, batalhadora e feliz... obrigada pela compreensão na ausência, obrigada pelos conselhos, pelo Amor e saibam que vocês são os melhores pais do mundo: AMO MUITO VOCÊS!!!

Ao meu irmão Jander, por estar presente tão significativamente em toda a minha vida e por se tornar um grande amigo, um verdadeiro homem e por fazer tanto por mim e por nossos pais. Orgulho-me muito de você: TE AMO, Dé!

A toda minha família, pelo apoio, amor e valiosa existência em minha vida; por estar ao meu lado com toda paciência durante este período, presença constante nos momentos de certezas e dúvidas, de desafios, confortando sempre meus conflitos e anseios;

Ao Juninho, meu Lindo! Sem você, esta tese seria muito mais difícil... obrigada pela compreensão nos momentos em que precisei ficar ausente por causa da tese, pela paciência, carinho, Amor e por me fazer a pessoa mais feliz do mundo! A cada dia, te admiro e tenho a mais absoluta certeza de que você é a pessoa certa que escolhi para ficar ao meu lado! Você representa, para mim, um exemplo de caráter, garra e dedicação a tudo que se compromete a fazer. Por tudo isto e muito, muito mais, que lhe sou eternamente grata: TE AMO!!!

A Deus que sempre esteve ao meu lado, em silêncio, protegendo, guiando e amparando os meus passos nesta caminhada e que tornou possível a concretização deste ideal!

A CAPES, pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	2
LISTA DE ABREVIATURAS	3
LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABELAS	9
1 – INTRODUÇÃO	9
1.1 - Poxvírus	9
1.1.1 - Taxonomia e estrutura da partícula viral	9
1.1.2 - Genoma e ciclo de multiplicação	12
1.2 - <i>Orthopoxvirus</i> : distribuição mundial e doenças associadas	15
1.2.1 - Vírus protótipo do gênero <i>Orthopoxvirus</i> : <i>Vaccinia virus</i>	18
1.2.2 - <i>Vaccinia virus</i> no Brasil	18
1.3 - Interação vírus-hospedeiro	25
1.3.1 - Patogênese e vias de eliminação	25
1.3.2 - Modelos de estudo de patogênese	27
1.4 - Resposta imune contra <i>Orthopoxvirus</i>	29
1.5 - Desenvolvimento de imunógenos contra <i>Orthopoxvirus</i>	31
1.5.1 - Vacinas de vírus recombinantes	31
1.5.2 - Vacinas de vírus atenuados	32
1.5.3 - Vacinas de vírus inativados	33
1.6 - Adjuvantes	34
2 - JUSTIFICATIVA	37
3 - OBJETIVOS	40
3.1 - Objetivo geral	40
3.2 - Objetivos específicos	40
4 – ESTRATÉGIA DE TRABALHO	41
4.1- Virulência das amostras brasileiras de <i>Vaccinia virus</i>	42
4.2- Resposta imune a antígeno inativado	42
5 - MATERIAL E MÉTODOS	43
5.1 - Sistemas celulares	43
5.1.1 - Células Vero	43
5.1.2 - Membrana corioalantóide de ovos embrionados	43
5.2 - Vírus	43
5.2.1 - Multiplicação viral em cultura celular	46
5.2.1.1 - Purificação viral	46

5.2.2 - Multiplicação da amostra viral BAV em membrana corioalantóide de ovos embrionados	47
5.2.2.1 - Purificação da amostra viral BAV a partir de membrana corioalantóide de ovos embrionados	47
5.2.3 - Titulação viral	48
5.3 - Experimentos em camundongos	49
5.3.1 - Isolador para camundongos	49
5.3.2 - Vias de inoculação de <i>Vaccinia virus</i>	49
5.3.2.1 - Inoculação de vírus pela via intradérmica	50
5.3.3.2 - Inoculação de vírus pela via intranasal	50
5.3.4 - Testes de proteção cruzada	51
5.4 - Processamento dos órgãos coletados de camundongos	51
5.5 - Análises histopatológicas e imunohistoquímicas dos órgãos	51
5.6 - Ensaios de soroneutralização	52
5.7 - Estudos de eliminação e transmissão viral em camundongos	53
5.7.1 - Coleta e processamento de espécimes clínicos e intestinos de camundongos infectados	54
5.7.2 - Detecção de vírus por reação em cadeia da polimerase em espécimes clínicos de camundongos infectados	54
5.7.3 - Quantificação de DNA viral das fezes por PCR em tempo real	57
5.8 - Preparo dos vírus inativados	57
5.8.1 - Inativação por luz ultra-violeta	57
5.8.2 - Inativação por β-propiolactona	57
5.9 - Microscopia de força atômica	58
5.10 - Testes de inativação	58
5.11 - Preparo do imunógeno para vacinação	59
5.12 - Imunização de camundongos pelo método de primeira imunização e reforço	60
5.13 – Detecção de anticorpos por ELISA	63
5.14 - Análise estatística	64
6 - RESULTADOS	65
6.1 - Multiplicação e purificação dos poxvírus em células Vero	65
6.2 - Estudo comparativo do curso de infecção e da virulência de amostras de <i>Vaccinia virus in vivo</i>	66
6.2.1 - Infecção intradérmica	66
6.2.1.1 - Curso de infecção intradérmica após inoculação por	66

escarificação no dorso e nas patas	
6.2.1.2 - Teste de proteção cruzada pela via de escarificação nas patas	71
6.2.2 - Infecção intranasal	72
6.2.2.1 - Sinais clínicos em camundongos Balb/c infectados com amostras de <i>Vaccinia virus</i>	72
6.2.3 - Título de vírus em órgãos de camundongos inoculados pela via intranasal com amostras de <i>Vaccinia virus</i>	76
6.2.3.1 - Amostras LST-BUT, ARAV, GP2V e PSTV	76
6.2.3.2 - Amostras WR, VBH, MURV, BAV, SAV e GP1V	76
6.2.4 - Cinética de títulos virais no pulmão	80
6.2.5 - Taxa de sobrevivência e dose letal de 50%	82
6.2.6 - Histopatologia e imunohistoquímica	84
6.3 - Ensaios de eliminação e transmissão viral em camundongos infectados pela via intranasal com a amostra WR	91
6.3.1 - Eliminação de WR através da saliva, urina e fezes e detecção viral no intestino	91
6.3.2 - Transmissão horizontal de WR através de excretas contaminadas	93
6.3.3 - Análises histopatológicas dos intestinos de camundongos infectados e expostos à serragem contaminada	95
6.3.3.1 - Animais infectados pela via intranasal	95
6.3.3.2 - Animais expostos à serragem contaminada	96
6.4 - Produção do imunógeno utilizando a amostra viral BAV	97
6.4.1 - Inativação de BAV por luz UV e β-propiolactona	97
6.4.2 - Comprovação da inativação viral <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	97
6.4.3 - Efeitos da inativação sobre a estrutura viral visualizada por AFM	101
6.5 - Preparo dos imunógenos	104
6.5.1 - Formulação e estudos da eficácia do imunógeno	104
6.5.1.1 - Testes de desafio através de escarificação nas patas	104
6.5.1.2 - Testes de desafio intranasal	108
6.5.1.3 - Testes de resposta humoral	109
7 - DISCUSSÃO	111
8 - CONCLUSÕES	129
9 - PERSPECTIVAS	130
10 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	131
11 - ANEXOS	149

RESUMO

Infecções causadas por poxvírus voltam a ser objeto de estudo e preocupação devido à ameaça do bioterrorismo e ao aumento de infecções humanas zoonóticas. No Brasil, surtos de vaccinia bovina, causados por *Vaccinia virus*, vêm acometendo vacas leiteiras e ordenhadores em várias regiões rurais, causando prejuízos econômicos e problemas relacionados à Saúde Pública. Alguns estudos já demonstraram a variabilidade genética das amostras brasileiras de *Vaccinia virus*, algumas diferenças biológicas *in vitro*, mas faltam estudos de virulência. O objetivo deste trabalho foi estudar aspectos relacionados à virulência de sete amostras de *Vaccinia virus* brasileiras, *BeAn 58058 virus*, *Span 232 virus*, *Belo Horizonte virus*, *Passatempo virus*, *Araçatuba virus*, *Guerani P1 virus* e *Guarani P2 virus*, uma amostra protótipo do gênero, *Western Reserve* e uma amostra vacinal, Lister-Butantã. Além disso, desenvolver um imunógeno inativado. Para tanto, camundongos Balb/c foram infectados pelas vias intradérmica e intranasal e estudos de morbidade, mortalidade e multiplicação viral em vários órgãos (traquéia, pulmões, coração, rins, fígado, baço e cérebro) foram feitos. O modelo de escarificação nas patas foi apropriado para mimetizar o curso de infecção de diferentes amostras brasileiras de *Vaccinia virus* na natureza, mas não foi eficiente para diferenciar virulências entre estas amostras. Entretanto, o modelo intranasal, baseado na patogenicidade em camundongos, foi apropriado para estudos de comparação de virulência. Assim, as amostras virais foram divididas em três grupos distintos: um, formado pelas amostras *Western Reserve*, *Guarani P1 virus*, *Belo Horizonte virus* e *Span238 virus*, que causaram alta morbidade e mortalidade em camundongos infectados; o segundo, constituído das amostras Lister Butantã, *Passatempo virus*, *Araçatuba vírus* e *Guarani P2 virus*, os quais não causaram nenhum sinal clínico e o terceiro, composto pela amostra *BeAn 58058 virus*, que causou morbidade sem morte. Assim, estes dados reforçam a diversidade de amostras brasileiras isoladas na natureza e estes agrupamentos estão de acordo com os agrupamentos filogenéticos prévios. Frente a diversidade de amostras que tem causado os surtos de vaccínia bovina, um imunógeno, inativado por β-propiolactona formulado com o adjuvante Emulsigen®, foi desenvolvido para futuras aplicações no campo ao combate a doença de bovinos. Este proporcionou uma resposta efetiva quando camundongos foram desafiados por escarificação nas patas e pela via intranasal uma vez que os animais imunizados não desenvolveram a doença quando comparado aos camundongos não imunizados.

Palavras-chaves: *Vaccinia virus*, camundongos Balb/c, patogênese, imunógeno, zoonoses, vaccinia bovina, poxvírus.

ABSTRACT

Infections caused by poxviruses have been much focused due to bioterrorism threat and increasing of human zoonosis. In Brazil, vaccinia outbreaks caused by *Vaccinia virus* have been affected dairy cows and milkers in several rural areas, causing economic losses and public health problems. Some studies showed genetic variability of Brazilian *Vaccinia virus*, but lack virulence studies of these viruses. Therefore, aim of the present work was to study virulence of seven strains of Brazilian *Vaccinia virus* *BeAn 58058 virus*, *Span 232 virus*, *Belo Horizonte virus*, *Passatempo virus*, *Araçatuba virus*, *Guarani P1 virus* and *Guarani P2 virus*, one prototype strain, *Western Reserve* and one vaccine strain, *Lister-Butantã*. Thereover, develop an inactivated immunogen. To that, Balb/c mice were infected by intradermal and intranasal routes and studies related to morbidity, mortality and viral multiplication in several organs (trachea, lungs, heart, kidneys, liver, spleen and brain) were done. The footpad scarification was appropriated to mimetizing the infection course of different Brazilian *Vaccinia virus* strains in nature, but were not efficient to differentiated the virulence between these strains. However, the intranasal model was appropriated to studies of virulence comparison. So, based on the mice pathogenesis, viruses were clustered in three groups, the first one, containing *Western Reserve*, *Guarani P1 virus*, *Belo Horizonte virus* and *Span 232 virus* strains that caused high morbidity and mortality in infected mice; another, including *Lister Butantã*, *Passatempo virus*, *Araçatuba virus* and *Guarani P2 virus* that not caused any clinical signs and the last one, constituted only by *BeAn 58058* strain that caused morbidity without dead. So, these data reinforce the Brazilian strains diversity isolated from nature and these groups are in agreement with the clustering based on previous phylogenetic studies. In front of the *Vaccinia virus* strains diversity that are responsible by bovine smallpox outbreaks, an inactivated immunogen by β -propiolactona mixed with adjuvant Emulsigen®, was developed to applications future to combat the disease in cattle. The results showed that a response in mice was effective when they were challenged by footpath scarification and intranasal route since that the immunized animals were protected after challenge.

Key words: *Vaccinia virus*, Balb/c mice, pathogenesis, imunogen, zoonoses, bovine *Vaccinia*, poxvirus.

ABREVIATURAS

- AFM – microscopia de força atômica
Al(OH)₃ – hidróxido de alumínio
ANOVA - análise de variância
A/O – água e óleo
A/O/A – água, óleo e água
ARAV –*Araçatuba virus*
ATCC – American Type Culture Collection
ati – corpúsculo de inclusão do tipo A
BAV – *BeAn 58058 virus*
BPL – β-propiolactona
BSA – albumina sérica bovina
BPXV – *Buفالlopox virus*
BR-VACVs – amostras brasileiras de *Vaccinia virus*
CAM – membrana corioalantóide
CEBIO – Centro de Bioterismo
CETEA – Comitê de Ética em Experimentação Animal
CETEC – Centro Tecnológico de Minas Gerais
CEV – vírus envelopado associado à célula
CPXV – *Cowpox virus*
CTGV – *Cantagalo virus*
CTL – linfócito T citolítico
dATP – trifosfato de deoxiadenosina
dCTP – trifosfato de deoxicitidina
dGTP – trifosfato de deoxiguanosina
DNA – ácido desoxirribonucléico
d.p.i. – dias pós infecção
dTTP – trifosfato de deoxitimidina
ECP – efeito citopático
ECTV – *Ectromelia virus*
EDTA – ácido etileno diamino tetracético
EEV – vírus envelopado extracelular
ELISA – Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EMU – emulsigen
EV – vírion extracelular
GP1V – *Guarani P1 virus*

- S** GP2V – *Guarani P2 virus*
HE - hematoxilina e eosina
HRPO – peroxidase de rábano silvestre
IEV – vírus envelopado intracelular
IFN – interferon
Ig - imunoglobulina
IL – interleucina
IMV – vírus maduro intracelular
ITRs – repetições terminais invertidas
IV – vírus imaturo
S Kb – quilo bases
KDa – quilo Dalton
Kpb – quilo pares de bases
LD₅₀ - dose letal de 50%
LPS – lipopolissacarídeo
LST-BUT – vírus Lister amostra Butantã
MEM – meio essencial mínimo de Eagle
MOI – multiplicidade de infecção
MPXV – *Monkeypox virus*
mRNA – ácido ribonucleico mensageiro
MURV – *Muriae virus*
MV – vírion maduro
MVA – *Vaccinia virus Ankara*
NK – células “natural killer”
O/A – óleo e água
OPD - ortofenilenodiamina
OMS – Organização Mundial de Saúde
OPXV - *Orthopoxvirus*
ORF – janela aberta de leitura
PAGE - gel de poliacrilamida
pb – pares de base
PBS – solução salina tamponada contendo fosfato
PCR – reação em cadeia pela polimerase
p.i. – pós infecção
PRR – receptor de reconhecimento padrão
pfu – unidade formadora de placa
pH – potencial de hidrogênio

PSTV – Passatempo virus

p/v – peso por volume

q.s.p. – quantidade suficiente para

RFLP – polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição

RNA – ácido ribonucléico

rpm – rotações por minuto

SAV – SPAN232 virus

SDS – duodecil sulfato de sódio

SFB – soro fetal bovino

SN – soroneutralização

t.a. – temperatura ambiente

TAE – tris-acetato-EDTA

TBE – tris-borato-EDTA

TCD4⁺ – linfócito T auxiliar

TCD8⁺ – linfócito T citolítico

TE – tris-EDTA

Th1 – T helper 1

Th2 – T helper 2

tk – timidina kinase

TNF – fator de necrose tumoral

UI – unidades internacionais

UV – ultravioleta

VBH – Belo Horizonte virus

VACV – Vaccinia virus

WR – Western Reserve

VACV-COP – Vaccinia virus Copenhagen

VACV-IOC – Vaccinia virus Instituto Oswaldo Cruz

VACV-NYCBOH – Vaccinia virus New York City Board of Health

vgf – fator de crescimento do Vaccinia virus

VARV – Variola virus

WV – vírion envelopado

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Representação esquemática da partícula EEV do <i>Vaccinia virus</i>	11
FIGURA 2	Representação esquemática das características estruturais do DNA dos vírus do gênero <i>Orthopoxvirus</i>	13
FIGURA 3	Estados brasileiros onde amostras de <i>Vaccinia virus</i> foram isoladas com respectivas datas de ocorrência dos surtos	22
FIGURA 4	Lesões causadas por infecção pelo vírus Passatempo, uma amostra brasileira de <i>Vaccinia virus</i>	24
FIGURA 5	Esquema representativo dos iniciadores do gene <i>vgf</i> utilizado na PCR semi-nested	56
FIGURA 6	Peso corporal dos camundongos infectados com amostras de <i>Vaccinia virus</i> pela via intradérmica	67
FIGURA 7	Lesões no dorso de camundongos por escarificação	68
FIGURA 8	Lesões em patas de camundongos por escarificação	70
FIGURA 9	Sinais clínicos apresentados por camundongos Balb/c infectados com <i>Vaccinia virus</i> pela via intranasal	73
FIGURA 10	Peso corporal de camundongos infectados pela via intranasal com amostras de <i>Vaccinia virus</i>	75
FIGURA 11	Títulos virais em órgãos de camundongos infectados com amostras de <i>Vaccinia virus</i>	77
FIGURA 12	Detecção de DNA viral no baço de camundongos Balb/c infectados com 10^6 pfu de WR	79
FIGURA 13	Cinética de título viral em pulmões de camundongos infectados com amostras de <i>Vaccinia virus</i>	81
FIGURA 14	Curva de sobrevivência em camundongos infectados com 10^6 pfu das amostras de <i>Vaccinia virus</i>	83
FIGURA 15	Seções histológicas de pulmões de camundongos infectados com 10^8 pfu de <i>Vaccinia virus</i> , coletados no 10º d.p.i.	85
FIGURA 16	Análises histológicas e imunohistoquímicas de pulmões de camundongos infectados com amostras de <i>Vaccinia virus</i>	88
FIGURA 17	Detecção de DNA viral e de partículas infecciosas nas fezes, urina e saliva de camundongos Balb/c infectados com 10^6 pfu de WR	92
FIGURA 18	Multiplicação viral de intestinos de camundongos Balb/c infectados com WR	94
FIGURA 19	Seções histológicas de tecido de Placas de Peyer de intestino de	96

	camundongos	
FIGURA 20	Curva de inativação viral utilizando duas concentrações da amostra viral BAV	98
FIGURA 21	Testes de inativação da amostra viral BAV por luz UV e BPL em camundongos Balb/c neonatos com 2 dias de idade utilizando a via de infecção intra-cerebral	100
FIGURA 22	Imagens de AFM do vírus BAV tratadas com luz ultra-violeta	102
FIGURA 23	Imagens de AFM da amostra viral BAV purificada (IMV) inativada com luz UV e BPL	103
FIGURA 24	Medidas da espessura das lesões das patas dos camundongos Balb/c imunizados	106
FIGURA 25	Medidas do comprimento das lesões das patas dos camundongos Balb/c imunizados.	107
FIGURA 26	Peso dos camundongos imunizados e não imunizados após desafio com WR	108
FIGURA 27	Titulação por ELISA dos soros de camundongos imunizados pelo método de primeira imunização e reforço com diferentes adjuvantes	110

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Gêneros da subfamília <i>Chordopoxvirinae</i>	9
TABELA 2	Amostras de <i>Vaccinia virus</i> utilizadas neste estudo: abreviação, origem, ano de isolamento, isolamento geográfico e referência bibliográfica	45
TABELA 3	Iniciadores utilizados para amplificação do DNA do gene <i>vgf</i> da amostra viral WR	56
TABELA 4	Iniciadores utilizados pra a amplificação do gene da RNA polimerase	57
TABELA 5	Cronograma de imunização e sangria de camundongos	62
TABELA 6	Grupos de camundongos para ensaios de imunização	63
TABELA 7	Títulos virais de amostras de <i>Vaccinia virus</i> multiplicadas em células Vero	65
TABELA 8	Estratégia de infecção de <i>Vaccinia virus</i> utilizada nos testes de proteção cruzada	71
TABELA 9	Dose letal de 50% (LD_{50}) de camundongos infectados com amostras de <i>Vaccinia virus</i>	83
TABELA 10	Detecção de DNA (PCR) e partículas infecciosas (CAM) em fezes de camundongos infectados naturalmente com amostras de VACV (expostos a serragem contaminada)	94
TABELA 11	Comparação dos títulos virais de BAV obtidos em células Vero e CAM	97
TABELA 12	Testes de inativação da amostra viral BAV com luz UV e BPL utilizando células Vero e CAM	98
TABELA 13	Testes de inativação do vírus BAV por luz UV e BPL utilizando camundongos Balb/c neonatos	99
TABELA 14	Esquema de intervalos de tempo utilizados para os testes de desafio dos camundongos pertencentes aos grupos 1 e 2.	104

5 1-INTRODUÇÃO

1.1 - Poxvírus

1.1.1 - Taxonomia e estrutura da partícula viral

A família *Poxviridae* comprehende vírus complexos, com genoma de DNA e multiplicam-se no citoplasma celular (revisado por MOSS, 2001; KNUTSON et al., 2006). De acordo com o espectro de hospedeiros, os poxvírus são classificados na subfamília *Chordopoxvirinae*, cujos vírus infectam vertebrados ou na subfamília *Entomopoxvirinae*, cujos hospedeiros são insetos. Vírus da subfamília *Entomopoxvirinae* são pouco estudados, sendo subdivididos em três gêneros de acordo com o inseto do qual o vírus foi isolado: *Entomopoxvirus A, B e C*. A subfamília *Chordopoxvirinae* é dividida em oito gêneros, sendo o gênero *Orthopoxvirus* (OPXV), cujo vírus protótipo é o *Vaccinia virus* (VACV), o mais estudado (revisado por PASTORETT & VANDERPLASSCHEN, 2003). Os protótipos dos 8 gêneros da subfamília *Chordopoxvirinae* e seus respectivos reservatórios naturais estão listados na TABELA 1 (McFADDEN, 2005, ICTV, 2006).

TABELA 1 – Gêneros da subfamília *Chordopoxvirinae*.

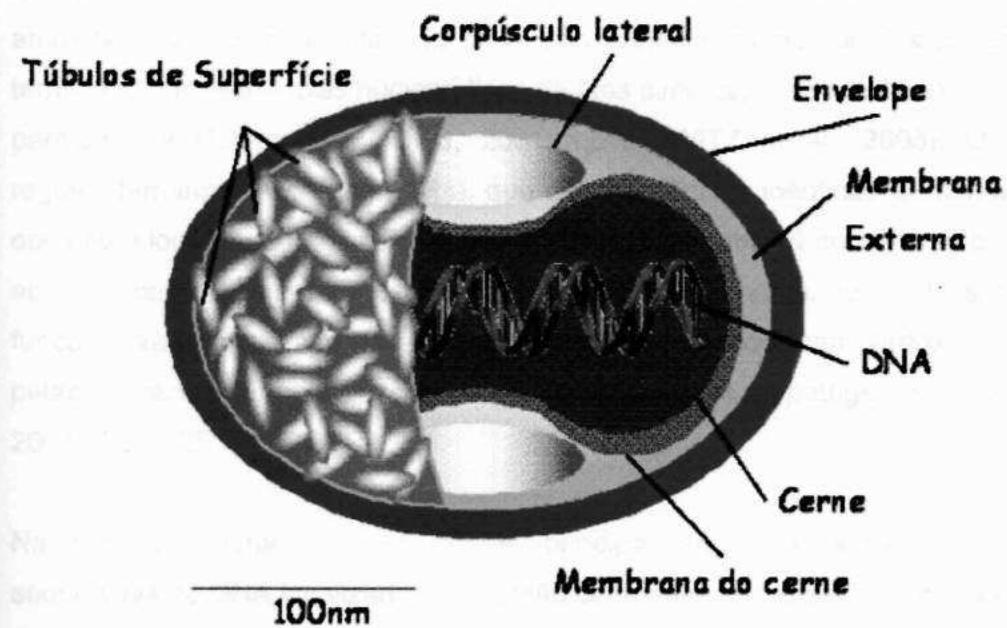
Gênero	Vírus protótipo	Hospedeiro reservatório
<i>Orthopoxvirus</i>	<i>Vaccinia virus</i>	Desconhecido
<i>Parapoxvirus</i>	<i>Pseudocowpox virus</i>	Bovinos
<i>Capripoxvirus</i>	<i>Sheeppox virus</i>	Ovinos
<i>Suipoxvirus</i>	<i>Swinepox virus</i>	Suínos
<i>Leporipoxvirus</i>	<i>Myxoma virus</i>	Coelhos
<i>Avipoxvirus</i>	<i>Fowlpox virus</i>	Aves
<i>Yatapoxvirus</i>	<i>Tanapox virus</i>	Indeterminados
<i>Molluscipoxvirus</i>	<i>Molluscum contagiosum virus</i>	Humanos

Fonte: ICTV <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/index.htm>

5 Devido ao seu grande tamanho, com dimensões que variam entre 140-260 nm de diâmetro por 220-450 nm de comprimento, os vírions VACV são discerníveis pela microscopia óptica em células infectadas (MOSS, 2001; CYRKLAFF *et al.*, 2005; ICTV, 2006). Os elementos estruturais principais dos VACV, tais como cerne, corpúsculos laterais, membrana e envelope estão ilustrados na FIGURA 1. O cerne é a estrutura mais interna da partícula viral e se apresenta bicôncavo, onde são encontradas enzimas, o DNA viral e fatores de transcrição de genes precoces. Os corpúsculos laterais encontram-se dispostos nos dois lados do cerne, ambos envoltos por uma membrana e cujas funções e composição química ainda não são bem definidas. Alguns autores os consideram como artefatos de preparação. A membrana externa é uma bicamada lipoprotéica de origem celular que circunda o cerne e frequentemente forma túbulos, os quais são responsáveis pelo aspecto irregular da superfície da partícula viral. Algumas formas virais apresentam uma membrana adicional, denominada envelope, também de natureza lipoprotéica constituindo o componente mais externo do vírus. Tanto a membrana externa quanto o envelope desempenham um papel importante na interação do vírus com o hospedeiro (revisado por SODEIK & KRIJNSE-LOCKER, 2002).

5 Durante a sua multiplicação, o VACV produz três partículas infecciosas distintas, o vírion maduro intracelular (IMV), o vírion envelopado extracelular (EEV) e o vírion envelopado associado à célula (CEV). As partículas EEV e CEV possuem uma membrana a mais que as partículas IMV denominada de envelope, adquirida na rede trans-Golgi (revisado por SODEIK & KRIJNSE-LOCKER, 2002). Uma nova nomenclatura para as partículas virais formadas durante o ciclo de multiplicação dos poxvírus tem sido proposta por MOSS (2006), em que refere-se aos IMVs como vírus maduro (MV) e às formas envelopadas EEV e IEV (vírus envelopado intracelular) como EVs (vírus extracelulares) e WV (vírus envelopados), respectivamente. Entretanto, para melhor entendimento, será utilizada a nomenclatura antiga, porém ainda vigente, neste trabalho.

5



10

15

20

25

30

FIGURA 1 - Representação esquemática da partícula EEV do *Vaccinia virus*. Os principais elementos estruturais estão representados: membrana externa, corpúsculos laterais, cerne e envelope. A membrana externa é uma bicamada lipoprotéica de origem celular e os corpúsculos laterais são estruturas ovóides, dispostas nas duas concavidades do cerne. Este, por sua vez, é a estrutura mais interna da partícula e abriga o material genético. O envelope, presente somente nas formas IEV, EEV e CEV, é o componente mais externo do vírus. Fonte: FENNER, 1996 – modificado.

5 1.1.2 - Genoma e ciclo de multiplicação

O genoma dos poxvírus consiste de uma molécula linear de DNA dupla fita, com tamanho que pode variar de 135 Kb a 289 Kb (FIGURA 2) de acordo com o gênero, espécie e amostra viral. As duas fitas de DNA são conectadas por uma alça, em suas porções terminais, por seqüências nucleotídicas de fitas simples, ricas em Adenina e Timina e não se pareiam completamente (MOSS, 2001; LEKFOWITZ *et al.*, 2006). O genoma contém regiões terminais invertidas (ITRs), que são seqüências idênticas dispostas em orientações opostas e localizadas nas duas extremidades do genoma. O comprimento das ITRs varia de acordo com o gênero, a espécie e a amostra dos vírus. As ITRs são seqüências de fundamental importância para a partícula viral, pois codificam vários genes responsáveis pelas interações vírus-hospedeiro e pelos mecanismos de patogênese (revisado por MOSS, 2001; GUBSER *et al.*, 2004).

Na grande maioria dos poxvírus e, principalmente, nos vírus do gênero OPXV, as seqüências de DNA localizadas na porção central do genoma são conservadas e essenciais para a replicação viral. A região central do genoma codifica, principalmente, para proteínas estruturais e enzimas envolvidas no metabolismo do ácido nucléico (ESPOSITO & KNIGHT, 1985).

O genoma dos VACV possui, aproximadamente, 200 genes não sobrepostos que podem ser subdivididos em três classes de genes temporalmente distintas: precoces, intermediários e tardios. Os genes precoces são transcritos por enzimas que estão contidas dentro do vírion, enquanto os genes intermediários e tardios são transcritos após a replicação do DNA viral (revisado por CONDIT *et al.*, 2006). Cerca de metade do genoma do VACV é transcrita antes da replicação do DNA viral, incluindo genes que codificam para proteínas envolvidas na replicação, biossíntese de nucleotídeos, expressão gênica intermediária e interação com o hospedeiro (revisado por CONDIT & NILES, 2002; BROYLES, 2003). A expressão da classe de genes virais intermediários é seguida da replicação do DNA, em que codificam transativadores tardios que levam à síntese da classe de RNAm virais tardios. Estes codificam enzimas e proteínas estruturais que são montadas dentro das partículas virais (revisado por CONDIT & NILES, 2002; BROYLES, 2003).

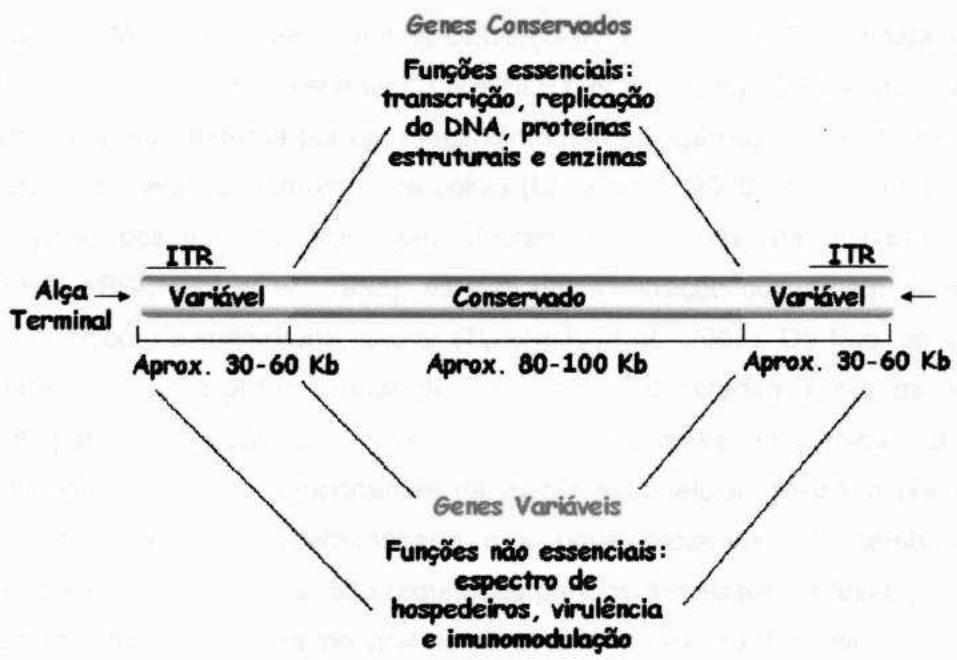


FIGURA 2 – Representação esquemática das características estruturais do DNA dos vírus do gênero *Orthopoxvirus*. As duas fitas de DNA são conectadas, nas suas extremidades, por alças ricas em Adenina e Timina, formando uma cadeia nucleotídica covalentemente fechada. As repetições terminais invertidas (ITRs) são seqüências idênticas, opostamente orientadas e estão localizadas nas duas extremidades do genoma. Fonte: MOSS, 2001 - modificado.

O ciclo de multiplicação dos poxvírus é complexo devido à existência de várias formas infecciosas e possui a peculiaridade dentre os vírus de DNA de animais, pois ocorre inteiramente no citoplasma da célula hospedeira, característica compartilhada apenas com a família *Asfarviridae* (revisado por SODEIK & KRIJNSE-LOCKER, 2002; MOSS, 2006). O ciclo se inicia com a adsorção viral na membrana da célula e subsequente fusão. As duas partículas virais infecciosas IMV e EEV podem iniciar o ciclo infeccioso (revisado por McFADDEN, 2005). A partícula IMV pode penetrar na célula através da fusão direta da membrana do IMV com a membrana da célula (CARTER et al., 2005) ou pela internalização da partícula através de endossomos (TOWNSLEY et al., 2006). O EEV, por sua vez, perde sua membrana mais externa por um mecanismo não fusogênico na superfície da célula e o IMV liberado funde-se à membrana da célula (LAW et al., 2006). Assim, embora as formas IMV e EEV possam interagir com diferentes proteínas na superfície da célula (VANDERPLASSCHEN et al., 1998), as vias de penetração convergem para a etapa de fusão do IMV com a membrana celular (TURNER et al., 2007). De fato, os vírions IMV e EEV diferem nas suas glicoproteínas de superfície, mas acredita-se que os determinantes celulares para a ligação do vírion sejam ubliquamente expressos, tais como as glicosaminoglicanas e os componentes da matriz extracelular (revisado por McFADDEN, 2005). Recentemente, foi demonstrado que nove proteínas de membrana do IMV, conservadas entre os poxvírus, são requeridas para os processos de fusão/penetração, que culmina com a liberação do cerne viral no citoplasma, processo denominado desnudamento primário (revisado por McFADDEN, 2005; SENKENVICH et al., 2005; BROWN et al., 2006; TOWNSLEY, et al., 2006).

No citoplasma, o cerne viral é transportado sobre os microtúbulos para locais próximos ao núcleo, onde é iniciada a síntese da classe precoce dos RNAm virais. Todas as proteínas necessárias para a síntese e maturação dos RNAs são empacotadas dentro do cerne viral junto ao genoma, como a RNA polimerase, fatores de transcrição, enzimas de metilação e “capping” (revisado por MOSS, 2006). Os RNAm precoces são transcritos ainda dentro do cerne e, em seguida, transportados sobre microtúbulos e organizados em estruturas granulares discretas em associação com fatores de tradução do hospedeiro e poliribossomos. Subseqüentemente, proteínas virais precoces medeiam o desnudamento do cerne para liberar o genoma viral no citoplasma, processo denominado desnudamento secundário (revisado por SMITH et al., 2003; BROYLES, 2003).

A replicação do DNA do VACV ocorre em locais do citoplasma denominados corpúsculos de inclusão do tipo basófilo ou “fábricas virais”, onde ocorre acúmulo de um material nucleoprotéico denso, embebido em uma matriz granular (revisado por CONDIT & NILES,

5 2002; BROYLES, 2003; revisado por YODER *et al.*, 2004). A montagem dos vírions começa com a formação de membranas na forma de luas crescentes (RODRIGUEZ *et al.*, 2006) que originam aos vírus imaturos (IVs), partículas esféricas constituídas de membranas que envolvem uma estrutura eletrodensa. Os IVs englobam o genoma e formam os IMVs (revisado por WARD, 2005; RODRIGUEZ *et al.*, 2006), cuja maioria permanece dentro da célula até a lise. Entretanto, uma pequena fração de IMVs deixa as fábricas, de maneira dependente de microtúbulos, e tornam-se envolvidas por uma camada dupla de membranas, derivadas dos endossomos ou da rede de trans-Golgi, para formar os IEVs. Estes, então, movem-se ao longo dos microtúbulos para a superfície da célula, onde o envelope mais externo se funde com a membrana plasmática, expondo os vírions envelopados na superfície da mesma (revisado por WARD, 2005; SCHEPIS *et al.*, 2006). Alguns destes são retidos na superfície da célula para formar os CEVs, enquanto outros se dissociam da célula e se disseminam sistematicamente como EEVs (revisado por SMITH *et al.*, 2003; HUSAIN & MOSS, 2005).

6 Os IMVs são vírions abundantes, constituindo 95% das partículas virais, estáveis e adaptados para causar a infecção entre hospedeiros. Os CEVs e EEVs são importantes para a disseminação viral, sendo que os primeiros estão envolvidos na dispersão célula a célula e os últimos medeiam a disseminação de longo alcance, ou seja, dentro do hospedeiro (PAYNE, 1980; revisado por SMITH *et al.*, 2003). Embora os EEVs representem apenas uma pequena proporção da progénie viral, eles são importantes biologicamente, pois medeiam a disseminação do vírus dentro do hospedeiro infectado (revisado por SMITH *et al.*, 2003).

1.2 - Orthopoxvirus: distribuição mundial e doenças associadas

O gênero OPXV comprehende vírus de vertebrados que são morfológicamente idênticos e há uma extensa reatividade sorológica cruzada entre as espécies, tanto em testes *in vitro* como em experimentos *in vivo* (ROPP *et al.*, 1995; ESPOSITO & FENNER, 2001; MOSS, 2001). Existem dez espécies de OPXV que infectam um variado espectro de hospedeiros, com uma ampla distribuição geográfica. Dentre essas espécies, quatro infectam humanos tais como *Variola virus* (VARV), *Monkeypox virus* (MPXV), *Cowpox virus* (CPXV) e VACV. Quatro espécies, além do CPXV e VACV, são importantes patógenos animais, como *Camelpox virus*, que é naturalmente encontrado na África e Ásia, *Ectromelia virus* (ECTV), encontrado na Europa e o *Raccoonpox virus* e *Volepox virus*, ambos encontrados nos Estados Unidos. Outras duas espécies não estão ainda completamente caracterizadas: *Taterapox virus*, na África ocidental e *Uasin Gishu disease virus*, encontrado no Kenya e

5 Zâmbia, os quais são agentes etiológicos de doenças em gambás e cavalos, respectivamente (FENNER, 2000; LOPAREV *et al.*, 2001; ICTV, 2006).

10 Em 1796, Edward Jenner demonstrou o princípio da vacinação, ao observar que a infecção prévia pelo vírus causador da varíola bovina era capaz de proteger as pessoas contra a infecção causada pelo VARV. A vacinação contra a varíola foi rapidamente difundida pelo mundo, utilizando, inicialmente, o CPXV e, posteriormente, o VACV (revisado por HENDERSON *et al.*, 1999). O VARV é o membro dos OPXV de maior importância como causador de doença humana e é, exclusivamente, um vírus humano (revisado por LI *et al.*, 2007). Este vírus causou uma grande pandemia, inclusive no Brasil, onde foram registradas, oficialmente, mais de 18.000 vítimas no período de 1962 a 1971. Em 1971, ocorreu o último caso brasileiro de varíola humana, enquanto que o último caso endêmico de varíola humana no mundo ocorreu na Somália, em 1977. Em 1980, a Organização Mundial de Saúde (OMS) declarou a erradicação da varíola e a campanha de vacinação cessou em 1982 (WHO, 1980; revisado por HENDERSON *et al.*, 1999). A ausência de outras espécies de hospedeiros como reservatórios facilitou a erradicação da doença (revisado por HENDERSON *et al.*, 1999; revisado por MMWR 2001; revisado por BICKNELL, 2002).

15 Devido à alta infectividade do VARV, a OMS concentrou seus esforços para a destruição das amostras deste vírus e os únicos institutos legalmente autorizados a manterem estoques do VARV são o Center for Disease Control and Prevention (CDC), em Atlanta, Estados Unidos e o Vektor Institute (State Research Center of Virology and Biotechnology), em Novosibirsk, Rússia (revisado por HENDERSON *et al.*, 1999; revisado por BREMAN & HENDERSON, 2002). Entretanto, existe uma grande preocupação quanto à possibilidade de existirem estoques clandestinos em países que se comprometeram em destruir seus estoques virais, mas não o fizeram, ou em países que podem ter adquirido ilegalmente estoques virais de laboratórios da extinta União Soviética (CDC, 2001; ROTZ *et al.*, 2001; revisado por DRAZEN, 2002). Esta preocupação aumentou ainda mais após o atentado terrorista em setembro de 2001, envolvendo *Bacillus anthracis*, nos Estados Unidos (McFADDEN, 2005).

20 Os outros OPXV que causam doença no homem são MPXV, CPXV e VACV, que possuem outros hospedeiros animais, sendo transmitidos, accidentalmente, para o homem (revisado por HENDERSON *et al.*, 1999). Vários eventos recentes têm ilustrado a vulnerabilidade de populações humanas e animais às infecções por poxvírus. O MPXV, por exemplo, é um agente zoonótico emergente que tem sido motivo de grande preocupação, pois a doença em humanos, originalmente com ocorrência em regiões tropicais da África Central e Ocidental, é

5 similar à varíola nas suas manifestações clínicas (SHCHELKUNOV et al., 2002; LEARNED
et al., 2005). Alguns roedores endêmicos dessas regiões representam os reservatórios
naturais de MPXV, enquanto o homem constitui seu hospedeiro zoonótico (McFADDEN,
2005). Além disso, em junho de 2003, 37 casos humanos foram confirmados em um surto
D de MPXV nos Estados Unidos, após importações de roedores de origem africana (CDC,
2003; Di GIULIO & ECKBURG, 2004; RIMONIN et al., 2007).

O CPXV é uma espécie endêmica e restrita a Europa e regiões adjacentes à antiga União Soviética (BAXBY et al., 1994; KAREM et al., 2005; PAHLITZSCH et al., 2006). Esta localização restrita é devida, provavelmente, à distribuição geográfica dos seus reservatórios
5 naturais, que são as espécies de roedores silvestres *Apodemus sylvaticus* e *Clethrionomys glareolus* (CHANTREY et al., 1999). O CPXV recebeu este nome porque foi isolado, primeiramente, do gado infectado, entretanto, a infecção destes animais é apenas esporádica (BURTHE et al., 2006). O CPXV vírus afeta uma ampla variedade de hospedeiros, como o gado, humanos e gatos (revisado por SMITH & KOTWAL, 2002). Além
D disso, infecções esporádicas têm sido documentadas em animais de zoológico e circo, incluindo elefantes e onças (ELLENBERGER et al., 2005). As infecções parecem ser raras em vacas, com prevalência de anticorpos para OPXV no gado europeu menor que 1%, enquanto que o número de gatos domésticos infectados tem aumentado devido ao comportamento de caça que, provavelmente, os torna expostos aos reservatórios naturais
5 do vírus (CORAS, 2005; SCHULZE et al., 2007). As alterações na pele são caracterizadas por lesões típicas de poxvírus, que normalmente se curam espontaneamente. As infecções humanas, geralmente, causam lesões limitadas no sítio de inoculação. O envolvimento generalizado da pele e mesmo a morte, pode ocorrer em indivíduos imunocomprometidos ou em associação com o tratamento sistêmico com corticosteróides para tratar doenças
J alérgicas (SCHULZE et al., 2007).

O *Buffalopox virus* (BPXV) que era considerado como uma espécie extinta, após análises do mapeamento do DNA de algumas amostras usando enzimas de restrição, foi considerado como uma subespécie do VACV (DUMBELL & RICHARDSON, 1993; revisado por LEWIS-JONES 2004). Os surtos de BPXV foram descritos, primeiramente, na Índia, Egito e Indonésia, durante a campanha de vacinação contra o VARV onde o búfalo (*Bubalis bubalis*) era utilizado como animal doméstico e, em certos países, o BPXV foram usados para produção de vacina (LAL & SINGH, 1977). Atualmente, surtos de BPXV têm sido relatados afetando búfalos, bovinos e humanos na Índia, Paquistão, Egito, Nepal e Bangladesh,
J causando lesões localizadas, semelhantes às vesículas da varíola. Esta doença tem sido caracterizada como uma enfermidade zoonótica com grande impacto econômico

5 (KOLHAPURE *et al.*, 1997; SINGH, 2007). As lesões causadas por BPXV são caracterizadas por lesões pustulares nas tetas e úberes de búfalas e vacas leiteiras e, ocasionalmente, uma infecção generalizada pode ser observada em bezerros. Lesões podem ocorrer nas mãos e face dos ordenhadores e na boca de pessoas que tomam leite não pasteurizado oriundo de animais infectados (DUMBELL & RICHARDSON, 1993).

1.2.1 - Vírus protótipo do gênero *Orthopoxvirus*: *Vaccinia virus*

A existência do VACV foi um dos fatores que contribuiu para o sucesso da Campanha de erradicação da varíola da OMS. Algumas características que o levaram a ser utilizado como amostra vacinal foram (*i*) não produzir lesões generalizadas, (*ii*) apresentar menor virulência que o VARV e CPXV e (*iii*) gerar extensa proteção cruzada contra o VARV (FENNER, 1989; ESPOSITO & FENNER, 2001).

No que se refere ao VACV, a sua origem e o hospedeiro natural permanecem desconhecidos. Sabe-se que o VACV é uma linhagem independente de OPXV, não sendo derivado recentemente do VARV ou do CPXV (GUBSER *et al.*, 2004). Uma das hipóteses levantadas para se explicar a origem do VACV é que eles seriam derivados de um OPXV raro ou mesmo já extinto, que em algum momento foi introduzido como amostra vacinal, dando origem aos VACV. O *Horsepox virus* é considerado como um provável candidato a ancestral do VACV (BAXBY, 1981) e, de fato, existem relatos do uso de material obtido de cavalos para a produção de vacina (BAXBY, 1981; TULMAN *et al.*, 2006). A análise do genoma completo de *Horsepox virus* mostrou que este possui seqüências adicionais com relação ao genoma de VACV, que poderiam ter sido perdidas durante a evolução, dando origem ao VACV (TULMAN *et al.*, 2006).

Mesmo cessada a campanha de vacinação há mais de 25 anos, este vírus tem se mantido na natureza em hospedeiros desconhecidos tanto na Índia (DUMBELL & RICHARDSON, 1993) quanto na América do Sul, principalmente no Brasil (FONSECA *et al.*, 1998; LEITE *et al.*, 2005; TRINDADE *et al.*, 2007).

1.2.2 - *Vaccinia virus* no Brasil

Amostras de VACV foram isoladas no Brasil, esporadicamente, nas décadas de 60 e 70, em diferentes áreas geográficas, principalmente nos Estados da região do Sudeste e algumas amostras brasileiras de VACV (BR-VACVs) foram isoladas de roedores. Em 1963, o vírus BeAn 58058 (BAV) foi isolado de sangue do roedor *Oryzomys*, capturado na floresta tropical

da região de Belém do Pará, Brasil (FONSECA et al., 1998). O BAV apresenta características biológicas muito semelhantes ao WR, porém estudos realizados por meio do infecção experimental em camundongos neonatos mantidos sob as mesmas condições com os dois vírus demonstraram que o BAV é menos virulento (LANNA, 1989). FONSECA e colaboradores (1998) através de caracterizações morfológicas e moleculares, tais como, análise do perfil de restrição do genoma do vírus, estudo dos genes que codificam para o fator de crescimento do VACV (*vgf*) e para a timidina quinase (*tk*), bem como a análise do perfil de síntese de polipeptídeos e análises filogenéticas, demonstraram que o BAV é uma amostra do VACV. MARQUES e colaboradores (2001) caracterizaram os genes do corpúsculo de inclusão do tipo A (*ati*), timidina quinase (*tk*) e *B18R* do BAV, reforçando a hipótese de que este vírus fosse realmente uma amostra de VACV.

O vírus SPAn232 (SAV) foi isolado de camundongos sentinelas na região de Cotia (SP), em 1965 (LOPES et al., 1965). Estudos moleculares, como análise do perfil de restrição do genoma viral e análise dos genes *vgf* e *tk*, demonstraram que este vírus caracterizava-se como um VACV, o que permitiu a sua inclusão no grupo dos OPXV (FONSECA et al., 2002).

O vírus Belo Horizonte (VBH) foi isolado de camundongos suíços do Centro de Bioterismo da UFMG, em Belo Horizonte (DINIZ et al., 2001), quando ocorria um surto semelhante à varíola murina, que é causada pelo ECTV. Este isolado foi, inicialmente, caracterizado biologicamente como um ECTV, porém em 1998, através de estudos morfológicos e moleculares, foi demonstrado que este vírus é uma amostra de VACV (TRINDADE, 2003a; TRINDADE et al., 2004).

Entretanto, desde o final da década de 90, vários surtos de vacínia bovina têm sido registrados em diferentes regiões do país, como no Vale do Paraíba, São Paulo, no município de Cantagalo, Rio de Janeiro, vários municípios de Minas Gerais e no Mato Grosso do Sul (FONSECA et al., 1998; SCHATZMAYR et al., 2000; DAMASO et al., 2000; DA FONSECA et al., 2002; DONATELE et al., 2003; FERNANDES et al., 2003; NAGASSE-SUGAHARA et al., 2004; LEITE, 2005; TRINDADE et al., 2007). A FIGURA 3 mostra a localização da coleta de algumas BR-VACVs.

Com relação aos vírus associados com surtos de vacínia bovina, em 1984, ocorreu um surto afetando gados de 180 fazendas do município de Prata, MG. Neste surto, 4.800 vacas foram acometidas apresentando lesões vesiculares nas tetas e uberes. Além disso, bezerros em fase de lactação apresentaram lesões ulcerativas na gengiva. Cerca de 100 ordenhadores foram também acometidos, apresentando lesões vesiculares nos dedos,

5 mãos e antebraço, febre alta persistente por 5 dias e adenopatia axilar dolorosa. Estudos biológicos mostraram ser um OPXV o agente causador do surto, entretanto nenhuma caracterização molecular do agente viral foi feita (SILVA et al., 1986).

DAMASO e colaboradores (2000) relataram o isolamento de um poxvírus obtido de lesões em vacas e ordenhadores em fazendas do Estado do Rio de Janeiro, na cidade de Cantagalo, que foi caracterizado como uma amostra de VACV. Caracterizações biológicas e moleculares indicaram que este vírus seria mais uma amostra de VACV.

5 TRINDADE e colaboradores (2003b) relataram um outro surto de vaccinia bovina, em Araçatuba, 1999, no Estado de São Paulo onde foi isolada a amostra Araçatuba (ARAV). Os vírus Guarani P1 (GP1V) e Guarani P2 (GP2V) também foram isolados, acometendo duas fazendas P1 e P2, respectivamente, no município de Guarani, MG, em 2001. Em 2003, um novo surto ocorreu em fazendas do município de Passa Tempo, MG, quando foi isolado o vírus Passatempo (PSTV). Todos esses vírus foram isolados de lesões de vacas, acometidas durante os surtos. A identificação das amostras de VACV foi baseada em sintomatologia, isolamento do vírus em cultura de tecido e em membrana corioalantóide (CAM), sorologia e estudos moleculares (TRINDADE et al., 2003b; LEITE et al., 2005; TRINDADE et al., 2006).

5 Além dessas amostras virais isoladas de bovino, duas foram isoladas de humanos durante surtos de vaccinia bovina. Os vírus Muriaé (MURV) e Serro foram isolados de ordenhadores, nos municípios de Muriaé e Serro, MG, nos anos de 2000 e 2005, respectivamente. Os pacientes apresentavam lesões ulcerativas e doloridas em ambas as mãos, além de apresentar linfoadenopatia axilar e febre. O diagnóstico foi o mesmo apresentado anteriormente para as amostras isoladas de lesões de vacas (TRINDADE et al., 2007; Flávio Guimarães da Fonseca, comunicação pessoal).

Uma série de surtos de vaccinia bovina acometendo gado bovino e humanos ocorreram no período de outubro de 2001 a julho de 2003, em dez cidades do Vale do Paraíba (SP), duas cidades de Minas Gerais e duas cidades de Goiás, totalizando 74 relatos de doença em pacientes humanos. Espécimes clínicos coletados de pacientes levaram ao isolamento e caracterização molecular do agente etiológico como VACV (NAGASSE-SUGAHARA et al., 2004). Vários estudos epidemiológicos demonstraram a ocorrência de outros surtos de vaccinia bovina em fazendas nos Estados do Espírito Santo e Rio de Janeiro, acometendo animais e ordenhadores (DONATELE et al., 2003; FERNANDES et al., 2003).

- 5 Tais surtos afetam, principalmente, vacas leiteiras e, consequentemente, bezerros e
humanos. As vacas apresentam lesões típicas de poxvírus, as quais se iniciam com o
aparecimento de pápulas, que evoluem para vesículas, pústulas, assumindo um caráter
ulcerativo (FIGURA 4A e 4B) e culminando com a formação de crostas. Geralmente, essas
lesões ulcerativas são localizadas nas tetas e úberes de vacas em lactação e podem causar
infecções secundárias, como mastite (FIGURA 4C). A contaminação de bezerros durante a
amamentação é comum, causando lesões no focinho (FIGURA 4D), gengivas e mucosa oral
(FIGURA 4E) destes. Em humanos, a infecção caracteriza-se pela presença de lesões
ulcerativas e pustulares nas mãos e dedos (FIGURA 4E), além de febre, dor, prostração e
linfoadenopatia (DAMASO *et al.*, 2000; LEITE, 2005; NAGASSE-SUGAHARA *et al.*, 2004;
TRINDADE *et al.*, 2006; DE SOUZA TRINDADE *et al.*, 2007).

- 5 Envolvendo o Brasil, o vírus da vacinação é considerado um vírus de grande importância, tanto para a saúde humana quanto para a economia. O vírus da vacinação é um vírus que é introduzido no organismo humano através de uma vacina, que é feita de vírus morto ou atenuado. O vírus da vacinação é capaz de causar infecções graves em pessoas com sistema imunológico comprometido, como pessoas com AIDS, pessoas com câncer e pessoas com doenças crônicas.
- 10 Para evitar a ocorrência de surtos de vírus da vacinação, é importante que as pessoas se vacinem regularmente. As vacinas contra o vírus da vacinação são eficazes em prevenir a infecção pelo vírus da vacinação, mas não são 100% eficazes. É importante que as pessoas se vacinem regularmente para evitar a ocorrência de surtos de vírus da vacinação.

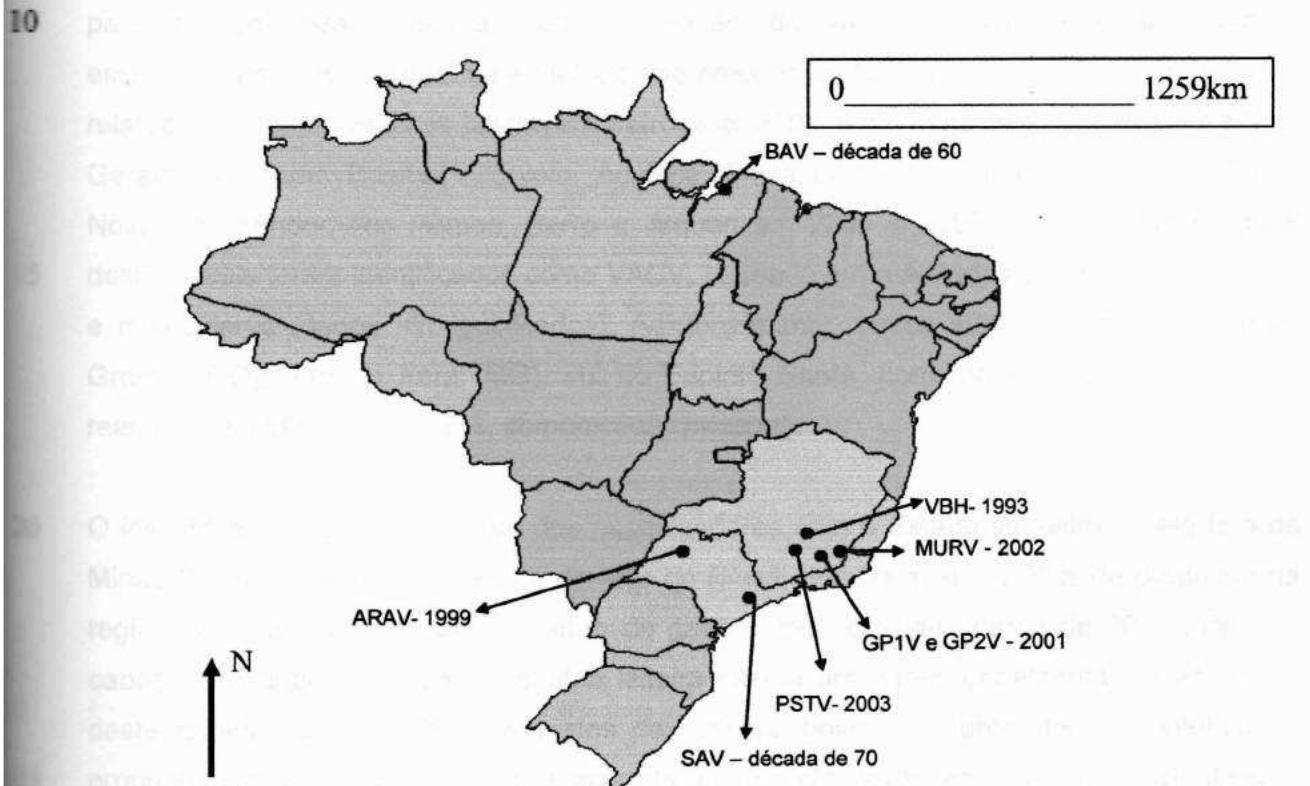


FIGURA 3 – Estados brasileiros onde amostras de *Vaccinia virus* foram isoladas com respectivas datas de ocorrência dos surtos. Pará: vírus BeAn 58058 (BAV), em 1963; Minas Gerais: vírus Belo Horizonte (VBH), em 1993; vírus Muriaé (MURV), em 2000; Vírus Guarani P1 (GP1V) e P2 (GP2V), em 2001; vírus Passatempo (PSTV), em 2003; São Paulo: Vírus SPAn232 (SAV), em 1979; vírus Araçatuba (ARA), em 1999. Fonte do mapa: IBGE, 2007.

- 5 Em Minas Gerais, o Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA), Escola de Veterinária da
UFMG, Centro de Pesquisa René Rachou (FIORUZ) e Laboratório de Vírus/ICB/UFMG,
tem feito um levantamento da situação das propriedades rurais da região. Materiais clínicos
são coletados e encaminhados ao Laboratório de Vírus para isolamento viral e diagnóstico e
este tem confirmado a alta prevalência de VACV no Estado. Além disso, são ministradas
10 palestras por pesquisadores, com a reunião de vários produtores rurais, com o
esclarecimento sobre a doença e métodos de prevenção. Até o presente momento, já foram
relatados surtos de vaccínia bovina em Patrocínio, 2004, e em mais de 11 cidades em Minas
Gerais, tais como Bambuí, Curvelo, Acaíaca, Barra Longa, Mariana, Ouro Preto, Ponte
Nova, Resplendor, Rio Pomba, Serra e Jequeri em 2005 e 2006. As amostras isoladas
25 destes locais foram identificados como VACV, baseado em resultados de testes sorológicos
e moleculares (dados não publicados). Adicionalmente, outros surtos ocorridos em Mato
Grosso (GO), Juiz de Fora (MG), sul do Espírito Santo, norte do Rio de Janeiro foram
relatados em 2007 (Kroon, EG, comunicação pessoal).
- O investimento e a preocupação dos pesquisadores com o Estado se justifica pelo fato de
30 Minas Gerais ser o maior produtor de leite do Brasil, responsável por 73% da produção na
região Sudeste, com o maior rebanho de gado leiteiro do país (cerca de 20 milhões de
cabeças) fazendo com que a indústria leiteira exerça um papel fundamental na economia
deste Estado (IBGE, 2006). Os surtos de vaccínia bovina comprometeram centenas de
35 propriedades em várias regiões e acarretaram grande perda econômica, principalmente
devido à queda na produção de leite, geralmente variando de 40 a 60% e à ocorrência de
mastite em até 50% das vacas, além de outras infecções bacterianas secundárias (LOBATO
et al., 2005). Outros prejuízos econômicos estão relacionados aos (i) gastos com
40 medicamentos para tratar as complicações secundárias; (ii) afastamento do ordenhador do
serviço por mais de uma semana, com consequente necessidade de um novo contrato e (iii)
acometimento de bezerros que mamam em vacas doentes, levando ao emagrecimento
destes animais. Além do grande impacto econômico na pecuária leiteira, a vaccínia bovina,
como zoonose, torna-se uma doença emergente na saúde veterinária e humana (LOBATO
et al., 2005; TRINDADE et al., 2007).

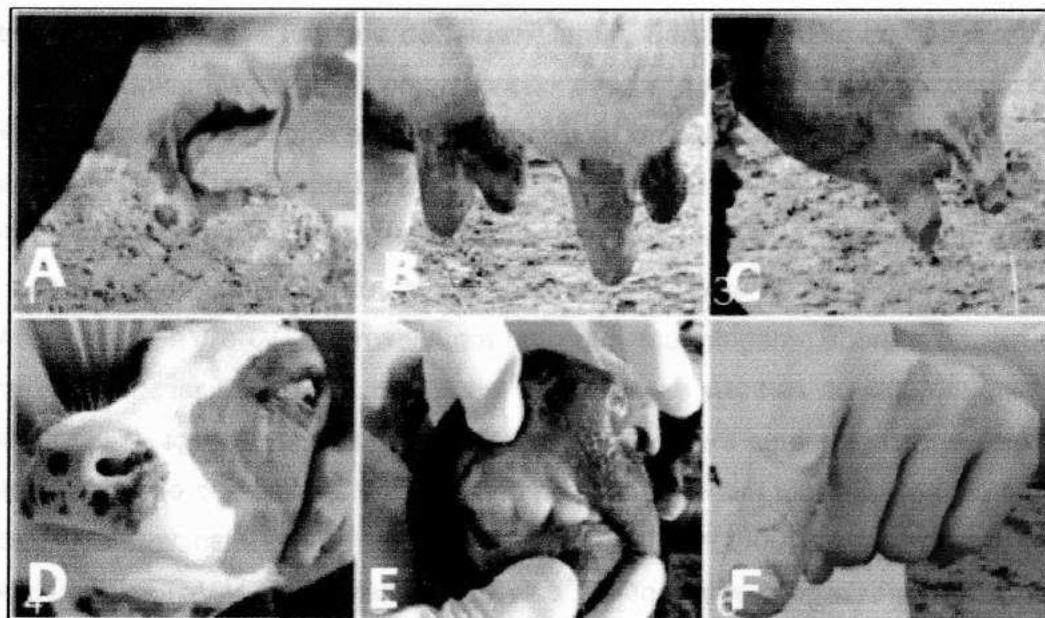


FIGURA 4 – Lesões causadas por infecção do vírus Passatempo, uma amostra brasileira de *Vaccinia virus*. (A) e (B) Lesões ulcerativas em tetas de vacas (C) mastite causada por infecção bacteriana secundária (D) e (E) lesões no focinho e mucosa oral de bezerros (F) lesão na mão de um ordenhador. Fonte: LEITE et al., 2005 – modificado.

5 MOTA (2006) fez uma análise de soroprevalência para OPXV, em indivíduos nascidos após o término da campanha de vacinação da varíola, nos municípios de Acrelândia (AC), Rio Machado (RO) e outros 10 municípios de Minas Gerais. Este estudo demonstrou que indivíduos não vacinados foram soropositivos em testes de ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) e soroneutralização, indicando que estas populações foram expostas a OPXV selvagens. Esses dados estão de acordo com outros trabalhos referentes a isolamentos de VACV nos Estados de Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Pará e Goiás (Mota, BEF, comunicação pessoal). Alguns estudos, conduzidos no sentido de caracterizar biológica e molecularmente as amostras BR-VACV já demonstraram que estas constituem um grupo heterogêneo. TRIGUEIRO (2004), através de ensaios de sensibilidade ao interferon (IFN), demonstrou que as BR-VACVs apresentam diferenças quanto aos níveis de sensibilidade ao IFN- $\alpha 2\alpha 1$ recombinante humano do tipo 1. Estudos filogenéticos de GP1V e GP2V provocaram uma questão intrigante sobre a origem destas amostras, pois apesar de serem isoladas em propriedades vizinhas durante um único surto ocorrido em 2001, apresentaram divergências suficientes para serem agrupadas em clados diferentes, indicando que os VACV circulantes no país poderiam ter mais de uma origem, e não apenas a vacinal, como proposto por DAMASO (2000). Além disso, análises filogenéticas das BR-VACVs indicaram que elas podem ser segregadas em dois grandes grupos filogenéticos (DRUMOND et al., 2007; TRINDADE et al., 2007). LEITE e colaboradores (2007) demonstraram a heterogeneidade dessas amostras em análises filogenéticas baseadas na seqüência do gene ati, permitindo dividir as BR-VACVs em três grupos. Todos estes resultados, biológicos, sorológicos e moleculares demonstram a existência de uma grande diversidade genética entre as amostras de BR-VACVs e demonstram que estes vírus estão amplamente distribuídos pelo território brasileiro.

1.3 – Interação vírus-hospedeiro

1.3.1 - Patogênese e vias de eliminação viral

Estudos de patogênese envolvem a interação da expressão genética do agente infeccioso com a resposta a infecções do hospedeiro. Esta dinâmica irá ditar a gravidade e o resultado do processo da doença (BULLER & PALUMBO, 1991). Embora a histologia patológica da varíola tenha sido extensivamente estudada na primeira metade do século 20, ainda há muito para se estudar sobre a patogênese ou o papel do sistema imune em combater a patogênese (FENNER, 1989; BRANDT & JACOBS, 2001).



Os vírus pertencentes à família *Poxviridae* causam um amplo espectro de manifestações clínicas, variando desde uma infecção localizada, geralmente auto-limitante até doenças sistêmicas generalizadas, com o comprometimento de vários órgãos com consequente morbidade e mortalidade (revisado por FENNER, 1989; TSCHARKE et al., 2002). Uma única espécie da família pode estar associada a diferentes níveis de patogenicidade, dependendo da virulência da amostra, da via de infecção viral e do tipo de hospedeiro e seu estado imunológico (FENNER, 1989). A porta de entrada do vírus no hospedeiro varia de acordo com a espécie do vírus e o hospedeiro envolvido. O trato respiratório é a via de infecção mais comum dos OPXV e constitui o sítio de entrada do *Came/pox virus*, do VARV e do MPXV. As infecções causadas por VACV e CPXV ocorrem por pequenas abrasões na pele. O trato gastrointestinal também representa uma porta de entrada para os OPXV, como ECTV e MPXV. Foi sugerido que o fato de roedores se alimentarem de carcaças de animais mortos da mesma espécie poderia favorecer a disseminação viral do ECTV. Para o CPXV, a via oral é a maior fonte de infecção em gatos domésticos e felinos habitantes de zoológicos, através da predação de roedores contaminados (CORAS, 2005).

O VACV causa infecções localizadas em seres humanos, sendo que a multiplicação ocorre no local de infecção e o vírus se espalha para os linfonodos adjacentes causando a linfoadenopatia local, característica da infecção por OPXV. Inicialmente, ocorre uma vasodilatação dos capilares na derme na região acometida e, em seguida, há a formação de vesículas com altos títulos virais, representando a maior fonte de infecção por contato. A migração de células polimorfonucleares para a região das vesículas faz com que estas se tornem pústulas. Estas, geralmente, sofrem ulceração para, posteriormente, desenvolver uma crosta e, por último, ocorre a formação de uma cicatriz (revisado por FENNER, 1989; BULLER & PALUMBO, 1991). A infecção localizada pode ser atribuída, pelo menos, em parte, à resposta imune do hospedeiro, visto que, em pacientes imunocomprometidos, o CPXV pode causar uma infecção sistêmica, geralmente fatal (revisado por SMITH & KOTWAL, 2002).

Em infecções sistêmicas, o VACV multiplica-se no local de entrada, alcançam o sistema linfático e a corrente sanguínea, causando viremia primária. Posteriormente, os vírus alcançam órgãos muito vascularizados, como o baço e o fígado, se multiplicam nestes órgãos e, novamente, alcançam a corrente sanguínea, causando a viremia secundária. Os vírus se disseminam pela corrente sanguínea tanto como partículas livres ou associadas a células sanguíneas. Após a viremia secundária, os vírus alcançam outros órgãos, como rins, intestino, pulmões e pele, onde causam as lesões ulcerativas típicas (revisado por FENNER, 1989; revisado por ESTEBAN & BULLER, 2005).

5 Alguns estudos descreveram as vias de eliminação dos OPXV incluindo CPXV, VARV e ECTV em secreções da conjuntiva e excretas do hospedeiro, como fezes e urina (GLEDHILL, 1962; SARKAR et al., 1973; MAIBORODA, 1982). MAIBORODA (1982) observou que uma subespécie do CPXV, o *Ratpox virus*, causou morbidade e mortalidade no roedor *Rattus norvegicus* e que os animais sobreviventes eliminavam o vírus nas fezes e urina por mais de um mês após a infecção. Esta eliminação viral pode ser comprovado através da observação de lesões hemorrágicas em membranas corioalantóides, após a inoculação do material biológico em ovos de galinha embrionados. Além disso, altos títulos virais foram observados no reto dos animais (10^9 pfu/mL), indicando que esta porção do intestino representa uma fonte de disseminação de partículas virais. GOFF e colaboradores (2007) demonstraram, através de titulações e ensaios de imunofluorescência, intensa multiplicação do CPXV no intestino de camundongos Balb/c, assim como nos linfonodos e tecido adiposo mesentérico. Durante a infecção por VARV, as partículas virais são excretadas por fluidos orofaríngeos, secreções da conjuntiva e através da urina dos pacientes, ocorrendo um decréscimo na concentração de vírus eliminados durante a fase de convalescência (revisado por BREMAN & HENDERSON, 2002). Infecções causadas por baixos títulos ECTV não apresentam os sinais clínicos característicos, mas partículas virais podem ser detectadas nas fezes, urina e lesões próximas ao ânus, durante algumas semanas após a infecção (revisado por FENNER, 1989).

3 1.3.2 - Modelos de estudo de patogênese

Embora outros modelos animais tenham sido utilizados para estudos de patogênese dos poxvírus, camundongos são os melhores modelos (JACOBS et al., 2006). Estes podem ser infectados com VACV por várias vias incluindo a intracerebral, intraperitoneal, intranasal e aerosol muito utilizadas para modelos de infecções sistêmicas, além das vias intravenosa e intradérmica (escarificação nas patas, na cauda e orelha) (BRIODY, 1959; TURNER, 1967; BULLER, 1985; ANDREW et al., 1989; TSHARKE et al., 2002; MESEDA et al., 2005; ABDALRHMAN et al., 2006; FERRIER-REMBERT et al., 2007). Inoculações intracerebral e intranasal com doses de 5×10^4 pfu de WR podem causar grave perda de peso, arqueamento de dorso e piloereção em camundongos e os resultados de infecções por estas vias são similares (TURNER, 1967; READING & SMITH, 2003; ABDALRHMAN et al., 2006; HAYASAKA et al., 2007). Entretanto, a via intranasal é a via natural de infecção do VARV e é a via mais freqüente de transmissão entre os OPXV (FENNER, 1989) além de ser um modelo eficiente para diferenciar a virulência entre OPXV. Em contraste, camundongos infectados com WR por inoculação cutânea apresentam uma infecção limitada que é bem tolerada, mesmo em doses equivalentes a 5×10^5 pfu (WILLIAMSON et al., 1990).

5

Como a origem e a natureza do hospedeiro do VACV permanecem obscuras, consequentemente, vários modelos animais têm sido utilizados para estudos de patogênese de VACV, incluindo WR e outros OPXV, como o ECTV e CPXV (BULLER & PALUMBO, 1991; BRAY *et al.*, 2000; SHRIEWER *et al.*, 2004; ESTEBAN & BULLER, 2005). No caso do ECTV e CPXV (CHANTREY *et al.*, 1999; QUENELLE *et al.*, 2004), o uso de modelos em camundongos é apropriado, visto que estes vírus são patógenos de roedores (TSCHARKE *et al.*, 2002). O ECTV e o CPXV são letais para espécies suscetíveis de camundongos, como Balb/c infectados por múltiplas vias, incluindo a infecção intranasal (BRAY *et al.*, 2000; MARTINEZ *et al.*, 2000; ZAUCHA *et al.*, 2001; SMEE *et al.*, 2002). O CPXV é letal em infecções via aerosol, porém esta via é menos eficiente do que intranasal, requerendo maior quantidade de vírus e métodos de contenção (BRAY *et al.*, 2002). Infecções sistêmicas podem ser induzidas em camundongos infectados com ECTV por escarificação nas patas, intranasal e intraperitoneal enquanto o WR não leva à morte por infecção intraperitoneal, exceto em altas doses (RAMIREZ *et al.*, 2003).

Possíveis locais de inoculação cutânea que não requerem depilação incluem cauda, pata e orelha. A escarificação na cauda de camundongos tem sido utilizada para imunização (FERRIER-REMBERT *et al.*, 2007), mas é difícil processar o material biológico para análises histológicas deste local. Infecções em orelha causam menos estresse do que inoculação em patas e têm sido utilizadas como modelos para outras infecções virais e possibilita facilmente as análises histológicas. Este modelo foi utilizado para estudos de patogênese de diferentes amostras de VACV, outros OPXV e mutantes de VACV (TSCHARKE *et al.*, 2002; LEITE, 2006). MILLER e colaboradores (1995) utilizaram o modelo de escarificação nas patas para estudar a função do complemento do hospedeiro na resposta inflamatória em camundongos C57/Bl6 na infecção por CPXV. Este modelo mimetiza a vacinação dérmica com VACV (TSCHARKE & SMITH, 1999), a infecção permanece restrita ao local de inoculação e a lesão pode ser medida convenientemente com um paquímetro (MILLER *et al.*, 1995).

A susceptibilidade à infecção por OPXV utilizando diferentes linhagens de animais tem sido descrita. TSCHARKE e colaboradores (2002) utilizaram a infecção intradérmica na orelha para comparar a patogênese de 6 mutantes de WR que apresentavam deleções em vários genes. Foi observado que camundongos de diferentes linhagens apresentaram diferentes tamanhos de lesões quando infectados com o mesmo vírus. As lesões formadas em camundongos Balb/c e CBA foram semelhantes diferindo das lesões em camundongos C57/Bl6 que se apresentaram maiores. Este resultado é contraditório ao descrito por

5 BULLER & PALUMBO (1991) quanto à susceptibilidade destas linhagens ao ECTV. Estes autores descreveram que camundongos C57Bl/6 são resistentes devido a respostas mais fortes e/ou precoces dos mediadores imunes por ambas respostas inata e adaptativa. Entretanto, os resultados apresentados por TSHARKE e colaboradores (2002) estão de acordo com estudos feitos por BRIODY (1959), em que camundongos C57Bl/6 apresentaram menor multiplicação viral na pele do que a maioria das linhagens utilizadas após escarificação dérmica, e ainda apresentou ser mais resistente à infecção intranasal quando comparada a outras linhagens. CHAUDHRI e colaboradores (2004), em um estudo feito com camundongos infectados com ECTV pela via intradérmica por escarificação nas patas mostrou, por meio de expressão de citocinas e experimentos de morbidade/mortalidade, que as linhagens C57Bl/6 foram resistentes às infecções enquanto Balb/c e A/J foram suscetíveis, cuja infecção resultou em alta multiplicação viral e morte dos camundongos.

1.4 - Resposta imune contra *Orthopoxvirus*

A resposta imune contra os poxvírus é complexa e multifatorial, desempenhando um papel vital na segregação e eliminação dos poxvírus (SMITH & KOTWAL, 2002; XU et al., 2004; PUTZ et al., 2006) e, como toda resposta a patógenos, consiste em um ramo celular (Th1) e um ramo humorais (Th2). O fator determinante da polarização da resposta em Th1 ou Th2 parece ser o perfil de citocinas produzidas por células dendríticas e células TCD4⁺ T auxiliares (CD4⁺) que, por sua vez, é determinado pela natureza do patógeno e a carga infectante (revisado por KOURISLSKY & TRUFFA-BACCHI, 2001; revisado por CHAUDRI et al., 2004; AMANNA et al., 2006). A resposta Th1 é iniciada pela produção de citocinas como interleucina 12 (IL-12) e fator de necrose tumoral (TNF α), pelas células dendríticas e macrófagos, após o reconhecimento de padrões moleculares conservados do patógeno por receptores do tipo PRR (*pattern recognition receptors*). Estas citocinas estimulam a diferenciação das células CD4⁺ em células ativas produtoras de IFN γ , citocina importante na ativação de macrófagos (revisado por SEET et al., 2003).

As células T citotóxicas (TCD8⁺) são necessárias no controle de infecções virais primárias e na prevenção de mortalidade no caso de infecções em curso, além de mediar o processo de recuperação da infecção (revisado por SEET et al., 2003; FANG & SIGAL et al., 2005). Segundo a ativação, elas se diferenciam em linfócitos T citolíticos (CTL), os quais têm a função de eliminar as células infectadas por vírus. Estudos demonstram que a resposta imunológica frente à infecção por OPXV apresenta um perfil tipicamente polarizado para Th1, com intensa atividade das funções de TCD8⁺ e células "natural killer" (NK) (CROTTY et

5 *al.*, 2003; HAMMARLUND *et al.*, 2003; PARKER *et al.*, 2007; PUTZ *et al.*, 2006; PRECPIO
et *al.*, 2007). A importância da resposta Th1 para a resolução da infecção pelos poxvírus é
ressaltada por resultados que mostram que ECTV recombinante expressando a IL-4 murina,
uma citocina central para a geração de uma resposta Th2, é letal em camundongos C57/B16,
que são resistentes à infecção selvagem (JACKSON *et al.*, 2001).

10 Estudos em modelos animais mostraram que Anticorpos neutralizantes contra OPXV são
imprescindíveis na geração de proteção contra novas infecções por poxvírus e também para
sua eliminação (XU *et al.*, 2004; EDGHILL-SMITH *et al.*, 2005). Os Anticorpos auxiliam no
controle da infecção através de uma variedade de mecanismos, incluindo neutralização viral,
15 ativação do complemento, opsonização e citotoxicidade mediada por células dependente de
anticorpos (SMITH & KOTWAL, 2002). A função destes é bem estabelecida em prevenir
infecções secundárias e na transmissão da imunidade passiva de mãe para filhos (revisado
por EDGHILL-SMITH *et al.*, 2005).

20 CHAUDHRI e colaboradores (2006) em estudos feitos com o vírus ECTV estabeleceram
papéis críticos para citocinas e funções efetoras de células TCD8⁺ no controle de estágios
agudos em infecções causadas por poxvírus. Estes autores também mostraram que
anticorpos previnem a disseminação do vírus na pele e a formação de lesões, as quais são
cruciais na transmissão entre os hospedeiros. Assim, a imunidade mediada por células e a
25 imunidade humorai são complementares e essenciais para a eliminação dos poxvírus
(SMITH & KOTWAL, 2002; XU *et al.*, 2004; PUTZ *et al.*, 2007).

30 O VACV é caracterizado por sua ampla gama de hospedeiros e por possuir como os outros
poxvírus, várias estratégias para escapar das defesas dos hospedeiros (MOSS, 2001). Os
poxvírus não integram seu DNA no genoma da célula hospedeira e não sofrem um estágio
latente, o que os manteria "invisíveis" ao sistema imune. Desse modo, para evadir da
resposta imune do hospedeiro, o genoma dos poxvírus contém genes que codificam para
35 proteínas de defesa, a maioria das quais foi reconhecida devido à similaridade com genes
celulares (MOSS & SHISLER, 2001; JOHNSTON & McFADDEN, 2003; LIU *et al.*, 2005).

40 Imediatamente após invasão viral, mecanismos não específicos envolvendo interferons
(IFN), complemento, citocinas, células NK, células T CD8⁺ e anticorpos assumem
importância na defesa do organismo do hospedeiro (ESPOSITO & FENNER, 2001;
JOHNSTON & MCFADDEN, 2003). Deste modo, para uma infecção viral eficiente, é
requerida ao vírus uma capacidade de escapar, obstruir ou subverter elementos críticos que
medeiam a resposta antiviral do hospedeiro. Os poxvírus, que apresentam grandes

5 genomas, têm a possibilidade de carregar genes que não são essenciais para a replicação viral, mas que auxiliam na multiplicação viral no hospedeiro, codificando várias proteínas imunomodulatórias, cuja maioria tem como alvo citocinas e mecanismos do sistema imune inato (TURNER & MOYER, 2002, JOHNSTON & MCFADDEN, 2003). Assim, os imunomoduladores dos poxvírus são os maiores fatores de virulência que contribuem 10 significantemente para a persistência viral (JOHNSTON & MCFADDEN, 2003, BOOMKER et al., 2005).

15 As proteínas imunomodulatórias dos poxvírus que os permitem evadir do hospedeiro podem ser divididas em três classes principais: proteínas de viromimetismo (virocinas e viroreceptores), proteínas de virocamuflagem e virotransdutores. Estas moléculas têm como alvo vias celulares específicas pelas quais o hospedeiro coordena e regula a resposta inflamatória. As viroquinas são proteínas virais secretadas que mimetizam moléculas de regulação do hospedeiro, como citocinas e reguladores do complemento (ESPOSITO & FENNER, 2001, SEET et al., 2003). Os viroreceptores, que podem ser secretados ou estar localizados na superfície das células infectadas, estão relacionados aos receptores celulares e agem seqüestrando os ligantes indutores dos processos antivirais inflamatório ou imune. 20 As proteínas de virocamuflagem subvertem as vias de apresentação de抗igenos não-próprios das células infectadas fazendo com que estas células não sejam reconhecidas pelo sistema imune. Os virotransdutores são proteínas intracelulares que interferem com as vias sinalizadoras ou efetoras (KOTWAL, 2000; ESPOSITO & FENNER, 2001; JOHNSTON & MCFADDEN, 2003; HAGA & BOWIE, 2005).

1.5 - Desenvolvimento de imunógenos contra *Orthopoxvirus*

1.5.1 – Vacina de vírus recombinantes

5 Poxvírus recombinantes, como VACV, *Fowpox virus* e *Canarypox virus* têm sido utilizados como vetores modificados para expressão de genes exógenos (MULLBACHER & LOBIGS, 2001; ROCHA et al., 2004; DREXLER et al., 2004). A flexibilidade do genoma dos VACV permite a deleção de vários genes para a inserção do DNA exógeno, tornando possível o desenvolvimento de vacinas polivalentes representadas por vírus recombinantes que podem infectar células de mamíferos, resultando na expressão de grandes quantidades de proteínas codificadoras (RUPPRECHT et al., 2001; MEEUSEN et al., 2007). Poxvírus recombinantes têm sido construídos para expressar agentes imunizantes de herpesvírus, hepatite B, vírus da raiva e vírus da imunodeficiência adquirida. Entretanto, existe a possibilidade de tais vírus se estabelecerem na natureza, assim como o VACV se

estabeleceu nos búfalos indianos. Ainda existe a possibilidade de sofrerem recombinação genética com outros OPXV existentes, o que também deve ser cuidadosamente considerada (BAXBY *et al.*, 1986; FONSECA, 1998; PASTORET & VANDERPLASCHEN, 2003).

1.5.2 - Vacinas de vírus atenuados

A grande vantagem das vacinas atenuadas é que elas desencadeiam as respostas imunes inatas e adaptativas que o microrganismo patogênico desencadearia, sendo, portanto, a maneira ideal de induzir imunidade protetora. As vacinas contra poliomielite, sarampo e febre amarela são três bons exemplos. A abordagem mais utilizada freqüentemente para a produção de tais vírus atenuados é a passagem repetida em cultivos celulares. Mais recentemente, mutantes sensíveis à temperatura começaram a ser gerados, com o mesmo objetivo. As vacinas virais atenuadas induzem imunidade específica de longa duração, entretanto a principal limitação dessas vacinas diz respeito à sua segurança, devido a uma atenuação incompleta ou à reversão para um vírus patogênico (WYATT *et al.*, 2004; PUSSANT & COMBADIERE, 2006; MEEUSEN *et al.*, 2007).

Existem várias amostras do VACV, que possuem diferentes níveis de virulência para os humanos e animais (FENNER, 1989). As amostras Copenhagen (VACV-COP) e Temple of Heaven são muito patogênicas para animais enquanto que a amostra New York City Board of Health (NYCBOH), da qual foi derivada a amostra vacinal Wyeth, possui patogenicidade baixa. Algumas amostras atenuadas de VACV, que apresentam pequeno espectro de hospedeiros e não se multiplicam ou apresentam problemas na multiplicação, em determinados tipos celulares, têm sido utilizadas no desenvolvimento de vacinas recombinantes. Alguns exemplos destas amostras incluem o vírus modificado Ankara (MVA) e o NYVAC (LEGRAND *et al.*, 2004; MESEDA *et al.*, 2005; PARRINO *et al.*, 2006; PHELPS *et al.*, 2007). A amostra NYVAC se multiplica bem em células de mamíferos, enquanto que a amostra MVA não o faz. MVA foi obtida após mais de 500 passagens seriadas em fibroblastos de embrião de galinha (MAYR & DANNER, 1978), enquanto NYVAC foi originado da amostra vaccinia Compenhagen por deleção específica de 18 janelas de leitura abertas. Ambas as amostras demonstraram ser seguras em macacos imunossuprimidos (revisado por MMWR, 2001; EDGHILL-SMITH *et al.*, 2005, STITTELLAR *et al.*, 2005). NYVAC foi capaz de induzir anticorpos neutralizantes para VACV correlacionando com a completa resolução de lesões na pele, mesmo em macacos com alta depleção de T CD4⁺ (EDGHILL- SMITH *et al.*, 2005). A amostra Lister, isolada do Instituto Lister foi, inicialmente, multiplicada em humanos, depois em coelhos e ovelhas, alternadamente e após testes de

- 5 virulência por várias vias de inoculação em coelhos, camundongos e ratos, foi utilizada como vacina contra a varíola bovina (revisado por FENNER *et al.*, 1988).

A procura por uma redução da patogenicidade das amostras de VACV, por meio de atenuação através de passagens seriadas, resultou no surgimento de novas amostras vacinais: VACV River, LC 16m8, entre outras (HENDERSON & MOSS, 1999; revisado por STITTELAAR & OSTERHAUS, 2001; revisado por BREMAN & HENDERSON, 2002; MORIKAWA *et al.*, 2005). Entretanto, mesmo utilizando uma amostra vacinal atenuada, a vacinação de um indivíduo imunossuprimido pode gerar complicações graves, uma vez que a multiplicação viral pode se apresentar aumentada. Entre os indivíduos imunossuprimidos, susceptíveis à ocorrência de efeitos adversos devido à vacinação, podem ser citados indivíduos transplantados, portadores do vírus HIV, com leucemia, com linfoma, com desordens imunológicas de origem celular ou humoral, ou indivíduos em terapia com antimetabólicos, radiações e altas doses de corticosteróides (HENDERSON & MOSS, 1999; ROSENTHAL *et al.*, 2001; CDC, 2001; PASTORET & VANDERPLASSCHEN, 2003; MESEDA *et al.*, 2005).

Após a erradicação mundial da varíola, a vacinação utilizando o VACV foi suspensa, uma vez que os riscos de efeitos adversos passaram a ser maiores que a própria possibilidade de infecção pelo VARV. Deste modo, a vacinação passou a ser recomendada apenas para os funcionários de laboratórios que manipulam diretamente culturas ou animais infectados com o VACV ou outro OPXV que infecta humanos (CDC, 2001; FULGINITI *et al.*, 2003).

1.5.3 - Vacinas de vírus inativados

Uma vez que a multiplicação do VACV pode ser exacerbada nas pessoas com doenças imunodeficientes e entre aquelas com imunossupressão, a administração de uma vacina, mesmo que atenuada, pode resultar em diversas complicações secundárias (ROSENTHAL *et al.*, 2001; CDC, 2001; PARRINO *et al.*, 2006). Deste modo, uma vacina utilizando VACV inativado se torna uma alternativa viável, não existindo a possibilidade de reversão para virulência e nem da multiplicação do vírus no animal vacinado. Adicionalmente, devido à inativação viral, a possibilidade de recombinação do vírus vacinal com outros poxvírus circulantes ou o estabelecimento e manutenção destes vírus na natureza torna-se improvável (TSUNG *et al.*, 1996; MEEUSEN *et al.*, 2007). Entretanto, devido à incapacidade do vírus inativado infectar células e ativar células T CD8⁺, estas vacinas são menos protetoras quando comparadas às vacinas vivas. Consequentemente, elas requerem fortes

5 adjuvantes e várias inoculações para induzir o nível necessário de imunidade (MINKE et al., 2004).

10 Vários estudos envolvendo a inativação do VACV e o mecanismo de proteção imunológica têm sido realizados (ROSENTHAL et al., 2001; CDL, 2001; BELYAKOV et al., 2003). Diversas metodologias para inativação viral têm sido desenvolvidas durante várias décadas, entre elas inativação por luz ultra-violeta (UV), calor, pressão e diversos produtos químicos como formalina, hidroxilamina, β -propiolactona (BPL), paraformaldeído, etilenimina binária, psoraleno e óxido de etileno (TURNER et al., 1970; TURNER & SQUIRES, 1971; THORNTON, 1980; TSUNG et al., 1996; HULSKOTTE et al., 1997; BOUDET et al., 2001; MEEUSEN et al., 2007). Porém, é importante ressaltar que algumas destas metodologias de inativação viral podem levar à desnaturação protéica, levando o animal vacinado a desenvolver anticorpos contra a forma desnaturada das proteínas virais, o que pode resultar em uma resposta imunológica menos eficiente (TURNER & SQUIRES, 1971).

15 Segundo TURNER e colaboradores (1970), a inativação viral utilizando luz UV resulta, principalmente, na destruição do ácido nucléico e nucleoproteínas virais com menor acometimento de proteínas do envelope. A BPL é uma lactona do ácido β - hidroxipropiônico com capacidade de reagir com a adenina do DNA causando mutações e inativação do vírus (THORMTON, 1980).

20 1.6 - Adjuvantes

25 Com a finalidade de aumentar ou modular a imunogenicidade das vacinas pouco imunogênicas, adjuvantes vêm sendo incorporados às vacinas (SINGH & O' HAGAN, 1999; ROSENTHAL & ZIMMERMAN, 2006). Estes vêm melhorando sua eficácia devido aos seguintes fatores: (i) aceleram a geração de uma resposta imune forte, aumentando a avidez dos anticorpos e a sua capacidade de neutralização assim como estimula os linfócitos T citotóxicos; (ii) sustentam esta resposta por um longo período de duração; (iii) reduzem a quantidade de antígeno necessário diminuindo assim, o custo de programas de vacinação (GUPTA, 1998; SINGH & O' HAGAN, 1999; PASHINE et al., 2005). Os novos sistemas têm como desafio superar as limitações decorrentes do número de imunizações necessárias para gerar proteção; a falha em estimular a resposta imune eficiente contra alguns抗ígenos; as reações inflamatórias nos locais de aplicação geradas pelo adjuvante e o custo final das vacinas para uso em larga escala (TURNER et al., 1970; THORMTON, 1980; HULSKOTTE et al., 1997; revisado por RAJPUT et al., 2007).

5 Atualmente, os adjuvantes são divididos em duas classes, baseados no seu mecanismo de
ação, os sistemas carreadores e os potencializadores imunes. Os sistemas carreadores
concentram e apresentam os抗igenos de forma repetitiva para células apresentadoras de
antígeno enquanto os potencializadores ativam diretamente a imunidade inata, por exemplo,
citocinas, com influência direta na indução subsequente de uma resposta imune adquirida
10 potente (PASHINE et al., 2005; revisado por RAJPUT et al., 2007). Como sistema carreador,
destaca-se as VLPs (virus-like particles), utilizadas como vacinas. QUAN e colaboradores
(2007), desenvolveram VLPs contendo o vírus influenza H1N1 para analisar sua
imunogenicidade e demonstraram que a imunização intranasal com VLPs, contendo a
hemaglutinina, induziu altos títulos de anticorpos neutralizantes contra o vírus influenza e
15 foram protegidos contra o desafio com o vírus letal. Exemplos de potencializadores são o
Adjuvante Freund completo que contém o *Bacillus Calmette Guérin* (BCG) e uma mistura de
diferentes ligantes de receptores do tipo "toll" em solução de óleo mineral. A emulsificação
do imunógeno em óleo mineral permite o depósito para a liberação lenta do antígeno para
promover a fagocitose, e o BCG é um forte ativador de células dendríticas e resposta Th1
20 (revisado por ROSENTHAL & ZIMMERMAN, 2006).

Esforços têm sido feitos para desenvolver adjuvantes seguros e eficazes para uso humano e
veterinário. Vários estão sendo utilizados na prática clínica, incluindo o gel de hidróxido de
25 alumínio Al(OH)₃, o qual se liga não-covalentemente a proteínas e induz inflamação
moderada e formulações de lipídeos que são ingeridas pelos fagócitos, induzindo células T
auxiliares e IgE (COX & COUTLER, 1997; GUPTA, 1998; BREWER et al., 1999; LINDBLAD,
2004; revisado por RAJPUT et al., 2007). Em camundongos, induzem respostas por
anticorpos mediadas por IgG1 e IgE como consequência da estimulação de IL-5 (revisado
30 por GUY, 2007).

Após o alumínio, as emulsões estão entre as mais frequentemente utilizadas em humanos e
animais, sendo constituídas de emulsões água em óleo (A/O) ou óleo em água (O/A). No
mercado, existem várias emulsões prontas para a formulação, as quais podem ser
incorporadas à vacina compondo até 30% da fórmula final. Estas emulsões são definidas
35 como sistemas heterogêneos onde um líquido fica disperso em outro (BOMFORD, 1998). As
emulsões óleo-água (O/A) caracterizam-se por microgotículas de óleo estabilizadas por
surfactantes em uma fase aquosa contínua e resultam em uma excelente apresentação
antigênica (COX & COUTLER, 1997; revisado por GUY, 2007), liberação lenta de抗igenos e
40 promovem uma estimulação duradoura do sistema imune. O Emulsigen® é uma emulsão
do tipo O/A comercial e liberada pelo Ministério da Agricultura Americano para uso em
vacinas veterinárias. As emulsões múltiplas água-óleo-água (A/O/A) apresentam, em sua

5 fase interna, uma emulsão de água em óleo e uma fase aquosa com fase contínua
(BOMFORD, 1998; revisado por GUY, 2007).

As saponinas são esteróides ou glicosídeos triterpenóides encontrados em plantas
selvagens ou cultivadas, em animais marinhos e algumas bactérias (RIGUERA, 1997;
10 YOSHIKI *et al.*, 1998). Adjuvantes a base de saponinas têm a capacidade para modular o
sistema imune celular assim como aumentar a produção de anticorpos com a vantagem de
ser utilizado em baixas concentrações (ODA, 2000). Saponinas também induzem forte
15 resposta de TCD8⁺ e potencializa a resposta a抗ígenos da mucosa, sendo amplamente
utilizado há muitos anos em várias vacinas veterinárias (KENSIL, 1996; revisado por
RAJPUT *et al.*, 2007).

5 2- JUSTIFICATIVA

Embora o agente etiológico da varíola humana, o *Variola virus*, tenha sido declarado erradicado pela Organização Mundial de Saúde em 1980, os poxvírus têm atraído a atenção da comunidade científica e órgãos de Saúde. Isto se deve em razão da possibilidade da existência de estoques clandestinos do vírus e, consequentemente, poderem ser empregados como arma biológica em atentados bioterroristas. Como arma biológica, o VARV seria extremamente eficaz, devido a sua elevada patogenicidade, facilidade de disseminação e longa permanência no ambiente, o que acarretaria consequências catastróficas para a humanidade (HENDERSON *et al.*, 1999).

Além desta potencialidade, outra preocupação em relação aos poxvírus tem se tornado evidente em razão da re-emergência e consequente risco de uma extensão epidêmica causada pela adaptação dos *Orthopoxvirus* ao hospedeiro humano. Desde a erradicação da varíola, a vacinação foi interrompida, diminuindo a imunidade e tornando grande parte da população suscetível aos *Orthopoxvirus*, incluindo *Variola virus*, *Vaccinia virus*, *Monkeypox virus*, *Buffalopox virus* e *Cowpox virus* (ESPOSITO & FENNER, 2001). Diferentemente do *Variola virus*, um patógeno estritamente humano, estes poxvírus apresentam um amplo espectro de hospedeiros. Estes vírus circulam ativamente na natureza e são responsáveis por surtos recorrentes de interesse médico e veterinário em todo o mundo. Estes surtos vêm ocorrendo, inclusive, fora de suas áreas de distribuição geográfica, como observado para o *Monkeypox virus*, recentemente introduzido na América, permitindo a introdução dos vírus em novos hospedeiros e ambientes (revisado por LEWIS-JONES 2004).

No Brasil, diversos relatos de amostras de *Vaccinia virus* zoonóticos durante surtos de vaccínia bovina têm sido feitos em regiões rurais de vários Estados e, principalmente, em Minas Gerais, o maior produtor de leite do país. A doença é de interesse médico e veterinário visto que o vírus causa lesões nas tetas e úberes de vacas leiteiras, que são transmitidas para as mãos dos ordenhadores, causando febre alta, dores corporais e linfoadenopatia (DA FONSECA *et al.*, 2002; LEITE *et al.*, 2005). A vaca apresenta mastite e outras infecções secundárias nas lesões, apresentando queda na produção de leite, que varia de 30 a 50%. O curso da doença em humanos dura de 15 a 30 dias, levando ao afastamento temporário do ordenhador do trabalho, devido aos sintomas da doença, acarretando, assim, grandes perdas econômicas (LOBATO *et al.*, 2005).

As amostras isoladas têm sido caracterizadas no Laboratório de Vírus/UFMG por diferentes métodos, especialmente pelo seqüenciamento de genes conservados do gênero

5 *Orthopoxvirus*. Os resultados mostram que há uma população de *Vaccinia virus* bem estabelecida, amplamente distribuída e ativa, causando infecções tanto em áreas rurais quanto silvestres e que estes vírus apresentam uma grande diversidade genética (LEITE et al., 2005; DRUMOND et al., 2007). Estes fatos levantam importantes questões relacionadas com a distribuição, circulação, virulência, mecanismos de escape imunológico e o potencial desses vírus se tornarem ainda mais prejudiciais ao homem e animais. Especula-se que estas populações de vírus tenham uma circulação estabelecida em alguns hospedeiros selvagens, que podem ser seus reservatórios naturais e, eventualmente, transmitem a doença a pessoas e animais (SILVA et al., 1986; FONSECA et al., 1998; DONATELLE et al., 2003; GUEDES, 2006; TRINDADE et al., 2006).

10 O aumento da co-circulação ativa destes vírus na população, permitindo o estabelecimento destas zoonoses, pode levar a um aumento na sua virulência e na sua capacidade de transmissão (revisado por McFADDEN, 2005). O potencial de re-emergência da varíola é objeto de muita especulação, entretanto, a ocorrência de mutações e recombiнаções em poxvírus patogênicos com a capacidade de disseminação eficiente entre os humanos, é considerada como uma ameaça à Saúde Pública (SHCHELKUNOV et al., 2002; SINGH et al., 2007). Apesar da maioria das infecções causadas por poxvírus ser benigna e de curso limitado, o acometimento de indivíduos imunossuprimidos pode causar quadros mais graves com complicações, incluindo disseminação e morte (revisado por LEWIS-JONES, 2004).

15 Embora a organização genômica e a replicação em relação aos poxvírus tenham sido estudados (MOSS, 2001), pouco se sabe sobre a virulência que estas amostras apresentam *in vivo*, quais são os seus reservatórios naturais e como estes vírus circulam na natureza. Assim, o estudo das amostras de *Vaccinia virus* brasileiras é de extrema importância para o conhecimento sobre a biologia e ecologia destes isolados que ocorrem ativamente na natureza, o que traria importantes informações comparados aos dados moleculares.

20 Uma vez que grande parte da população está totalmente desprotegida, uma vacinação, no atual cenário, deveria ser altamente criteriosa, devido a grande prevalência de indivíduos imunocomprometidos que exigiriam uma vacina mais segura (BELYAKOV et al., 2003). A possibilidade de ocorrência de uma infecção grave em indivíduos imunocomprometidos, devido à baixa resistência do hospedeiro e à multiplicação de patógenos (REDFIELD et al., 1987), a passagem do vírus no hospedeiro natural imunocomprometido poderia levar ao aumento da virulência da amostra vacinal, tornando-o patogênico também para indivíduos saudáveis (LEDUC & JAHLING, 2001). Além disso, existe a possibilidade de recombiнаção entre uma amostra vacinal e outros poxvírus circulantes ou da manutenção de uma amostra

5 vacinal na natureza. Assim sendo, um imunógeno utilizando *Vaccinia virus* inativado se torna uma alternativa viável, não existindo a possibilidade de multiplicação do vírus no animal vacinado.

10 O grande número de isolados de *Vaccinia virus* no Brasil tem assumido um importante papel como causador de uma zoonose emergente. Esta zoonose, que acarreta em problemas de ordem econômica, de saúde animal e humana, demonstra a importância deste trabalho em estudar a virulência destas amostras assim como o desenvolvimento de um imunógeno inativado seguro para futuras aplicações no combate da vaccínia bovina, visto que esta é transmitida para o homem, o que também poderá ajudar a sanar os problemas veterinários e
15 econômicos.

5 3- OBJETIVOS

3.1 - Objetivo geral

10 Estudar a virulência de amostras brasileiras de *Vaccinia virus* e avaliar a resposta imune humoral ao vírus BeAn 58058 inativado.

15 3.2 - Objetivos específicos

15 1 - Comparar a virulência de amostras brasileiras de *Vaccinia virus* em camundongos Balb/c utilizando diferentes vias de inoculação;

20 2 - Estudar o tropismo de amostras de *Vaccinia virus* em órgãos de camundongos infectados;

25 3 - Avaliar as possíveis vias de eliminação da amostra WR em camundongos infectados;

30 4 - Comparar e estabelecer o melhor sistema celular para multiplicação do vírus BeAn 58058;

35 5 - Estabelecer testes de inativação do vírus BeAn 58058 *in vitro* e *in vivo* e avaliar os seus prováveis efeitos na estrutura e viabilidade da partícula viral;

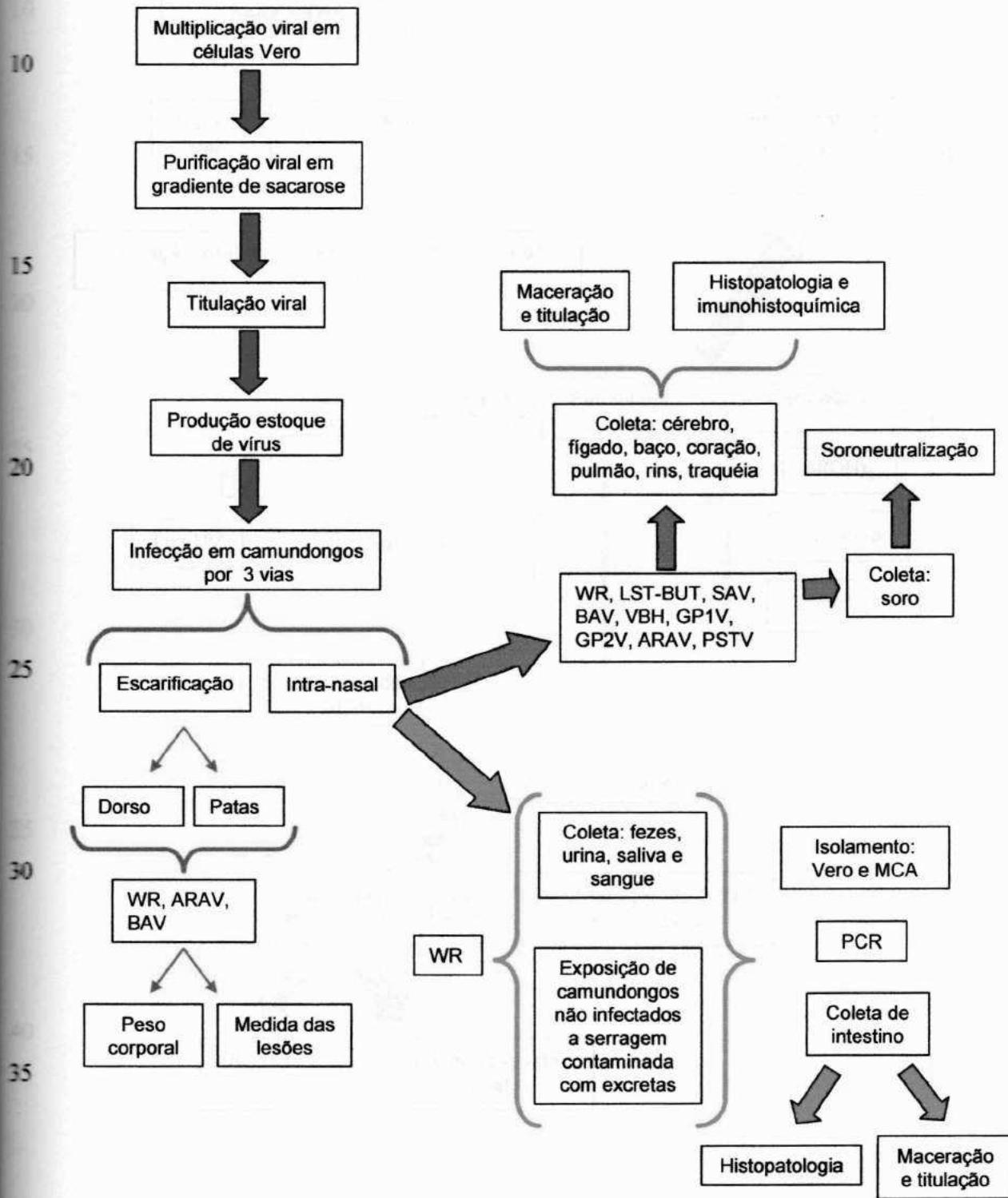
40 6 - Avaliar a eficácia *in vivo* de diferentes adjuvantes e diferentes intervalos de imunização em camundongos Balb/c para a melhor resposta imune ao antígeno inativado BeAn 58058;

45 7 - Avaliar a proteção conferida após imunização com BeAn 58058, utilizando a amostras virais WR e Araçatuba para desafio;

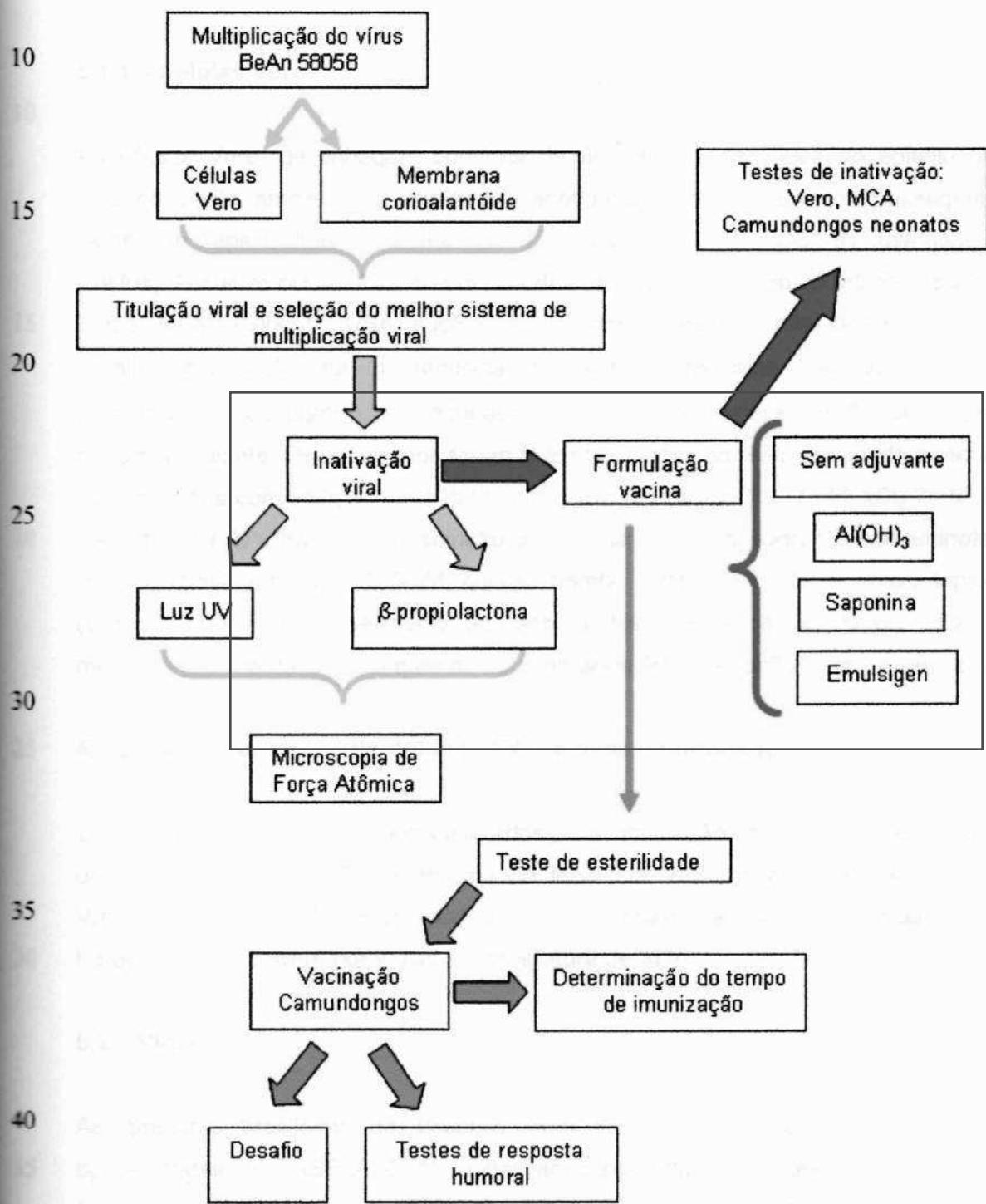
50 8 - Estudar a resposta imune humoral de camundongos Balb/c imunizados com BeAn 58058 inativado.

5 4- ESTRATÉGIA DE TRABALHO

4.1 - Virulência de amostras brasileiras de *Vaccinia virus*



5 4.2 - Resposta imune a antígeno inativado BeAn 58058



5 5- METODOLOGIA

5.1 – Sistemas celulares

5.1.1 – Células Vero

As células Vero, de linhagem contínua de fibroblastos derivados do epitélio de rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*) foram obtidas na passagem 126 da "American Type Culture Collection" (ATCC), catálogo número CCL-81 (Maryland, Estados Unidos). O cultivo celular foi feito em garrafas redondas contendo 25 mL de meio mínimo de Eagle (MEM) (Gibco™, USA) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Brasil), 2mM glutamina, gentamicina (50 µg/mL), penicilina potássica (200 U/mL) e anfotericina B (2,5 µg/mL), sob incubação a 37°C, em atmosfera com 5% de CO₂ em estufa de tambor rolante. Os subcultivos foram feitos três vezes por semana sendo a monocamada celular lavada com solução tampão fosfato salina (PBS) (NaCl 137mM; KCl 7mM; Na₂HPO₄ 1,4mM; pH 7,2) e tratada com solução de tripsina contendo ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) (NaCl 136mM; KCl 5mM; glicose 55mM; NaHCO₃ 69mM; 0,5g p/v tripsina 1:250 (Difco); EDTA 0,5mM; vermelho de fenol a 1%). Estas células foram utilizadas para multiplicação e titulação viral quando apresentaram 90% de confluência da monocamada.

5.1.2 – Membrana corioalantóide (CAM) de ovos embrionados

Os ovos embrionados de galinha utilizados para inoculação de vírus em CAM foram obtidos do Setor de Aves do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG. Estes ovos inoculados foram mantidos em incubadora de ovos Petersime (SC, Brasil), por 9 dias à temperatura de 37°C.

5.2 – Virus

As amostras brasileiras de *Vaccinia virus* (BR-VACV) utilizadas neste estudo estão apresentadas na TABELA 2. Além das amostras brasileiras, foram utilizadas a amostra *Vaccinia virus Western Reserve* (WR), gentilmente cedida pelo Dr. C. Jungwirth, Universität Würzburg, Alemanha e a amostra Lister Butantã (LST-BUT), gentilmente cedida pelo Instituto Butantã, SP. Estas amostras foram escolhidas por serem consideradas de alta e baixa patogenicidade, respectivamente em camundongos Balb/c pela via intranasal (BRANDT & JACOBS, 2001; ABDALRHMAN et al., 2006).

5 A amostra BeAn 58058 (BAV) foi gentilmente cedida pelo Dr. Francisco de Paula Pinheiro e
a amostra SPAn 232 (SAV) foi gentilmente cedida pelo Dr. Oscar de Souza Lopes. Todos os
vírus já haviam sido previamente clonados.

10

TABELA 2 - Amostras de *Vaccinia* virus utilizadas neste estudo: origem, ano de isolamento, isolamento geográfico e referência bibliográfica.

Amostra viral (abreviação)	Origem	Ano de isolamento	Isolamento geográfico (Instituto e Estado)	Referência
BAV	Roedor, <i>Oryzomys sp.</i>	1963	Instituto Evandro Chagas, PA	FONSECA <i>et al.</i> , 1998
SAV	Roedor, sentinelas sp.	1965	Instituto Adolfo Lutz, SP	DA FONSECA <i>et al.</i> , 2002
VBH	Roedor, camundongo Balb/c	1993	Instituto de Ciências Biológicas/ MG	TRINDADE <i>et al.</i> , 2004
ARAV	<i>Bos taurus</i>	2000	SP	TRINDADE <i>et al.</i> , 2003
GP1V	<i>Bos taurus</i>	2001	Instituto de Ciências Biológicas/ MG	TRINDADE <i>et al.</i> , 2006
GP2V	<i>Bos taurus</i>	2001	Instituto de Ciências Biológicas/ MG	TRINDADE <i>et al.</i> , 2006
PSTV	<i>Bos taurus</i>	2003	Instituto de Ciências Biológicas/ MG	LEITE <i>et al.</i> , 2005
LST-BUT	Humana	1870	Vaccine Institute, Cologne, German	FENNER <i>et al.</i> , 1988
WR	Amostra NYCBH	1876	NYCDHL	FENNER <i>et al.</i> , 1988

BAV: BeAn58058 virus; SAV: SpAn232 virus; VBH: Belo Horizonte virus; ARAV: Araçatuba virus; GP: Guarani; WR: *Vaccinia* virus Western Reserve; LST-BUT: Lister; NYCBH: New York City Board of Health; NYCDHL: New York City Department of Health Laboratory

5 5.2.1 – Multiplicação viral em cultura celular

Os estoques de vírus foram obtidos após a multiplicação em células Vero cultivadas em 30 garrafas redondas de 500 mL, a 37°C, em estufa de tambor rolante. Monocamadas contendo cerca de 80 milhões de células foram lavadas duas vezes com PBS e infectadas com multiplicidade de infecção (MOI) de 0,01, em 5 mL de MEM, acrescido de antibióticos. Após 1 hora de incubação, a 37°C, para adsorção do vírus, foram acrescentados 25 mL de MEM suplementado com 1% SFB. Novamente, as células foram incubadas a 37°C e monitoradas diariamente, ao microscópio óptico até a detecção de 90% de efeito citopático (ECP), aproximadamente, 48 horas após a infecção. Em seguida, o meio de cultivo foi desprezado, as células foram lavadas com PBS e desprendidas das garrafas com auxílio de um raspador e utilizando Tris-HCl 10mM, pH 8,0. A suspensão obtida foi centrifugada durante 10 minutos a 1500 rpm (rotor H1000B - Sorvall RT6000 B), a 4°C e o sedimento obtido foi mantido a – 70°C para posterior purificação das partículas virais.

20 5.2.1.1 – Purificação viral (JOKLIK, 1962 – modificado)

O sedimento de células infectadas (Item 5.2.1) foi homogeneizado em 8mL de Tris-HCl 10mM, pH 8,0 e centrifugado a 2.500 rpm (rotor H1000B - Sorvall RT6000 B) durante 15 minutos a 4°C. O sobrenadante obtido foi mantido em banho de gelo e o sedimento celular foi lisado duas vezes em 10 mL de solução de lise ($MgCl_2$ 1mM; Tris10mM, pH 7,0; KCl 10mM). Após a adição desta solução, a suspensão foi incubada em banho de gelo, durante 10 minutos e as células lisadas mecanicamente em homogeneizador do tipo "Dounce" (Wheaton, USA) por 80 vezes. A suspensão viral resultante foi centrifugada a 14.000 rpm (rotor AH 629 Sorvall), 4°C, por 2 horas sobre um colchão de sacarose a 36% em Tris-HCl 10mM, pH 8,0 para separação dos restos celulares. Utilizando-se uma pipeta Pasteur, o sobrenadante e a interface foram coletados e desprezados e o restante foi descartado por inversão do tubo. Os sedimentos obtidos foram homogeneizados em 1mL de Tris 10mM, pH 8,0 e submetidos a 2 ciclos de sonicação por 30 segundos, com 40% de potência de saída (Sonic Desmembrator-50, Fisher Scientific – USA). Posteriormente, os sedimentos foram centrifugados em gradiente de sacarose (25% a 40%) a 12.000 rpm (rotor AH 629 – ultracentrifuga Sorvall), 4°C, por 45 minutos. As bandas relativas aos vírus foram coletadas com pipeta Pasteur e adicionadas de Tris 10mM, pH 8,0 e centrifugadas a 20.000 rpm (rotor AH 629 – ultracentrifuga Sorvall), 4°C por 45 minutos. Os sobrenadantes foram desprezados e os sedimentos homogeneizados em

- 5 até 500 µL de Tris 10mM, pH 8,0 e distribuídos em alíquotas de 5 µL em microtubos e estocados
a -70°C para posterior titulação.

5.2.2 – Multiplicação da amostra viral BAV em membrana corioalantóide de ovos embrionados (TRINDADE, 2003 - modificado)

A inoculação da amostra BAV em CAM foi feita por deslocamento da câmara de ar dos ovos embrionados pela técnica convencional, utilizando um ovoscópio. Um volume de 100 µL contendo 1000 pfu de vírus BAV foi inoculado, utilizando seringa de 1 mL com agulha 0,45 x 13mm (26 Gauge). Os ovos foram mantidos em estufa úmida, a 37°C, por um período de 72 horas e, posteriormente, incubados a 4°C durante 24 horas. Os ovos cujos embriões morreram antes de 72 horas foram armazenados a 4°C. As CAMs destes ovos foram retiradas assepticamente, sendo que a região onde houve formação de lesão do tipo "pock" foi coletada e armazenada a -70°C.

5.2.2.1 – Purificação da amostra viral BAV multiplicada em membrana corioalantóide de ovos embrionados (JOKLIK, 1962 – modificado)

Para o preparo do imunógeno, a amostra viral BAV, selecionada para este objetivo, não passou pelo processo de purificação em gradiente de sacarose visando maior simplificação para o processo industrial. Cada CAM infectada foi macerada em nitrogênio líquido e adicionada de 1 mL de tampão Tris, 10mM, pH 8,0. Esta foi triturada utilizando homogeneizador Politron (Brinkmann Homogenizer, Suiça), primeiramente com a sonda maior por 90 segundos e, posteriormente, utilizando intervalo de 30 segundos e, novamente, com a sonda menor por 90 segundos. Posteriormente, o material foi centrifugado a 1.500 rpm (Sorvall RT-6000) por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi colocado sobre um colchão de sacarose 36% e centrifugado a 14.000 rpm (rotor AH 629 - ultracentrífuga Sorvall) por 2 horas a 4°C. Com o auxílio de uma pipeta Pasteur, o sobrenadante e a interface foram coletados e desprezados, e o restante foi descartado por inversão do tubo. Os sedimentos obtidos foram homogeneizados em 1mL de Tris 10 mM, pH 8,0 e submetidos a 2 ciclos de sonicação por 30 segundos com 40% de potência de saída (Sonic Desmembrator-50, Fisher Scientific – USA). A suspensão obtida foi colocada sobre um colchão de sacarose 36% e centrifugado por 2 horas, a 14.000 rpm (rotor AH 629 - ultracentrífuga Sorvall). Posteriormente, o sedimento foi homogeneizado em Tris

5 10mM, pH 8,0 e distribuídos em aliquotas de 5 µL em microtubos, sendo 2 µL do vírus
purificado retirada para determinação do título e o restante foi estocado a - 70°C.

Outra metodologia testada consistiu na utilização de dicloro difluormetano - Genetron 407C
10 (GENETRON® – Honeywell - USA) para a retirada dos lipídeos da CAM. As membranas foram
maceradas em gral com nitrogênio líquido e para cada uma delas foi adicionado 1 mL de Tris
15 10mM pH8,0 para posterior homogeneização no Politron (Brinkmann Homogenizer, Suíça),
primeiramente com a sonda maior por 90 segundos e, posteriormente, utilizando intervalo de 30
segundos e, novamente, com a sonda menor por 90 segundos. Em seguida, foram
acrescentados 750 µL de Genetron para a retirada de gordura e as membranas foram
homogeneizadas novamente com a sonda maior por 90 segundos e, posteriormente, utilizando
20 intervalo de 30 segundos, com a sonda menor por 90 segundos. Posteriormente, o material foi
centrifugado a 1.500 rpm (Sorvall RT-6000) por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi colocado
sobre um colchão de sacarose e, a partir deste ponto, foi utilizado o mesmo processo descrito
no parágrafo anterior.

25 5.2.3 – Titulação viral (CAMPOS & KROON, 1993)

A titulação viral foi feita em placas de 6 câmaras, em triplicata, contendo aproximadamente $1,5 \times 10^6$ células Vero/ câmara cultivadas por 16 a 24 horas, a 37°C em MEM, contendo 5% SFB
25 (Cutilab). Em cinco câmaras da placa, o meio foi desprezado e 200 µL de uma série de
diferentes diluições dos vírus, na razão de 10, em meio MEM, foram adicionados às células.
Uma câmara não foi infectada, ficando reservada para o controle da viabilidade celular. Após 1
hora de adsorção a 37°C, 2 mL de MEM contendo 1% de SFB foram adicionados e as placas
30 foram novamente incubadas a 37°C e monitoradas diariamente até o surgimento de 90% de
ECP. Em seguida, as células foram fixadas com solução de formol a 10% em PBS por 30
minutos, lavadas com água e, posteriormente, coradas com solução 1% (p/v) de cristal violeta
35 por 15 minutos. O título viral foi calculado pelo número de placas obtidas na câmara da diluição
que apresentou entre 30 a 300 placas de lise, multiplicado pelo inverso da diluição, em 200 µL,
sendo posteriormente convertido para o volume final 1 mL.

5 **5.3 – Experimentos em camundongos**

Camundongos Balb/c machos com 4 semanas de idade foram utilizados como modelo animal, sendo cedidos pelo Centro de Bioterismo da UFMG (CEBIO/UFMG). Estes animais foram mantidos no biotério da Escola de Veterinária/UFMG, em gaiolas contendo microisoladores com filtros de proteção e alimentados com ração comercial e água, conforme recomendações do “Guia de Manutenção e Uso de Animais de Laboratórios”. Todos os experimentos foram aprovados e conduzidos de acordo com as regulamentações da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG (anexos 1 e 2).

15 **5.3.1 – Isolador de camundongos**

Um isolador foi construído por medida de biossegurança no que diz respeito à proteção dos animais infectados com os vírus utilizados neste trabalho e aos animais externos. Este isolador foi feito utilizando tela apropriada para proteção contra a entrada de mosquitos, outros roedores 20 ou quaisquer animais. Dentro deste isolador foram colocados, em média, 15 gaiolas que, por sua vez, também possuíam filtros de proteção. O isolador foi mantido em sala separada no biotério da Escola de Veterinária/UFMG.

25 **5.3.2 – Vias de inoculação de *Vaccinia virus***

Visando avaliar diferenças na virulência entre as diversas amostras virais estudadas, 6 camundongos Balb/c machos com 4 semanas de idade foram infectados com as seguintes BR-VACVs BAV, ARAV, PSTV, GP1V, GP2V, além das amostras WR e LST-BUT. Os camundongos pertencentes ao grupo controle negativo foram inoculados com 10 µL de PBS. 30 Os vírus purificados foram inoculados em uma concentração de 10^8 pfu/10 µL nas três vias de inoculação: intranasal (BRANDT et al., 2001), escarificação no dorso e nas patas dos camundongos (MILLER et al., 1997). Previamente às infecções, os camundongos foram anestesiados com injeção intraperitoneal de 50 µL de uma solução contendo 1.300 µL de Ketamina (Dopalen®, Brasil) a 50 mg/mL, 200 µL de Cloridrato de Xilazina (Kensol®, Brasil) a 35 20mg/mL e 1.500 µL de PBS (QUENELLE et al., 2004; FERRIER-REMBERT et al., 2007).



5 5.3.2.1 – Inoculação pela via intradérmica

Para inoculação de vírus pela via intradérmica na face plantar da pata direita ou no dorso dos camundongos, estes foram devidamente anestesiados e, em seguida, 10 movimentos horizontais foram feitos com o auxílio de uma agulha 0,45 x 13mm (26 Gauge) até o aparecimento de sangue. Para a inoculação na região do dorso, o pelo da região de inoculação foi retirado com um raspador (Gilette, USA). Posteriormente, uma solução de 10 μ L contendo 10⁶ pfu da suspensão viral foi colocada sobre o local ferido com uma pipeta. Os efeitos da inoculação foram monitorados macroscopicamente diariamente durante 20 dias pós infecção (d.p.i.). A espessura das patas e o tamanho das lesões, quando existentes, de cada camundongo foram medidas utilizando um paquímetro antes e após as inoculações (MILLER et al., 1995; QUENELLE et al., 2004).

20 5.3.2.2 – Inoculação pela via intranasal

25 Para inoculação intranasal, os camundongos foram previamente anestesiados (item 5.3.2) e infectados utilizando-se uma placa de superfície plana de 35 mm, sendo a gota inspirada pelos camundongos.

30 Todos os camundongos foram examinados e pesados diariamente para a observação do aparecimento dos sinais clínicos. A partir da infecção intranasal com 10⁶ pfu/10 μ L dos poxvírus estudados, os camundongos que perderam 25% do peso corporal foram sacrificados e aqueles que não apresentaram perda de peso e não apresentaram nenhum sinal clínico, foram acompanhados até o dia 10 p.i. e, então, sacrificados. Órgãos como baço, cérebro, rins, fígado, pulmão, coração e traquéia foram coletados para a verificação do tropismo viral. Metade dos órgãos foi armazenado a -70°C para titulação viral e a outra metade foi armazenada em aldeído fórmico 10% para análises histopatológicas e imunohistoquímicas (TSCHARKE & SMITH, 1999).

35 Adicionalmente, a fim de comparar como as BR-VACVs se multiplicam nos pulmões de camundongos infectados, foi feita uma cinética de titulação viral dos vírus presentes nos pulmões nos dias 1, 3 e 5 p.i. Além disso, biópsias de pulmão também foram utilizadas para estudos histopatológicos e imunohistoquímicos (ZAUCHA et al., 2001).

5 Experimentos da determinação de dose letal de 50% (LD_{50}) foram feitos utilizando doses que variaram de 10^3 até 10^8 pfu e para a detecção da taxa de sobrevivência, camundongos foram infectados com 10^6 pfu de VACV e os camundongos foram acompanhados por 21 d.p.i. ou até a morte dos camundongos.

10 **5.3.4 – Testes de proteção cruzada**

Visando analisar se as inoculações intradérmicas poderiam conferir proteção contra VACV, 4 grupos contendo 9 camundongos cada foram infectados pela via de escarificação nas patas com 10^6 pfu de cada vírus estudado: BAV, ARAV e WR. Trinta d.p.i.; 3 camundongos de cada grupo foram reinfectados utilizando a mesma via de infecção e a mesma dose viral de outras amostras. Os camundongos foram monitorados diariamente para o monitoramento do peso e do desenvolvimento das lesões.

20 **5.4 – Processamento dos órgãos coletados de camundongos (SMEE et al., 2002-modificado)**

25 Os órgãos coletados de camundongos foram triturados em 90% de MEM com o auxílio de um pistilo e areia autoclavada. Posteriormente, a suspensão foi centrifugada a 8.000 rpm por 5 minutos, à 4°C em microcentrifuga (Eppendorf, 5415C, Europa). O sobrenadante foi coletado e as diluições foram feitas na razão de 10. O título viral foi determinado conforme a metodologia descrita no item 5.2.3. Após a contagem de placas de lise, o título obtido em pfu/mL foi convertido para pfu/g de tecido.

30 **5.5 – Análises histopatológicas e imunohistoquímicas dos órgãos (MARTINEZ et al., 2000-modificado)**

35 Os tecidos foram fixados em formalina a 10% para avaliação histopatológica. Os tecidos fixados foram processados, os blocos foram embebidos em parafina e seccionados em 5 a 6 µm em micrótomo rotatório padrão, e colocados sobre lâminas para fixação com hematoxilina e eosina (HE). As lesões histopatológicas observadas foram graduadas na escala de mínima, moderada e máxima, baseada na gravidade das lesões.

5 Para as análises imunohistoquímicas, experimentos pilotos para testes das diluições e escolha
do anticorpo anti-H3L (da Fonseca *et al.*, 2000) foram conduzidos previamente em diluições de
1:100, 1:200, 1:1000 e 1:10.000 do anticorpo por Leite, 2006. A recuperação antigênica foi feita
com o intuito de melhorar a sensibilidade, mas ainda apresentou grau moderado de reatividade
10 cruzada inespecífica com os tecidos. O trabalho foi desenvolvido com a diluição de 1:10000 do
anticorpo anti-H3L. Todos os controles foram conduzidos em animais não infectados e em
animais infectados omitindo-se o soro primário.

As lâminas foram desparafinizadas e hidratadas em soluções de álcoois em concentrações
decrescentes. A recuperação antigênica induzida pelo calor foi feita por incubação em solução
15 específica (Target Retrieval Solution, S1700, Dako Corporation, USA) a 98°C por 30 minutos.
Em seguida, foi feito o bloqueio da peroxidase endógena com banho em solução de peróxido
de hidrogênio a 3,5% por 30 minutos. Os sítios de ligação inespecífica foram bloqueados por
incubação em soro normal de cabra, diluído 1:20, em câmara úmida por 30 minutos à
temperatura ambiente (t.a.). Em seguida, as lâminas foram incubadas com anticorpo anti-H3L
20 na diluição 1:10.000 em PBS com soro albumina bovina (BSA, 1870, Inlab, Brasil) a 2% por 18
horas, em câmara úmida, a 4°C. A incubação com o anticorpo secundário biotilinado (DAKO kit
K0675, USA) por 30 minutos foi seguida pela incubação com anticorpo terciário contendo
25 estreptavidina conjugada à peroxidase (DAKO Kit K0675, USA) por igual período à t.a. A reação
foi visualizada após incubação em solução de 0,05% de 3,3-diaminobenzidine
tetrahydrochloride (DAB, Sigma, USA) com 0,03% de peróxido de hidrogênio por 5 minutos. As
lâminas foram, então, contracoradas com hematoxilina (Reagen, Brasil). Entre todas as etapas
30 anteriormente descritas, foram realizados 3 banhos de 5 minutos em PBS, exceto entre o
bloqueio dos sítios inespecíficos e a incubação com o anticorpo primário. Após a
contracoloração, as lâminas foram desidratadas em soluções de concentrações crescentes de
álcoois, diafanizadas em xanol e montadas com meio de montagem comercial (Entellan, Merck,
USA).

5.6 – Ensaios de soroneutralização (TRINDADE, 2003)

35 Amostras de sangue dos camundongos foram coletadas no momento do sacrifício e os soros
foram aquecidos a 56°C por 30 minutos para a inativação do complemento e testados, em
triplicata, pelo teste de soroneutralização para detecção da presença de anticorpos contra os
VACV estudados.

5 Para cada soro, foram utilizadas placas de 6 câmaras, nas quais foram implantadas 500.000 células Vero por câmara. Os vírus, diluídos seriadamente em MEM, foram acrescidos de gentamicina (50 μ g/mL), penicilina potássica (200U/mL) e amfotericina B (2,5 μ g/mL). Os soros foram diluídos também seriadamente, nas diluições de 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640 e 1:1280. Para cada diluição de soro, foi preparada uma mistura que consistiu de 200 μ L de diluição de soro mais 200 μ L de suspensão viral contendo 10² pfu, que foram mantidas sob agitação a 37°C, por 1 hora e, em seguida, inoculadas nas células. As placas foram incubadas a 37°C e após 1 hora de adsorção das partículas virais, foi acrescentado meio MEM suplementado com 1% SFB. Novamente, as placas foram incubadas a 37°C no período de 48 a 72 horas até o aparecimento de ECP. Após esta incubação, as células foram fixadas por 15 minutos em solução de formol 10% em PBS e em seguida, a monocamada de células foi corada com solução de cristal violeta durante 15 minutos. Foram feitos controles de viabilidade celular, sendo uma câmara inoculada somente com células e controles positivos, nos quais foram inoculadas 10² pfu da amostra WR. Atividades neutralizantes contra a partícula IMV foram determinadas por ensaio de redução do número de placas e expresso como concentração requerida para atingir 50% de redução do número de placas por mililitro.

5.7 – Estudos de eliminação e transmissão viral em camundongos

Com o intuito de analisar as possíveis vias de eliminação da amostra WR, camundongos Balb/c com 4 semanas de idade foram infectados com 10⁶ pfu de WR pela via intranasal e os espécimes clínicos tais como saliva, urina e fezes foram coletados diariamente para a detecção do vírus. Tanto os camundongos infectados quanto aqueles do grupo controle, inoculados com PBS, tiveram material clínico coletado diariamente até a morte.

Para determinar se as excretas de camundongos infectados são potenciais veículos de transmissão do WR, 5 camundongos Balb/c foram infectados pela via intranasal conforme descrito no item 5.3.2.2 e após 5 dias, os camundongos foram sacrificados e tiveram seus intestinos coletados para ensaios de titulação viral e histopatologia como descritos nos itens 5.2.3 e 5.5, respectivamente. Ainda no 5º d.p.i., camundongos não infectados foram transferidos para a serragem contaminada com fezes e urina de camundongos infectados e as fezes foram coletadas nos dias 1, 5, 10, 15 e 20 p.i. quando os camundongos foram, então, sacrificados e seus intestinos também foram coletados para ensaios de titulação viral e histopatologia como

5 descritos nos itens 5.2.3 e 5.5, respectivamente. Amostras de sangue também foram coletados para ensaios de soroneutralização.

10 **5.7.1 – Coleta e processamento de espécimes clínicos e intestinos de camundongos infectados**

15 A coleta de certos espécimes clínicos como urina e fezes foi feita em conjunto, visto que depende, exclusivamente, da disposição dos animais, dificultando a coleta diária individual. Alguns estímulos, como o manuseio e massagem da região ventral, favoreceram a eliminação das excretas, que foram coletadas diretamente em microtubos e armazenadas a -70°C. As amostras de fezes foram previamente processadas para serem utilizadas nas reações de PCR e para inoculação em CAM (Item 5.2.2). Inicialmente, foram maceradas em PBS1x (100 mg fezes/1 mL), com o auxílio de uma ponteira de 100 µL estéril e, em seguida foram centrifugadas a 5000 rpm (Eppendorf, 5415C, Europa) por 5 minutos, e o sobrenadante coletado. Amostras de urina não foram processadas previamente.

20 Para a coleta da saliva, uma haste de algodão de 30mm (Diagnósticos Microbiológicos Especializados, Brasil) foi introduzida na cavidade oral dos camundongos com movimentos rotatórios, armazenada a seco em microtubos e congeladas a -70°C. Para os estudos de infectividade e de detecção de DNA viral, no momento do uso, o swab foi diluído em 50µL de PBS e centrifugado a 5.000 rpm (Eppendorf, 5415C, Europa), por 5 minutos, 4°C.

25 O sangue foi coletado através de uma incisão na ponta da cauda dos camundongos, com o auxílio de uma tesoura cirúrgica e coletado em um tubo contendo 25µL de EDTA para evitar a coagulação e, posteriormente, armazenado a -70°C. No momento do uso, este também foi diluído na razão de 1:10 para a realização dos estudos de PCR e inoculação em CAM.

30 Os intestinos com as respectivas Placas de Peyer e linfonodos mesentéricos foram coletados, sendo parte armazenado a -70°C para a titulação viral (Item 5.2.3) e a outra parte armazenada em aldeído fórmico 10% para as análises histopatológicas (item 5.6).

35 **5.7.2 – Detecção de vírus por reação em cadeia da polimerase em espécimes clínicos de camundongos infectados (ABRAHÃO, 2006)**

5 De acordo com a padronização da semi-nested PCR desenvolvida por Abrahão, 2006, os
espécimes clínicos foram submetidos à amplificação do gene fator de crescimento viral (*vfg*),
sem a extração prévia de DNA. Para verificar a presença do DNA viral na urina, saliva e fezes
dos camundongos infectados foram utilizados iniciadores específicos como mostrado na
TABELA 3 (FONSECA et al., 1999; DRUMOND, 2007)

10 A reação *semi-nested* PCR para a amplificação do gene *vfg* consiste de duas etapas. Na
primeira, são utilizados os iniciadores VGF F e WR 9/10 (FIGURA 5, TABELA 3), que
amplificam um fragmento de 1536 pb. O produto da primeira reação serve como amostra para a
segunda etapa de amplificação, que utiliza os iniciadores VGF F e VGF R, cujo produto final é
15 um amplificado de 381 pb (FIGURA 5, TABELA 3).

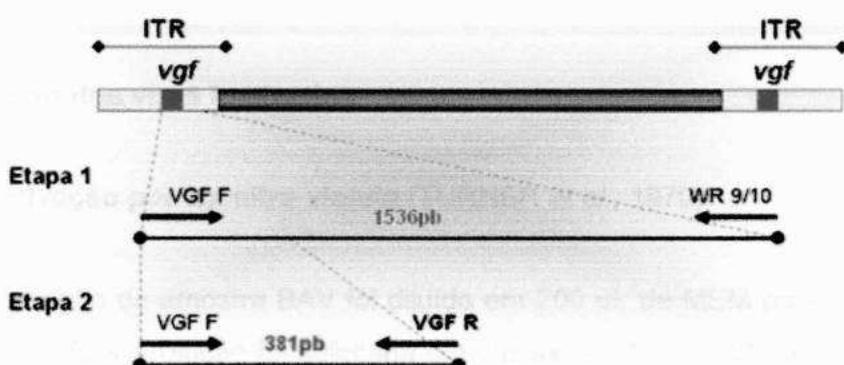
20 Nessas reações, foram utilizados 1,5 mM de MgCl₂, 20 mM dos nucleotídeos (dATP, dCTP,
dGTP, dTTP), 2U de *Taq* polimerase (Promega), 2 µL de tampão 10 X de *Taq* polimerase, 20
pmol dos iniciadores específicos e 1 µL da amostra a ser estudada em um total de 20 µL de
reação. Todas as reações foram processadas no aparelho Perkin Elmer Cetus (Perkin, USA),
modelo N801-150.

25 A primeira etapa do ciclo de amplificação consistiu de 1 ciclo de 94°C por 9 minutos, 30 ciclos
de 94°C por 1 minuto, 45°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos e 72°C por 15 minutos. A
segunda etapa foi programada com as mesmas temperaturas e ciclos com exceção da etapa de
extensão, na qual foi utilizado 72°C por 1 minuto. Os fragmentos amplificados foram fracionados
30 eletroforeticamente em gel de poliacrilamida (PAGE) a 8%, sob voltagem de 100V e corados
pela prata.

35

5 TABELA 3 - Iniciadores utilizados para amplificação do gene *vgf* da amostra viral WR

Nomes	Seqüências	Tamanho esperado Amplicon	Referência
VGF F	5' CGCAGGATCCATAATCAGTCATT 3'	381 pb	FONSECA et al., 1999
VGF R	3' CCAGAACGCTTGGCACACCAATATC 5'		
WR 9/10	3' ACAATGGATATTTACGAC 5'	1536pb	DRUMOND, 2007

FIGURA 5 - Esquema representativo dos iniciadores do gene *vgf* utilizado na PCR semi-nested.

5 5.7.3 – Quantificação de DNA viral das fezes por PCR em tempo real

Para quantificar o DNA nas fezes de camundongos infectados, foi feita uma reação de PCR em tempo real para a amplificação do gene da RNA polimerase segundo iniciadores desenhados por NITSHE et al., 2004 (TABELA 4). Foram utilizados 2 µL da amostra na reação de PCR com 10 o kit SYBR Green master mix (*Applied Biosystems*) contendo marcador SYBR Green I, AmpliTaq Gold DNA Polimerase, dNTPs e tampão. A reação foi feita no aparelho *Applied Biosystems' 7900 Sequence Detection System* com as seguintes temperaturas e tempos: 95°C, 10' e 45 ciclos de 95°C, 55°, 10"; 72°C, 10".

15 TABELA 4 - Iniciadores utilizados para a amplificação do gene da RNA polimerase por PCR em tempo real.

Gene	Nomes	Seqüências	Tamanho Amplicon	Referência
RNA pol	rpo OPV F1	5' CTGTAGTTATAAACGTTCCGTGTG 3'	18 kd	NITSHE et
	Rpo OPV R1	3' TTATCATAACGCATTACCATTTCGA 5'		al., 2004

5.8 – Preparo dos vírus inativados

20 5.8.1 – Inativação por luz ultra-violeta (TURNER et al., 1970)

Cada preparação da amostra BAV foi diluída em 200 µL de MEM para uma concentração final de 10⁶ e 10⁸ pfu. Essa solução foi colocada em placas de Petri de 35 mm formando uma película fina, sendo irradiada por diferentes intervalos de tempo: 0", 15", 30" e 45"; 1', 3', 5', 10' ou 15'.

25 As placas contendo a suspensão viral foram colocadas a uma distância de 15 cm da luz UV, cujo comprimento de onda é de 280nm.

5.8.2 - Inativação por β-propiolactona (THORNTON, 1980 - modificado)

30 O vírus BAV previamente titulado em 10⁷ pfu foi transferido para um erlenmeyer e em seguida, adicionado β-propiolactona (BPL) (Sigma) na proporção de 1:100 (ISLAS et al., 1995; FRAZATTI-GALLINA et al., 2004). A solução foi mantida sob agitação por 2 horas a 37°C, sendo o pH monitorado por meio de um potenciômetro (MB-10-Marte, Brasil), corrigido para 7,2

5 pela adição de K₂HPO₄ 1M estéril, quando necessário. Após este período, o vírus foi incubado à temperatura de 25°C e a agitação foi mantida por mais 4 horas.

A suspensão viral inativada foi coletada e dialisada em salina 0,8% por 24 horas, a 4°C (Sambrook et al., 1989). A diálise da amostra inativada foi feita com o objetivo de se retirar a 10 BPL, seus produtos de degradação e parte do meio de cultura. A membrana de diálise (12000-14000 MWCO) foi preparada conforme instruções do fabricante (Spectral Medical Industries Inc., U.S.A.) e autoclavada após o preparo sendo, em seguida, armazenada imersa em água Milli-Q estéril a 4°C. Ao final da diálise, a amostra foi armazenada a -70°C.

15 **5.9 – Microscopia de força atômica (MALKIN et al., 2003)**

Essa metodologia foi utilizada para visualização e comparação das partículas virais 20 após inativação por luz UV e BPL. Análises utilizando MFA foram feitos no Centro Tecnológico (CETEC). Suspensões de 1,0 µL do vírus BAV, inativadas por luz UV ou BPL foram depositadas sobre um substrato de mica. A suspensão contendo os vírus foi secada ao ar livre durante 20 minutos. A superfície de mica foi cuidadosamente lavada com água destilada e rapidamente seca com um jato de argônio. As imagens foram obtidas após visualização em Nanoscópio IIIA AFM (Digital Instrum, Santa Bárbara, Califórnia).

25 **5.10 – Testes de inativação**

Para a avaliação e comprovação da inativação viral foram utilizados: células Vero, ovos embrionados e camundongos neonatos Balb/c.

30 Para inoculação em células Vero, um volume de 100 µL de vírus BAV inativado foi diluído em 0,4 mL de MEM acrescido de glutamina, antibióticos e antifúngico. A inoculação da suspensão viral foi feita em monocamadas de células Vero com confluência de 90%, implantadas em garrafas de cultivo celular de 25cm². O meio de cultura foi removido e a monocamada lavada com PBS. Em seguida, foram acrescentados 0,5 mL da suspensão viral inativada e, em 35 paralelo, feito um controle da viabilidade celular e um controle de vírus, em duplicata. As células foram incubadas a 37°C, homogeneizadas por 1 hora, de 15 em 15 minutos. Em seguida, foram acrescentados 4,5 mL de MEM suplementado com 1% de SFB (Cultilab). As células foram observadas quanto ao aparecimento de ECP por um período de 48 a 72 horas. Uma das

5 garrafas de cada teste foi fixada em formol e corada com cristal violeta para contagem de placas. Da outra garrafa, o meio foi descartado, as células foram congeladas e descongeladas por três vezes em Tris a 10 mM pH8,0 e, posteriormente, centrifugadas a 1.500 rpm (Sorvall, RT6000) a 4°C. O sobrenadante foi coletado, sendo 1mL deste, repassado em 6 vezes sucessivas em células Vero. Esse processo foi feito para as garrafas com a suspensão
10 inativada, com os controles positivos, inoculados com o BAV vivo e com os controles negativos, inoculados com PBS (THORNTON, 1980; SOMEKH *et al.*, 2004).

15 Para inoculações em CAM, foram utilizados 100 µL contendo 10^7 pfu de vírus BAV inativado (item 5.2.2). Após incubação por 72 horas a 37°C, as CAM infectadas foram retiradas
20 assepticamente, e armazenadas a -70°C. Foram feitas duas passagens consecutivas em CAM, em duplicita, as quais foram coletadas e maceradas com areia autoclavada para inoculação em células Vero para confirmação da inativação viral. Os controles negativos consistiram na inoculação da CAM com PBS e os controles positivos, na inoculação com 1000 pfu do vírus BAV não inativado (THORNTON, 1980).

25 Foram utilizados camundongos neonatos Balb/c com dois dias de idade para inoculações pela via intracerebral com 200 µL contendo 2×10^5 pfu do vírus BAV inativado por luz UV e BPL. Cada grupo foi composto por 5 animais que foram observados diariamente e ao apresentarem
30 sinais clínicos causados por poxvírus, foram sacrificados e seus órgãos como cérebro, fígado e baço foram coletados para posterior titulação viral (LANNA, 1980). Paralelamente, também foram feitos controles negativos, inoculados com 200 µL de PBS e positivos utilizando-se 5 camundongos infectados com os vírus BAV e 5 com a amostra WR.

35 5.11 – Preparo do imunógeno para vacinação

Os抗igenos foram preparados a partir de 10^7 pfu previamente inativados da amostra BAV na ausência ou presença de diferentes adjuvantes para avaliação da melhor resposta e humoral do sistema imune. Para o preparo do imunógeno com o vírus inativado na ausência de adjuvantes, foi adicionado somente a suspensão viral diluída em PBS para a concentração desejada.

Para o preparo do imunógeno a base de emulsão do tipo óleo e água (O/A) foi utilizado Emulsigen® (Laboratórios MVP, Ralston, NE), que é autorizado pelo Ministério da Agricultura Americano para uso em vacinas veterinárias, para injeção intramuscular e subcutânea. A

5 fórmula utilizada foi composta (% p/p) de 5% de Rehydragel LV® (Reheis, U.S.A) - dispersão coloidal de hidróxido de alumínio, 25% de Emulsigen® (Laboratórios MVP, Ralston, NE) e 70% de suspensão viral inativada. Inicialmente, sob fluxo laminar, o Rehydragel® foi vertido em um bêquer, seguido da adição da suspensão viral inativada. Esta mistura foi mantida à temperatura ambiente (T.A.), sob agitação, a 2000 rpm utilizando o aparelho Eurostar Basic, Brasil. Após 1
10 hora, a suspensão obtida foi vertida em um bêquer contendo o Emulsigen® e a agitação foi mantida por mais 1 hora a 2000 rpm (Eurostar Basic, Brasil) à t.a. Ao término do processo, o imunógeno foi envasado e conservado a 4°C até o momento do uso.

15 Para o preparo do imunógeno a base de hidróxido de alumínio (Al(OH)_3) como adjuvante foi utilizado o Rehydragel LV® (Reheis, U.S.A) cuja fórmula (%p/p) é composta por 10% de Rehydragel® e 90% de suspensão viral inativada. Sob fluxo laminar, o Rehydragel e a suspensão viral inativada foram transferidos para um bêquer e mantidos à t.a. sob agitação a 1700 rpm (Eurostar Basic, Brasil) por 24 horas, utilizando o aparelho Eurostar Basic. O imunógeno foi envasado e conservado a 4°C até o momento do uso.

20 Para o preparo do imunógeno contendo saponina, foi feito o mesmo procedimento para o preparo do imunógeno a base de (Al(OH)_3). Posteriormente, foi adicionada uma concentração de solução de saponina contendo 0,054 g/mL à solução final e esta foi mantida em agitação a 2000 rpm (Eurostar Basic, Brasil) durante 30 minutos e armazenada a 4°C.

25 Todos os imunógenos passaram por um teste de esterilidade. Para tal, foi desenvolvido um procedimento adaptado a partir do método direto descrito no capítulo V.5.1.1 da Farmacopéia Brasileira 4ª edição (Brasil, 1988). Este método consiste na transferência asséptica do produto para meio tioglicolato fluido e meio caseína soja, seguida de incubação a 30-35°C e 20-25°C, respectivamente, por 14 dias. Foi feito o acompanhamento diário dos tubos para a observação da turbidez em caso de contaminação.

5.12 – Imunização de camundongos pelo método de primeira imunização e reforço

35 Os protocolos de imunização foram do tipo primeira imunização e reforço homólogo, ou seja, com imunizações de início e reforço da resposta imune, consistindo na administração de mesmo antígeno e dose, segundo intervalos de tempo descritos na TABELA 5. Grupos de 6 camundongos Balb/c machos com 4 semanas de idade receberam um volume máximo de

- 5 100µL contendo 10^7 pfu de BAV previamente à inativação tanto na primeira imunização quanto
na reforço. Os camundongos não receberam nenhum pré-tratamento antes das injeções e
todos os grupos receberam duas injeções por via subcutânea na ausência ou presença de
diferentes adjuvantes.
- 10 Duas semanas após a aplicação do reforço, os animais foram separados em dois grupos, 6
camundongos foram utilizados para os testes de desafio e os 6 restantes foram sacrificados
para obtenção de soro. Foram testados dois grupos, em um deles, camundongos foram
sacrificados após 3 e 5 semanas p.i. (TABELA 5A) e em outro, os animais foram sacrificados 4
15 e 6 semanas p.i. (TABELA 5B). Estes tempos de imunização foram testados para a avaliação
de qual seria o melhor tempo para o desenvolvimento de uma resposta imune mais eficiente.
Os animais sacrificados, por deslocamento da coluna cervical, foram previamente anestesiados
como descrito no item 5.3.2. O sangue dos animais foi coletado por secção do plexo braquial
em tubos estéreis contendo EDTA para evitar a coagulação e centrifugado por 15 minutos a
20 4°C, 3000 rpm (rotor H1000B - Sorvall RT6000 B) para separação do soro. Este foi aliquotado e
estocado a -20°C. As sangrias e vacinações foram realizadas segundo esquemas descritos nas
TABELAS 5A e 5B.

25

30

35

5 TABELA 5 – Cronograma de imunização e sangria de camundongos. A) Dia 0: coleta de sangue (controle negativo) e primeira imunização; dia 21: coleta de sangue e reforço; dia 35: desafio e coleta de sangue. B) Dia 0: coleta de sangue (controle negativo) e primeira imunização; dia 28: coleta de sangue e reforço; dia 42: desafio e coleta de sangue.

A	Dias	0	21	35
Coleta soro				
pré-imune		X		
Primeira				
imunização		X		
Reforço			X	
Desafio			X	X
Sacrifício				
coleta de		X		X
sangue				

B	Dias	0	28	42
Coleta soro				
pré-imune		X		
Primeira				
imunização		X		
Reforço			X	
Desafio			X	X
Sacrifício				
coleta de		X		X
sangue				

5 Grupos de 6 camundongos foram imunizados com antígeno inativado previamente titulado em
 10⁷ pfu/100 µL adicionado com Emulsigen® (grupo 1), Al(OH)₃ (grupo 2), saponina (grupo 3) ou
 na ausência de adjuvante (grupo 4) como descrito na TABELA 6. Paralelamente, foi utilizado
 10 um grupo de controle negativo do experimento, o qual foi inoculado com PBS no dia 0 e
 desafiado com PBS ou extrato celular seguindo os mesmos intervalos de tempo utilizados pelos
 outros grupos. Este extrato foi obtido a partir da multiplicação de células Vero cultivadas em 4
 15 garrafas redondas de 500mL, a 37°C, em estufa de tambor rolante. Monocamadas com 90% de
 confluência foram lavadas duas vezes com PBS e desprendidas mecanicamente das garrafas
 com o auxílio de um raspador e de Tris-HCl 10mM, pH 8,0. A suspensão obtida foi centrifugada
 por 15 minutos durante 2500 rpm (rotor H1000B – Sorvall RT6000B) a 4°C e o sedimento obtido
 15 foi armazenado a -70°C até o momento do desafio. Os grupos experimentais foram delineados
 como mostrado na TABELA 6. Os camundongos, com exceção do grupo controle negativo,
 foram desafiados com os vírus WR e ARAV em uma concentração de 10⁸ pfu/10 µL pela via de
 escarificação nas patas e pela via intranasal.

20 TABELA 6 - Grupos de camundongos para ensaios de imunização.

Inoculação com BAV	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Cont negativo	Cont positivo
Emulsigen®	X					
Al(OH) ₃		X				
Saponina			X			
Ausência de adjuvante				X		
Inoculação com PBS					X	X
Desafio com PBS					X	X
Desafio com WR	X	X	X	X		X
Desafio com ARAV	X	X	X	X		X
TOTAL	72 animais					

5.13 – Detecção de anticorpos por ELISA

25 Em cada câmara de placa de microtitulação de 96 poços (Hemobag, Brasil ou Nunc,
 Dinamarca) foram adicionados 100 ng da amostra viral inativada WR e diluídas em 100 µL de
 tampão carbonato (0,05 M, pH 9,6), sendo que as câmaras correspondentes ao branco da
 reação receberam somente o tampão carbonato. As placas foram mantidas a 4°C, por 18 horas
 para adsorção das proteínas. Em seguida, o líquido foi desprezado e às placas foi adicionado

5 PBS, contendo 0,05% de Tween 20 (tampão de lavagem). Para o bloqueio, foram utilizados
200 μ L, em cada câmara, de leite em pó desnatado diluído a 5% no tampão de lavagem. Após
incubação por 1 hora à ta, a placa foi lavada três vezes com tampão de lavagem. Em seguida,
foram adicionados 100 μ L do soro de camundongos diluídas nas proporções 1:40, 1:80, 1:160,
1:320, 1:640, 1:1280, 1:2560, 1:5120, 1:10240, 1:20480, 1: 40960, 1:81920 em solução de leite
10 em pó desnatado e 1% em PBS/Tween, sendo aplicados 100 μ L de cada diluição por poço.
Após 2 horas de incubação à T.A., cada poço foi lavado isoladamente com 200 μ L de
PBS/Tween 20. Em seguida, as placas foram incubadas com o conjugado anti-imunoglobulina
(IgG, IgM e IgA) de camundongo ligado à peroxidase de rábano silvestre (HRPO), diluído a
1:5000 em PBS 0,15M, contendo 0,05% de Tween 20, em um volume final de 100 μ L/poço.
15 Após 1 hora de incubação à T.A., cada poço foi exaustivamente lavado separadamente com
tampão de lavagem e, finalmente, foram adicionados 100 μ L/câmara de substrato para a enzima
peroxidase: OPD 0,3 mg/mL diluído em tampão 0,1M fosfato/citrato 0,1M, pH5,0 adicionado de
peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Após 10 minutos, a reação foi interrompida pela adição de 25
20 μ L/poço de ácido sulfúrico a 25%. A densidade óptica em comprimento de onda 492 nm foi
medida em leitor ELISA (AWARENESS Technology Inc, EUA). A linha de corte foi determinada
pela média mais três desvios padrões das leituras obtidas de cinco controles negativos. Os
valores das absorbâncias das amostras foram subtraídos da linha de corte. Após esta
25 subtração, todos os valores maiores que zero foram considerados positivos (KAREM et al.,
2005).

25

5.14 – Análise estatística

Buscando avaliar os resultados obtidos com as medidas das lesões nas patas de camundongos
30 infectados, foi utilizado o método de análise de variância (ANOVA). Valores de P=0,05 ou
menores foram considerados significativamente diferentes (GraphPad Prism software, versão
3.0).

35

Para analisar a correlação entre os valores de títulos virais encontrados em diferentes órgãos
de camundongos e a relevância dos títulos obtidos por ELISA foi realizado o teste T-student. A
comparação entre as porcentagens de médias de perda de peso dos diferentes grupos de
camundongos foi analisada pelo teste T-student não paramétrico (GraphPad Prism software,
versão 3.0).

5 **6- RESULTADOS**

6.1. - Multiplicação e purificação dos poxvírus em células Vero

Os estoques semente dos vírus purificados WR, LST-BUT, ARAV, BAV, GP1V, GP2V, PSTV,

10 SAV e VBH, todos previamente clonados (isolamento de placas virais), foram utilizados para infecção de 30 garrafas redondas de 500 mL, contendo monocamadas de células Vero.

O efeito citopático (ECP) produzido pelos vírus, caracterizado pela formação de placas de lise

15 na monocamada celular, além do aparecimento de alterações morfológicas, como formação

discreta de vacúolos citoplasmáticos e aglomerados celulares foram observados em torno de

48-72 horas após infecção, momento em que se observava 90% de ECP. A coleta e lise das

células infectadas e a purificação das partículas virais foram feitas e, posteriormente, as

amostras de poxvírus foram tituladas, em triplicata, em células Vero para utilização nos demais

experimentos. A média dos títulos de todos os poxvírus foram obtidos 48 horas após infecção e

20 encontram-se listados na TABELA 7. Os títulos obtidos foram maiores para a amostra LST-

BUT, com título de $6,7 \times 10^{10}$ pfu/mL e menores para a amostra PSTV, com título de $6,25 \times 10^7$

pfu/mL.

TABELA 7 – Títulos virais de amostras de *Vaccinia virus* multiplicadas em células Vero

Amostra	Título viral (pfu/mL)
LST-BUT	$6,7 \times 10^{10}$
BAV	$8,3 \times 10^9$
WR	$2,0 \times 10^9$
ARAV	$4,7 \times 10^9$
VBH	$9,7 \times 10^8$
SAV	$3,8 \times 10^8$
GP1V	$2,0 \times 10^8$
GP2V	$1,0 \times 10^8$
PSTV	$6,25 \times 10^7$



5 **6.2 – Estudo comparativo do curso de infecção e da virulência de amostras de *Vaccinia virus in vivo***

10 Após infecção dos camundongos por duas vias diferentes, a intradérmica e intranasal, os camundongos foram observados quanto aos seguintes aspectos: peso corporal, lesões na região inoculada e por todo o corpo, arqueamento de dorso, piloereção, alopecia periocular, balanopostite, reflexo, entre outros sinais clínicos.

15 **6.2.1 – Infecção intradérmica**

20 **6.2.1.1 – Curso de infecção intradérmica após inoculação por escarificação no dorso e nas patas**

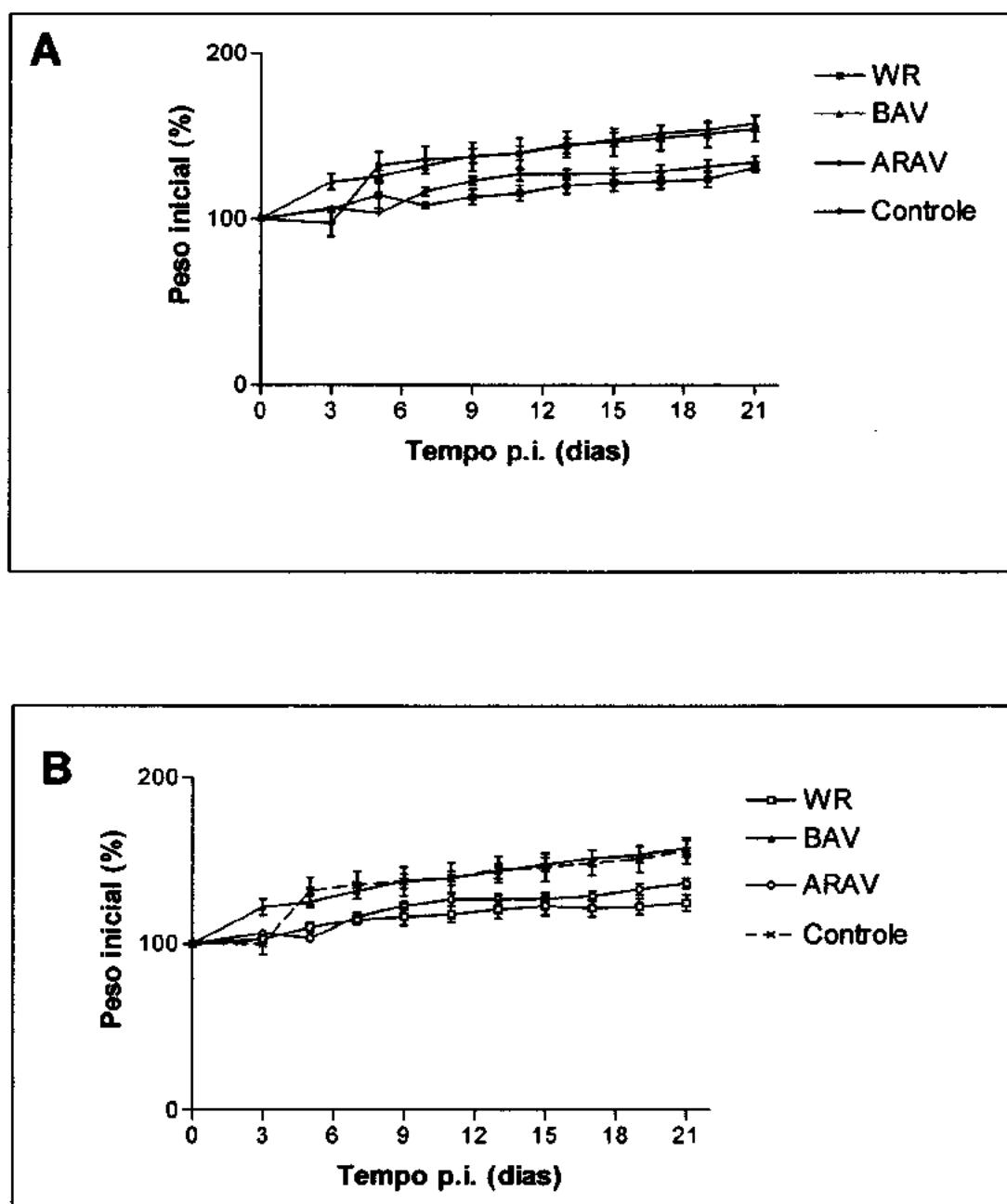
25 Camundongos infectados com 10^6 pfu/10 µL das amostras WR, BAV e ARAV tanto pela via de escarificação no dorso quanto nas patas não apresentaram perda significativa de peso corporal (teste-t Student $P \leq 0,05$) em um período de 21 d.p.i. quando comparados aos animais controles, inoculados com PBS (FIGURAS 6A e 6B).

25

30

35

40



35

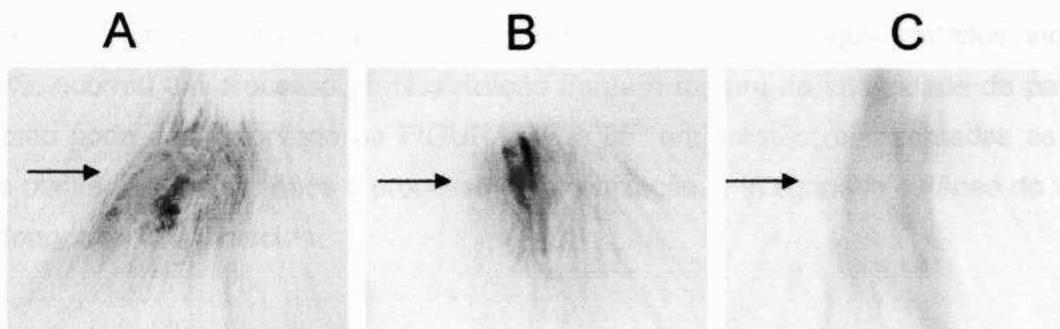
FIGURA 6 – Peso corporal dos camundongos Balb/c infectados com amostras de *Vaccinia virus* pela via intradérmica. Grupos de 6 camundongos foram infectados com 10^6 pfu/10 μ L das amostras WR, BAV e ARAV pela via de escarificação no dorso (A) ou escarificação nas patas (B). O grupo controle foi inoculado com PBS. A média da porcentagem do peso dos camundongos ($n=6$) foi obtida em comparação com o peso inicial, monitorado diariamente. A barra de erro indica o desvio padrão.

40

5 Os camundongos infectados com as amostras virais WR, BAV e ARAV apresentaram o mesmo
perfil de desenvolvimento das lesões. A FIGURA 7 representa as lesões causadas pela amostra
ARAV no dorso de camundongos infectados. No 4º d.p.i., foi detectada uma lesão de superfície
irregular e de aspecto amarelado, caracterizado como pústula (FIGURA 7A) com consequente
10 evolução para uma crosta preta no 9º d.p.i. (FIGURA 7B). A cicatrização até o desaparecimento
completo da lesão ocorreu no 13º d.p.i. Ao contrário, camundongos controles, inoculados com
PBS, mostraram uma reação normal de cicatrização frente à ruptura da integridade da pele do
dorso no 3º d.p.i., como pode ser observado na FIGURA 7C. Com o passar do tempo e
progresso da cicatrização, a integridade cutânea de todos os camundongos foi restabelecida.

15

20



25 **FIGURA 7 – Lesões no dorso de camundongos por escarificação.** Desenvolvimento das lesões no
dorso de camundongos Balb/c infectados com 10^6 pfu/ 10 µL de ARAV por escarificação no dorso. **(A)**
Pústula no 4º d.p.i. **(B)** Crosta no 9º d.p.i. **(C)** Ausência de lesões no dorso de camundongos controles,
inoculados com PBS no 3º d.p.i. Setas pretas indicam o local de inoculação.

30

5 Quando foi utilizada a via intradérmica por escarificação nas patas, o curso de infecção dos camundongos infectados com as três amostras de VACV WR, BAV e ARAV também foi similar e lesões típicas de poxvírus foram observadas. A espessura e tamanho das lesões das patas direitas, inoculadas, foram medidas diariamente e comparadas com as medidas das patas esquerdas, que serviram como controles, com espessura de 0,2 cm. A FIGURA 8 representa
10 lesões causadas pela amostra ARAV. No 1º d.p.i. as patas não apresentaram nenhuma lesão aparente, entretanto a partir do 2º d.p.i. o dorso das patas apresentou-se edemaciado, com aumento de volume em relação ao membro normal (FIGURA 8A). Esse aspecto permaneceu até o 4º d.p.i., porém com o surgimento de vesículas envolvidas por lesões ulcerativas na face plantar da pata, com medidas de espessuras que variaram de 0,3 a 0,7 cm. Entre os dias 10 e
15 12 p.i., o inchaço diminuiu e as vesículas continuaram (FIGURA 8B) com posterior evolução para pústulas medindo de 0,25 a 0,61 cm, caracterizadas pela presença de pus, a partir do 13º d.p.i., permanecendo até o 17º d.p.i., como pode ser observado na FIGURA 8C. As crostas apareceram no 18º d.p.i., e as patas apresentavam espessuras medindo de 0,24 a 0,45 cm (FIGURA 8D), com completa cicatrização no 20º d.p.i. Em camundongos controles, inoculados
20 com PBS, ocorreu um processo de cicatrização frente à ruptura da integridade da pata no 3º d.p.i. como pode ser observado na FIGURA 8E e 8F, onde estão representadas as regiões dorsal e plantar das patas. Após o processo de cicatrização, a integridade cutânea de todos os camundongos foi restabelecida.

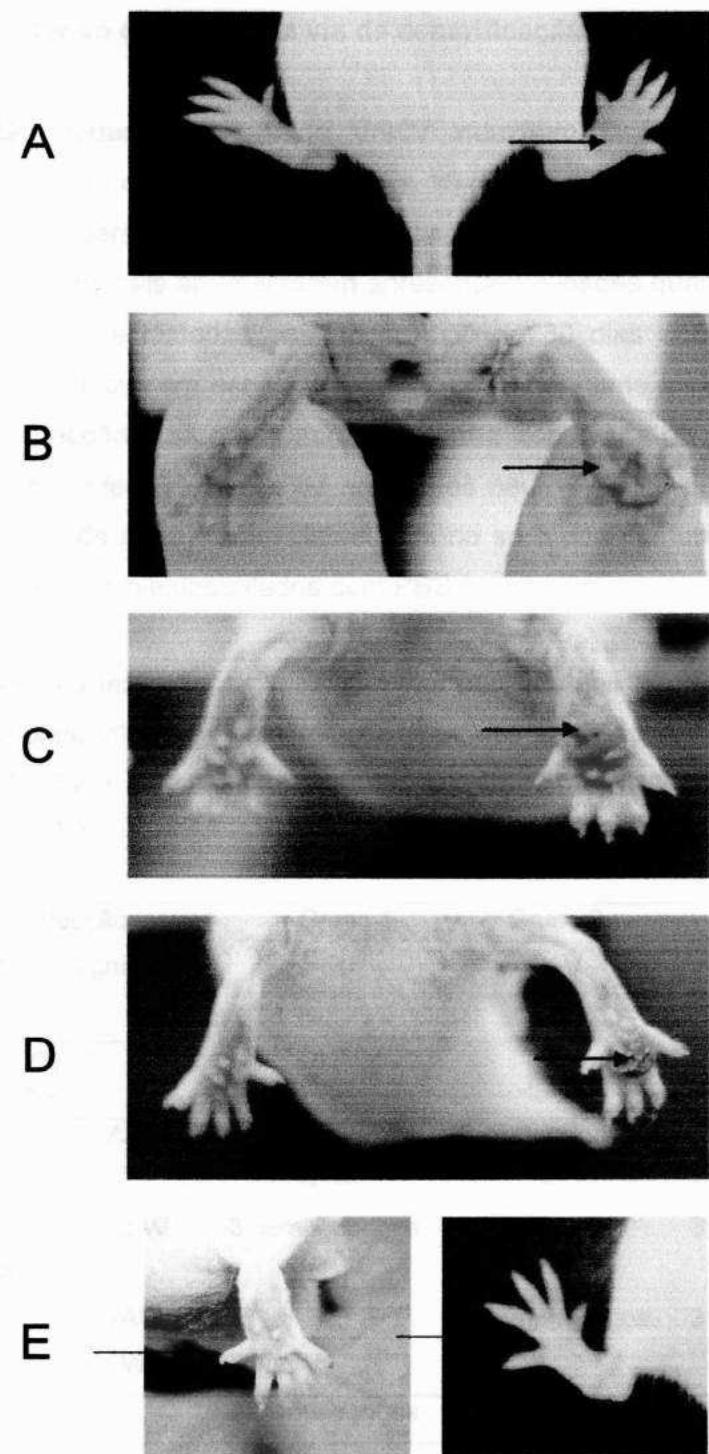


FIGURA 8 – Lesões em patas de camundongos por escarificação. Desenvolvimento das lesões nas patas de camundongos Balb/c infectados com 10^6 pfu/10 µL de ARAV. (A) Edema no dorso da pata no 2º d.p.i. (B) Vesículas no 10º d.p.i. (C) Pústula no 16º d.p.i. (D) Crosta no 18º d.p.i. (E) e (F) Região dorsal e plantar de camundongos controles, inoculados com PBS no 3º d.p.i. Setas pretas indicam o local de inoculação.

5 **6.2.1.2 - Teste de proteção cruzada pela via de escarificação nas patas**

Na primeira infecção, todas amostras de VACV induziram lesões típicas nas patas de camundongos com duração de, aproximadamente, 15 dias, com o desenvolvimento de edema com posterior evolução para vesículas, pústulas e crostas, como mostrado na FIGURA 8.

10 Entretanto, nenhum dos animais apresentaram lesões quando foram reinfetados com as diferentes amostras testadas em um período de 30 dias após a primeira infecção (TABELA 8). As patas mantiveram espessura de 0,2 cm e nenhuma lesão foi observada como aquelas da primeira infecção e as patas apresentaram a espessura daquelas inoculadas com PBS. Após 30 dias da reinfecção, títulos de anticorpos neutralizantes de 1:160 (160 unidades neutralizantes para 1mL de meio) foram detectados no soro dos camundongos, mas não nos camundongos do grupo controle, inoculados com PBS.

15

TABELA 8 – Estratégia de infecção de *Vaccinia virus* utilizada nos testes de proteção cruzada.
 Camundongos Balb/c foram infectados com 10^6 pfu/10 µL das amostras WR, BAV e ARAV pela via escarificação nas patas. Após 30 d.p.i., os mesmos animais foram reinfetados pela mesma via com diferentes amostras de VACV.

Primeira infecção 9 camundongos/grupo	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	
	WR (L +)	BAV (L +)	ARAV (L +)	
	↓	↓	↓	↓
Reinfecção	ARAV BAV VACV- WR	3 camundongos (L -) 3 camundongos (L -) -	3 camundongos (L -) -	- 3 camundongos (L -) 3 camundongos (L -)
Total		9 camundongos	9 camundongos	9 camundongos

(L +) presença de lesões após infecção

25 (L -) ausência de lesões após infecção

5 **6.2.2 – Infecção intranasal**

Buscando, ainda, um modelo para estudo comparativo de virulência entre as amostras de VACV, foi feita a infecção pela via intranasal. Inicialmente, foram utilizadas as mesmas amostras virais utilizadas nos experimentos pelas vias de escarificação no dorso e patas: WR, BAV e ARAV, utilizando 10^8 pfu/ 10 µL. A partir dos resultados obtidos, foi iniciado um estudo comparativo de virulência que incluiu mais 6 amostras de VACV: LST-BUT, GP1V, GP2V, VBH, SAV e PSTV, sendo que 6 animais foram utilizados para os experimentos com cada amostra viral. Os animais foram sacrificados para a coleta de órgãos destinados aos estudos de detecção e quantificação viral e análises histológicas/imunohistoquímicas.

10 **6.2.2.1 – Sinais clínicos em camundongos Balb/c infectados com amostras de *Vaccinia virus***

A infecção intranasal induziu o aparecimento de sinais clínicos tais como mais de 25% de perda
20 de peso, piloereção e arqueamento de dorso em todos os animais infectados com as amostras VBH (FIGURA 9A), WR, BAV, SAV e GP1V com início entre os dias 2 e 3 d.p.i. Metade dos camundongos infectados com as amostras BAV (FIGURA 9B) e SAV apresentou alopecia periocular e olhos fechados com inflamação, provavelmente atingindo a cegueira no 4º d.p.i. Camundongos infectados com GP1V apresentaram pénis com balanopostite no 3º d.p.i.
25 (FIGURA 9C). Nenhum sinal clínico foi observado em camundongos infectados com LST-BUT, PSTV, ARAV e GP2V até o 10º d.p.i. quando comparados aos animais controles, inoculados com PBS.

30

35

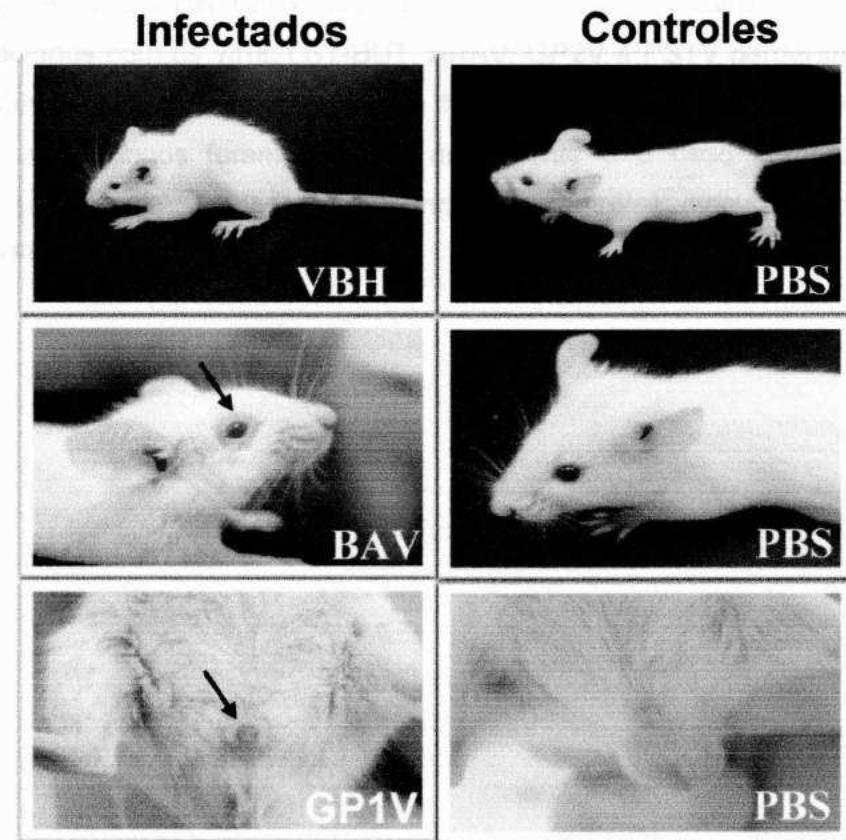


FIGURA 9 – Sinais clínicos apresentados por camundongos Balb/c infectados com *Vaccinia virus* pela via intranasal. Camundongos foram infectados com 10^6 pfu/10 µL pela via intranasal e sinais clínicos foram observados com 3 ou 4 d.p.i. **(A)** Arqueamento de dorso e pilo-ereção em camundongos infectados com VBH no 3º d.p.i. **(B)** Alopecia periocular causada pela infecção com BAV no 4º d.p.i. **(C)** Pênis com balanopostite no 3º d.p.i. em camundongos infectados com GP1V. Nenhum sinal clínico foi observado em camundongos do grupo controle, inoculados com PBS. Setas indicam os locais de inflamação.

5 A média do peso dos camundongos infectados pela via intranasal está representada na
FIGURA 10. Camundongos infectados com as amostras virais WR, BAV, GP1V, VBH e SAV
apresentaram perda de 25% do peso corporal entre de 4 a 6 d.p.i. e foram, então, sacrificados.
A amostra WR induziu perda de 25% do peso corporal dos camundongos no 5º d.p.i., enquanto
aqueles infectados com BAV e SAV atingiram o mesmo peso crítico no 4º d.p.i. e os infectados
10 com as amostras GP1V e VBH no 3º d.p.i (FIGURA 10A). Por outro lado, nenhum dos
camundongos infectados com os vírus LST-BUT, ARAV, GP2V e PSTV perderam peso e nem
apresentaram algum sinal clínico evidente durante 10 dias, de acompanhamento, quando foram
sacrificados. Os camundongos foram pesados diariamente e o peso corporal não diferiu
15 significativamente quando comparados aos camundongos controles, inoculados com PBS (test
t-student $P \leq 0,05$) (FIGURA 10B).

20

25

30

35

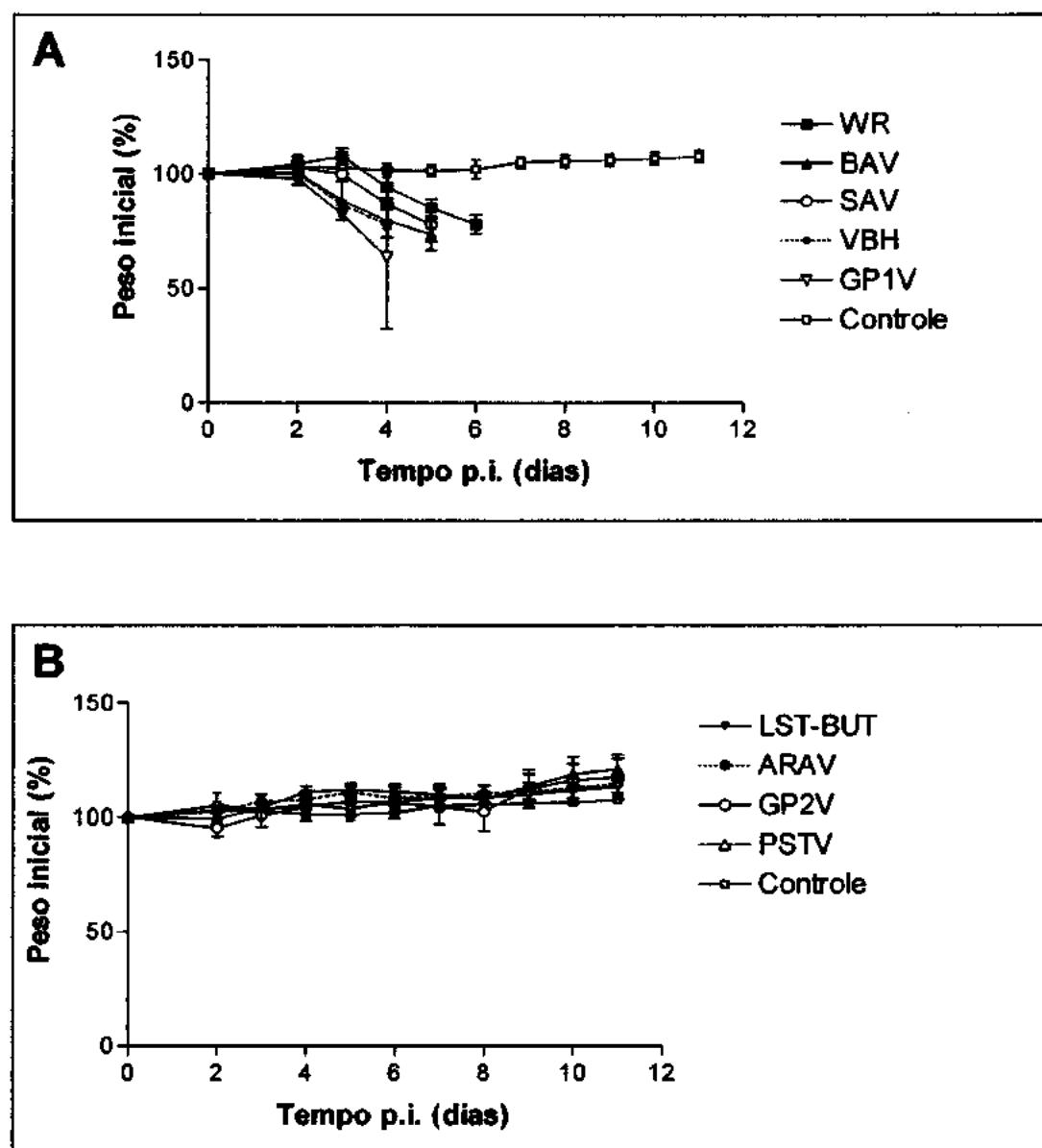


FIGURA 10 – Peso corporal de camundongos infectados pela via intranasal com amostras de

35 **Vaccinia virus.** Camundongos ($n=6$) foram infectados com 10^8 pfu/ $10\mu\text{L}$ utilizando amostras virais de VACV (A) WR, BAV, SAV, VBH, GP1V (B) LST-BUT, ARAV, GP2V, PSTV. A média da porcentagem do peso de cada grupo foi obtida em comparação com o peso inicial, monitorado diariamente, e aqueles que perderam 25% do peso corporal foram sacrificados. O peso dos camundongos pertencentes ao grupo controle, inoculado com PBS, também foi monitorado diariamente. A barra de erro indica o desvio padrão.

40 Variações estatísticas foram calculadas utilizando o test-t student ($P \leq 0,05$).

5 **6.2.3 – Título de vírus em órgãos de camundongos inoculados pela via intranasal com amostras de *Vaccinia virus***

6.2.3.1 – Amostras LST-BUT, ARAV, GP2V e PSTV

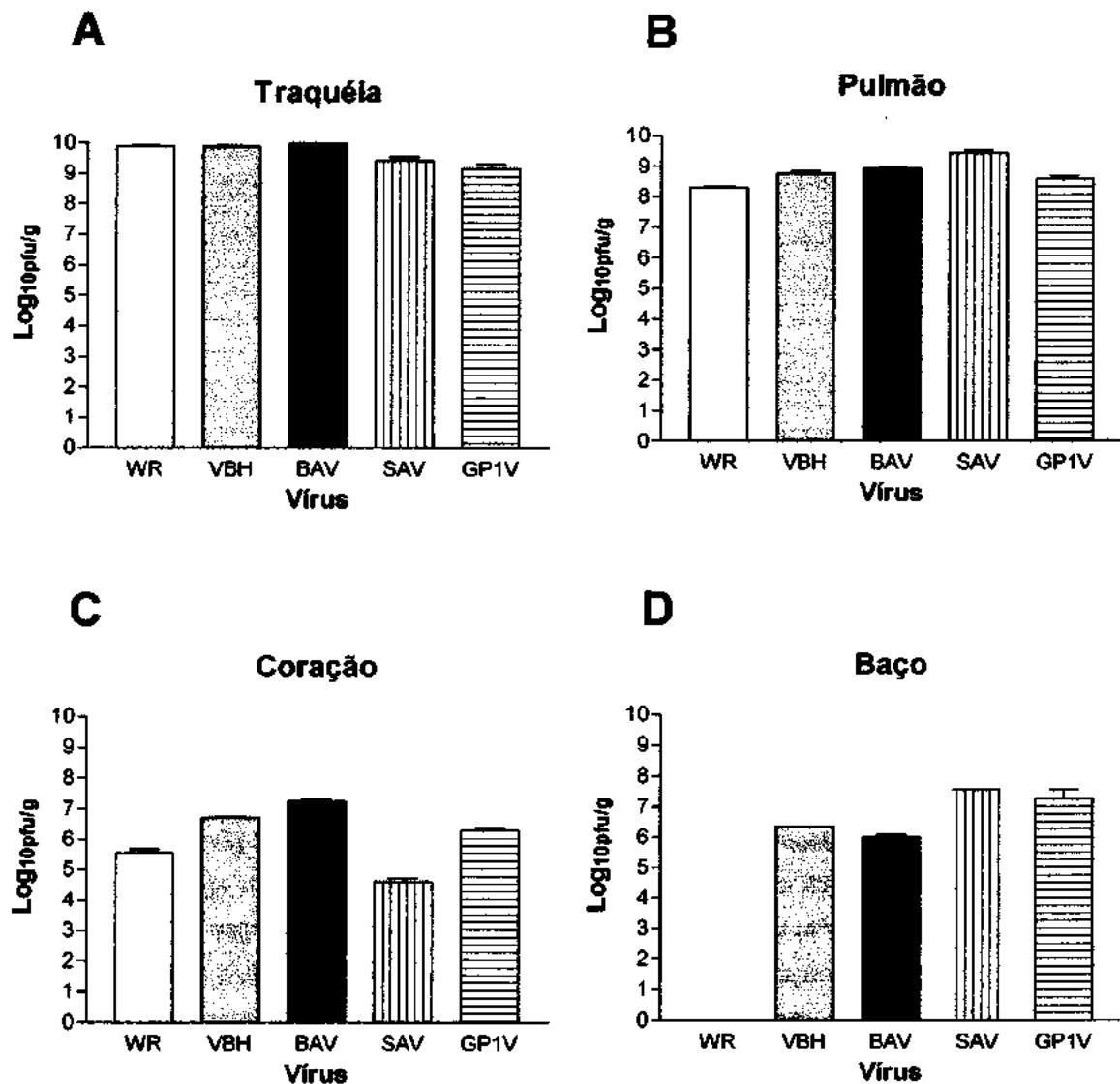
- 10 Os órgãos coletados de camundongos infectados pela via intranasal com os vírus LST-BUT, ARAV, GP2V e PSTV foram titulados no 10º d.p.i. e não foram detectados vírus nos órgãos testados: baço, fígado, pulmão, cérebro, coração e rins. Os camundongos foram sacrificados no 10º d.p.i. e anticorpos neutralizantes com títulos de 1:40 (40 unidades neutralizantes para 1mL de meio) foram detectados nos animais infectados com ARAV e PSTV e 1:20 (unidades neutralizantes para 1mL de meio) nos animais infectados com LST-BUT e GP2V. Não foram detectados anticorpos neutralizantes em camundongos do grupo controle, inoculado com PBS.
- 15

6.2.3.2 – Amostras WR, VBH, BAV, SAV e GP1V

- 20 Vírus foram detectados pelo método de unidades formadoras de placas em todos os órgãos estudados, como fígado, baço, pulmões, coração, cérebro e rins em camundongos infectados com as amostras virais WR, BAV, SAV, GP1V e VBH no dia em que apresentaram 25% de perda do peso corporal (FIGURA 11), com exceção dos baços coletados de camundongos infectados com a amostra WR. Os maiores títulos obtidos foram detectados na traquéia, variando de 10^6 pfu/g para animais infectados com VBH e 10^8 pfu/g em camundongos infectados com WR, SAV, GP1V e BAV (FIGURA 11A) e nos pulmões, com título de 10^8 pfu/g em camundongos infectados com SAV e 10^8 pfu/g em camundongos infectados com as outras amostras (FIGURA 11B). Em seguida, o órgão em que foram detectados os maiores títulos virais foi o coração, com o título de 10^5 pfu/g em camundongos infectados com WR, 10^8 pfu/g em camundongos infectados com GP1V, 10^7 pfu/g em camundongos infectados com VBH e BAV e 10^8 pfu/g em camundongos infectados com SAV (FIGURA 11C). No baço, foram detectados 10^6 pfu/g em camundongos infectados com VBH e BAV e 10^7 pfu/g para camundongos infectados com as amostras virais SAV e GP1V (FIGURA 11D). No cérebro, foram detectados 10^5 pfu/g em camundongos infectados com a amostra WR, 10^3 pfu/g em camundongos infectados com SAV e 10^4 pfu/g em camundongos infectados com as outras amostras virais (FIGURA 11E). Nos rins, foram detectados títulos virais de 10^5 pfu/g em camundongos infectados com SAV e 10^4 pfu/g para as outras amostras virais (FIGURA 11F). No fígado, foram obtidos títulos de 10^3 pfu/g em camundongos infectados com WR e VBH e 10^4
- 25
- 30
- 35

5 pfu/g para camundongos infectados com o restante das amostras (FIGURA 11G). Entretanto, quando foi feita a PCR semi-nested para o gene *vif* DNA viral foi detectado neste órgão (FIGURA 12). Os camundongos foram sacrificados em tempos iniciais de infecção, que variaram de 3 a 5 d.p.i., não sendo possível detectar anticorpos neutralizantes no soro.

10 Figura 11



5

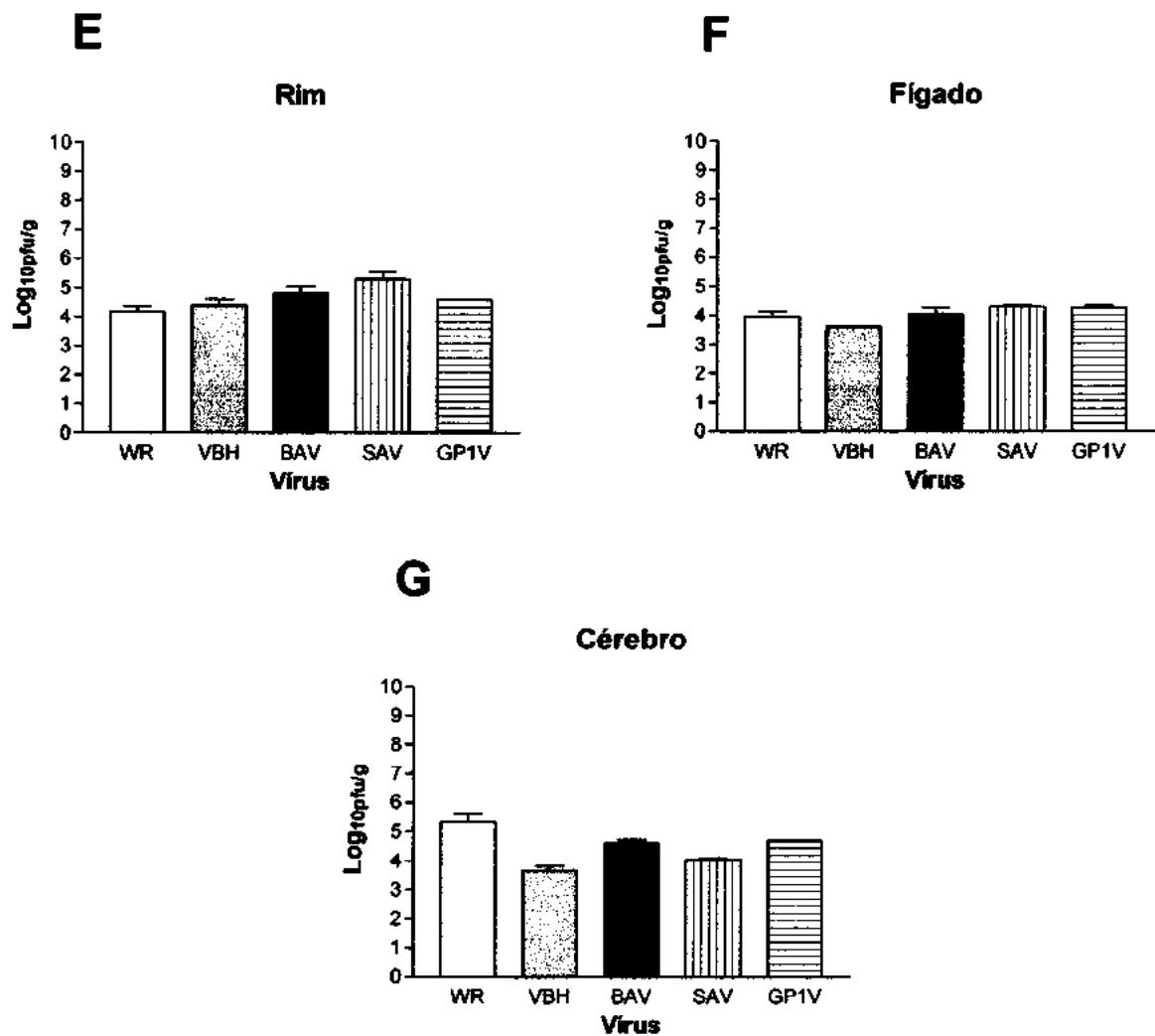


FIGURA 11 – Títulos virais de amostras de *Vaccinia virus* em órgãos de camundongos infectados.

- 10 Camundongos ($n=3$) foram infectados com 10^6 pfu/ 10 μ L com amostras de VACV e os órgãos foram coletados e a carga viral titulada quando os camundongos perderam 25% do peso corporal para posterior titulação viral nos seguintes dias WR (5º d.p.i.), BAV (4º d.p.i.), SAV (4º d.p.i.), GP1V (3º d.p.i.) e VBH (3º d.p.i.). Os órgãos titulados foram: A) traquéia; B) Pulmão; C) Coração; D) Baço; E) Rins; F) figado; G) cérebro. O título viral foi apresentado a partir da média obtida dos títulos de vírus nos órgãos de 3 camundongos e foi calculado como pfu/g de tecido.
- 15

20

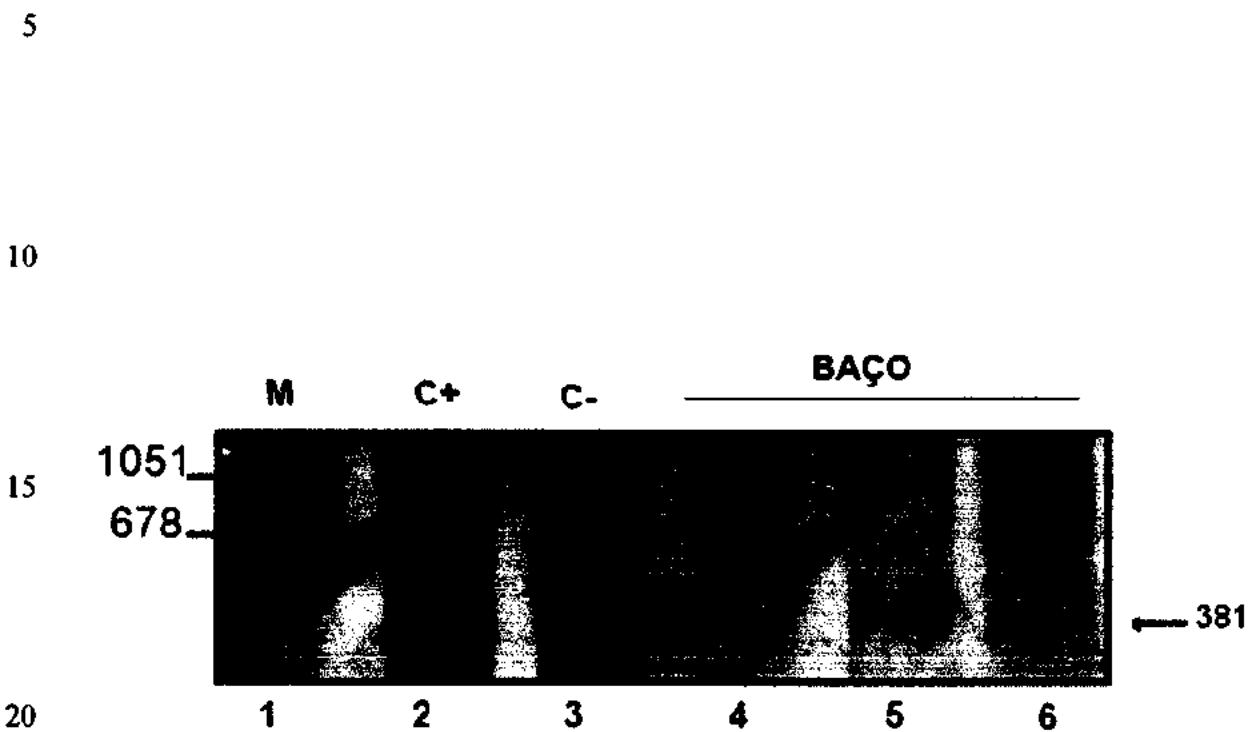


FIGURA 12 – Detecção de DNA viral no baço de camundongos Balb/c infectados com 10^6 pfu de WR. Os órgãos foram processados e submetidos à PCR semi-nested para o gene vgf. Canaleta 1: padrão de tamanho molecular; Canaleta 2: Controle positivo (WR); Canaleta 3: controle negativo; Canaletas 4, 5, 6: baços de camundongos infectados com WR.

5 **6.2.4 – Cinética de títulos virais no pulmão**

Devido ao fato de camundongos infectados com as amostras virais LST-BUT, ARAV, GP2V e PSTV não apresentarem perda de peso corporal tampouco vírus nos pulmões no 10º d.p.i. uma cinética de titulação viral nos pulmões pelo método de pfu foi feita nos dias 1, 3 e 5 p.i.,
10 utilizando 3 camundongos por dia. Mesmo nos dias iniciais de infecção, não foram detectadas partículas infecciosas nos pulmões de camundongos infectados com estas amostras. O título viral nos pulmões de camundongos infectados com as amostras WR, BAV, SAV, GP1V e VBH também foi analisado (FIGURA 13). Partículas infecciosas foram detectadas nos pulmões em todos os dias testados em camundongos infectados com as amostras WR e BAV. Títulos virais
15 nos pulmões de camundongos infectados com a amostra WR foram menores no 1º e 3º d.p.i. (5×10^7 pfu/g) aumentando para 10^8 pfu/g no 5º d.p.i. Nos pulmões de camundongos infectados com a amostra BAV, os títulos virais foram menores no 1º d.p.i. (10^8 pfu/g), aumentando para 10^9 pfu/g no 3º d.p.i e diminuindo para 10^8 pfu/g no 5º d.p.i. Pulmões de camundongos infectados com as amostras virais VBH, GP1V e SAV apresentaram vírus somente nos dias 3 e
20 5 após infecção. Nos pulmões de camundongos infectados com VBH, os títulos virais foram de 10^8 pfu no 3º d.p.i. e de 10^7 pfu no 5º d.p.i. Ao contrário dos camundongos infectados com VBH, os pulmões de camundongos infectados com GP1V e SAV apresentaram um maior título viral no 5º d.p.i. Os títulos virais nos pulmões de camundongos infectados com a amostra GP1V diminuíram de 10^8 pfu/g no 3º d.p.i. para 10^7 pfu no 5º d.p.i. e em relação à amostra SAV, de
25 10^9 para 10^8 pfu/g nos dias 3 e 5, respectivamente.

30

35

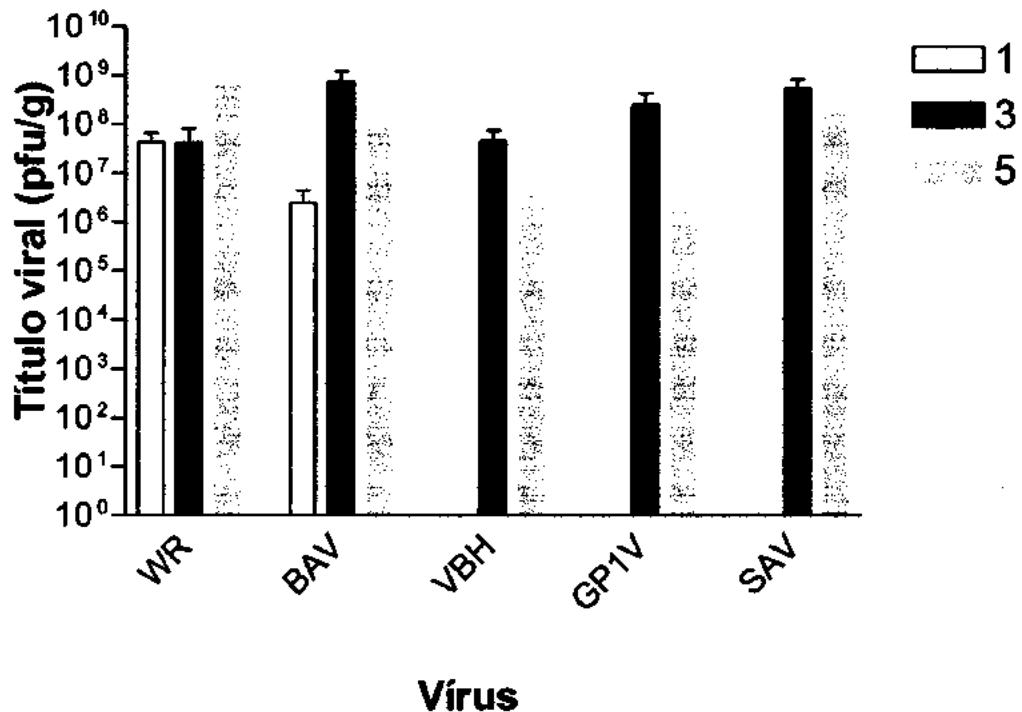


Figura 13 – Cinética de título viral em pulmões de camundongos infectados com amostras de *Vaccinia virus*. Três camundongos foram infectados pela via intranasal com 10^6 pfu/10 µL para cada uma das amostras estudadas: WR, BAV, VBH, GP1V e SAV. Os camundongos foram sacrificados nos dias 1, 3 e 5 após infecção para a coleta dos pulmões. Os títulos virais foram calculados como pfu/g de tecido. As barras de erro indicam o desvio padrão.

5 **6.2.5 - Taxa de sobrevivência e dose letal de 50% (LD_{50})**

Após a compreensão da cinética de titulação viral e das amostras virais que causam ou não, perda de peso em camundongos, foi feita uma análise de sobrevivência em camundongos infectados com 10^6 pfu de amostras de VACV (FIGURA 14). Cem por cento dos camundongos 10 infectados com BAV, GP2V, LST-BUT, ARAV e PSTV bem como os animais controles, sobreviveram. Apesar dos camundongos infectados com BAV perderem 25% do peso corporal, eles o recuperaram. Todos os camundongos infectados com WR e VBH morreram no sexto d.p.i. e oitavo d.p.i., respectivamente; 50% dos camundongos infectados com GP1V morreram no quarto d.p.i.; 50% dos camundongos infectados com SAV morreram a partir do sexto d.p.i..

15

A determinação da dose letal de 50% (TABELA 9), utilizando concentrações virais que variaram entre 10^3 e 10^8 pfu/camundongo, mostrou que a LD_{50} de camundongos infectados com VBH foi a menor, de 5×10^3 pfu. A segunda dose letal foi observada para camundongos infectados com WR, com LD_{50} de 10^4 pfu e, posteriormente, para camundongos infectados com SAV e GP1V, 20 que apresentaram LD_{50} de 10^8 pfu. Por último, a infecção com 5×10^7 pfu da amostra viral BAV causou óbito em 50% dos camundongos.

25

30

35

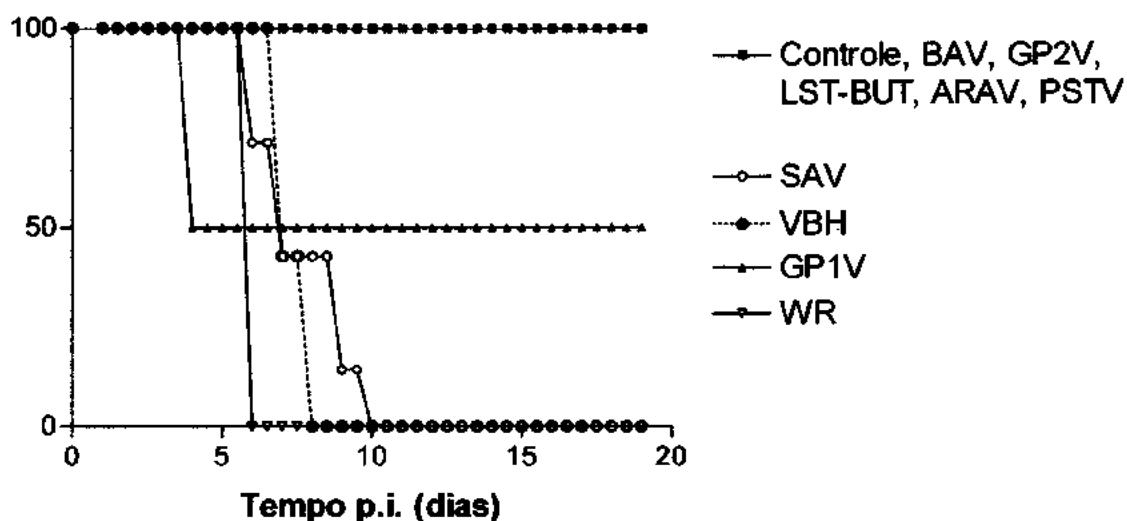
5

10

15

20

Sobrevivência (%)



25

Figura 14 – Curva de sobrevivência de camundongos infectados com 10⁸ pfu de amostras de *Vaccinia virus*. Grupos de 7 camundongos Balb/c foram infectados pela via intranasal com as amostras BAV, GP2V, LST-BUT, ARAV, PSTV, SAV, VBH, GP1V e WR. Camundongos do grupo controle foram inoculados com PBS. Os camundongos foram monitorados diariamente durante 20 dias após infecção.

30

TABELA 9 – Dose letal de 50% (LD₅₀) de camundongos infectados com amostras de *Vaccinia virus*. Grupos de 7 camundongos Balb/c foram infectados pela via intranasal com doses que variaram de 10³ a 10⁸ pfu das amostras VBH, WR, GP1V, SAV e BAV. Os camundongos foram acompanhados durante 20 dias ou até sua morte.

Vírus	LD ₅₀ (pfu)
VBH	5x10 ³
WR	10 ⁴
GP1V	10 ⁶
SAV	10 ⁶
BAV	5x10 ⁷

35

5 **6.2.6 – Histopatologia e imunohistoquímica**

Em um estudo preliminar, camundongos foram infectados com 10^6 pfu das diferentes amostras de VACV pela via intranasal. Estes foram sacrificados após perderem 25% do peso corporal ou no 10º d.p.i., para as amostras que não causaram perda de peso corporal nos camundongos.

10 Dentre os órgãos coletados que foram baço, rins, pulmões, cérebro, coração e fígado, o órgão que apresentou maiores alterações histopatológicas foi o pulmão. Todos os camundongos infectados com as diferentes amostras de VACV utilizadas neste estudo apresentaram algum grau de pneumonia, mesmo aqueles em que não foram detectados vírus nos pulmões pelo método de pfu. Por exemplo, no 10º d.p.i., camundongos infectados com as amostras ARAV, 15 GP2V e PSTV, apesar de não apresentarem nenhum sinal clínico, tiveram pneumonia intersticial leve, com a presença de aumento da espessura dos septos inter-alveolares devido ao intenso infiltrado de células inflamatórias mononucleares e também apresentaram edema, caracterizado por material eosinófilo no parênquima (FIGURA 15). Seções histopatológicas também foram obtidas de pulmões de camundongos controles, inoculados com PBS (FIGURA 20 15).

25

30

35

5

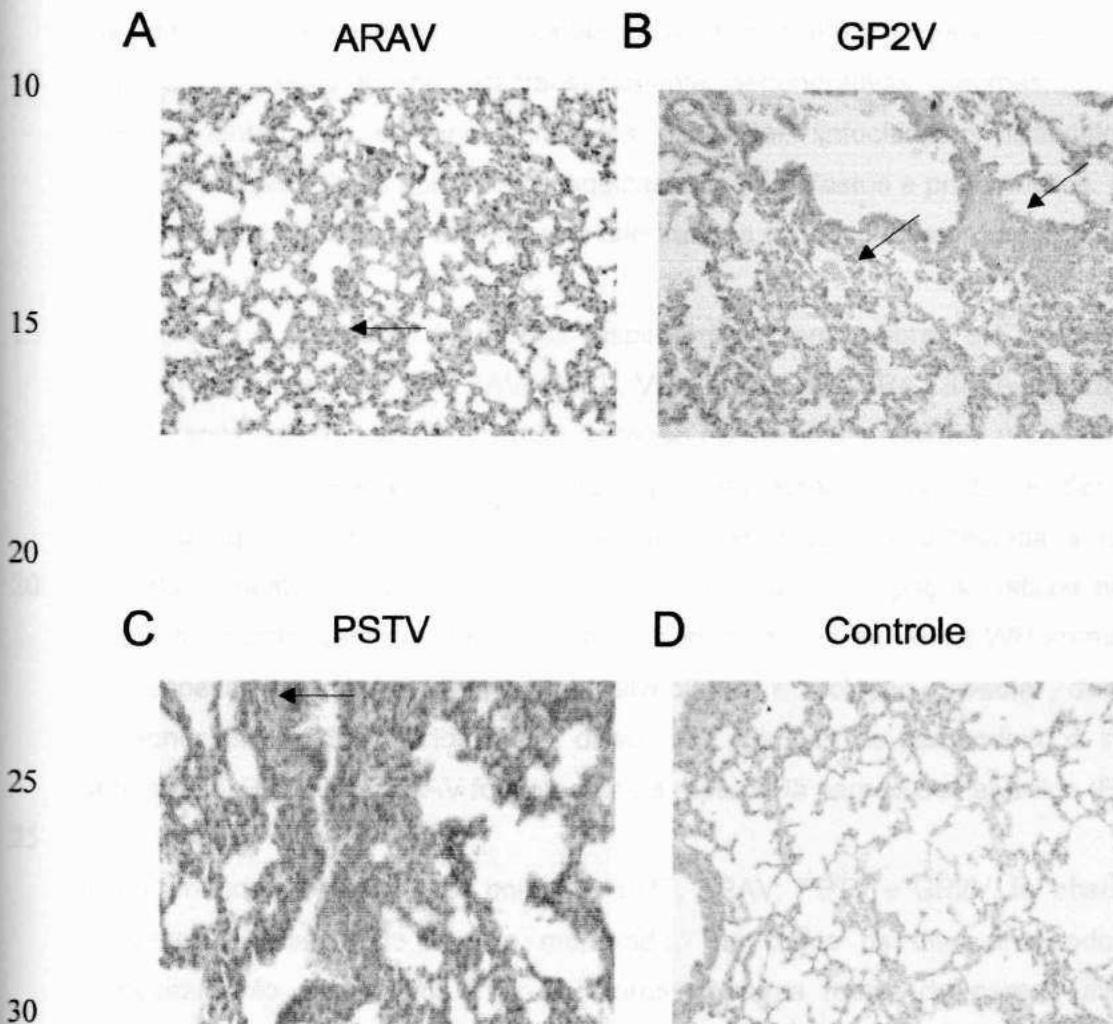


FIGURA 15 – Seções histológicas de pulmões de camundongos infectados com 10^6 pfu de *Vaccinia virus*, coletados no 10º d.p.i. A,B,C: Pulmões de camundongos infectados com ARAV, GP2V e PSTV apresentam espessamento dos septos inter-alveolares devido ao infiltrado de células inflamatórias mononucleares (setas). Pode ser notada a presença de edema no parênquima. D: Corte histológico de pulmão de camundongo Balb/c controle, inoculado com PBS. Aumento: 35X.

40

- 5 A histopatologia das lesões no trato respiratório inferior foi similar entre os animais inoculados com WR, BAV, GP1V, VBH e SAV (FIGURA 16A), com a presença de pneumonia grave. Os pulmões de camundongos inoculados com as amostras LST-BUT, ARAV, GP2V e PSTV apresentaram pulmões com pneumonia que variou de leve a moderada (FIGURA 16B). Todos os camundongos desenvolveram pneumonia intersticial e bronquiolite, sendo que as lesões de
10 ambos os grupos foram caracteristicamente degenerativas, necrosantes, hemorrágicas e, predominantemente, contendo infiltrados intersticiais linfocíticos e histiocíticos. Ocorreu uma hiperplasia das células epiteliais brônquicas, dos fibroblastos e pneumócitos. Embora ambos os grupos tenham lesões similares, estas diferiram na distribuição e progressão (FIGURA 16A).
- 15 A extensão e gravidade das lesões respiratórias foram maiores em camundongos infectados com as amostras virais WR, BAV, GP1V, VBH e SAV (FIGURA 16A) e diferiram dependendo do tempo após infecção, com evolução da lesão de grave a moderada no dia 1 p.i., moderada no dia 3 p.i. e moderada a leve no dia 5 p.i. Não foram detectadas lesões nos pulmões de camundongos do grupo controle, inoculado com PBS. Foi detectada a ruptura da parede
20 alveolar e destruição dos bronquíolos com formação de espaços císticos nos pulmões. Mais especificamente, camundongos infectados com as amostras VBH e WR apresentaram aumento no espessamento dos septos inter-alveolares e colapso alveolar devido a infiltrados mononucleares inflamatórios. Além disso, nos pulmões de camundongos infectados com as amostras GP1V, SAV e BAV foi detectada a ruptura da parede dos alvéolos (FIGURA 16A).
- 25 Em camundongos infectados com LST-BUT, ARAV, PSTV e GP2V, foi observada pneumonia intersticial variando de leve a moderada. Em todos os dias analisados, foi observado espessamento dos septos inter-alveolares, rupturas focais da parede alveolar, congestão vascular e hemorragia focal. Nenhuma lesão foi detectada em pulmões de camundongos controles, inoculados com PBS (FIGURA 16B).
- 30 As análises de imunohistoquímica mostraram a positividade para o anticorpo anti-H3L em áreas de lesões dos pulmões de camundongos infectados. A expressão de H3L foi evidente no citoplasma de células infectadas com amostras virulentas tais como WR, BAV, GP1V, SAV e VBH (FIGURA 16A) e em amostras pouco virulentas como LST-BUT, ARAV, PSTV e GP2V (FIGURA 16B). Embora células inflamatórias estivessem presentes em alguns locais do tecido dos pulmões, forte imuno-reatividade foi observada somente em áreas de intenso infiltrado inflamatório. Uma reação inespecífica na coloração em poucas células do sangue e do

5 parênquima foi detectado sem o comprometimento da interpretação dos resultados (FIGURA
16A e 16B).

10

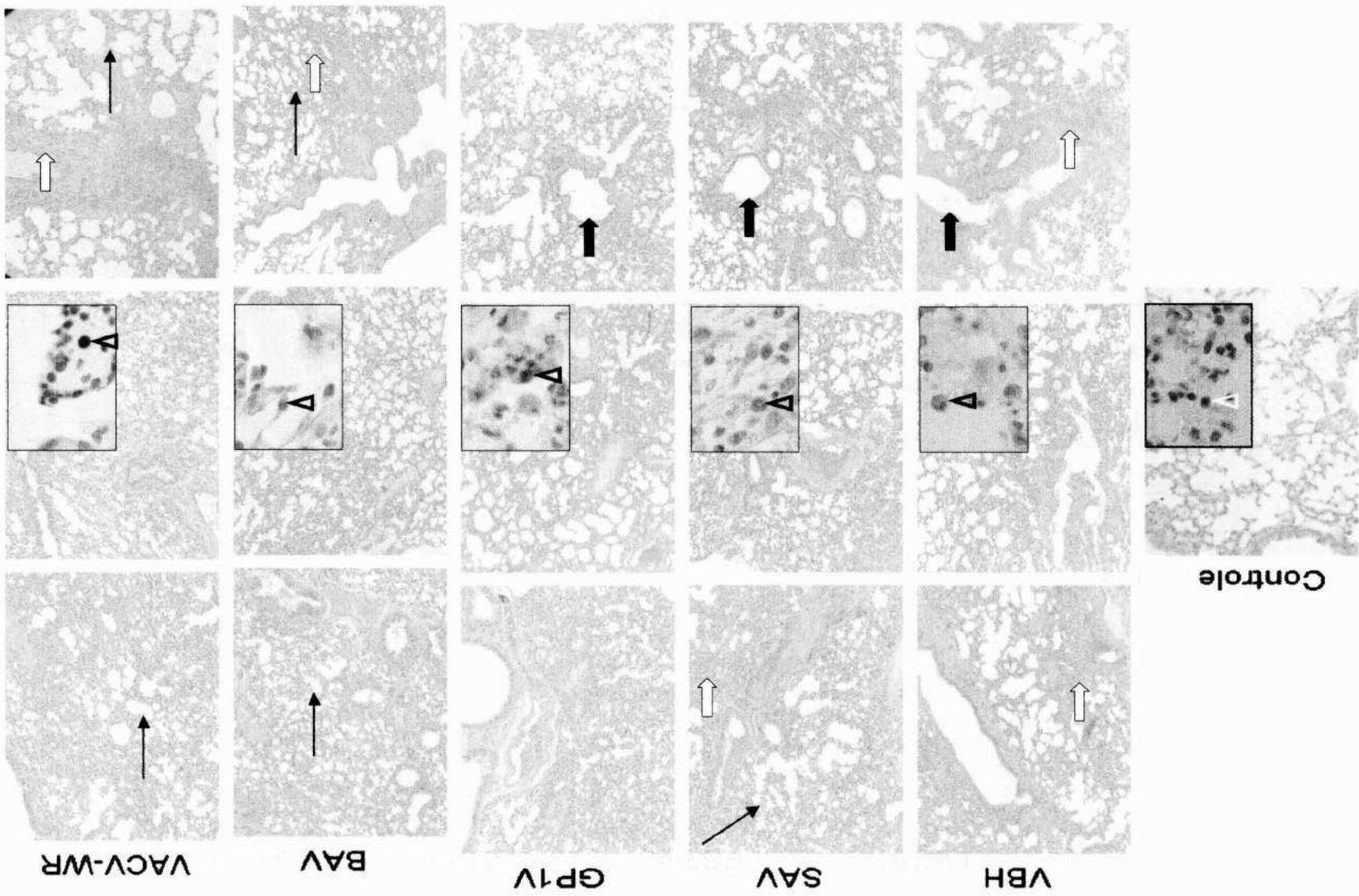
15

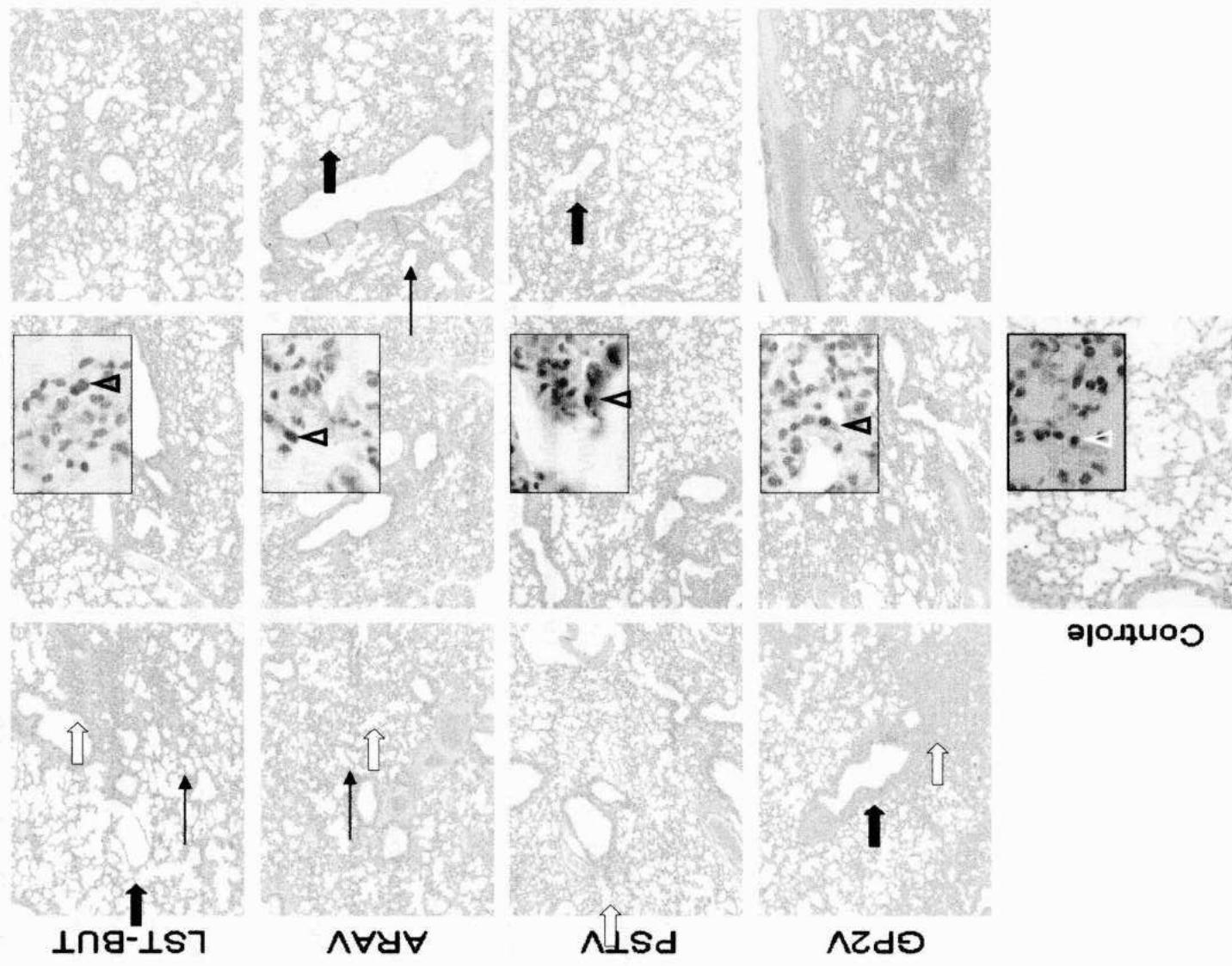
20

25

30

35





5 FIGURA 16 - Análises histológicas e imunohistoquímicas de pulmões de camundongos infectados com amostras de *Vaccinia virus*. Seções histológicas dos pulmões de camundongos infectados com 10^6 pfu das amostras virais WR, BAV, GP1V, SAV e VBH foram feitas nos dias 1, 3 e 5 p.i. (setas) e seções de imunohistoquímica foram feitas no dia 3 p.i. (setas abertas). Pneumonia intersticial foi observada nos pulmões de camundongos inoculados com todas as amostras de VACV. A) 10 Espessamento do septo inter-alveolar (setas pretas longas e finas) e colapso alveolar (setas brancas) foram observados, principalmente, nos pulmões de camundongos infectados com WR e BAV. Observa-se uma ruptura das paredes alveolares com formação de espaços císticos (setas pretas) nos pulmões de camundongos infectados com GP1V, SAV e VBH. Pode ser notada necrose da mucosa brônquica nos pulmões de camundongos infectados com VBH no 5º d.p.i. (setas pretas grossas). Evolução da lesão de 15 grave para moderada no dia 1 p.i., moderada no dia 3 p.i. e moderada a leve no dia 5 p.i. B) Os pulmões de camundongos inoculados com as amostras LST-BUT, ARAV, GP2V e PSTV apresentaram pneumonia que variou de leve a moderada. Espessamento do septo inter-alveolar (setas pretas longas e finas) foi observado, principalmente nos pulmões de camundongos inoculados com LST-BUT e ARAV. Colapso alveolar (setas brancas) e ruptura das paredes alveolares com formação de espaços císticos (setas pretas) foram observados nos pulmões de camundongos infectados com todas as amostras. A e B) Não 20 foram detectadas lesões nos pulmões de camundongos não infectados. Expressão positiva (setas pretas abertas) de anti-H3L foi evidente no citoplasma de células inflamatórias no dia 3 p.i. em camundongos infectados com as amostras WR, BAV, GP1V, SAV, VBH, LST-BUT, ARAV, GP2V e PSTV no dia p.i. Expressão negativa (setas brancas abertas) de anti-H3L no citoplasma de células inflamatórias no dia 25 p.i. em camundongos inoculados com PBS. Aumento: 35X.

30

35

40

5 **6.3 – Ensaios de eliminação e transmissão viral em camundongos infectados pela via
intranasal com a amostra WR**

6.3.1 – Eliminação de WR através da saliva, urina e fezes e detecção viral no intestino

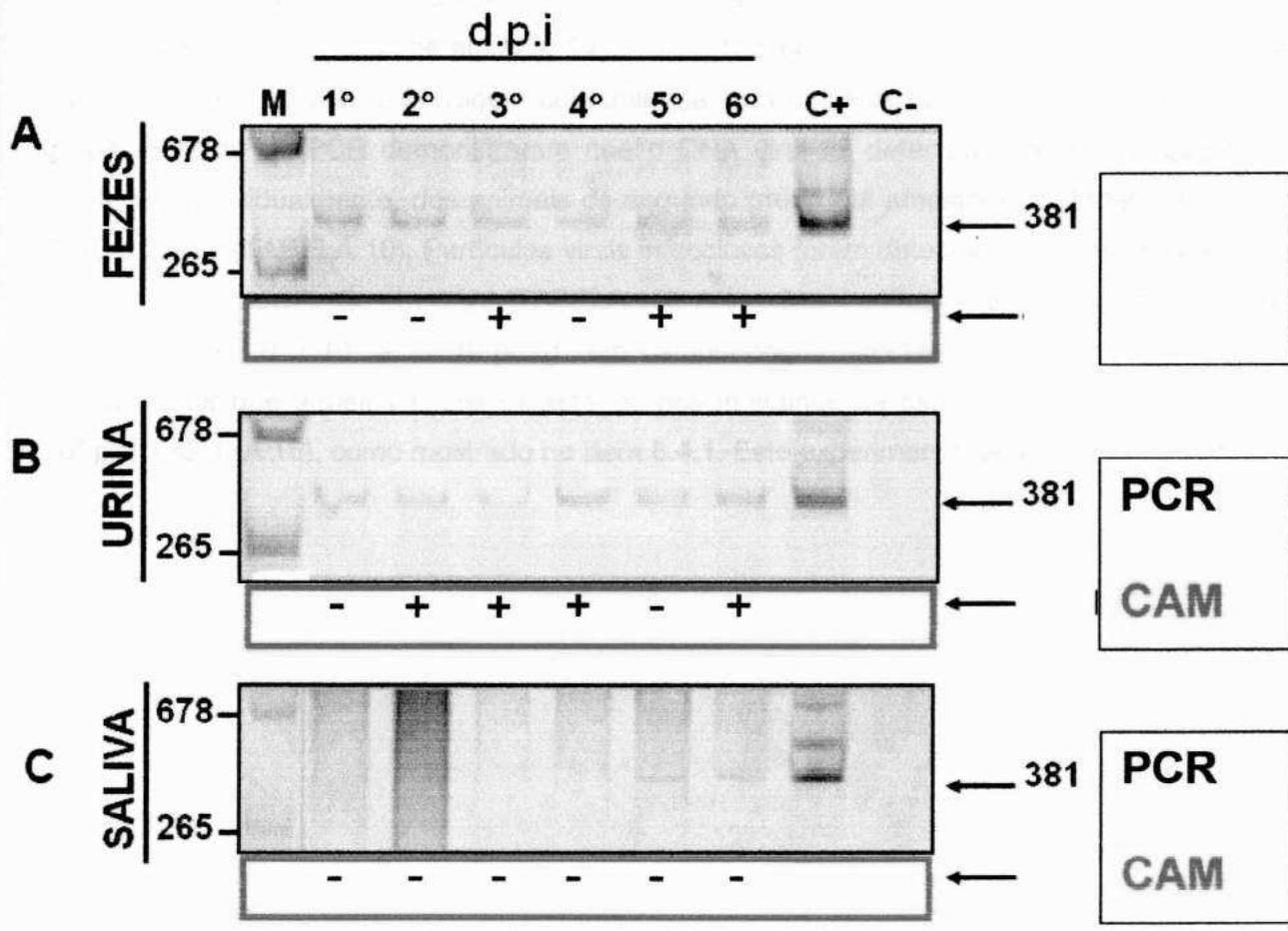
10 Camundongos Balb/c foram infectados com 10^6 pfu com a amostra viral WR pela via intranasal e excretas tais como fezes, urina e saliva foram coletados diariamente para avaliar a presença de DNA viral e partículas infecciosas. Primeiramente, foi feita uma *semi-nested* PCR para detecção de DNA viral, que gerou um amplificado de, aproximadamente, 381pb. DNA viral foi detectado de um "pool" de fezes e urina coletados a partir de 5 camundongos, diariamente, 15 durante 6 dias após infecção, visto que neste período eles vão a óbito (FIGURA 17A e 17B). Na saliva, o DNA viral foi detectado somente nos dias 5 e 6 p.i. (FIGURA 17C). Nenhum DNA viral foi detectado em excretas coletadas de camundongos inoculados com PBS.

20 Partículas infecciosas de WR foram detectadas nas fezes de camundongos infectados com WR pelo aparecimento de pock brancos típicos nas CAMs nos dias 3, 5 e 6 (FIGURA 17A). Também foram observadas lesões do tipo pock nas CAMs inoculadas com urina dos dias 2, 3, 4 e 6 (FIGURA 17B). Na saliva, não foram detectadas partículas infecciosas. Em células Vero, partículas infecciosas também foram detectadas no intestino de camundongos infectados com WR pela via intranasal com títulos que variaram de $5,2 \times 10^6$ a $6,3 \times 10^7$ pfu/g no 5º d.p.i.

25 Anticorpos neutralizantes contra OPXV com títulos de 1:80 (80 unidades neutralizantes para 1mL de meio) e 1:160 (160 unidades neutralizantes para 1mL de meio) foram detectados no soro de camundongos expostos a serragem contaminada com WR no 20º d.p.i. Anticorpos não foram detectados em camundongos não expostos às mesmas. Nenhum camundongo exposto à serragem contaminada apresentou sinais clínicos da doença.

5

10



15

20

25

30

35

40

FIGURA 17 – Detecção de DNA viral e de partículas infecciosas nas fezes, urina e saliva de camundongos Balb/c infectados com 10^6 pfu de WR. As amostras clínicas processadas foram utilizadas para a amplificação do gene *vif* através da PCR semi-nested e inoculação em CAM nas A)fezes B)urina e C)saliva. Os produtos de PCR foram fracionados em PAGE a 8% e corados pela prata. A presença de partículas viáveis em CAMs foi determinada pelo aparecimento de pocks brancos característicos em ovos embrionados de galinha com 9 dias de incubação. Na saliva dos camundongos infectados, foi detectado DNA viral nos dias 6 e 6 e não foram detectadas partículas infecciosas. C+: controle positivo (WR purificado); C-: controle negativo; M: tamanho molecular; PCR: reação em cadeia de polimerase; CAM: membrana corioalantóide.

5 **6.3.2 – Transmissão horizontal de WR através de excretas contaminadas**

Para avaliar se as fezes contaminadas com a amostra WR eram capazes de transmitir o vírus ou a doença a camundongos não infectados, o seguinte experimento foi feito: camundongos foram infectados pela via intranasal, com 10^6 pfu. No 5º d.p.i. todos os animais foram retirados
10 da gaiola e um novo grupo de animais, livres de anticorpos contra OPXV, foram colocados nas gaiolas em contato com a serragem contaminada com excretas de camundongos do primeiro grupo. Ensaios de PCR demonstraram que o DNA viral foi detectado nas fezes, que foram coletadas, individualmente, dos animais do segundo grupo em amostras coletadas nos dias 1, 5, 10 e 20 p.i. (TABELA 10). Partículas virais infecciosas foram detectadas nas fezes dos dias 1, 15 5, 10 e 20 p.i. após inoculação em CAM (TABELA 10). Além disso, o título viral no intestino no dia 20 p.i. variou de $5,0 \times 10^3$ a 2×10^4 pfu/g em camundongos infectados naturalmente com WR, sendo menor que aqueles títulos detectados nos intestinos de camundongos infectados com 10^8 pfu (FIGURA 18), como mostrado no item 6.4.1. Este experimento foi repetido três vezes.

20

25

30

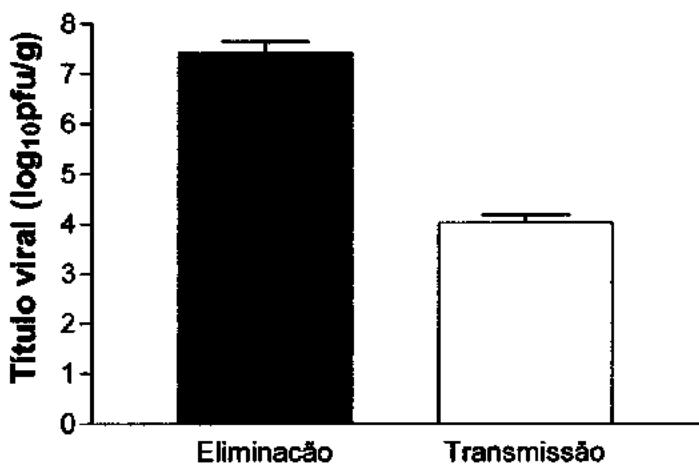
35

5

TABELA 10 – Detecção de DNA (PCR) e partículas infecciosas (CAM) em fezes de camundongos infectados naturalmente com amostras de WR (expostos a serragem contaminada)

Camundongos	WR							
	1		5		10		20	
	PCR	CAM	PCR	CAM	PCR	CAM	PCR	CAM
1	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	-	+	-	+	+
3	+	-	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	-	+	-
5	-	-	+	-	+	+	+	+

10



15

FIGURA 18 - Título viral em intestinos de camundongos Balb/c Infectados com WR. Nos experimentos de eliminação, camundongos ($n=5$) foram infectados pela via intranasal com 10^6 pfu/ $10\mu\text{L}$ e seus intestinos coletados no dia 5 d.p.i. e nos experimentos de transmissão viral, camundongos ($n=5$) foram infectados naturalmente (expostos a serragem contaminada) e intestinos coletados no dia 20 d.p.i.

20

Os títulos virais foram calculados como pfu/g de tecido. As barras de erro indicam o desvio padrão.

5 A quantificação do DNA viral através da técnica de PCR em tempo real nas fezes de camundongos infectados pela via intranasal (item 6.4.1) e daqueles infectados naturalmente não foi eficiente. Os iniciadores utilizados foram testados em uma reação na ausência das fezes, confirmando, assim, sua capacidade de detecção do material genético viral. A reação ocorreu de forma específica, conforme demonstrado pela curva de dissociação, quando foram
10 utilizadas diluições seriadas da amostra WR e a detecção ocorreu até a diluição mínima de 1 pfu. Porém, quando a amostra viral WR foi adicionada em diluições seriadas juntamente com fezes não contaminadas, a sensibilidade da técnica foi menor, com detecção de 10^3 pfu.

15 Anticorpos neutralizantes contra OPXV com títulos de 1:80 (80 unidades neutralizantes para 1mL de meio) foram detectados em dois camundongos e títulos de 1:160 (160 unidades neutralizantes para 1mL de meio) foram detectados no soro de camundongos expostos a serragem contaminada com WR no 20º d.p.i. Anticorpos não foram detectados em camundongos não expostos às mesmas. Nenhum camundongo exposto à serragem contaminada apresentou sinais clínicos da doença.
20

6.3.3 - Análises histopatológicas dos intestinos de camundongos infectados

6.3.3.1 – Animais infectados pela via intranasal

25 Análises histopatológicas revelaram lesões intestinais em camundongos Balb/c envolvendo o íleo distal e o cólon. No 5º d.p.i., lesões intestinais em camundongos infectados com WR foram caracterizadas por erosão na mucosa e infiltração por linfócitos e células plasmáticas na lámina própria, distorcendo as vilosidades, com a presença de hiperplasia linfóide proeminente nas placas de Peyer. As placas de Peyer eram envolvidas por intestino pequeno atrófico, demonstrando erosão superficial envolvidas por regeneração. A hiperplasia linfóide foi caracterizada por centros altamente germinativos e numerosos tipos de células (FIGURA 19A). Nenhuma lesão histológica foi encontrada em camundongos não infectados, inoculados com PBS.
35

5 6.3.3.2 – Animais expostos à serragem contaminada

Em camundongos naturalmente infectados com o WR, intestinos coletados no dia 20 pi, apresentaram lesões, caracteristicamente com hiperplasia linfóide nas placas de Peyer, erosão na mucosa e infiltração por linfócitos na lâmina própria (FIGURA 19B). Nenhuma lesão histológica foi encontrada em camundongos não infectados, inoculados com PBS.

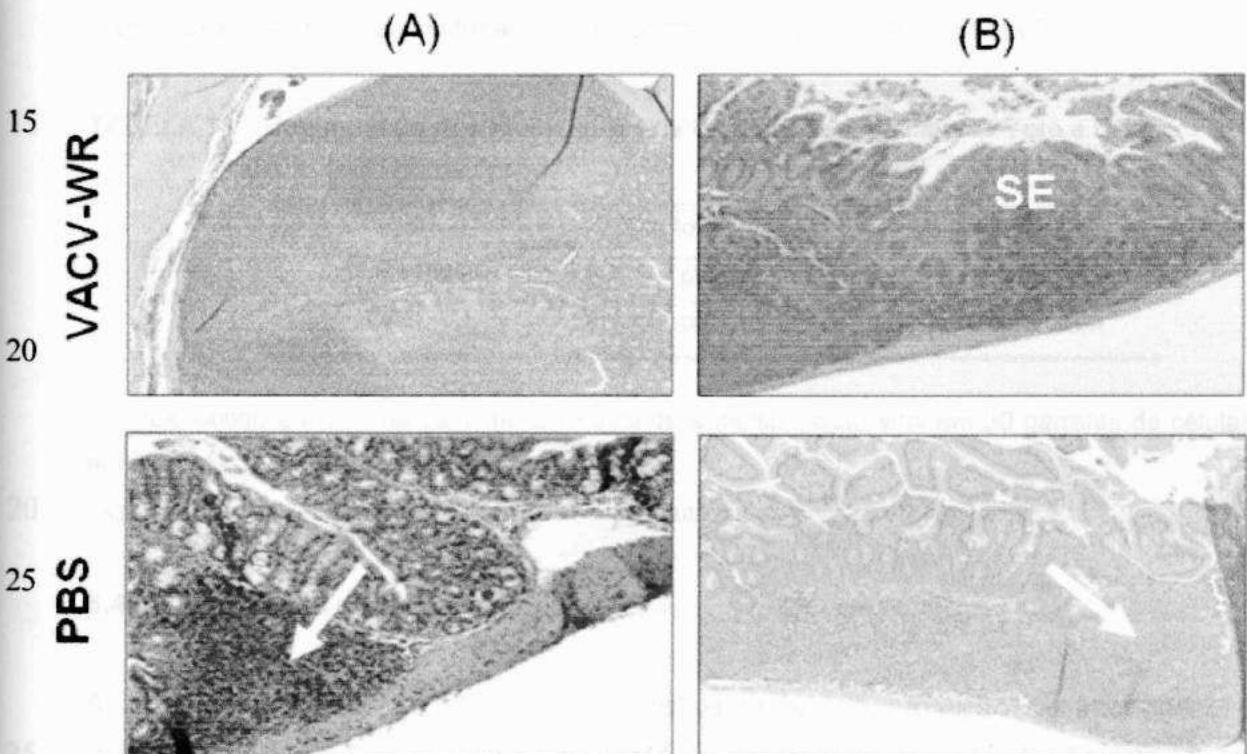


FIGURA 19 - Seções histológicas de tecido de Placas de Peyer de intestinos de camundongos. A) Camundongos infectados com 10^6 pfu da amostra viral WR pela via intra-nasal. Hiperplasia linfóide nas Placas de Peyer e células inflamatórias na lâmina própria em camundongos infectados no 5º d.p.i. **B)** Camundongos expostos a serragem contaminada. Estes animais apresentaram hiperplasia nas Placas de Peyer no 20º d.p.i. Adicionalmente, WR causou erosão superficial (SE) com infiltração linfocítica intraepitelial. Camundongos inoculados com PBS apresentaram aparência normal da mucosa das placas de Peyer (setas brancas). Os tecidos foram fixados com hematoxilina-eosina. Aumento: 35X.

5 **6.4 – Produção do imunógeno utilizando a amostra viral BeAn 58058**

6.4.1 – Seleção do método de produção viral

Para avaliar o método mais eficiente da produção de VACV e que fosse capaz de atender à produção em larga escala, foram comparados dois sistemas celulares: multiplicação do vírus BAV em cultivo celular (células Vero) e em CAM de ovos embrionados. Os títulos virais obtidos não diferiram significativamente em ambos os sistemas, sendo a produção em garrafas apenas 1,58 vezes maior que a produção em ovos, como mostrado na TABELA 8.

15 **TABELA 11 – Comparação dos títulos virais de BAV obtidos em células Vero e CAM**

	Título total ^a	Título por unidade ^b
Células Vero	$8,3 \times 10^9$ pfu/ mL	$2,7 \times 10^8$ pfu/garrafa
CAM	$2,9 \times 10^9$ pfu/ mL	$1,12 \times 10^8$ pfu/CAM

^aO título obtido em volume de 1 mL corresponde à multiplicação viral em 30 garrafas de células Vero e em 30 CAM de ovos embrionados.

^bAs unidades correspondem às garrafas e CAMs utilizadas para multiplicação viral

6.4.2 – Inativação de BAV

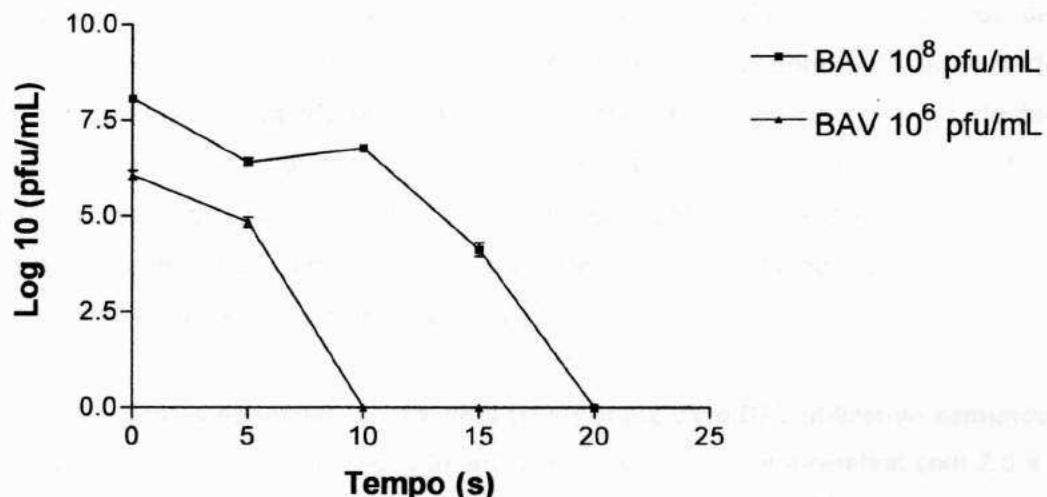
A amostra viral BAV foi selecionada para os testes de produção do imunógeno. Para a inativação do vírus BAV produzido em CAM, foram empregados métodos físicos e químicos. A BPL foi utilizada na concentração de 1:100 como método químico e a luz UV foi utilizada como método físico. Quando foram empregados 10^6 pfu em 200 μ L de meio, a inativação por UV foi completa a partir de 5 segundos. Porém, quando foram empregados 10^8 pfu/200 μ L, a inativação ocorreu a partir do período de 20 segundos (FIGURA 20), porém para ainda maior confiabilidade, utilizamos a inativação de 5 minutos.

Para testar a inativação do vírus BAV feita por luz UV e BPL, foram utilizados inoculação em células Vero, em CAM de ovos embrionados e em camundongos Balb/c neonatos. Os testes de inativação utilizando células Vero e CAM de ovos embrionados foram feitos em 3 passagens sucessivas e em duplicata e não houve multiplicação viral em ambos os sistemas confirmando, assim, a inativação viral como mostrado na TABELA 12. Em paralelo, foram utilizados controles



5 positivos, com inoculação de 10^7 pfu da amostra viral BAV não inativada e os controles negativos, os quais referem-se às células inoculadas com PBS. Nos controles positivos, foram observadas placas de lise em monocamadas de células Vero e quando os vírus foram inoculados em CAM, esta apresentou muitas lesões do tipo pocks, as quais serviram como controles positivos.

10



25 **FIGURA 20 – Curva de inativação viral utilizando duas concentrações da amostra viral BAV.**

30 **TABELA 12 - Testes de inativação da amostra viral BAV com luz UV e BPL utilizando células Vero e CAM.**

Presença de vírus				
	BAV UV/5minutos*	BAV BPL**	Controle negativo	Controle positivo
Células Vero	-	-	-	+
CAM	-	-	-	+

O grupo de camundongos que serviu como controle negativo foi inoculado com PBS.

* BAV inativado com luz ultravioleta por 5 minutos

35 ** BAV inativado com β-propiolactona (BPL)

5 Posteriormente, foi utilizado um sistema *in vivo*, com camundongos neonatos da linhagem Balb/c com 2 dias de vida, utilizando a via de infecção intra-cerebral. Para detectar a presença ou ausência de vírus viáveis, órgãos tais como cérebro, fígado e baço foram coletados.

10 Não foi detectada a presença de vírus em nenhum dos órgãos titulados dos camundongos inoculados com o BAV inativado tanto por luz UV, 5 minutos, quanto por BPL, comprovando a eficiência de ambos os métodos. Os controles positivos foram inoculados pela via intracerebral com 20 µL contendo 2×10^5 pfu com os vírus BAV e WR. No 5º d.p.i., os camundongos infectados por ambos os vírus apresentaram letalidade semelhante, com paralisia dos membros posteriores, perda de vivacidade, paralisia progressiva e morte. Vírus foram detectados nos três 15 órgãos analisados com altos títulos, variando de $4,3 \times 10^8$ pfu no baço a $2,8 \times 10^9$ pfu no cérebro de camundongos infectados com a amostra BAV. Para a infecção com a amostra WR, foram detectados títulos virais que variaram de $6,5 \times 10^8$ pfu no fígado a $1,3 \times 10^{10}$ pfu no cérebro como pode ser observado na TABELA 13.

20 **TABELA 13 – Testes de inativação do vírus BAV por luz UV e BPL utilizando camundongos Balb/c neonatos.** Grupos de 3 camundongos foram infectados pela via intra-cerebral com $2,0 \times 10^5$ pfu/20µL das amostras virais BAV e WR para serem utilizados como controles positivos. O grupo de camundongos do controle negativo (c-) refere-se aos camundongos inoculados com PBS.

25

	Títulos virais (pfu/g)				
	BAV UV/ 5 min*	BAV BPL**	BAV (c+)	WR (c+)	PBS (c-)
Cérebro	ND	ND	$2,8 \times 10^8$	$1,3 \times 10^{10}$	ND
Fígado	ND	ND	$8,8 \times 10^7$	$6,5 \times 10^8$	ND
Baço	ND	ND	$4,3 \times 10^6$	$3,1 \times 10^9$	ND

* BAV inativado com luz ultravioleta por 5 minutos

** BAV inativado com β-propiolactona (BPL)

ND: não detectado

30 c+: controle positivo

c-: controle negativo

35

5 A FIGURA 21 ilustra a diferença de tamanho entre os camundongos Balb/c neonatos com 2
dias de idade inoculados com BAV e WR inativados (FIGURA 20A e 20B), comparados ao
camundongo inoculado com BAV não inativado (FIGURA 20C), que começa a apresentar
retardo no desenvolvimento.

10

15

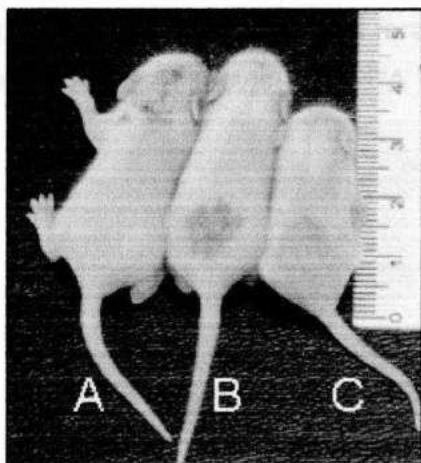
20

25 **FIGURA 21 – Testes de inativação da amostra viral BAV por luz UV e BPL em camundongos Balb/c
neonatos com 2 dias de idade utilizando a via de infecção intra-cerebral. (A) Animal infectado com
BAV inativado por luz UV (B) Animal infectado com BAV inativado por BPL (C) Animal infectado com BAV
não inativado.**

30

35

40



5 **6.4.3 – Efeitos da inativação sobre a estrutura viral visualizada por Microscopia de Força
Atómica**

10 Após o processo de inativação da partícula viral BAV por luz UV e BPL, que atuam no DNA
viral, esta foi visualizada por AFM, onde foram observadas partículas intactas, em forma de
tijolo e uma área central proeminente, típica de poxvírus. Porém, foi observada alteração na
15 morfologia das partículas virais como ocorreu com algumas partículas inativadas por ambos os
processos. Partículas intactas e parcialmente abertas foram observadas (FIGURA 22A), assim
como partículas com envelopes virais intactos (FIGURA 22B) e cerne de vírus IMV (FIGURA
22C).

15

20

25

30

35

5

10

15

20

25

30

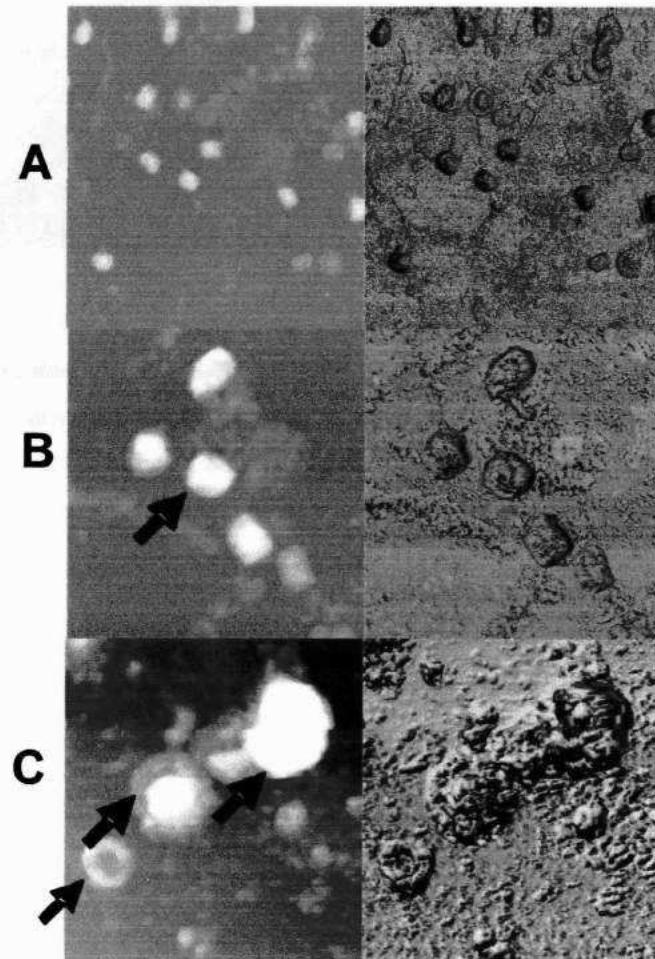


FIGURA 22 – BAV inativado por luz ultra-violeta e visualizado por microscopia de força atômica.

Amostras purificadas em gradiente de sacarose foram tratadas com luz UV por 5 minutos. (A) Partículas

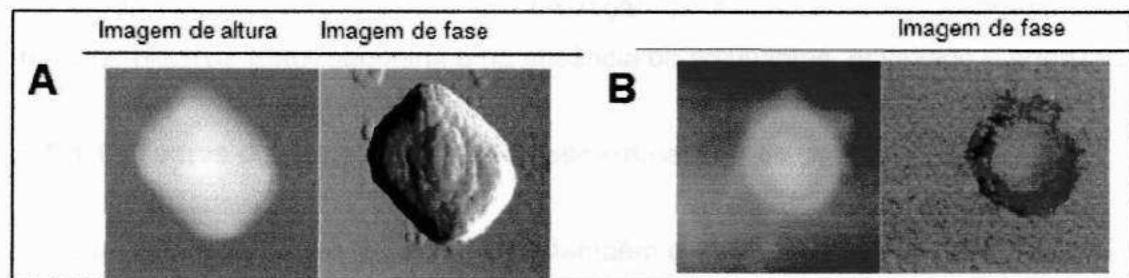
intactas e parcialmente abertas estão indicadas com setas pretas (B) Envelopes intactos estão indicados

35

com setas pretas (C) Cerne do vírus IMV. Amostras foram observadas em ar com um Nanoscópio

AFMIIIa (Digital Instruments Santa Barbara, clif).

- 5 A FIGURA 23A ilustra partículas inativadas com UV/5 minutos a uma distância de 10cm e a FIGURA 23B ilustra partículas inativadas com BPL, com formato arredondado.



10
15
20
25
30
35
40

FIGURA 23 – Partículas IMV de BAV inativado com luz UV e BPL. A) inativação a uma distância de 10cm da luz UV B) inativação por BPL. Imagens dos vírus foram obtidas em ar com Nanoscópio AFM IIIa (Digital Instruments, Santa Bárbara, calif). Imagens de AFM são 500nm por 500nm.

5 **6.5 – Preparo dos imunógenos**

6.5.1 – Formulação e estudos da eficácia do imunógeno

A concentração viral antes da inativação de BAV foi 10^7 pfu/100 µL por camundongo. Após 10 testes de inativação com BPL e comprovação da esterilidade, o imunógeno foi formulado a base de (AlOH_3), EMU, saponina e na ausência de adjuvantes, envazado e armazenado a 4°C.

6.5.1.1 - Testes de desafio através de escarificação nas patas

15 O desafio foi feito com a amostra WR e também com a amostra viral ARAV foi utilizada por ser um vírus de origem bovina. Para testar a eficiência dos抗ígenos virais, na ausência ou na presença de diferentes adjuvantes, utilizando uma concentração de 10^6 pfu/10 µL pela via escarificação nas patas, foram utilizadas duas medidas: tamanho das lesões e espessura das patas dos camundongos. A pata direita inoculada e a esquerda (não inoculada) foram medidas 20 diariamente antes e após fazer o desafio. Não foram observadas alterações nas patas esquerdas de todos os animais, medindo aproximadamente 0,2 cm. As medidas das patas inoculadas com ARAV seguiram o mesmo padrão apresentado para o WR, sendo mostrados apenas os dados referentes ao desafio com WR.

25 Os resultados do desafio referem-se aos camundongos imunizados após o reforço de acordo com os intervalos de tempo utilizados para os grupos 1 e 2 como mostrado na TABELA 14, ou seja, após 5 e 6 semanas (s). Os resultados aqui apresentados são apenas do desafio com a amostra WR. Foram utilizados 6 camundongos por grupo e os resultados representam a média das medidas da espessura e comprimento das lesões.

30 TABELA 14 – Esquema de intervalos de tempo utilizados para os testes de desafio dos camundongos pertencentes aos grupos 1 e 2.

	Grupo 1			Grupo 2		
Dias (semanas)	0	21 (3s ⁺)	35 (5s ⁺)	0	28 (4s ⁺)	42(6s ⁺)
1ª imunização	X			X		
2ª imunização		X			X	
Desafio			X			X

5 *s=semanas

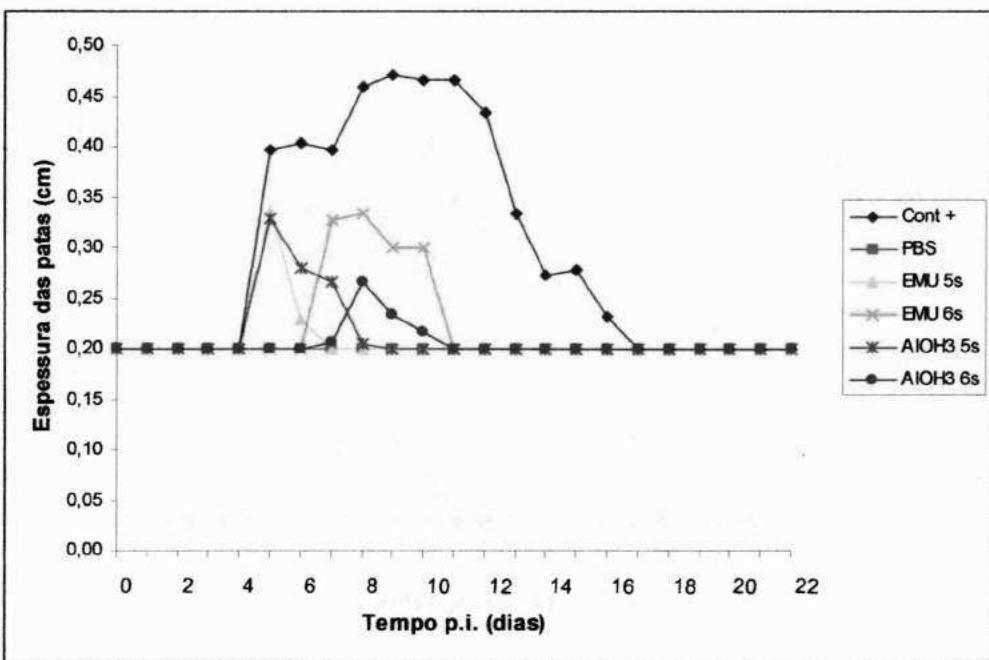
Como pode ser observado nas FIGURAS 24 A e 25A, a partir do 5º dia após o desafio, as medidas das patas dos camundongos imunizados com Emulsigen® (EMU) e dos camundongos pertencentes ao grupo controle positivo começaram a aumentar. A espessura aumentada das patas após desafio feito em 5 semanas (5 s) após a primeira imunização durou 3 dias enquanto 10 o desafio feito em 6 semanas (6 s) após a primeira imunização durou 5 dias. O aumento no tamanho das lesões durou 5 a 6 dias, no desafio feito após 5 e 6 semanas (s) após a primeira imunização, respectivamente.

Analisando-se a espessura das patas dos camundongos imunizados com o adjuvante Al(OH)₃, 15 estas iniciaram o processo de inflamação a partir do 4º d.p.i. e durou 4 e 5 dias para a imunização feita 5 e 6 semanas após a primeira imunização, respectivamente (FIGURA 24A). Em relação ao tamanho das lesões das patas, estas evoluíram para a cura em 5 dias após desafio feito após ambos intervalos, 5 e 6 semanas após a primeira imunização (FIGURA 25A).

20 As medidas das patas dos camundongos imunizados com os adjuvantes EMU e Al(OH)₃ não diferiram significativamente dos camundongos inoculados com PBS, enquanto as medidas das patas dos camundongos desafiadas com WR foram significativamente maiores em todos os dias de infecção quando comparados com os animais imunizados com o antígeno inativado adicionado de EMU e Al(OH)₃ 5 e 6 semanas.

25 As lesões dos camundongos imunizados com o antígeno inativado adicionado do adjuvante saponina e na ausência do adjuvante duraram em torno de 12 a 18 dias. O aumento das lesões dos controles positivos também durou em torno de 12 a 18 dias, porém permaneceram maiores que as lesões que tiveram a adição dos adjuvantes saponina ou somente com o vírus inativado 30 sem a adição de adjuvante (FIGURA 24B e 25B). Quando foi feita a análise estatística do uso do adjuvante saponina e na ausência de adjuvante, as medidas não diferiram significativamente do controle positivo.

A



5

B

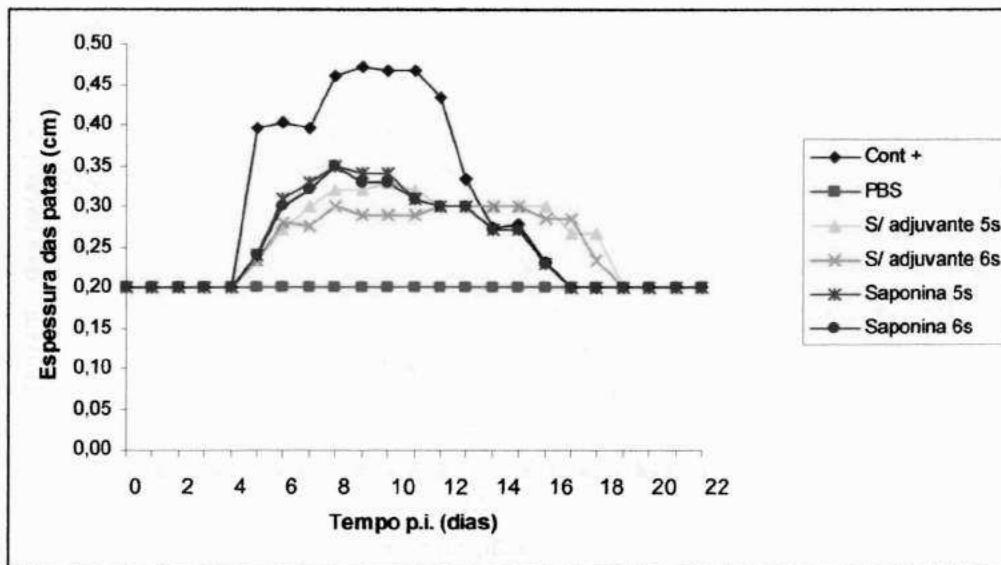


FIGURA 24 – Medidas da espessura das lesões das patas dos camundongos Balb/c imunizados e desafiados com WR. Camundongos ($n=6$) foram imunizados com antígeno inativado contendo: A) Emulsigen® (EMU) e $\text{Al}(\text{OH})_3$ B) saponina e na ausência de adjuvante. Ambos receberam o reforço dos imunógenos na terceira ou quarta semana com posteriores desafios na quinta ou sexta semanas, respectivamente. Controles negativos (-) referem-se aos animais inoculados com PBS e desafiados com extrato celular e controles positivos (+), foram inoculados com PBS e desafiados com 10^6 pfu do vírus WR. Foram utilizados 3 camundongos por grupo e os resultados representam a média das medidas obtidas. Foi utilizado o test t-student ($P \leq 0,05$).

5

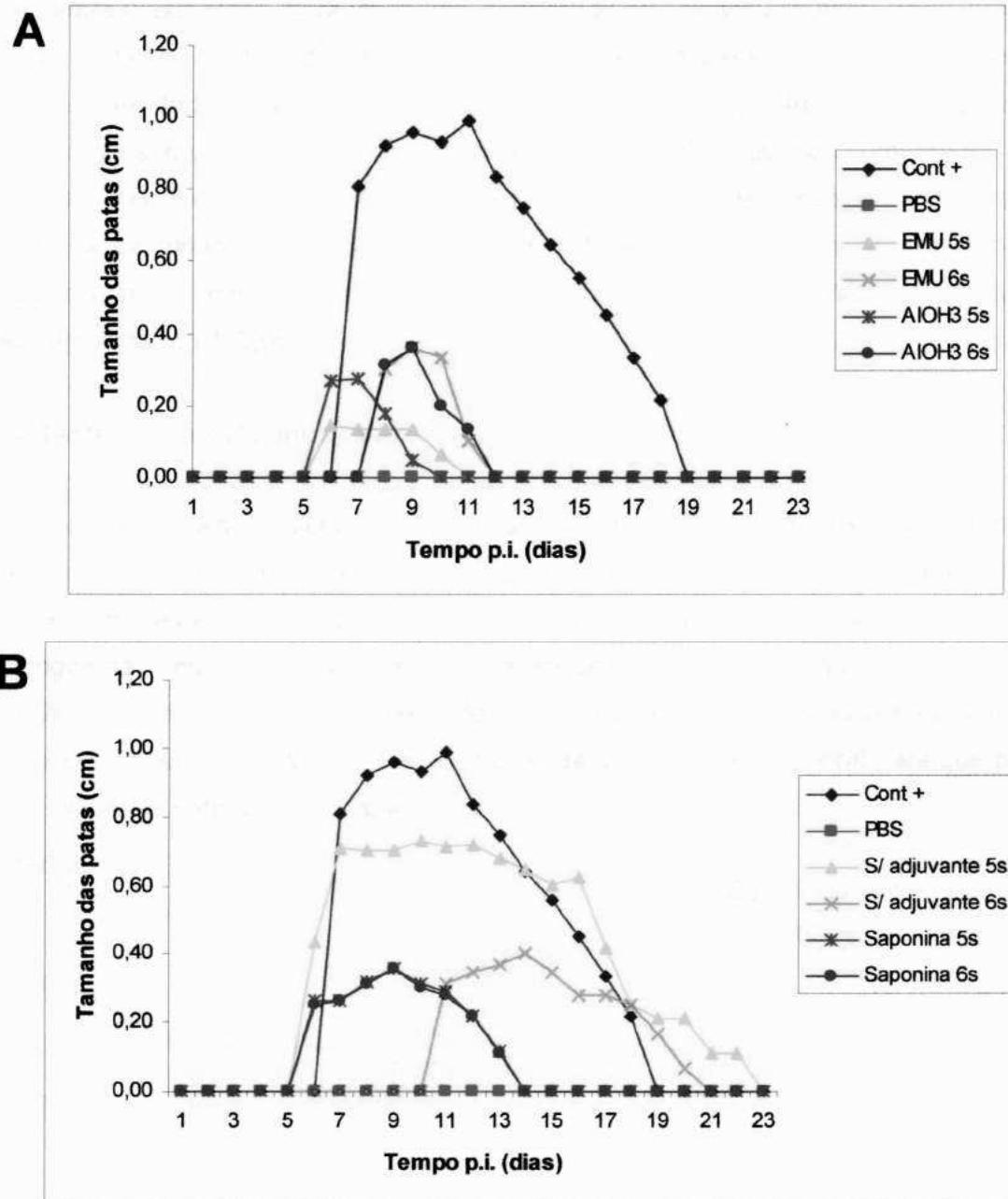
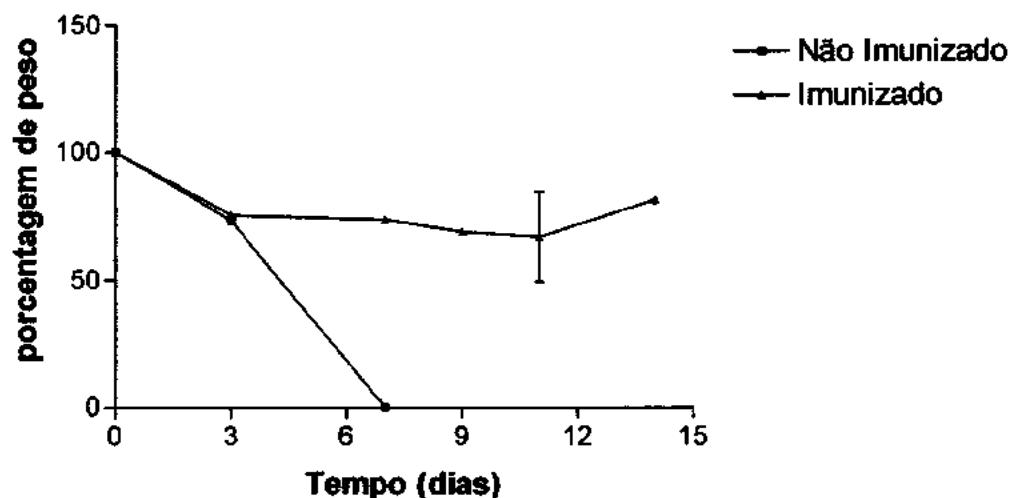


FIGURA 25 – Medidas do comprimento das lesões das patas dos camundongos Balb/c imunizados e desafiados com WR. Camundongos foram imunizados com antígeno inativado contendo: **A)** Emulsigen® (EMU), Al(OH)₃ **B)** saponina e na ausência de adjuvante. Ambos receberam o reforço do imunógeno na terceira ou quarta semana com posteriores desafios na quinta ou sexta semanas, respectivamente. Controles negativos (-) referem-se aos animais inoculados com PBS e desafiados com extrato celular e controles positivos (+), foram inoculados com PBS e desafiados com 10⁶ pfu do vírus WR. Foram utilizados 3 camundongos por grupo e os resultados representam a média das medidas obtidas. Foi utilizado o test t-student ($P \leq 0,05$).

5 Foi feita análise estatística para cada dia analisando-se, individualmente, cada tratamento através da ANOVA. Analisando-se os dados relativos à espessura e tamanho das patas infectadas a partir do 5º d.p.i., a diferença foi significativa ($P<0,01$) entre as medidas das patas dos camundongos imunizados com os adjuvantes EMU e Al(OH)₃ quando comparados com os controles positivos. Entretanto, comparando-se as medidas da espessura e tamanho das lesões das patas, os camundongos imunizados com o BAV adicionado destes adjuvantes quando comparados com os camundongos do grupo de controle negativo, não houve nenhuma diferença significativa ($P>0,05$).
 10

6.5.1.2 – Testes de desafio intranasal

15 Também foi feito o desafio pela via intranasal com 10^6 pfu com o WR em camundongos imunizados com o adjuvante EMU, com segunda imunização na quarta semana p.i. Os camundongos perderam peso a partir do 2º d.p.i., porém o recuperaram a partir do 8º d.p.i. Os camundongos não imunizados começaram a perder peso no 2º d.p.i. e morreram no 6º d.p.i. A
 20 FIGURA 26 representa a média do peso de 4 camundongos imunizados e não imunizados, sendo que estes não foram sacrificados após a perda de 25% peso corporal para que pudesse detectar a diferença entre os dois tratamentos.



35
 40
FIGURA 26 – Peso dos camundongos imunizados e não imunizados após desafio com WR. Um grupo de camundongos ($n=4$) foi imunizado com EMU com segunda imunização em 4 semanas p.i. e o outro grupo foi desafiado sem imunização. Ambos foram desafiados com 10^6 pfu do vírus WR.

5 **6.5.1.3 – Testes de resposta humoral**

Os soros testados foram originados de grupos contendo 6 camundongos imunizados com adjuvantes EMU e Al(OH)₃, os quais apresentaram menores lesões em um menor período de tempo nos testes de desafio. Os soros coletados foram testados pelo método de ELISA. O 10 grupo imunizado com o antígeno contendo EMU cujo sangue foi coletado em 6 semanas após o reforço com 4 semanas, foi considerado positivo e apresentou o maior título de anticorpos com 1:360 (360 unidades neutralizantes para 1mL de meio), segundo método descrito por KAREM e colaboradores, 2006, em que os valores das absorbâncias das amostras foram subtraídos da linha de corte e após esta subtração, todos os valores que forem maior que zero foram 15 considerados positivos. Este grupo apresentou diferença estatisticamente significativa em relação aos valores de absorbância dos outros grupos, tanto do antígeno contendo Al(OH)₃ e dos controles negativos (FIGURA 27).

O soro de animais do grupo imunizado com EMU coletado com 5 semanas após a segunda 20 imunização em 3 semanas, apresentou um valor de absorbância maior que o valor dos animais imunizados com EMU e Al(OH)₃ com única imunização em 3 semanas. Entretanto, os valores de absorbância dos grupos imunizados com EMU e Al(OH)₃ na primeira imunização, em 3 semanas foram negativos e não apresentaram diferença significativa nos valores de absorbância (FIGURA 27).

25 Em paralelo à realização dos testes de ELISA, com os mesmos soros, foram analisados os Ac neutralizantes contra o WR pelo método de soroneutralização. Somente os soros coletados no período de 5 e 6 semanas após o reforço, que foi feito em 3 e 4 semanas, respectivamente, foram positivos. Os títulos de anticorpos obtidos variaram de 1:20 (20 unidades neutralizantes 30 para 1mL de meio) a 1:60 (60 unidades neutralizantes para 1mL de meio). Estes resultados são compatíveis com os obtidos nos testes de ELISA, comprovando a eficácia do método de primeira imunização e reforço e, neste caso, a melhor resposta desencadeada foi obtida pela adição do adjuvante EMU.

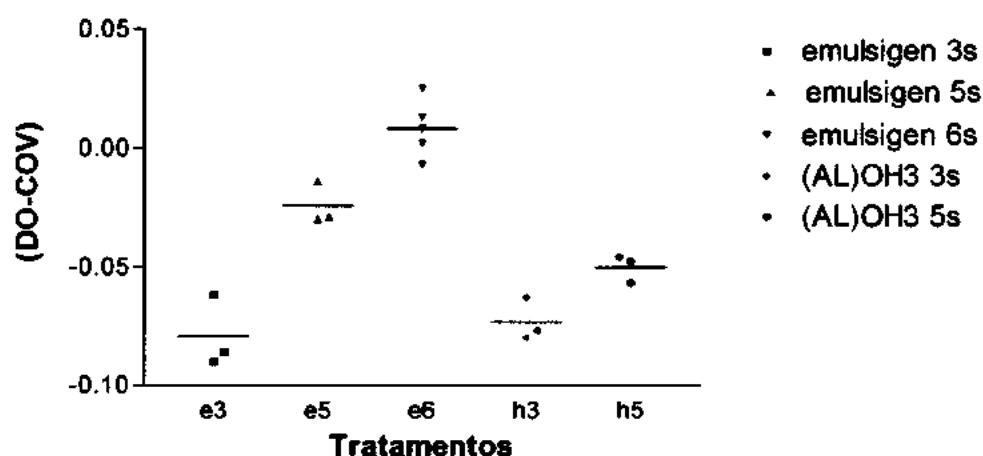


FIGURA 27 - Titulação de anticorpos totais por ELISA dos soros de camundongos imunizados pelo método de primeira imunização e reforço com diferentes adjuvantes. Os resultados estão apresentados como (DO-COV), onde os valores acima de zero são considerados positivos. Os soros imunes (+) dos camundongos inoculados com imunógenos inativados utilizando o adjuvante Al(OH)_3 e os controles + e - foram coletados antes da primeira imunização e 21 dias após a primeira imunização e 39 dias após o reforço, depois do qual foi feita a sangria dos camundongos através da secção do plexo braquial.

e= emulsigen

h= Al(OH)_3

s=semanas

5 7- DISCUSSÃO

Com o aumento da freqüência de doenças causadas por surtos de vaccinia bovina, resultando em infecções de vacas e humanos, aliado à alta diversidade filogenética apresentada pelas amostras de BR-VACVs (TRINDADE *et al.*, 2007; DRUMOND *et al.*, 2007), surgem importantes 10 questões sobre as características biológicas e ecológicas destes vírus que estão circulando na natureza. Este trabalho é o primeiro a mostrar as diferenças de virulência entre amostras de VACV isoladas no Brasil e os resultados obtidos demonstram a diversidade destas amostras. Além disso, este trabalho desenvolveu um imunógeno inativado com futuras aplicações para o combate à vaccinia bovina nas áreas rurais.

15

Vários modelos têm sido utilizados para estudos de patogênese de poxvírus, tais como o coelho Europeu para *Myxoma virus* e camundongos para *Ectromelia virus* (ECTV), CPXV e VACV (BULLER & PALUMBO, 1991). No caso de ECTV e CPXV, o uso do modelo roedor é apropriado visto que estes vírus são seus patógenos naturais. Uma vez que o hospedeiro 20 natural dos VACV ainda é desconhecido, consequentemente, o modelo animal mais apropriado para estudos de patogênese continua incerto (CHANTREY *et al.*, 1999). Contudo, devido às facilidades de experimentação em camundongos, outros estudos para OPXV já foram feitos utilizando este modelo. Os roedores são fortes candidatos a serem hospedeiros naturais de VACV, visto que BAV foi isolado naturalmente de um roedor *Oryzomys sp.*, SAV foi isolado de 25 um roedor sentinela e VBH foi isolado de um camundongo da linhagem Balb/c.

Primeiramente, neste estudo, camundongos Balb/c foram inoculados pela via intradérmica por escarificação nas patas e no dorso com amostras de BR-VACVs isoladas de diferentes espécies tais como BAV (roedor), ARAV (bovino) e uma amostra protótipo do gênero, o WR para o estudo do curso de infecção viral, visto que a inoculação por esta via, provavelmente, mimetiza a infecção natural causada por VACV em humanos e animais no campo. Outra vantagem desta via de inoculação é que elucida respostas inflamatórias resultando em inchaço, que pode ser medido, convenientemente, com paquímetro.

35

A inoculação pela via intradérmica, mesmo utilizando altas doses de vírus, como 10^6 pfu por camundongo, resultou no desenvolvimento de lesões que se restringiram ao local de inoculação e nenhum outro sinal clínico foi observado. Estes resultados condizem com aqueles obtidos por MILLER e colaboradores (1995), que ao inocular 10^7 pfu de CPXV nas patas de camundongos

5 C57/Bl6, observou que a infecção permaneceu restrita ao local de inoculação. Outros estudos mostraram que, após inoculação intradérmica na orelha de camundongos com 10^6 pfu da amostra WR, a multiplicação do vírus também permaneceu localizada, com a formação de uma lesão sobre a orelha inoculada, sem nenhum sinal de doença generalizada (TSCHARKE et al., 2002). O mesmo modelo foi utilizado por LEITE (2006), quando comparou a infecção por CPXV recombinante deletado para o gene *at1*, que induziu uma maior perda tecidual e deposição de tecido conjuntivo quando comparado ao CPXV selvagem, também obtendo lesões localizadas no sítio de inoculação.

10 15 Diferenças no curso de evolução das lesões entre as vias de inoculação intradérmica foram observadas, apresentando-se menores, com duração de 13 dias nos camundongos inoculados no dorso, e maiores naqueles inoculados pela via escarificação nas patas, com duração de 20 dias. Este período de evolução da doença pela infecção nas patas foi similar comparando-se ao curso de infecções naturais em vacas e humanos, que varia de 20 a 30 dias (LEITE et al., 2005).

20 25 Enquanto camundongos inoculados no dorso desenvolveram somente pústulas e crostas, aqueles inoculados nas patas mostraram edema/inchaço, vesículas, pústulas e crostas. Comparando os resultados obtidos pelo método de escarificação nas patas com os dados de infecções naturais que acometem vacas, bezerros e humanos durante surtos de vaccínia bovina, um modelo similar de evolução das lesões pode ser notado. Vacas leiteiras desenvolvem lesões típicas de poxvírus nas tetas e úberes. Após contato com estas lesões, ordenhadores se infectam e desenvolvem lesões similares nas mãos enquanto bezerros, da mesma forma, se tornam infectados na mucosa oral e gengiva. Primeiramente, vacas apresentam um eritema roseolar e edema localizado que evolui para formas de vesículas. As vesículas progridem para pápulas e pústulas e, subsequentemente, para crostas (DAMASO et al., 2000; NAGASSE-SUGAHARA et al., 2004; TRINDADE et al., 2006).

30 35 Durante coletas de material biológico a partir de lesões nas tetas de vacas durante surtos de vaccínia bovina, diferenças no tamanho, formas e gravidade destas lesões foram observadas (LOBATO, 2007 - comunicação pessoal). Este fato suscitou a hipótese de que estas amostras também poderiam causar lesões diferentes quando inoculadas em camundongos. Entretanto, a infecção pela via intradérmica no dorso e nas patas não se mostrou um método eficaz para detectar diferenças na virulência das amostras de BR-VACVs (BAV, ARAV) e WR. Estas

5 amostras, mesmo sendo isoladas de diferentes hospedeiros, em diferentes locais e períodos e, ainda possuindo diferenças genéticas entre si, apresentaram as mesmas características e o mesmo tempo de evolução das lesões (LEITE *et al.*, 2007; TRINDADE *et al.*, 2007; DRUMOND *et al.*, 2008 *in press*). Contudo, a via escarificação nas patas mostrou ser um método apropriado para o estudo do curso de infecção de BR-VACVs, visto que este mimetiza o curso de infecção
10 de diferentes amostras de VACV na natureza.

Diante da diversidade biológica apresentada pelas amostras de BR-VACVs, foi feito um estudo de proteção cruzada com algumas amostras, mesmo sabendo-se que espécies de OPXV induzem proteção cruzada (BULLER & PALUMBO, 1991), porém estudos demonstram que esta teoria deve ser melhor estudada. Neste estudo, foi demonstrado que camundongos infectados com uma das amostras de BR-VACVs, como BAV, ARAV ou pela amostra protótipo WR, foram protegidas da reinfecção com amostras diferentes e não desenvolveram nenhuma lesão ou sinal clínico (TABELA 11). Isto demonstra que a infecção primária pela via intradérmica induz respostas específicas humoral e/ou celular que podem neutralizar a infectividade viral e combater o vírus, como já mostrado por MILLER e colaboradores, 1995. Assim, pode-se especular que durante os surtos de vaccinia bovina, uma vez que a vaca, o bezerro ou o humano sejam infectados por uma amostra de VACV, estes estarão protegidos da infecção por outras amostras de VACV ou OPXV. Atualmente, a despeito da falta de total conhecimento das origens históricas, da grande diversidade biológica e genética dos poxvírus, a busca do conhecimento sobre a proteção cruzada entre estes vírus se torna necessária. Além disso, estudos recentes mostraram que a vacinação contra VARV na infância falhou em induzir uma completa proteção contra MPXV em dois indivíduos (KAREM *et al.*, 2007). TSCHARKE e colaboradores (2005) mostraram uma potencial base de proteção cruzada entre OPXV na identificação de determinantes de células TCD8⁺ para a caracterização de vacinas contra a varíola, porém sugere que determinantes antigênicos reconhecidos por células TCD8⁺ e a imunidade em modelos animais possam trazer importantes implicações para a compreensão desta proteção cruzada, visto que o MVA falhou em induzir respostas para dois dos determinantes definidos (A43L e A42R).

35 Após a compreensão sobre o curso de infecção das amostras de BR-VACVs pela via intradérmica, foi selecionado o modelo de infecção intranasal em camundongos Balb/c para estudar as diferenças de virulência entre 7 amostras de BR-VACV, uma amostra protótipo do gênero (WR) que é altamente virulenta e uma amostra vacinal (LST-BUT), pouco virulenta para

5 camundongos (ABDARHAMAN *et al.*, 2006). A infecção intranasal já é descrita como
conveniente, fácil e bem caracterizada para estudos de virulência de OPXV (MARTINEZ *et al.*,
2000; ABDARHAMAN *et al.*, 2006). O quadro clínico apresentado pelos camundongos após a
infecção intranasal mostrou-se completamente diferente dos sinais clínicos causados pela via
infecção intradérmica, causando uma infecção sistêmica e permitindo que diferentes amostras
10 fossem agrupadas de acordo com sua virulência.

De acordo com o potencial de virulência, as amostras estudadas foram divididas em três
grupos, quando inoculadas em camundongos com 10^6 pfu. O primeiro grupo foi composto pelas
amostras SAV, VBH, GP1V e WR, que causaram morbidade grave, com rápida perda de peso
15 dos camundongos infectados culminando em óbito, que variou de 50% a 100% com doses de
 10^6 pfu/ camundongo. O segundo grupo, constituído pela amostra BAV, que causou mais de
25% de perda de peso dos camundongos, mas todos o recuperaram em poucos dias após a
infecção, não causando o óbito. E o terceiro grupo, composto pelas amostras, ARAV, GP2V,
20 PSTV e LST-BUT as quais não causaram nenhum sinal clínico nem perda de peso nos
camundongos infectados. Nos camundongos inoculados com as amostras de VACV que
causaram perda de peso, sinais clínicos como piloereção, arqueamento de dorso, alopecia
periocular e balanopostite foram observados (FIGURA 9).

Além da curva de sobrevivência das amostras de VACV, foi determinada a dose letal de 50%
25 (LD_{50}) das amostras de VACV mais virulentas. A menor LD_{50} foi detectada para a amostra VBH,
seguida de WR e, posteriormente, de GP1V e SAV, que apresentam a mesma LD_{50} . Por último,
BAV apresentou a maior LD_{50} (TABELA 9).

Segundo as análises de multiplicação viral em diversos órgãos de camundongos infectados
30 pela via intranasal com 10^6 pfu, as amostras virulentas de VACV apresentaram um amplo
tropismo viral. Os maiores títulos virais obtidos foram detectados nos locais iniciais de infecção
de acordo com via utilizada, tais como traquéia e pulmões com disseminação para os outros
órgãos analisados, incluindo coração, baço, rins, fígado e cérebro dos camundongos infectados
35 com as amostras WR (exceto baço), SAV, VBH, GP1V e BAV (FIGURA 11). A detecção de
maiores títulos virais nos pulmões e traquéia estão de acordo com resultados publicados por
READING & SMITH (2003) que utilizou a infecção intranasal com amostra WR em
camundongos Balb/c. De maneira diferente, camundongos inoculados com as amostras ARAV,
GP2V, PSTV e LST-BUT não apresentaram títulos virais em nenhum órgão pelo método de pfu,

5 tampouco tiveram algum sinal clínico da doença ou perda de peso até o dia 10 p.i., momento
em que foram sacrificados (FIGURA 10B). A ausência de detecção viral no baço de
camundongos inoculados com a amostra WR pelo método de pfu em células Vero pode ser
devido à baixa multiplicação destes vírus e, consequentemente, e estes não foram detectados
10 pela baixa sensibilidade da técnica utilizada. Contudo, DNA viral foi detectado quando o
material genético foi analisado por semi-nested PCR (ABRAHÃO, 2006) (FIGURA 12).

Ainda para estudar a multiplicação viral dos VACV, foi feita uma cinética de titulação viral do
curso de infecção em pulmões de três camundongos infectados para cada amostra viral
estudada, visto que estes órgãos apresentaram os maiores títulos virais. Assim, foi detectado
15 que nas amostras mais virulentas, houve uma multiplicação viral iniciando no 1º d.p.i. para as
amostras WR e BAV e no 3º d.p.i., para as amostras VBH, GP1V e SAV (FIGURA 13) com altos
níveis de multiplicação viral, indicando uma multiplicação viral rápida nestes órgãos. De maneira diferente,
nenhuma partícula infecciosa foi detectada nos pulmões de camundongos inoculados com as
amostras pouco virulentas (PSTV, ARAV, GP2V e LST-BUT). Isto ocorreu, provavelmente,
20 devido à baixa multiplicação destes vírus nos pulmões e, consequentemente, não foram
detectados vírus devido à baixa sensibilidade da técnica utilizada como ocorreu com o baço de
camundongos inoculados com WR. Entretanto, quando o material genético foi analisado por
semi-nested PCR (ABRAHÃO, 2006), que é um método mais sensível, o DNA viral foi detectado
25 nos pulmões de camundongos infectados com as amostras PSTV, ARAV, GP2V e LST-BUT
(dados não mostrados) (FIGURA 12).

Em paralelo à cinética de multiplicação viral, foram feitas análises histopatológicas de todos os
órgãos coletados dos camundongos infectados com as amostras virais de VACV estudadas. Os
órgãos que mais apresentaram lesões foram os pulmões, incluindo aqueles provenientes de
30 camundongos em que não foram detectados títulos virais pelo método de titulação em pfu em
células Vero. Nos pulmões de camundongos infectados com WR, SAV, VBH, GP1V e BAV, foi
detectado pneumonia grave comparando com os pulmões de camundongos inoculados com
LST-BUT, ARAV, GP2V e PSTV, que apresentaram pneumonia branda a moderada. As
alterações histológicas observadas nos pulmões dos camundongos estão de acordo com outros
35 estudos feitos em camundongos inoculados com a amostra WR. Estes também desenvolveram
pneumonia com edema alveolar severo, bronquiolite necrosante, assim como infiltrados de
neutrófilos no interstício nos pulmões (BRAY et al., 2000; CHEN et al., 2005; DAMON et al.,
2007), corroborando com os resultados deste trabalho.

5 Análises de imunohistoquímica mostraram que áreas contendo lesões nos pulmões foram
positivas para o anticorpo anti-H3L, que é anti-orthopoxvírus, confirmando a presença do vírus
nos tecidos danificados em ambas as amostras, com maior ou menor potencial virulento
(FIGURA 16). Estes dados, aliados aos de histopatologia e PCR, comprovam a presença do
vírus nos pulmões de camundongos infectados com todas as amostras estudadas, apesar de
10 em algumas amostras menos virulentas não serem detectados vírus pelo método de pfu em
células Vero. Além disso, a detecção de anticorpos neutralizantes em camundongos inoculados
com GP2V, ARAV, PSTV e LST-BUT poderia ser uma indicação de infecção sub-clínica. Os
baixos títulos de anticorpos neutralizantes obtidos podem ser devido à sua reduzida
15 multiplicação e expansão destes vírus. Na natureza, uma infecção subclínica poderia causar
uma exposição da população em geral aos VACV. Este fato poderia explicar como diferentes
amostras de VACV se mantêm e circulam ativamente na natureza, transmitindo o vírus para
diferentes hospedeiros. Quando as condições ambientais são favoráveis, como comprovado
pela ocorrência sazonal dos surtos de vacúnia bovina, principalmente na época de seca, que
dura de julho a outubro (LOBAT et al., 2005), os roedores, possíveis hospedeiros naturais,
20 saem de seu habitat natural e se dirigem em busca de alimentos nas fazendas. Estes entram
em contato com outros hospedeiros, objetos, excretas ou diretamente com as vacas e
transmitem a doença.

Estudos paralelos feitos pelo grupo de Poxvírus do Laboratório de Vírus utilizaram
25 camundongos da linhagem C57/Bl6 para a inoculação intranasal com 10^6 pfu das amostras de
BR-VACV utilizadas neste trabalho. Resultados preliminares de uma curva de sobrevivência
mostraram que camundongos da linhagem C57/Bl6 são mais resistentes às infecções por
VACV (dados não mostrados) comparados às infecções em camundongos da linhagem Balb/c.
Porém, estudos mais aprofundados devem ser feitos para a comparação da susceptibilidade
30 das duas linhagens às amostras BR-VACV. Trabalhos têm descrito que a utilização de mesmas
amostras de VACV indicam fortes variações nos níveis de virulência e na imunopatologia
dependendo do modelo animal utilizado (FENNER, 1989; READING & SMITH, 2003).
Resultados descritos por BULLER & PALUMBO (1991) mostraram que camundongos C57Bl/6
35 infectados por ECTV são mais resistentes que camundongos Balb/c devido a respostas mais
fortes e/ou precoces dos mediadores imunes pelas respostas inata e adaptativa.
Diferentemente, inoculações pela via intradérmica e intranasal mostraram que as lesões
formadas e outros sinais clínicos apresentados por camundongos Balb/c foram menores que
aqueles apresentadas pelos camundongos C57/Bl6 (BRIODY, 1959; TCSHARKE et al., 2002;

- 5 CHAUDRY *et al.*, 2004). Entretanto, a compreensão sobre a diferença de virulência entre linhagens diferentes ainda não está definida. Assim, estes dados reforçam a necessidade de estudos adicionais envolvendo diferentes linhagens de camundongos para estudos de patogenicidade e imunopatologia.
- 10 Os dados referentes à virulência da amostra WR neste estudo estão de acordo com resultados mostrados por ABDALRHMAN e colaboradores (2006). Estes autores mostraram que camundongos Balb/c inoculados com a amostra WR começaram a perder peso no 3º d.p.i., atingindo perda de 25% do peso corporal no 5º d.p.i., sendo os maiores títulos virais detectados nos pulmões, atingindo o fígado, rins e coração e, posteriormente, ultrapassaram a barreira 15 sanguínea e expandiram para o cérebro. A amostra LST-BUT, utilizada neste trabalho, não multiplicou em nenhum órgão dos camundongos infectados e titulados em células Vero. Estudos feitos por ABDALRHMAN e colaboradores (2006) também descreveram que camundongos Balb/c inoculados 5×10^5 pfu da amostra LST (Elstree) não perderam peso durante o período de duas semanas quando comparadas ao grupo controle, inoculado com 20 PBS, o que corrobora com os resultados aqui apresentados. Entretanto, contrapondo os resultados apresentados neste trabalho com a amostra LST-BUT, a amostra Lister (Elstree) apresentou títulos virais nos pulmões de camundongos durante oito dias de estudo, porém vírus não foram detectados nos rins, fígado e cérebro, exceto no coração de um camundongo no 2º d.p.i. e nos rins de outro no 4º d.p.i. (TURNER, 1967; BRANDT & JACOBS, 2001; 25 ABDALRHMAN *et al.*, 2006). Esta diferença, provavelmente, pode ser explicada pelo fato da amostra oriunda do Instituto Butantã, ter uma origem diferente e também apresentar números diferentes de passagens em células, se mostrando ainda mais atenuada que a amostra oriunda de Elstree.
- 30 As amostras GP1V e GP2V são provenientes de lesões de tetas de vacas do mesmo surto de vaccínia bovina, isoladas ao mesmo tempo e de fazendas adjacentes (TRINDADE *et al.*, 2006). Analisando o perfil de virulência destas amostras, foi observado que GP2V não causou perda de peso em camundongos Balb/c e GP1V causou perda de peso, culminando com a morte dos camundongos inoculados. Estas amostras demonstraram que as diferenças de virulência não 35 apresentam, neste caso, nenhuma correlação entre o hospedeiro no qual a amostra foi isolada, nem com o período ou local de isolamento e estes dados corroboram com as análises genéticas (LEITE *et al.*, 2007; DRUMOND *et al.*, 2008, *in press*). As amostras PSTV e ARAV, também isoladas de gado, apresentaram o mesmo padrão, menos virulento, da amostra GP2V.

- 5 Estas características foram similares àquelas encontradas para LST-BUT. Ao contrário, o perfil
virulento apresentado pela amostra GP1V foi similar ao da amostra SAV, que foi isolada de
roedor sentinela, e também ao da amostra VBH, proveniente de camundongos suíços a partir
de um surto de vaccinia murina no Brasil. A amostra WR, protótipo para outros estudos de
patogênese em camundongos, foi agrupada com estas amostras mais virulentas.
- 10 Camundongos inoculados com a amostra BAV perderam peso, mas o recuperaram.

Assim, analisando a região geográfica, local e ano de isolamento das BR-VACVs, o grupo
formado pelas amostras ARAV, PSTV e GP2V constituiu o grupo mais homogêneo, visto que
foram isoladas de bovinos, na região Sudeste do país, em anos próximos como 2000, 2001 e
15 2003, respectivamente (TRINDADE et. al., 2003; LEITE et.al., 2005; TRINDADE et.al., 2006). O
segundo grupo principal, formado por VBH, BAV, SAV e GP1V é mais heterogêneo, não sendo
observada nenhuma correlação de virulência com o hospedeiro, a região geográfica ou o ano
de isolamento das amostras vírais. Nesse grupo, BAV, SAV e VBH foram isolados de roedores,
enquanto GP1V foi isolado de gado; sendo que BAV foi isolado na região Norte do país
20 enquanto os demais vírus na região Sudeste. Em relação ao período de isolamento BAV e SAV
foram isolados em 1963 e 1965, respectivamente, enquanto VBH e GP1V foram isolados
posteriormente, nos anos de 1993 e 2001, respectivamente (FONSECA et. al., 1998;
MARQUES et. al., 2001; da FONSECA et. al., 2002, TRINDADE et. al., 2004; LEITE et. al.,
25 2005; TRINDADE et. al., 2006).

Análises filogenéticas do grupo de Poxvírus/Laboratório de Vírus mostraram divergências
suficientes para que as amostras GP1V e GP2V fossem agrupadas em clados diferentes
(TRINDADE et al., 2006, De SOUSA TRINDADE et al., 2007). LEITE e colaboradores (2007)
demonstraram a heterogeneidade dessas amostras em análises filogenéticas baseadas na
30 seqüência do gene que codifica para o corpúsculo de inclusão do tipo acidófilo (ati), permitindo
dividir as BR-VACVs em três grupos: (i) BAV, GP1V e VBH, que possuem o gene ati totalmente
deletado, (ii) ARAV, GP2V e PSTV, que possuem o gene ati, com duas deleções de 12 e 21 nt
e (iii) SAV que não apresenta deleções na região do gene ati (FONSECA et al., 2002). Clados
similaras foram obtidos por análises filogenéticas baseadas em seqüências do gene ha,
35 mostrando que ARAV, GP2V e PSTV estão mais próximas entre si, enquanto VBH, GP1V e
WR exibiram maior proximidade (TRINDADE et al., 2007).

5 DRUMOND e colaboradores (2008) também confirmaram com base em genes relacionados com virulência e tropismo viral, tais como k3L, B18, E3L dentre outros, que as BR-VACVs estão divididas em pelo menos dois grupos principais, com um clado constituído pelas amostras GP2V, ARAV e PSTV e o outro composto pelas amostras VBH, SAV, BAV, GP1V e WR. Os dois grupos possuem subdivisões, sendo que no primeiro, observa-se que ARAV e GP2V são
10 mais proximamente relacionados entre si do que com PSTV. Já no segundo grupo, as amostras BAV, GP1V e VBH apresentam-se mais relacionadas entre si do que com SAV. TRINDADE e colaboradores (2007) compararam sequências de 3 genes (A56R, B19R e E3L) e o rpo132 e todas as análises geraram dois clados distintos de BR-VACVs que coincidem com aqueles mostrados por DRUMOND e colaboradores 2008, indicando uma relação próxima de
15 WR com as amostras GP1V, VBH, BAV e SAV. Estes dados genéticos sugerem que as amostras de BR-VACV poderiam ter uma origem diversa e em todas as análises nenhuma BR-VACV apresentou similaridade maior com a amostra vacinal LST-BUT ou mostrou ter originado de amostras vacinais. Estes dados contradizem aos publicados por DAMASO e colaboradores (2001), cujas análises filogenéticas indicaram que o VACV Cantagalo apresentou-se mais
20 proximamente relacionado com o VACV-IOC. Esta amostra foi utilizada pelo Instituto Oswaldo Cruz na produção de vacinas durante a campanha de erradicação da varíola no Brasil, sugerindo que a amostra brasileira Cantagalo poderia ter originado da amostra vacinal.

25 Todos estes dados, biológicos e moleculares, indicam a existência de um maior número de populações de vírus circulando no Brasil ou até em um mesmo surto de vaccinia bovina (TRINDADE et al., 2006). Também mostram que as diferenças genéticas entre as amostras de BR-VACVs corroboram com as diferenças biológicas detectadas em camundongos Balb/c. Porém, a origem dessas amostras e como estão circulando na natureza permanecem indeterminados. Estudos com um maior número de amostras poderiam auxiliar no estabelecimento da correlação da filogenia com virulência, hospedeiro, época e região de
30 ocorrência dessas amostras, como já foi demonstrado para as amostras MPXV e VARV, como descrito a seguir.

35 Dados atuais vêm tentando correlacionar a virulência de amostras de OPXV tanto geográfica quanto temporalmente. ESPOSITO e colaboradores (2006) utilizaram 45 amostras de VARV, isoladas em diferentes partes do mundo e estas, mesmo apresentando uma baixa diversidade genética, foram subdivididas em três grupos filogenéticos diferentes. Essa subdivisão em três grupos é coincidente com a origem geográfica e com as taxas de casos fatais associados a

5 essas amostras. Em 2007, LI e colaboradores utilizaram sequências do genoma de 47 amostras de VARV, isoladas de diversos locais geográficos. Os autores observaram a formação de dois clados, um representado pela VARV major, uma forma clinicamente mais severa de varíola e o outro composto pelo alastrim minor, uma amostra fenotipicamente mais branda e também por isolados da África Oriental. Estudos recentes demonstraram que existem
 0 dois diferentes grupos filogenéticos de MPXV na África, que são correlacionados com as diferenças epidemiológicas e as características clínicas da doença causada pelos vírus dos diferentes clados (LIKOS et. al., 2005).

Também corroborando com os resultados biológicos e genéticos obtidos, estudos feitos por
 5 TRIGUEIRO (2004) demonstraram que as amostras ARAV e GP2V mostraram-se mais sensíveis aos efeitos antivirais do interferon alfa/beta recombinante (IFN α / β R) em comparação com as amostras GP1V, BAV, SAV e VBH. Estes dados poderiam explicar, em parte, a menor virulência causada pelas amostras ARAV e GP2V, entretanto estudos adicionais sobre o sistema do escape imunológico destes vírus devem ser feitos.

0 A existência de diferentes populações virais co-circulando pode apontar importantes implicações nas zoonoses emergentes, pois da mesma forma que dois vírus diferentes podem circular em fazendas vizinhas, eles também poderiam o fazer em uma mesma fazenda e até mesmo em um único hospedeiro. Isso poderia facilitar o aparecimento de recombinantes, que
 5 por sua vez poderia levar ao aparecimento de amostras mais virulentas como mostrado nas infecções em camundongos Balb/c no modelo intranasal, fato que, possivelmente, poderia ilustrar a virulência das amostras virais na natureza.

A princípio, todas as diferenças de virulência citadas anteriormente não estão relacionadas com
 0 o hospedeiro tampouco com o local ou período de isolamento das amostras de BR-VACV. As diferenças apresentadas por estas amostras também sugere que não estão relacionadas com a adaptação dos vírus a diferentes hospedeiros, pois as amostras BAV, SAV e VBH foram altamente virulentas para camundongos e estas foram isoladas a partir de roedores. Outro ponto a ser discutido é que o espectro de hospedeiros dos VACV pode ser amplo. Sendo
 5 assim, os roedores, por exemplo, não seriam, necessariamente, os hospedeiros definitivos destas amostras que poderiam, acidentalmente, terem sido isoladas de roedores.



5 A emergência das doenças causadas por VACV, como outras doenças infecciosas deve estar co-relacionado à evolução dos seus agentes causadores e seus hospedeiros (WOOLHOUSE et al., 2005). Durante os surtos de vaccínia bovina no Brasil, bovinos e o homem são afetados. Entretanto, os reservatórios desses vírus ainda não foram identificados, mas provavelmente incluem animais domésticos e ou/silvestres (GUEDES, 2006). A diversidade dos OPXV e, mais
10 especificamente, dos VACV com seus hospedeiros vertebrados necessitam de mais estudos e, no Brasil, há uma escassez de dados sobre a epidemiologia e a ecologia das espécies de OPXV. É importante a busca de seus reservatórios naturais, visto que estes são responsáveis pela manutenção destes vírus na natureza. Anticorpos contra OPXV foram detectados em muitas espécies animais infectadas naturalmente em uma região de Lago, em Tocantins, tais
15 como macacos, tamanduás dentre outros como mostrado por GUEDES em 2006. Nestes estudos, foi detectada a soroprevalência contra OPXV em várias espécies, indicando a infecção por OPXV em várias espécies de mamíferos. Além disso, anticorpos neutralizantes contra OPXV foram detectados em várias espécies de roedores, gatos domésticos e outros carnívoros (TRYLAND et al., 1998; PELKKONEN et al., 2003; LAAKKONEN et al., 2006).

20 Adicionalmente, em outras regiões do Brasil, foi comprovada que grande parte da população humana está sendo exposta constantemente aos OPXV selvagens como descrito por MOTA (2006). Estes estudos demonstraram que indivíduos *H. sapiens* não vacinados, nascidos após o término da campanha de vacinação contra a varíola, foram soropositivos para OPXV.

25 Após a compreensão sobre a grande diversidade biológica e genética e sobre os diferentes níveis de virulência apresentados entre as amostras de BR-VACV, ainda resta a busca do entendimento sobre o modo pelo qual os VACV se mantêm na natureza. Os reservatórios destes vírus são desconhecidos e não se sabe sobre a cadeia de transmissão na natureza. Há
30 uma grande especulação do modo pelo qual a doença acomete nas vacas, visto que estudos epidemiológicos não são suficientes para explicar como a doença surge nas fazendas ou a rota da doença entre as fazendas. Em busca de uma explicação para estas questões, este estudo buscou identificar as possíveis vias pelas quais estes vírus poderiam estar sendo eliminados na natureza.

5 Existem poucos dados sobre as vias de eliminação dos OPXV e não há estudos disponíveis sobre as vias de eliminação dos BR-VACV. Estudos envolvendo o VARV, CPXV e ECMV demonstraram o papel das vias de eliminação como fezes, urina, fluidos orofaringeos e secreções da conjuntiva sendo algumas das possíveis vias responsáveis pela eliminação dos poxvírus (revisado por FENNER *et al.*, 1989; revisado por BREMAN & HENDERSON, 2002). O
10 VARV, durante infecções humanas, eliminavam partículas virais através da saliva, secreções da conjuntiva e urina de pacientes (SARKAR *et al.*, 1973). Particulas de ECTV podem ser detectadas em excretas de camundongos durante algumas semanas após infecção (FENNER, 1989) e estudos mostraram que gaiolas contendo camundongos infectados por ECTV foram
15 infectivas para camundongos não infectados e apresentou-se ainda mais alta em gaiolas onde os camundongos infectados morrem e praticam o canibalismo. MAIBORODA (1982), utilizando o modelo *Rattus norvegicus* para inoculação com o *Ratpox virus*, uma variante biológica de CPXV, mostrou excreção por 30 dias após infecção de partículas infecciosas nas fezes e urina de ratos. Em contrapartida, GAERTNER e colaboradores (2003) em estudos feitos com camundongos Swiss, em inoculações subcutâneas ou intra-retais, demonstraram que tanto
20 camundongos colocados em serragem de animais infectados como aqueles colocados diretamente em contato com animais infectados foram soronegativos para OPXV. Entretanto, sugerem que a transmissão horizontal deve ser investigada.

Assim, visto que os roedores poderiam ser os reservatórios dos VACV e poderia eliminar este
25 vírus em excretas e fluidos orofaríngeos, foi iniciado um estudo pela busca de como os VACV poderiam eliminar o vírus WR, protótipo do gênero. Como citado anteriormente em estudos comparativos de virulência, a amostra WR causou 100% de mortalidade durante 6 dias após inoculação intranasal. Tanto DNA viral quanto partículas infecciosas foram detectadas em amostras fecais e urina coletadas dos camundongos durante os 6 dias de infecção (FIGURA 17
30 A e 17B). DNA viral foi detectado na saliva, o que poderia indicar outra via de eliminação, embora partículas infecciosas não tenham sido detectadas nestas amostras (FIGURA 17C).

Pelo fato das excretas apresentarem-se como fonte potencial de eliminação de partículas virais,
35 estas poderiam também, ser veículos de transmissão de VACV na natureza, visto que a disseminação e a manutenção destes vírus trazem importantes informações ecológicas. Desta maneira, foi feito um experimento de transmissão horizontal que mimetiza a infecção natural dos VACV em Balb/c. Embora nenhum dos camundongos infectados naturalmente (colocados em serragem contaminada) apresentassem sinais clínicos da doença, eles se tornaram

5 infectados como demonstrado por (i) detecção de DNA viral e partículas infecciosas nas fezes e urina, (ii) presença de partículas infecciosas nos intestinos por titulação viral, (iii) detecção de anticorpos neutralizantes específicos contra OPXV e (iv) análises histopatológicas que indicaram a multiplicação viral no intestino. O fato de que os camundongos infectados pela via natural com WR não apresentaram sinais clínicos da doença, poderia estar associado aos
10 baixos títulos virais e a outras possíveis vias de infecção que não a via intranasal. Este fato também traz questões sobre o possível estabelecimento de uma infecção subclínica, sem doença letal ou aguda, que poderia ocorrer em reservatórios naturais dos VACV com a constante eliminação de vírus nas fezes e consequente transmissão para outros animais.
15 Estudos paralelos de eliminação e transmissão mais aprofundados das BR-VACVs estão sendo feitos por pesquisadores do Laboratório de Vírus.

Ainda no intuito de quantificar a carga viral presente nas fezes destes camundongos infectados com a amostra WR, a PCR em tempo real foi feita, porém não foi eficaz, provavelmente devido à presença de DNA bacteriano e outros contaminantes. Outras possíveis maneiras de
20 quantificar este material poderiam ser feitas com a extração prévia do DNA viral, diminuindo, assim, os contaminantes ou utilizar sondas específicas para a utilização na técnica, aumentando a sensibilidade, visto que o Syber green utilizado se liga a todo DNA de fita dupla (GIULIETTI *et al.*, 2001).

25 Os resultados de histopatologia (FIGURA 19), que são compatíveis com estudos prévios de infecções naturais ou experimentais com OPXV (ZAUCHA *et al.*, 2001), em adição aos dados de titulação da amostra WR no intestino de camundongos (FIGURA 18), indicam que este órgão poderia ser o local de multiplicação do vírus, eliminando as partículas infecciosas lentamente durante o período de infecção. A capacidade dos OPXV replicar no intestino, como previamente
30 observado em outros estudos (GOFF *et al.*, 2007) poderia ser um recurso permanente de contaminação fecal por VACV (MAIBORODA, 1982). Assim, aquelas partículas infecciosas poderiam contribuir para a manutenção viral e transferência contínua entre seu espectro de hospedeiros. Além disso, resultados deste trabalho confirmam a eliminação viral através das fezes e urina durante todo o curso de infecção. Considerando a resistência ambiental intrínseca
35 dos VACV (ESSBAUER *et al.*, 2007) associado à grande variedade de micro-nichos presentes nas fezes, estas poderiam contribuir para a manutenção da viabilidade dos vírions algum tempo após a excreção.

5 Sabendo-se da possibilidade de eliminação e transmissão horizontal de VACV através das excretas no modelo Balb/c, seria necessário considerar algumas características inerentes aos possíveis hospedeiros, tais como os roedores, o ambiente e o próprio vírus. As características biológicas e ambientais dos roedores, tais como a vida em comunidades super-populosas e hábitos de coprofagia, poderiam favorecer a circulação do vírus entre os roedores através da
10 ingestão/finalização de excretas contaminadas, como pode ser observado para outras zoonoses (HJELLE et al., 1995). Entretanto, desde que infecções por OPXV estejam, geralmente, associadas com mais de uma rota de transmissão, outras vias como a respiratória, contato pele/mucosa ou transmissão vertical não poderiam ser descartadas (FENNER, 1989). No que diz respeito ao meio ambiente, os surtos de vaccínia bovina, geralmente, ocorrem em pequenas
15 propriedades com infra-estruturas precárias (LEITE et al., 2005). Nestas fazendas, os bovinos muitas vezes, têm contato com roedores domésticos ou selvagens e também com suas excretas, não sendo difícil encontrar fezes de roedores ao redor dos currais, como em palióis e ferramentas (GUEDES, 2007 - comunicação pessoal). Assim, a transmissão viral através de excretas contaminadas não pode ser descartada.

20 Devido à existência da grande diversidade biológica e genética apresentada pelas amostras de BR-VACV somada aos prejuízos econômicos relacionados à saúde humana e animal, causados pela vaccínia bovina em diversas regiões do Brasil, a produção de um imunógeno inativado seguro se faz necessário para futuras aplicações no campo para bovinos. Para isto, a amostra
25 viral BAV foi selecionada por ser a única isolada de um roedor silvestre e que contém estudos biológicos e moleculares (MARQUES et al., 2001). LANNA (1980), em inoculações pela via intracerebral em neonatos Balb/c com a amostra BAV, observou que esta amostra apresentava-se menos virulenta que a amostra WR, o que está de acordo com nossos estudos em camundongos Balb/c adultos, infectados pela via intranasal. Além disso, BAV apresentou LD₅₀
30 menor entre as amostras estudadas e é antigenicamente relacionado com outras amostras de poxvírus isolados no Brasil (FONSECA et al., 1998).

Assim sendo, em busca de um método eficiente para a produção do imunógeno inativado, foi observado que a multiplicação viral em CAM dos ovos embrionados é mais rápida e mais barata que a multiplicação em células, sendo que os títulos virais obtidos em ambos os sistemas não diferiram significativamente. Repique de células duram, aproximadamente, três semanas até que as 30 garrafas (75 cm³), contendo 8 x 10⁷ células cada uma, apresentem 90% de confluência para posterior infecção viral. Além disso, a manipulação de células é trabalhosa e

- 5 há o risco de contaminação, fato que ocorre com freqüência em cultura de tecidos. Quanto ao custo do sistema, os meios de cultivo e o soro utilizado são caros, o que torna a produção em células dispendiosa. Outro fator a ser considerado é que o soro fetal bovino, usado como fator de crescimento, adicionado ao meio de cultivo, pode conter príons. Analisando-se o tempo de produção viral, a inoculação em CAM é mais rápida visto que os ovos embrionados chegam ao
- 10 laboratório no tempo de inoculação (aos nove dias de incubação) e a manipulação é consideravelmente mais fácil, excetuando-se o problema de contaminação. Adicionalmente, o custo dos ovos é inferior quando comparado ao da produção viral em células, sendo o método selecionado para a produção do imunógeno inativado BAV.
- 15 Após a multiplicação viral em CAM, a produção do imunógeno passou pelo processo de purificação em colchão de sacarose. Assim, a maior parte das partículas produzidas foi constituída de IMV. TURNER & SQUIRES (1971) mostraram que vacinas inativadas utilizando a amostra Lister induziram imunidade dérmica em coelhos e protegeram camundongos contra o desafio intra-cerebral. Estes autores também mostraram que tanto coelhos imunizados com o
- 20 vírus vivo quanto com o vírus inativado juntamente com adjuvantes, responderam à imunização com altos títulos de anticorpos neutralizantes. Entretanto, na imunidade dérmica, o desafio viral causou lesões na pele de coelhos controles, enquanto induziu lesões menores em coelhos imunizados com a vacina inativada e nenhuma lesão em animais imunizados com o vírus vivo. Estudos demonstram que há diferenças antigênicas entre os vírus IMV e EEV O IMV e o EEV
- 25 inativados conferiram uma imunidade não correlacionada à resposta humoral (VANDERPLASSCHEN *et al.*, 1997; FOGG *et al.*, 2004). FOGG e colaboradores (2004) descreveram a atividade neutralizante anticorpos contra proteínas do IMV, como A27 e H3 que foram capazes de proteger parcialmente camundongos da infecção intraperitoneal com a amostra WR, enquanto combinações de proteínas do IMV e EEV protegeram completamente da
- 30 infecção.

A inativação do vírus BAV por luz UV mostrou ser dose-dependente da concentração viral (FIGURA 20). Quando comparada à eficiência da inativação por métodos físicos e químicos, em células Vero, MCA (TABELA 12) e em camundongos Balb/c neonatos (TABELA 13), ambos os

35 métodos foram eficientes para a completa inativação a partir de uma concentração viral de 10^7 pfu. Em testes de inativação de poxvírus, são utilizadas passagens seriadas do vírus inativado em células Vero (SOMECK *et al.*, 2004), porém estudos paralelos do grupo de Poxvírus do Laboratório de Vírus detectaram que em alguns testes de inativação, amostras consideradas

- 5 inativadas para inoculação em células Vero foram positivas em CAM e neonatos, mostrando que inoculações em CAM e neonatos são mais sensíveis para testes de inativação. Camundongos neonatos com dois dias de idade, por não apresentarem ainda um sistema imune formado, se tornam altamente suscetíveis às infecções. A inoculação em CAM também se mostrou eficiente quando comparado ao modelo *in vivo*, sendo, assim um método eficaz para testes de inativação viral. THORNTON (1980), testando a imunogenicidade contra VACV, 10 também utilizou CAM para os testes de inativação e verificou que a inativação com baixas doses de BPL e luz UV em poucos segundos induziram a completa inativação viral com resultados satisfatórios de antigenicidade e imunogenicidade.
- 15 Com o objetivo de fazer a produção do imunógeno inativado com o vírus BAV, em grande escala, observou-se que a execução da técnica seria mais difícil utilizando-se luz UV devido à dificuldade da técnica. A medida da energia (J/cm^3) emitida pela luz UV seria necessária para padronizar a inativação e, além disso, também seria difícil obter uma película fina para a penetração da luz UV em meio contendo o vírus em placas de Petri grandes, fatos que 20 dificultaram a continuação desta metodologia. Assim, devido à facilidade da inativação por BPL em relação a luz UV, esta foi selecionada para a produção do imunógeno.

A próxima etapa da produção do imunógeno foi a seleção do adjuvante, visto que um imunógeno inativado necessita de adjuvantes para melhor indução do sistema imune 25 (MEEUSEN *et al.*, 2007). Dentre os adjuvantes testados, aqueles que apresentaram melhor resultado frente aos testes de desafio foram os imunógenos produzidos a base de $Al(OH)_3$ e EMU. Nos testes de desafio por escarificação nas patas, os imunógenos contendo EMU e $Al(OH)_3$ foram os que induziram menores lesões em um menor período de tempo (FIGURAS 24A e 24B). Os títulos de anticorpos detectados por ELISA foram maiores nos camundongos 30 imunizados com o imunógeno a base de EMU (FIGURA 27) e o título de anticorpos neutralizantes foi o mesmo para ambos os adjuvantes. Camundongos imunizados com o antígeno inativado a base de EMU e desafiados pela via intranasal com WR perderam peso, mas o recuperaram, mostrando, mais uma vez, ser um adjuvante eficiente (FIGURA 26). Assim, 35 a produção do imunógeno a base do adjuvante EMU, com segunda imunização feita após 4 semanas, apresentou melhor indução de resposta humoral e também frente ao desafios virais.

O modelo intradérmico por escarificação nas patas foi utilizado neste trabalho para testes de desafio em experimentos com camundongos imunizados com diferentes formulações de

5 imunógenos inativados. A transmissão de VACV entre os bovinos e o homem no campo ocorrem pela via intradérmica e outros estudos demonstraram que este modelo é apropriado para testes de desafio (MILLER *et al.*, 1995; MILLER *et al.*, 1997). O modelo intranasal também foi utilizado para desafio, visto que a inoculação de WR em doses altas é letal para camundongos, permitindo, assim, avaliar se o imunógeno foi capaz de impedir, além da
10 infecção localizada, também uma infecção sistêmica.

Sabendo-se que tanto a luz UV quanto a BPL atuam no DNA viral (HULSKOTTE *et al.*, 1997; BOUDET *et al.*, 2001), a amostra viral BAV foi visualizada por AFM após inativação por ambos os processos. Esta ferramenta possibilita que, após inativações virais, haja a confirmação se as
15 partículas virais permanecem intactas. As imagens obtidas estão de acordo com as imagens de AFM de partículas de IMV purificadas do WR, incluindo a visualização de uma protrusão central típica (MALKIN *et al.*, 2003; CARDOSO & TRINDADE *et al.*, 2005). A presença de uma protrusão central observada nas imagens analisadas “em ar” pode ser devido a um processo de desidratação, quando as partículas podem sofrer colapso, resultando em imagens virais
20 exibindo uma área central proeminente, similares a observações por microscopia eletrônica (MALKIN *et al.*, 2003). TRINDADE e colaboradores (2007) mostraram que a técnica MFA é rápida e segura para teste de diagnóstico de OPXV após processos de purificação e inativação dos vírus por luz UV e detergente Triton X-100 0,2%, se mostrando uma ferramenta adicional de diagnóstico para detecção de OPXV que ocorrem naturalmente na natureza.

25 De fato, a AFM tem proporcionado um amplo espectro de oportunidades para manipulação de sistemas biológicos como células, DNA, bactérias e vírus de maneira não destrutiva, possibilitando a detecção e a visualização rápida destes em três dimensões além da facilidade de preparação da amostra (PLOMP *et al.*, 2002; DUFRÊME, 2004). A AFM permite determinar
30 as dimensões das partículas virais, disposição dos capsômeros, estrutura dos capsídeos virais, propriedades mecânicas e a arquitetura de suas superfícies (KUZNESTOV *et al.*, 2001; HINTERDORFER & DUFRÊME, 2006).

35 Este trabalho desenvolveu metodologias de infecção intradérmica e intranasal para o modelo murino, trazendo importantes informações sobre as diferenças biológicas entre as BR-VACV. A diversidade destas amostras somado aos eventos de mutação e recombinação faz com que estas possam se adaptar a novos hospedeiros, dando origem a amostras mais virulentas para homens e animais, fatos preocupantes que devem ser analisados. Além disso, modelos de

- 5 eliminação e transmissão murinos apresentados neste trabalho poderiam fornecer elementos para o entendimento da manutenção e transmissão de VACV na natureza. Os estudos de virulência e eliminação/transmissão de VACV contribuem para a compreensão sobre a interação vírus/hospedeiro, a biologia e a ecologia destes vírus. Adicionalmente, foi estabelecida uma metodologia para preparo de um imunógeno inativado seguro que poderá ter
10 aplicações futuras na clínica veterinária no controle da vacúnia bovina, uma zoonose que vem acarretando vários prejuízos econômicos.

15

20

25

30

35

5 8- CONCLUSÕES

- 10 ➤ O modelo de escarificação nas patas foi apropriado para mimetizar o curso de infecção de diferentes amostras de BR-VACV na natureza e também foi eficaz para testes de desafio em camundongos imunizados. Entretanto, os métodos de inoculação pelas vias escarificação nas patas e no dorso de camundongos não foram eficientes para diferenciar a virulência entre amostras de VACV.
- 15 ➤ O modelo de inoculação intranasal se mostrou apropriado para estudos comparativos de virulência com a presença de uma infecção sistêmica. Os dados mostram que os vírus podem ser divididos em três grupos os quais correspondem ao mesmo observado por análises filogenéticas prévias.
- 20 ➤ A utilização de MCA para a produção do imunógeno BAV foi considerada a mais eficiente. O imunógeno foi inativado com β -propiolactona e a melhor resposta imunogênica foi obtida a partir de camundongos que foram imunizados pelo método de primeira imunização e reforço feito após 4 semanas, com a adição do adjuvante Emulsigen®.
- 25 ➤ VACV são eliminados nas fezes, urina e saliva a partir da infecção intra-nasa de camundongos.

30

35

5 9- PERSPECTIVAS

- Estudar o padrão de virulência de BR-VACVs para outras linhagens de camundongos, tais como C57/BL6 e Swiss;
- 10 ➤ Estudar a resposta imune celular em camundongos infectados com as amostras de BR-VACVs que apresentaram diferentes perfis de virulência;
- 15 ➤ Avaliar aspectos da resposta celular em camundongos imunizados com o antígeno inativado BAV adicionado do adjuvante Emulsigen®.
- 20
- 25
- 30
- 35

5 10- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDALRHMAN, I., I. GURT e E. KATZ. Protection induced in mice against a lethal orthopox virus by the Lister strain of vaccinia virus and modified vaccinia virus Ankara (MVA). *Vaccine*, v.24, n.19, May 8, p.4152-60. 2006.
- 10 ABRAHÃO, J. S. Detecção de Vaccinia virus em espécimes clínicos utilizando a reação em cadeia da polimerase. Monografia de conclusão de curso. Departamento de Microbiologia-ICB-UFMG. 2006.
- AMANNA, I. J., M. K. SLIFKA e S. CROTTY. Immunity and immunological memory following smallpox vaccination. *Immunol Rev*, v.211, Jun, p.320-37. 2006.
- 15 ANDREW, M. E., B. E. COUPAR e D. B. BOYLE. Humoral and cell-mediated immune responses to recombinant vaccinia viruses in mice. *Immunol Cell Biol*, v.67 (Pt 5), Oct, p.331-7. 1989.
- BAXBY, D., M. BENNETT e B. GETTY. Human cowpox 1969-93: a review based on 54 cases. *Br J Dermatol*, v.131, n.5, Nov, p.598-607. 1994.
- 20 BELYAKOV, I. M., P. EARL, A. DZUTSEV, V. KUZNETSOV, M. LEMON, L. S. WYATT, J. T. SYNDER, J. D. AHLERS, G. FRANCHINI e B. MOSS. Shared modes of protection against poxvirus infection by attenuated and conventional smallpox vaccine viruses. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, v.100, n.16, Aug 5, p.9458-63. 2003.
- BICKNELL, W. J. The case for voluntary smallpox vaccination. *N Engl J Med*, v.346, 25 n.17, Apr 25, p.1323-5. 2002.
- BOMFORD, R. Will adjuvants be needed for vaccines of the future? *Dev Biol Stand*, v.92, p.13-7. 1998.
- BOOMKER, J. M., D. T. LUTTIKHUIZEN, H. VENINGA, L. F. DE LEIJ, T. H. THE, A. DE HAAN, M. J. VAN LUYN e M. C. HARMSEN. The modulation of angiogenesis in the foreign 30 body response by the poxviral protein M-T7. *Biomaterials*, v.26, n.23, Aug, p.4874-81. 2005.
- BRANDT, T. A. e B. L. JACOBS. Both carboxy- and amino-terminal domains of the vaccinia virus interferon resistance gene, E3L, are required for pathogenesis in a mouse model. *J Virol*, v.75, n.2, Jan, p.850-6. 2001.
- 35 BRAY, M., M. MARTINEZ, D. F. SMEE, D. KEFAUVER, E. THOMPSON e J. W. HUGGINS. Cidofovir protects mice against lethal aerosol or intranasal cowpox virus challenge. *J Infect Dis*, v.181, n.1, Jan, p.10-9. 2000.
- BREMAN, J. G. e D. A. HENDERSON. Diagnosis and management of smallpox. *N Engl J Med*, v.346, n.17, Apr 25, p.1300-8. 2002.

- 5 BREWER, J. M., M. CONACHER, C. A. HUNTER, M. MOHRS, F. BROMBACHER e J. ALEXANDER. Aluminium hydroxide adjuvant initiates strong antigen-specific Th2 responses in the absence of IL-4- or IL-13-mediated signaling. J Immunol, v.163, n.12, Dec 15, p.6448-54. 1999.
- 10 BRIODY, B. A. Response of mice to ectromelia and vaccinia viruses. Bacteriol Rev, v.23, n.2, Jun, p.61-95. 1959.
- 15 BROWN, E., T. G. SENKEVICH e B. MOSS. Vaccinia virus F9 virion membrane protein is required for entry but not virus assembly, in contrast to the related L1 protein. J Virol, v.80, n.19, Oct, p.9455-64. 2006.
- 20 BROYLES, S. S. Vaccinia virus transcription. J Gen Virol, v.84, n.Pt 9, Sep, p.2293-303. 2003.
- 25 BULLER, R. M. e G. J. PALUMBO. Poxvirus pathogenesis. Microbiol Rev, v.55, n.1, Mar, p.80-122. 1991.
- 30 BULLER, R. M. The BALB/c mouse as a model to study orthopoxviruses. Curr Top Microbiol Immunol, v.122, p.148-53. 1985.
- 35 BURTHE, S., S. TELFER, X. LAMBIN, M. BENNETT, D. CARSLAKE, A. SMITH e M. BEGON. Cowpox virus infection in natural field vole *Microtus agrestis* populations: delayed density dependence and individual risk. J Anim Ecol, v.75, n.6, Nov, p.1416-25. 2006.
- 40 CAMPOS, M. A. S. e KROON, E.G. Critical period for irreversible block of Vaccinia virus replication. Review Microbiology, v.24, 104-110. 1993.
- 45 CARDOSO, A. V. e TRINDADE, G. S. Interface between UV-treated or detergent-treated Vaccinia virus particles. Microsc Microanal 11, 86-89. 2005.
- 50 CARTER, G. C., M. LAW, M. HOLLINSHEAD e G. L. SMITH. Entry of the vaccinia virus intracellular mature virion and its interactions with glycosaminoglycans. J Gen Virol, v.86, n.Pt 5, May, p.1279-90. 2005.
- 55 CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Multistate Outbreak of Monkeypox - Illinois, Indiana, and Wisconsin. (2003). MMWR – Morbidity and Mortality Weekly Report 52, 537-540.
- 60 CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Vaccinia (Smallpox) Vaccine: Recommendation of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). (2001). MMWR – Morbidity and Mortality Weekly Report. 50, RR-10.
- 65 CHANTREY, J., H. MEYER, D. BAXBY, M. BEGON, K. J. BOWN, S. M. HAZEL T. JONES, W. I. MONTGOMERY e M. BENNETT. Cowpox: reservoir hosts and geographic range. Epidemiol Infect, v.122, n.3, Jun, p.455-60. 1999.

- 5 CHAUDHRI, G., V. PANCHANATHAN, H. BLUETHMANN e G. KARUPIAH. Obligatory requirement for antibody in recovery from a primary poxvirus infection. J Virol, v.80, n.13, Jul, p.6339-44. 2006.
- 10 CHAUDHRI, G., V. PANCHANATHAN, R. M. BULLER, A. J. VAN DEN EERTWEGH, E. CLAASSEN, J. ZHOU, R. DE CHAZAL, J. D. LAMAN e G. KARUPIAH. Polarized type 1 cytokine response and cell-mediated immunity determine genetic resistance to mousepox. Proc Natl Acad Sci U S A, v.101, n.24, Jun 15, p.9057-62. 2004.
- CONDIT, R. C. e E. G. NILES. Regulation of viral transcription elongation and termination during vaccinia virus infection. Biochim Biophys Acta, v.1577, n.2, Sep 13, p.325-36. 2002.
- 15 CONDIT, R. C., N. MOUSSATCHÉ e P. TRAKTMAN. In a nutshell: structure and assembly of the vaccinia virion. Adv Virus Res, v.66, p.31-124. 2006.
- CORAS, B., S. ESSBAUER, M. PFEFFER, H. MEYER, J. SCHRODER, W. STOLZ, M. LANDTHALER e T. VOGT. Cowpox and a cat. Lancet, v.365, n.9457, Jan 29-Feb 4, p.446. 2005.
- 20 COX, J. C. e A. R. COULTER. Adjuvants—a classification and review of their modes of action. Vaccine, v.15, n.3, Feb, p.248-56. 1997.
- CROTTY, S., P. FELGNER, H. DAVIES, J. GLIDEWELL, L. VILLARREAL e R. AHMED. Cutting edge: long-term B cell memory in humans after smallpox vaccination. J Immunol, v.171, n.10, Nov 15, p.4969-73. 2003.
- 25 CYRKLAFF, M., C. RISCO, J. J. FERNANDEZ, M. V. JIMENEZ, M. ESTEBAN, W. BAUMEISTER e J. L. CARRASCOSA. Cryo-electron tomography of vaccinia virus. Proc Natl Acad Sci U S A, v.102, n.8, Feb 22, p.2772-7. 2005.
- DA FONSECA, F. G., E. J. WOLFFE, A. WEISBERG e B. MOSS. Effects of deletion or stringent repression of the H3L envelope gene on vaccinia virus replication. J Virol, v.74, n.16, Aug, p.7518-28. 2000.
- 30 DA FONSECA, F. G., G. S. TRINDADE, R. L. SILVA, C. A. BONJARDIM, P. C. FERREIRA e E. G. KROON. Characterization of a vaccinia-like virus isolated in a Brazilian forest. J Gen Virol, v.83, n.Pt 1, Jan, p.223-8. 2002.
- DA FONSECA, F. G., R. L. SILVA, J. T. MARQUES, P. C. FERREIRA e E. G. KROON. The genome of cowpox virus contains a gene related to those encoding the epidermal growth factor, transforming growth factor alpha and vaccinia growth factor. Virus Genes, v.18, n.2, p.151-60. 1999.

- 5 DAMASO, C. R., J. J. ESPOSITO, R. C. CONDIT e N. MOUSSATCHÉ. An emergent
poxvirus from humans and cattle in Rio de Janeiro State: Cantagalo virus may derive from
Brazilian smallpox vaccine. Virology, v.277, n.2, Nov 25, p.439-49. 2000.
- 10 DE SOUZA TRINDADE, G., B. P. DRUMOND, M. I. GUEDES, J. A. LEITE, B. E. MOTA, M.
A. CAMPOS, F. G. DA FONSECA, M. L. NOGUEIRA, Z. I. LOBATO, C. A. BONJARDIM, P. C.
FERREIRA e E. G. KROON. Zoonotic vaccinia virus infection in Brazil: clinical description and
implications for health professionals. J Clin Microbiol, v.45, n.4, Apr, p.1370-2. 2007.
- 15 DI GIULIO, D. B. e P. B. ECKBURG. Human monkeypox: an emerging zoonosis. Lancet Infect Dis, v.4, n.1, Jan, p.15-25. 2004.
- 20 DINIZ, S., G. S. TRINDADE, F. G. FONSECA e E. G. KROON. Surto de varíola murina em
camundongos suíços em biotérios – relato de caso. Arq Bras Med Vet Zootec v.53, p. 152-156.
2001.
- 25 DONATELE, D. M., C. E. P. F. TRAVASSOS, S. R. F. PEREIRAG, A. T. S. FERNANDES,
R. S. Q. S. MARINS, L. F. P. VIEIRA e FREITAS, A. C. Epidemiologic study of bovine poxviral
disease in the southern region of Espírito Santo State, Brazil. Em: XIV Encontro Nacional de
Virologia, 2003, Florianópolis. J Br Soc Vir 8, 79-79. 2003.
- 30 DRAZEN, J. M. Smallpox and bioterrorism. N Engl J Med, v.346, n.17, Apr 25, p.1262-3.
2002.
- 35 DREXLER, I., C. STAIB e G. SUTTER. Modified vaccinia virus Ankara as antigen delivery
system: how can we best use its potential? Curr Opin Biotechnol, v.15, n.6, Dec, p.506-12.
2004.
- 40 DRUMOND, B. P. Sequenciamento e análise das regiões terminais invertidas e repetidas e
de genes relacionados ao tropismo e virulência de amostras brasileiras de *Vaccinia virus* e da
amostra vacinal lyster butantan. Tese de Doutorado. Departamento de Microbiologia-ICB-UFMG.
2007.
- 45 DRUMOND, B. P., J. A. LEITE, F. G. FONSECA, C. A. BONJARDIM, P. C. P. FERREIRA e
E. G. KROON. Brazilian Vaccinia virus strains are genetically divergent and differ from the Lister
vaccine strain. *Microbes Infect.* in press. 2008.
- 50 DUFRÊME, Y. F. Using nanotechniques to explore microbial surfaces. Nat Ver Microbiol,
v.2, p. 451-460. 2004.
- 55 DUMBELL, K. e M. RICHARDSON. Virological investigations of specimens from
buffaloes affected by buffalopox in Maharashtra State, India between 1985 and 1987. Arch Virol,
v.128, n.3-4, p.257-67. 1993.

- 5 EDGHILL-SMITH, Y., H. GOLDING, J. MANISCHEWITZ, L. R. KING, D. SCOTT, M. BRAY, A. NALCA, J. W. HOOPER, C. A. WHITEHOUSE, J. E. SCHMITZ, K. A. REIMAN e G. FRANCHINE. Smallpox vaccine-induced antibodies are necessary and sufficient for protection against monkeypox virus. Nat Med, v.11, n.7, Jul, p.740-7. 2005.
- 10 ELLENBERGER, C., K. F. SCHUPPEL, M. MOHRING, A. REISCHAUER, M. ALEX, C. P. CZERNY, A. FERCHO e H. A. SCHOON. Cowpox virus infection associated with a streptococcal septicaemia in a foal. J Comp Pathol, v.132, n.1, Jan, p.101-5. 2005.
- 15 ESPOSITO, J. J. e J. C. KNIGHT. Orthopoxvirus DNA: a comparison of restriction profiles and maps. Virology, v.143, n.1, May, p.230-51. 1985.
- .5 ESPOSITO, J. J., and FENNER, F. Poxviruses in Fields' Virology. (2001). Fields, B. N., Knipe, D. M., Howley, P. M., Griffin, D. E. 4(2) Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, PA – USA, p. 2885 – 2921.
- !0 ESPOSITO, J. J., S. A. SAMMONS, A. M. FRACE, J. D. OSBORNE, M. OLSEN-RASMUSSEN, M. ZHANG, D. GOVIL, I. K. DAMON, M. LAKER, Y. LI, G. L. SMITH, H. MEYER, J. W. LEDUC e R. M. WOHLHUETER. Genome sequence diversity and clues to the evolution of variola (smallpox) virus. Science, v.313, n.5788, Aug 11, p.807-12. 2006.
- !5 ESSBAUER, S., H. MEYER, M. PORSH-OZCURUMEZ e M. PFEFFER. Long-lasting stability of vaccinia virus (orthopoxvirus) in food and environmental samples. Zoonoses Public Health, v.54, n.3-4, p.118-24. 2007.
- .5 ESTEBAN, D. J. e R. M. BULLER. Ectromelia virus: the causative agent of mousepox. J Gen Virol, v.86, n.Pt 10, Oct, p.2645-59. 2005.
- 15 FANG, M. e L. J. SIGAL. Antibodies and CD8+ T cells are complementary and essential for natural resistance to a highly lethal cytopathic virus. J Immunol, v.175, n.10, Nov 15, p.6829-36. 2005.
- 20 FENNER F. Poxviruses in Fields' Virology. Fields, B.N., Knipe, D. M., Howley, P. M. and Griffin, D. E. Lippincott-Raven Publishers. Philadelphia, PA – USA 3, 2673-2701. 1996.
- 25 FENNER, F. Adventures with poxviruses of vertebrates. FEMS Microbiol Rev, v.24, n.2, Apr, p.123-33. 2000.
- 30 FENNER, F. Risks and benefits of vaccinia vaccine use in the worldwide smallpox eradication campaign. Res Virol, v.140, n.5, Sep-Oct, p.465-6; discussion 487-91. 1989.
- 35 FENNER, R., HENDERSON, D.A., JEKEK, A.Z e LADNYI, I.D. Smallpox and Its Eradication. Geneva: World Health Organization. 1988.
- 40 FERNANDES, A. T. S., S. R. F. G. PEREIRA, C. E. P. F. TRAVASSOS, D. M., DONATELE, R. S. Q. S. MARINS, L. F. P. VIERIA e FREITAS, A. C. Outbreak of poxviral disease affecting

- 5 milk farmers in São Francisco de Itabapoama country, Rio de Janeiro State, Brazil: Epidemiological Survey and Containment of New Outbreaks. Em: XIV Encontro Nacional de Virologia, 2003, Florianópolis. Virus Reviews & Research – J Braz Soc Virol 8, 79-80. 2003
- FERRIER-REMBERT, A., R. DRILLIEN, J. N. TOURNIER, D. GARIN e J. M. CRANCE. Intranasal cowpox virus infection of the mouse as a model for preclinical evaluation of smallpox vaccines. Vaccine, v.25, n.25, Jun 15, p.4809-17. 2007.
- FOGG, C., S. LUSTIG, J. C. WHITBECK, R. J. EISENBERG, G. H. COHEN e B. MOSS. Protective immunity to vaccinia virus induced by vaccination with multiple recombinant outer membrane proteins of intracellular and extracellular virions. J Virol, v.78, n.19, Oct, p.10230-7. 2004.
- 15 FONSECA, F. G., M. C. LANNA, M. A. CAMPOS, E. W. KITAJIMA, J. N. PERES, R. R. GOLGHER, P. C. FERREIRA e E. G. KROON. Morphological and molecular characterization of the poxvirus BeAn 58058. Arch Virol, v.143, n.6, p.1171-86. 1998.
- FRAZATTI-GALLINA, N. M., R. M. MOURAO-FUCHES, R. L. PAOLI, M. L. SILVA, C. MIYAKI, E. J. VALENTINI, I. RAW e H. G. HIGASHI. Vero-cell rabies vaccine produced using serum-free medium. Vaccine, v.23, n.4, Dec 9, p.511-7. 2004.
- 20 FREY, S. E. e R. B. BELSHE. Poxvirus zoonoses—putting poxes into context. N Engl J Med, v.350, n.4, Jan 22, p.324-7. 2004.
- FULGINITI, V. A., A. PAPIER, J. M. LANE, J. M. NEFF e D. A. HENDERSON. Smallpox vaccination: a review, part II. Adverse events. Clin Infect Dis, v.37, n.2, Jul 15, p.251-71. 2003.
- 25 GAERTNER, D. J., M. BATCHELDER, L. H. HERBST e H. L. KAUFMAN. Administration of vaccinia virus to mice may cause contact or bedding sentinel mice to test positive for orthopoxvirus antibodies: case report and follow-up investigation. Comp Med, v.53, n.1, Feb, p.85-8. 2003.
- GEDDES, A. M. The history of smallpox. Clin Dermatol, v.24, n.3, May-Jun, p.152-7. 30 2006.
- GHERARDI, M. M. e M. ESTEBAN. Recombinant poxviruses as mucosal vaccine vectors. J Gen Virol, v.86, n.Pt 11, Nov, p.2925-36. 2005.
- 35 GIULIETTI, A., L. OVERBERGH, D. VALCKX, B. DECALLONNE, R. BOUILLON e C. MATHIEU. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. Methods, v.25, n.4, Dec, p.386-401. 2001.
- GLEDHILL, A. W. Latent ectromelia. Nature, v.196, Oct 20, p.298. 1962.



- 5 GOFF, A., N. TWENHAFEL, A. GARRISON, E. MUCKER, J. LAWLER e J. PARAGAS.
In vivo imaging of cidofovir treatment of cowpox virus infection. Virus Res, v.128, n.1-2, Sep,
p.88-98. 2007.
- 0 GUBSER, C., S. HUE, P. KELLAM e G. L. SMITH. Poxvirus genomes: a phylogenetic
analysis. J Gen Virol, v.85, n.Pt 1, Jan, p.105-17. 2004.
- 0 GUEDES, M. I. M. C., M. F. SOUZA JUNIOR, G. S. TRINDADE, J. A. LEITE, B. P.
DRUMOND, J. M. S. FERREIRA, C. A. BONJARDIM, P. C. P. FERREIRA e KROON, E. G.
Occurrence of Orthopoxvirus infection in native mammal species in Brazil. : XVI Encontro
Nacional de Virologia, 2005, Salvador. Virus Reviews and Research 10. 2005.
- 5 GUPTA, R. K. Aluminum compounds as vaccine adjuvants. Adv Drug Deliv Rev, v.32,
n.3, Jul 6, p.155-172. 1998.
- GUY, B. The perfect mix: recent progress in adjuvant research. Nat Rev Microbiol, v.5,
n.7, Jul, p.505-17. 2007.
- HAGA, I. R. e A. G. BOWIE. Evasion of innate immunity by vaccinia virus. Parasitology,
v.130 Suppl, p.S11-25. 2005.
- 0 HAMMARLUND, E., M. W. LEWIS, S. G. HANSEN, L. I. STRELOW, J. A. NELSON, G.
J. SEXTON, J. M. HANIFIN e M. K. SLIFKA. Duration of antiviral immunity after smallpox
vaccination. Nat Med, v.9, n.9, Sep, p.1131-7. 2003.
- HAYASAKA, D., F. A. ENNIS e M. TERAJIMA. Pathogeneses of respiratory infections
with virulent and attenuated vaccinia viruses. Virol J, v.4, p.22. 2007.
- 5 HENDERSON, D. A., T. V. INGLESBY, J. G. BARTLETT, M. S. ASCHER, E. EITZEN, P.
B. JAHLING, J. HAUER, M. LAYTON, J. MCDADE, M. T. OSTERHOLM, T. O'TOOLE, G.
PARKER, T. PERL, P. K. RUSSELL e K. TONAT. Smallpox as a biological weapon: medical and
public health management. Working Group on Civilian Biodefense. Jama, v.281, n.22, Jun 9,
p.2127-37. 1999.
- 0 HULSKOTTE, E. G., M. E. DINGS, S. G. NORLEY e A. D. OSTERHAUS. Chemical
inactivation of recombinant vaccinia viruses and the effects on antigenicity and immunogenicity
of recombinant simian immunodeficiency virus envelope glycoproteins. Vaccine, v.15, n.17-18,
Dec, p.1839-45. 1997.
- 5 HUSAIN, M. e B. MOSS. Role of receptor-mediated endocytosis in the formation of
vaccinia virus extracellular enveloped particles. J Virol, v.79, n.7, Apr, p.4080-9. 2005.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2006. (Acessado em 18 de janeiro
de 2008 em <http://www.ibge.com.br>).

5 ICTV International Committee on Taxonomy of Viruses. 2006. The Big picture Book of
Viruses: Poxviridae. (acessado em 18 de Janeiro de 2008 em
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/index.htm>).

10 ISLAS, A. L., J. M. VOS e P. C. HANAWALT. Differential introduction and repair of
psoralen photoadducts to DNA in specific human genes. Cancer Res, v.51, n.11, Jun 1, p.2867-
73. 1991.

15 JACKSON, R. J., A. J. RAMSAY, C. D. CHRISTENSEN, S. BEATON, D. F. HALL e I. A.
RAMSHAW. Expression of mouse interleukin-4 by a recombinant ectromelia virus suppresses
cytolytic lymphocyte responses and overcomes genetic resistance to mousepox. J Virol, v.75,
n.3, Feb, p.1205-10. 2001.

20 JACOBS, N., R. A. CHEN, C. GUBSER, P. NAJARRO e G. L. SMITH. Intradermal
immune response after infection with Vaccinia virus. J Gen Virol, v.87, n.Pt 5, May, p.1157-61.
2006.

JOHNSTON, J. B. e G. MCFADDEN. Poxvirus immunomodulatory strategies: current
perspectives. J Virol, v.77, n.11, Jun, p.6093-100. 2003.

25 JOKLIK, W. K. The purification of four strains of poxvirus. Virology, v.18, Sep, p.9-18.
1962.

KAREM, K. L., M. REYNOLDS, C. HUGHES, Z. BRADEN, P. NIGAM, S. CROTTY, J.
GLIDEWELL, R. AHMED, R. AMARA e I. K. DAMON. Monkeypox-induced immunity and failure
of childhood smallpox vaccination to provide complete protection. Clin Vaccine Immunol, v.14,
n.10, Oct, p.1318-27. 2007.

30 KAREM, K. L., M. REYNOLDS, Z. BRADEN, G. LOU, N. BERNARD, J. PATTON e I. K.
DAMON. characterization of acute-phase humoral immunity to monkeypox: use of
immunoglobulin M enzyme-linked immunosorbent assay for detection of monkeypox infection
during the 2003 North American outbreak. Clin Diagn Lab Immunol, v.12, n.7, Jul, p.867-72.
2005.

KENSIL, C. R. Saponins as vaccine adjuvants. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst, v.13,
n.1-2, p.1-55. 1996.

35 KENSIL, C. R., S. SOLTYSIK, D. A. WHEELER e J. Y. WU. Structure/function studies on
QS-21, a unique immunological adjuvant from Quillaja saponaria. Adv Exp Med Biol, v.404,
p.165-72. 1996.

KNUTSON, B. A., X. LIU, J. OH e S. S. BROYLES. Vaccinia virus intermediate and late
promoter elements are targeted by the TATA-binding protein. J Virol, v.80, n.14, Jul, p.6784-93.
2006.

- 5 KOLHAPURE, R. M., R. P. DEOLANKAR, C. D. TUPE, C. G. RAUT, A. BASU, B. M. DAMA, S. D. PAWAR, M. V. JOSHI, V. S. PADBIDRI, M. K. GOVERDHAN e K. BANERJEE. Investigation of buffalopox outbreaks in Maharashtra State during 1992-1996. Indian J Med Res, v.106, Nov, p.441-6. 1997.
- 10 KOTWAL, G. J. Poxviral mimicry of complement and chemokine system components: what's the end game? Immunol Today, v.21, n.5, May, p.242-8. 2000.
- KOURILSKY, P. e P. TRUFFA-BACHI. Cytokine fields and the polarization of the immune response. Trends Immunol, v.22, n.9, Sep, p.502-9. 2001.
- LAL, S. M. e I. P. SINGH. Buffalopox-a review. Trop Anim Health Prod, v.9, n.2, May, p.107-12. 1977.
- 15 LANNA, M. C. Propriedades biológicas dos poxvírus silvestres Cotia e BeAn58058 isolados no Brasil. Dissertação de Mestrado. Departamento de Microbiologia-ICB-UFMG. 1980.
- LAW, M., G. C. CARTER, K. L. ROBERTS, M. HOLLINSHEAD e G. L. SMITH. Ligand-induced and nonfusogenic dissolution of a viral membrane. Proc Natl Acad Sci U S A, v.103, n.15, Apr 11, p.5989-94. 2006.
- 20 LEARNED, L. A., M. G. REYNOLDS, D. W. WASSA, Y. LI, V. A. OLSON, K. KAREM, L. L. STEMPORA, Z. H. BRADEN, R. KLINE, A. LIKOS, F. LIBAMA, H. MOUDZEO, J. D. BOLANDA, P. TARANGONIA, P. BOUMANDOKI, P. FORMENTY, J. M. HARVEY e I K. DAMON. Extended interhuman transmission of monkeypox in a hospital community in the Republic of the Congo, 2003. Am J Trop Med Hyg, v.73, n.2, Aug, p.428-34. 2005.
- 25 LEDUC, J. W. e P. B. JAHLING. Strengthening national preparedness for smallpox: an update. Emerg Infect Dis, v.7, n.1, Jan-Feb, p.155-7. 2001.
- LEFKOWITZ, E. J., C. Wang e C. Upton. Poxviruses: past, present and future. Virus Res, v.117, n.1, Apr, p.105-18. 2006.
- 30 LEGRAND, F. A., P. H. VERARDI, L. A. JONES, K. S. CHAN, Y. PENG e T. D. YILMA. Induction of potent humoral and cell-mediated immune responses by attenuated vaccinia virus vectors with deleted serpin genes. J Virol, v.78, n.6, Mar, p.2770-9. 2004.
- LEITE, J. A. Gene do corpúsculo de inclusão do tipo acidófilo (ATI) de Orthopoxvirus: estudo do polimorfismo genético e função. Tese de Doutorado, Departamento de Microbiologia-ICB - UFMG. 2006.
- 35 LEITE, J. A., B. P. DRUMOND, G. S. TRINDADE, C. A. BONJARDIM, P. C. FERREIRA e E. G. KROON. Brazilian Vaccinia virus strains show genetic polymorphism at the ati gene. Virus Genes, v.35, n.3, Dec, p.531-9. 2007.

- 5 LEITE, J. A., B. P. DRUMOND, G. S. TRINDADE, Z. I. LOBATO, F. G. DA FONSECA, S. J. DOS, M. C. MADUREIRA, M. I. GUEDES, J. M. FERREIRA, C. A. BONJARDIM, P. C. FERREIRA e E. G. KROON. Passatempo virus, a vaccinia virus strain, Brazil. Emerg Infect Dis, v.11, n.12, Dec, p.1935-8. 2005.
- 10 LEWIS-JONES, S. Zoonotic poxvirus infections in humans. Curr Opin Infect Dis, v.17, n.2, Apr, p.81-9. 2004.
- 15 LI, Y., D. S. CARROLL, S. N. GARDNER, M. C. WALSH, E. A. VITALIS e I. K. DAMON. On the origin of smallpox: correlating variola phylogenics with historical smallpox records. Proc Natl Acad Sci U.S.A, v.104, n.40, Oct 2, p.15787-92. 2007.
- 20 LIKOS, A. M., S. A. SAMMONS, V. A. OLSON, A. M. FRACE, Y. LI, M. OLSEN-RASMUSSEN, W. DAVIDSON, R. GALLOWAY, M. L. KHRISTOVA, M. G. REYNOLDS, H. ZHAO, D. S. CARROL, A. CURNS, P. FORMENTY, J. J. ESPOSITO, R. L. REGNERY e I. K. DAMON. A tale of two clades: monkeypox viruses. J Gen Virol, v.86, n.Pt 10, Oct, p.2661-72. 2005.
- 25 LINDBLAD, E. B. Aluminium compounds for use in vaccines. Immunol Cell Biol, v.82, n.5, Oct, p.497-505. 2004.
- LIU, L., Z. XU, R. C. FUHLBRIGGE, V. PENA-CRUZ, J. LIEBERMAN e T. S. KUPPER. Vaccinia virus induces strong immunoregulatory cytokine production in healthy human epidermal keratinocytes: a novel strategy for immune evasion. J Virol, v.79, n.12, Jun, p.7363-70. 2005.
- 30 LOBATO, Z. I. P., G. S. TRINDADE, M. C. M. FROIS, E. B. T. RIBEIRO, G. R. C. DIAS, B. M. TEIXEIRA, F. A. LIMA, G. M. F. ALMEIDA e E. G. KROON. Surto de varíola bovina causada pelo vírus Vaccinia na região da Zona da Mata Mineira. Arq Bras Med Vet Zootec 57, 423-429. 2005.
- LOPAREV, V. N., R. F. MASSUNG, J. J. ESPOSITO e H. MEYER. Detection and differentiation of old world orthopoxviruses: restriction fragment length polymorphism of the crmB gene region. J Clin Microbiol, v.39, n.1, Jan, p.94-100. 2001.
- 35 LOPES, S., J. P. LACERDA, I. E. FONSECA, D. P. CASTRO, O. P. FORATTINI e E. X. RABELLO. Cotia Virus: A New Agent Isolated from Sentinel Mice in São Paulo, Brazil. Am J Trop Med Hyg, v.14, Jan, p.156-7. 1965.
- MALKIN, A. J., A. MCPHERSON e P. D. GERSHON. Structure of intracellular mature vaccinia virus visualized by *in situ* atomic force microscopy. J Virol, v.77, n.11, Jun, p.6332-40. 2003.
- MARQUES, J. T., G. D. TRINDADE, F. G. DA FONSECA, J. R. DOS SANTOS, C. A. BONJARDIM, P. C. FERREIRA e E. G. KROON. Characterization of ATI, TK and IFN-

- 5 alpha/betaR genes in the genome of the BeAn 58058 virus, a naturally attenuated wild Orthopoxvirus. *Virus Genes*, v.23, n.3, Dec, p.291-301. 2001.
- MARTINEZ, M. J., M. P. BRAY e J. W. HUGGINS. A mouse model of aerosol-transmitted orthopoxviral disease: morphology of experimental aerosol-transmitted orthopoxviral disease in a cowpox virus-BALB/c mouse system. *Arch Pathol Lab Med*, v.124, n.3, Mar, p.362-77. 2000.
- 10 MAYR, A. e K. DANNER. Vaccination against pox diseases under immunosuppressive conditions. *Dev Biol Stand*, v.41, p.225-34. 1978.
- MCFADDEN, G. Poxvirus tropism. *Nat Rev Microbiol*, v.3, n.3, Mar, p.201-13. 2005.
- MEEUSEN, E. N., J. WALKER, A. PETERS, P. P. PASTORET e G. JUNGERSEN. Current status of veterinary vaccines. *Clin Microbiol Rev*, v.20, n.3, Jul, p.489-510, table of contents.
- 15 2007.
- MESEDA, C. A., A. D. GARCIA, A. KUMAR, A. E. MAYER, J. MANISCHEWITZ, L. R. KING, H. GOLDING, M. MERCHLINSKY e J. R. WEIR. Enhanced immunogenicity and protective effect conferred by vaccination with combinations of modified vaccinia virus Ankara and licensed smallpox vaccine Dryvax in a mouse model. *Virology*, v.339, n.2, Sep 1, p.164-75. 2005.
- 20 MILLER, C. G., D. E. JUSTUS, S. JAYARAMAN e G. KOTWAL. Severe and prolonged inflammatory response to localized cowpox virus infection in footpads of C5-deficient mice: investigation of the role of host complement in poxvirus pathogenesis. *Cell Immunol*, v.162, n.2, May, p.326-32. 1995.
- MILLER, C. G., S. N. SHCHELKUNOV e G. KOTWAL. The cowpox virus-encoded homolog of the vaccinia virus complement control protein is an inflammation modulatory protein. *Virology*, v.229, n.1, Mar 3, p.126-33. 1997.
- 25 MINKE, J. M., J. C. AUDONNET e L. FISCHER. Equine viral vaccines: the past, present and future. *Vet Res*, v.35, n.4, Jul-Aug, p.425-43. 2004.
- MMWR – Vaccinia (Smallpox) Vaccine: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). Morbidity and mortality weekly report – Recommendations and reports 50, 1-24. 2001.
- 30 MORIKAWA, S., T. SAKIYAMA, H. HASEGAWA, M. SAIJO, A. MAEDA, I. KURANE, G. MAENO, J. KIMURA, C. HIRAMA, T. YOSHIDA, Y. ASAHI-OZAKI, T. SATA, T. KURATA e A. KOJIMA. An attenuated LC16m8 smallpox vaccine: analysis of full-genome sequence and induction of immune protection. *J Virol*, v.79, n.18, Sep, p.11873-91. 2005.
- 35 MOSS, B. e J. L. SHISLER. Immunology 101 at poxvirus U: immune evasion genes. *Semin Immunol*, v.13, n.1, Feb, p.59-66. 2001.

- 5 MOSS, B. Poxviridae: The viruses and their replication in FIELDS, B. N., KNIPE, D. M., HOWLEY, P. M. & GRIFFIN, D. E. *Fields virology*, 4th edn (Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins). 2849 – 2883. 2001
- MOSS, B. Poxvirus entry and membrane fusion. *Virology*, v.344, n.1, Jan 5, p.48-54. 2006.
- MOTA, B. E. F. Caracterização molecular de amostras de Vaccinia virus circulantes no Brasil e avaliação do estado imune da população contra Orthopoxvirus. Dissertação de Mestrado. Departamento de Microbiologia-ICB-UFMG. 2006.
- 10 MULLBACHER, A. e M. LOBIGS. Creation of killer poxvirus could have been predicted. *J Virol*, v.75, n.18, Sep, p.8353-5. 2001.
- NAGASSE-SUGAHARA, T. K., J. J. KISIELIUS, M. UEDA-ITO, S. P. CURTI, C. A. FIGUEIREDO, A. S. CRUZ, M. M. SILVA, C. H. RAMOS, M. C. SILVA, T. SAKURAI e L. F. SALLES-GOMES. Human vaccinia-like virus outbreaks in Sao Paulo and Goias States, Brazil: virus detection, isolation and identification. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. V.46, p.315-322. 2004.
- 15 NITSCHE A, H. ELLERBROK E G. PAULI. Detection of orthopoxvirus DNA by real-time PCR and identification of variola virus DNA by melting analysis. *J Clin Microbiol*, v.42, n.1, Mar, p.1207-13. 2004.
- PACHECO, M. L., E. M. PENA-MENDEZ e J. HAVEL. Supramolecular interactions of humic acids with organic and inorganic xenobiotics studied by capillary electrophoresis. *Chemosphere*, v.51, n.2, Apr, p.95-108. 2003.
- 20 PAHLITZSCH, R., A. L. HAMMARIN e A. WIDELL. A case of facial cellulitis and necrotizing lymphadenitis due to cowpox virus infection. *Clin Infect Dis*, v.43, p.737-742. 2006.
- PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. *Epid Bul*, v.17, p.737-742. 1996.
- PAOLETTI, E. Applications of pox virus vectors to vaccination: an update. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.93, n.21, Oct 15, p.11349-53. 1996.
- 25 PARKER, A. K., S. PARKER, W. M. YOKOYAMA, J. A. CORBETT e R. M. BULLER. Induction of natural killer cell responses by ectromelia virus controls infection. *J Virol*, v.81, n.8, Apr, p.4070-9. 2007.
- PARRINO, J., L. H. MCCURDY, B. D. LARKIN, I. J. GORDON, S. E. RUCKER, M. E. ENAMA, R. A. KOUP, M. ROEDERER, R. T. BAILER, Z. MOODIE, L. GU, L. YAN e B. S. GRAHAM. Safety, immunogenicity and efficacy of modified vaccinia Ankara (MVA) against Dryvax challenge in vaccinia-naive and vaccinia-immune individuals. *Vaccine*, v.25, n.8, Feb 9, p.1513-25. 2007.

- 5 PASHINE, A., N. M. VALIANTE e J. B. ULMER. Targeting the innate immune response with improved vaccine adjuvants. Nat Med., v.11, n.4 Suppl, Apr, p.S63-8. 2005.
- PAYNE, L. G. Significance of extracellular enveloped virus in the in vitro and in vivo dissemination of vaccinia. J Gen Virol., v.50, n.1, Sep, p.89-100. 1980.
- 10 PHELPS, A. L., A. J. GATES, M. HILLIER, L. EASTAUGH e D. O. ULAETO. Comparative efficacy of modified vaccinia Ankara (MVA) as a potential replacement smallpox vaccine. Vaccine, v.25, n.1, Jan 2, p.34-42. 2007.
- PLOMP, M., M. K. RICE, E. K. WAGNER, A. MCPHERSON e A. J. MALKIN. Rapid visualization at high resolution of pathogens by atomic force microscopy: structural studies of herpes simplex virus-1. Am J Pathol, v.160, n.6, Jun, p.1959-66. 2002.
- 15 PRECPIO, M. L., M. R. BETTS, J. PARRINO, D. A. PRICE, E. GOSTICK, D. R. AMBROZAK, T. E. ASHER, D. C. DOUEK, A. HARARI, G. PANTALEO, G., R. BAILER, B. S. GRAHAM , M. ROEDERER e R. A. KOUP. Immunization with vaccinia virus induces polyfunctional and phenotypically distinctive CD8(+) T cell responses. J Exp Med., v.204, n.6, Jun 11, p.1405-16. 2007.
- 20 PUISSANT, B. e B. COMBADIERE. Keeping the memory of smallpox virus. Cell Mol Life Sci., v.63, n.19-20, Oct, p.2249-59. 2006.
- PUTZ, M. M., C. M. MIDGLEY, M. LAW e G. L. SMITH. Quantification of antibody responses against multiple antigens of the two infectious forms of Vaccinia virus provides a benchmark for smallpox vaccination. Nat Med., v.12, n.11, Nov, p.1310-5. 2006.
- 25 QUAN, F., C. HUANG, R. W. COMPANS e S. M. KANG. Virus-like particle vaccine induces protective immunity against homologous and heterologous strains of influenza virus. v.81, n. 7, abr, p. 3514-3524.
- QUENELLE, D. C., D. J. COLLINS e E. R. KERN. Cutaneous infections of mice with vaccinia or cowpox viruses and efficacy of cidofovir. Antiviral Res., v.63, n.1, Jul, p.33-40. 2004.
- 30 RAJPUT, Z. I., S. H. HU, C. W. XIAO e A. G. ARIJO. Adjuvant effects of saponins on animal immune responses. J Zhejiang Univ Sci B, v.8, n.3, Mar, p.153-61. 2007.
- RAMIREZ, J. C., D. FINKE, M. ESTEBAN, KRAEHENBUHL e H. ACHA-ORBEA. Tissue distribution of the Ankara strain of vaccinia virus (MVA) after mucosal or systemic administration. Arch Virol, v.148, n.5, May, p.827-39. 2003.
- 35 READING, P. C. e G. L. SMITH. Vaccinia virus interleukin-18-binding protein promotes virulence by reducing gamma interferon production and natural killer and T-cell activity. J Virol., v.77, n.18, Sep, p.9960-8. 2003.

- 5 RIGUERA, R. Isolating bioactive compounds from marine organisms. J Marine Biotechnol, 5, 187-193.1997.
- RIMOIN, A. W., N. KISALU,B. KEBELA-ILUNGA, T. MUKABA, L. L. WRIGHT, P. FORMENTY, N. D. WOLFE, R. L. SHONGO, F. TSHIOKO, E. OKITOLONDA, J. J. MUYEMBE R. W. RYDER e H. MEYER. Endemic human monkeypox, Democratic Republic of Congo, 2001-10 2004. Emerg Infect Dis, v.13, n.6, Jun, p.934-7. 2007.
- ROCHA, C. D., B. C. CAETANO, A.V. MACHADO e O. BRUNA-ROMERO. Recombinant viruses as tools to induce protective cellular immunity against infectious diseases. Int Microbiol, v.7, n.2, Jun, p.83-94. 2004.
- RODRIGUEZ, D., M. BARCENA, W. MOBIUS, S. SCHLEICH, M. ESTEBAN,W. J. GEERTS, 15 A. J. KOSTER, G. GRIFFITHS e J. K. LOCKER. A vaccinia virus lacking A10L: viral core proteins accumulate on structures derived from the endoplasmic reticulum. Cell Microbiol, v.8, n.3, Mar, p.427-37. 2006.
- ROPP, S. L., Q. JIN, R.F. MASSUNG e J. J. ESPOSITO. PCR strategy for identification and differentiation of small pox and other orthopoxviruses. J Clin Microbiol, v.33, n.8, Aug, p.2069-20 20 76. 1995.
- ROSENTHAL KS e D. H. ZIMMERMAN. Vaccines: all things considered. Clin Vaccine Immunol, V. 13, n. 8, Aug, p. 821-9. 2006.
- ROSENTHAL, S. R., M. MERCHLINSKY, C. KLEPPINGER e K. L. GOLDENTHAL. Developing new smallpox vaccines. Emerg Infect Dis, v.7, n.6, Nov-Dec, p.920-6. 2001.
- ROTZ, L. D., D. A. DOTSON,I. K. DAMON e J. A. BECHER. Vaccinia (smallpox) vaccine: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 2001. MMWR Recomm Rep, v.50, n.RR-10, Jun 22, p.1-25; quiz CE1-7. 2001.
- RUPPRECHT, C. E., L. BLASS, K. SMITH, L. A. ORCIARI, M. NIEZGODA, S. G. WHITFIELD, R. V. GIBBONS, M. GUERRA e C. A. HANLON. Human infection due to 30 recombinant vaccinia-rabies glycoprotein virus. N Engl J Med, v.345, n.8, Aug 23, p.582-6. 2001.
- SAMBROOK, J. e M. J. GETHING. Protein structure. Chaperones, paperones. Nature, v.342, n.6247, Nov 16, p.224-5. 1989.
- SARKAR, J. K., A. C. MITRA, M. K. MUKHERJEE e S. K. DE. Virus excretion in smallpox. 2. 35 Excretion in the throats of household contacts. Bull World Health Organ, v.48, n.5, May, p.523-7. 1973.
- SCHATZMAYR, H. G., E. R. LEMOS,C. MAZUR, A. SCHUBACH, S. MAJEROWICZ, T. ROZENTAL, T. M. SCHUBACH, M. C. BUSTAMANTE e O. M. BARTH. Detection of poxvirus in

- 5 cattle associated with human cases in the State of Rio de Janeiro: preliminary report. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.95, n.5, Sep-Oct, p.625-7. 2000.
- SCHEPIS, A., B. SCHRAMM, C. A. DE HAAN e J. K. LOCKER. Vaccinia virus-induced microtubule-dependent cellular rearrangements. Traffic, v.7, n.3, Mar, p.308-23. 2006.
- SCHRIEWER, J., R. M. BULLER e G. OWENS. Mouse models for studying orthopoxvirus respiratory infections. Methods Mol Biol, v.269, p.289-308. 2004.
- SCHULZE, C., M. ALEX, H., A. HLINAK, A. ENGELHARDT, B. KOSCHINSKI, B. BEYREISS, M. HOFFMANN e C. P. CZERNY. Generalized fatal Cowpox virus infection in a cat with transmission to a human contact case. Zoonoses Public Health, v.54, n.1, p.31-7. 2007.
- SEET, B. T., J. B. JOHNSTON, C. R. BRUNETTI, J. W. BARRETT, H. EVERETT, C. CAMERON, J. S. H. NAZARIAN, A. LUCAS e G. McFADDEN. Poxviruses and immune evasion. Annu Rev Immunol, v.21, p.377-423. 2003.
- SENKEVICH, T. G., S. OJEDA, A. TOWNSLEY, G. E. NELSON e B. MOSS. Poxvirus multiprotein entry-fusion complex. Proc Natl Acad Sci U S A, v.102, n.51, Dec 20, p.18572-7. 2005.
- SHCHELKUNOV, S. N., A. V. TOTMENIN, P. F. SAFRONOV, V. V. GUTOROV, O. I. RYAZANKINA, N. A. PETROV, I. V. BABKIN, E. A. UVAROVA, M. V. MIKHEEV e J. R. SISLER. Multiple genetic differences between the monkeypox and variola viruses. Dokl Biochem Biophys, v.384, May-Jun, p.143-7. 2002.
- SILVA, P. L., F. C. VIANA, S. C. A. RIBEIRO, H. E. COELHO, W. F. LÚCIO e OLIVEIRA, P. R. Surto de varíola bovina no município de Prata – MG. Arg Bras Méd Zoot v. 38, p. 323-330. 1986
- SINGH, M. e D. O'hagan. Advances in vaccine adjuvants. Nat Biotechnol, v.17, n.11, Nov, p.1075-81. 1999.
- SINGH, R. K., M. HOSAMANI, V. BALAMURUGAN, V. BHANUPRAKASH, T. J. RASOOL e M. P. YADAV. Buffalopox: an emerging and re-emerging zoonosis. Anim Health Res Rev, v.8, n.1, Jun, p.105-14. 2007.
- SMEE, D. F., K. W. BAILEY e R. W. SIDWELL. Treatment of lethal cowpox virus respiratory infections in mice with 2-amino-7-[(1,3-dihydroxy-2-propoxy)methyl]purine and its orally active diacetate ester prodrug. Antiviral Res, v.54, n.2, May, p.113-20. 2002.
- SMITH, G. L. e G. MCFADDEN. Smallpox: anything to declare? Nat Rev Immunol, v.2, n.7, Jul, p.521-7. 2002.
- SMITH, G. L., B. J. MURPHY and M. LAW. Vaccinia virus motility. Annu Rev Microbiol, v.57, p.323-42. 2003.

- 5 SMITH, S. A. e G. J. KOTWAL. Immune response to poxvirus infections in various animals. Crit Rev Microbiol, v.28, n.3, p.149-85. 2002.
- SODEIK, B. e J. KRIJNSE-LOCKER. Assembly of vaccinia virus revisited: de novo membrane synthesis or acquisition from the host? Trends Microbiol, v.10, n.1, Jan, p.15-24. 2002.
- 10 SOMEKH, E., Z. SMETANA, T. AMIR, D. ILAN, B. I. BABAI e E. MENDELSON. Determination of immunity to vaccinia virus by using diluted inactivated vaccinia vaccine solution for skin testing. Vaccine, v.23, n.3, Dec 2, p.321-4. 2004.
- STITTELAAR, K. J. e A. D. OSTERHAUS. MVA: a cuckoo in the vaccine nest? Vaccine, v.19, n.27, Jun 14, p.V-VI. 2001.
- 15 STITTELAAR, K. J., G. VAN AMERONGEN, K. IVANELA, K. THIJS, F. ROB VAN LAVIEREN, H. M. FRANK, G. M. H. NIESTERS, G VAN DOORNUM, A. M. BEN, Z. VAN DER ZEIJST, M. LUIS, P. J. CHAPLIN e A. D. M. E. OSTERHAUS. Modified vaccinia virus Ankara protects macaques against respiratory challenge with monkeypox virus. J Virol, v.79, n.12, Jun, p.7845-51. 2005.
- 20 TAN, S. Y. Edward Jenner (1749-1823): conqueror of smallpox. Singapore Med J, v.45, n.11, Nov, p.507-8. 2004.
- THORNTON, B. The antigenicity and immunogenicity of the intracellular and extracellular forms of vaccinia virus. I: The production of high-titre vaccinia extracellular virus and its antigenicity after inactivation. Br J Exp Pathol, v.61, n.4, Aug, p.444-50. 1980.
- 25 TOWNSLEY, A. C., A. S. WEISBERG, T. T. VAGENAAR e B. MOSS. Vaccinia virus entry into cells via a low-pH-dependent endosomal pathway. J Virol, v.80, n.18, Sep, p.8899-908. 2006.
- TRIGUEIRO, R. C. Imunoevasão em Orthopoxvirus isolados no Brasil: análise dos genes B18R e E3L. Dissertação de Mestrado. Departamento de Microbiologia-ICB-UFMG. 2004.
- 30 TRINDADE, G. S., G. L. EMERSON, D. S. CARROLL, E. G. KROON e I. K. DAMON. Brazilian vaccinia viruses and their origins. Emerg Infect Dis, v.13, n.7, jul, p.965-72. 2007.
- TRINDADE, G. S. Isolamento, identificação e caracterização molecular de Poxvírus circulantes no Brasil. Tese de Doutorado. Departamento de Microbiologia-ICB-UFMG. 2003.
- TRINDADE, G. S., F. G. DA FONSECA, J. T. MARQUES, M. L. NOGUEIRA, L. C. MENDES, A. S. BORGES, J. R. PEIRO, E. M. PITUCO, C. A. BONJARDIM, P. C. FERREIRA e E. G. 35 KROON. Araçatuba virus: a vaccinia-like virus associated with infection in humans and cattle. Emerg Infect Dis, v. 9, p. 155 – 160. 2003.
- TRINDADE, G. S., F. G. DA FONSECA, J. T. MARQUES, S. DINIZ, J. A. LEITE, S. DE BODT, Y. VAN DER PEER, C. A. BONJARDIM, P. C.P. FERREIRA e E. G. KROON. Belo

- 5 Horizonte virus: a vaccinia-like virus lacking the A-type inclusion body gene isolated from infected mice. *J Gen Virol*, v.85, n.Pt 7, Jul, p.2015-21. 2004.
 TRINDADE, G. S., VILELA, J. M., FERREIRA, J. M., AGUIAR, P. H., LEITE, J. A., GUEDES, M. I., LOBATO, Z. I., MADUREIRA, M. C., DA SILVA, M. I., DA FONSECA, F. G., E. G. KROON e M. S. ANDRADE. (2007). Use of atomic force microscopy as a diagnostic tool to identify orthopoxvirus. *J Virol Methods*, 141, 198-204.
- 10 TRINDADE, G. S., Z. I. LOBATO, B. P. DRUMOND, J. A. LEITE, R. C. TRIGUEIRO, M. I. M. GUEDES, F. G. DA FONSECA, J. R. DOS SANTOS, C. A. BONJARDIM, P. C. FERREIRA e E. G. KROON. 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.
- 15 15 *Am J Trop Med Hyg*, v.75, n.3, Sep, p.486-90. 2006.
 TSCHARKE, D. C e G. L. SMITH. A model for vaccinia virus pathogenesis and immunity based on intradermal injection of mouse ear pinnae. *J Gen Virol*, v.80 (Pt 10), Oct, p.2751-5. 1999.
- 20 20 TSCHARKE, D. C., G. KARUPIAH, J. ZHOU, T. PALMORE, K. R. IRVINE, S. M. MANSOUR HAERFAR, S. WILLIANS, J. SIDNEY, A. SETTE, J. R. BENNINK e J. W. YEWDELL. Identification of poxvirus CD8+ T cell determinants to enable rational design and characterization of smallpox vaccines. *J Exp Med*, v.201, n.1, Jan 3, p.95-104. 2005.
- 25 TSCHARKE, D. C., P. C. READING e G. L. SMITH. Dermal infection with vaccinia virus reveals roles for virus proteins not seen using other inoculation routes. *J Gen Virol*, v.83, n.Pt 8, Aug, p.1977-86. 2002.
- TSUNG, K., J. H. YIM, R. M. BULLER e J. A. NORTON. Gene expression and cytopathic effect of vaccinia virus inactivated by psoralen and long-wave UV light. *J Virol*, v.70, n.1, Jan, p.165-71. 1996.
- 30 TULMAN, E. R., G. DELHON, C. L. AFONSO, Z. LU, L. ZSAK, N. T. SANDYBAEV, U. Z. KEREMBEKOVA, V. L. ZAITSEV, G. F. KUTISH e D. L. ROCK. Genome of horsepox virus. *J Virol*, v.80, n.18, Sep, p.9244-58. 2006.
- TURNER, G. S. e E. J. SQUIRES. Inactivated smallpox vaccine: immunogenicity of inactivated intracellular and extracellular vaccinia virus. *J Gen Virol*, v.13, n.1, Oct, p.19-25. 1971.
- 35 TURNER, G. S. Respiratory infection of mice with vaccinia virus. *J Gen Virol*, v.1, n.3, Jul, p.399-402. 1967.
- TURNER, G. S., E. J. SQUIRES e A. G. MURRAY. Inactivated smallpox vaccine. A comparison of inactivation methods. *J Hyg (Lond)*, v.68, n.2, Jun, p.197-210. 1970.

- 5 TURNER, P. C. e R. W. MOYER. Poxvirus immune modulators: functional insights from animal models. Virus Res., v.88, n.1-2, Sep, p.35-53. 2002.
- 10 TURNER, P. C., B. P. DILLING, C. PRINS, S. G. CRESAWN, R. W. MOYER e R. C. CONDIT. Vaccinia virus temperature-sensitive mutants in the A28 gene produce non-infectious virions that bind to cells but are defective in entry. Virology, v.366, n.1, Sep 15, p.62-72. 2007.
- 15 VANDERPLASSCHEN, A., E. MATHEW, M. HOLLINSHEAD, R. B. SIM e SMITH, G. L.. Extracellular enveloped vaccinia virus is resistant to complement because of incorporation of host complement control proteins into its envelope. Proc Natl Acad Sci U S A, v.95, n.13, Jun 23, p.7544-9. 1998.
- 20 VANDERPLASSCHEN, A., M. HOLLINSHEAD e G. L. SMITH. Antibodies against vaccinia virus do not neutralize extracellular enveloped virus but prevent virus release from infected cells and comet formation. J Gen Virol, v.78 (Pt 8), Aug, p.2041-8. 1997.
- 25 WARD, B. M. The longest micron; transporting poxviruses out of the cell. Cell Microbiol, v.7, n.11, Nov, p.1531-8. 2005.
- 30 WHO. The Global eradication of Smallpox: Final report of the Global Commission for the Certification of Smallpox Eradication. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 1980.
- 35 WILLIAMSON, J. D., R. W. REITH, L. J. JEFFREY, J. R. ARRAND e MACKETT, M. Biological characterization of recombinant vaccinia viruses in mice infected by the respiratory route. J Gen Virol, v.71 (Pt 11), Nov, p.2761-7. 1990.
- 40 WOOLHOUSE, M. E., D. T. HAYDON e R. ANTIA. Emerging pathogens: the epidemiology and evolution of species jumps. Trends Ecol Evol, v.20, n.5, May, p.238-44. 2005.
- 45 WYATT, L. S., P. L. EARL, L. A. ELLER e B. MOSS. Highly attenuated smallpox vaccine protects mice with and without immune deficiencies against pathogenic vaccinia virus challenge. Proc Natl Acad Sci U S A, v.101, n.13, Mar 30, p.4590-5. 2004.
- 50 XU, R., A. J. JOHNSON e M. J. BEVAN. Cellular and humoral immunity against vaccinia virus infection of mice. J Immunol, v.172, n.10, May 15, p.6265-71. 2004.
- 55 YODER, J. D., T. CHEN e D. E. HRUBY. Sequence-independent acylation of the vaccinia virus A-type inclusion protein. Biochemistry, v.43, n.26, Jul 6, p.8297-302. 2004.
- 60 YOSHIKI, Y., S. KUDOU e K. OKUBO. Relationship between chemical structures and biological activities of triterpenoid saponins from soybean. Biosci Biotechnol Biochem, v.62, n.12, Dec, p.2291-9. 1998.
- 65 ZAUCHA, G. M., P. B. JAHLING, T. W. GEISBERT, J.R. SWEARENGEN e L. HENSLEY. The pathology of experimental aerosolized monkeypox virus infection in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). Lab Invest, v.81, n.12, Dec, p.1581-600. 2001.

5 **11- ANEXOS**

11.1- Produção Bibliográfica

Artigos publicados:

10

1- Passatempo Virus, a Vaccinia Virus Strain, Brazil. 2005. Juliana A. Leite, Betânia P. Drumond, Giliane S. Trindade, Zélia I. P. Lobato, Flávio G. da Fonseca, João R. dos Santos, Marieta C. Madureira, Maria I. M. C. Guedes, **Jaqueline M. S. Ferreira**, Cláudio A. Bonjardim, Paulo C. P. Ferreira, Erna G. Kroon. *Emerging Infectious Diseases*, 11: 1935-1938.

15

2- Use of atomic force microscopy as a diagnostic tool to identify orthopoxvirus. 2007. Giliane S. Trindade, José M. Vilela, **Jaqueline M. S. Ferreira**, Pedro H. Aguiar, Juliana A. Leite, Maria I. M. C. Guedes, Zélia I. Lobato, Marieta C. Madureira, Flávio G. da Fonseca, Cláudio A. Bonjardim, Paulo C. P. Ferreira, Erna G. Kroon. *J Virol Methods* 141: 198-204.

20

25

30

35

5 Artigos submetidos:

1- **Brazilian *Vaccinia virus* strains show a classical *Orthopoxvirus* infection course and cross-protection.** Jaqueline M. S. Ferreira, Betânia P. Drumond, Jônatas S. Abrahão, Pedro A. Alves, Zélia I. P. Lobato, Cláudio A. Bonjardim, Paulo C. P. Ferreira, Erna G. Kroon.

10

15

20

25

30

35

Summary: Poxviruses are a large, complex group of highly successful pathogens that cause disease in humans and animals. Recently, bovine vaccinia outbreaks caused by these viruses have been described as affecting dairy cows and milkers, in Brazil. This disease is considered occupational and is involved in economic loss and problems related to public health. Despite the great impact of the circulation of poxviruses in the world, there are few studies about its pathogenesis. So, the aim of this work was to study the infection course and cross-protection after intradermal injection of the following three Brazilian *Vaccinia virus* strains: Araçatuba, Muriae and BeAn58058 and the *Vaccinia virus* strain Western Reserve. Balb/c mice were inoculated by footpad and back scarification and mice were daily monitored. By using the footpad scarification model, cross-protection between *Vaccinia virus* strains was observed. Moreover the lesion development pattern was similar among different virus strains. Although it was not possible to observe virulence differences among *Vaccinia virus* strains isolated from cow, rodent and human, this inoculation route has shown to be an appropriate model to study lesions development since it mimics natural infections by *Vaccinia virus* in nature.

5 2- Brazilian *Vaccinia virus* strains show different virulence in murine model. 2008.
 Jaqueline M. S. Ferreira, Betânia P. Drumond, Maria I. M. C. Guedes, Marcelo A. Pascoal-Xavier, Camila M. Almeida-Leite, Bruno E. F. Mota, Jonatas S. Abrahão, Pedro A. Alves, Paulo P. Ferreira, Cláudio A. Bonjardim, Zélia I. P. Lobato, Erna G. Kroon. *Journal of Virology*.

10 **Summary:** Although *Vaccinia virus* (VACV) was used to eradicate smallpox by dermal vaccination, there is little information about the virulence of different strains of this species. Previously, an intra-nasal model that mimics smallpox infection was established and in the present study this model was used in BALB/c mice to investigate virulence differences among seven Brazilian VACV isolates, one prototype strain *Western Reserve Vaccinia virus* (VACV-WR) and one vaccine strain Lister-Butanta (LST-BUT). *Vaccinia*-like viruses had been isolated from sentinel mice, rodents and from outbreaks on dairy farms affecting cattle and their handlers in several rural areas in Brazil. Due to the high economic and social impact caused by the circulation of VACV in Brazil and to the lack of studies related to the biological characteristics of these strains, our goal was studied their virulence pattern. Infected mice were monitored for
 15 morbidity, mortality and viral replication in organs as trachea, lungs, heart, kidneys, liver, brain and spleen. Based on the virulence potential, the viruses were clustered into three groups, one containing WR, GP1V, VBH and SAV which caused high morbidity and mortality of infected mice, the second one including LST-BUT, ARAV, GP2V and PSTV that cause no clinical signs and the third one containing BAV which caused morbity, but no mortality. The data reinforce the
 20 diversity of Brazilian fields *Vaccinia virus* and show the similar clustering based on previous phylogenetic analyses.

30

35



5 3- Horizontal transmission of *Vaccinia virus* strains in BALB/c mice model. 2008.
Jaqueline M. S. Ferreira, Jônatas S. Abrahão, Betânia P. Drumond, Marcelo A. Pascoal-Xavier,
Fernando M. Oliveira, Zélia I. P. Lobato, Cláudio A. Bonjardim, Paulo C. P. Ferreira, Erna G.
Kroon. *Journal of General Virology*.

10 **Summary:** *Vaccinia virus* (VACV) has been associated with several bovine vaccinia outbreaks
in Brazil; however, there is no information available about its maintenance in nature, transmission to cattle
and the possible role of wild-life in the emergence of those outbreaks. Since *Vaccinia virus* had already
been isolated from wild rodents in Brazil, we decided to investigate VACV shedding and transmission
patterns in a murine model using two VACV strains: Western Reserve and Guarani P2. After intranasal
15 infection, viral DNA and virions were detected in feces and urine collected from mice infected with
either strain. Horizontal virus transmission was assessed by exposure of uninfected mice to excrements
from experimentally infected mice, in order to mimic a natural infection. Naturally infected mice
presented neutralization antibodies against *Orthopoxvirus*, viral DNA was detected in feces and virions
were also detected in feces and in the intestine, confirming the infection of those mice after contact with
20 contaminated excrement. These results indicated that *Vaccinia virus* could be shed and transmitted by
rodents in nature through their excrement and that excrement could also play an important role in virus
transmission to cows.

25

30

35

40

Passatempo Virus, a Vaccinia Virus Strain, Brazil

Juliana A. Leite,* Betânia P. Drumond,*
Giliâne S. Trindade,* Zélia I.P. Lobato,*
Flávio G. da Fonseca,† João R. dos Santos,*
Marieta C. Madureira,‡ Maria I.M.C. Guedes,*
Jaqueline M.S. Ferreira,* Cláudio A. Bonjardim,
Paulo C.P. Ferreira,* and Erna G. Kroon*

Passatempo virus was isolated during a zoonotic outbreak. Biologic features and molecular characterization of hemagglutinin, thymidine kinase, and vaccinia growth factor genes suggested a vaccinia virus infection, which strengthens the idea of the reemergence and circulation of vaccinia virus in Brazil. Molecular polymorphisms indicated that Passatempo virus is a different isolate.

Since 1999, an increasing number of exanthemous outbreaks affecting dairy cattle and cow milkers in Brazil have been reported (1–3). These outbreaks were related to poxvirus infections, which resulted in economic losses to farmers and affected the health of humans and animals. Here we report a vaccinia virus (VACV) outbreak that emerged in March 2003 in the town of Passa-Tempo, Minas Gerais State, Brazil.

The Study

The outbreak area is characterized by small rural properties with diverse crops, pasturelands, and surrounding fragments of Atlantic Forest. Its climate is tropical, with a relatively severe dry season, generally from April to September (4).

All dairy farms were similar, consisting of a main house with corrals and pasture fields generally with unsophisticated infrastructure. All milking was manually performed by milkers, typically without strict aseptic measures, which could have contributed to the spread of the virus among the herd and milkers. Cows exhibited lesions on teats and udders that resembled the clinical features observed during other Brazilian VACV outbreaks (1). Initial acute lesions were associated with a roseolar erythema with localized edema that led to the formation of vesicles. The vesicles rapidly progressed to papules and

pustules, which subsequently ruptured and suppurated. Typically, a thick dark scab followed, but the formation of large areas of ulceration was also common. The course of infection lasted from 3 to 4 weeks. Different stages of lesions were present, ranging from papules to vesicles, pustules, and crusts (Figure 1). Moreover, because of secondary infections, some cows had mastitis (Figure 1). Calves became infected, showing lesions on oral mucosa and muzzles (Figure 1). Several infected milkers reported lesions on their hands, which were apparently transmitted by unprotected contact with sick cattle (Figure 1). In addition, infected persons reported severe headache, backache, lymphadenopathy, and high fever.

For virus isolation, crusts were collected from 5 cows and 1 calf, macerated, and added to the chorioallantoic membrane of embryonated eggs (2). The whitish pockmarks produced on chorioallantoic membranes resembled VACV pocks, differing from the red hemorrhagic ones produced by cowpox virus (CPXV) (online Appendix Figure 1; available at http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol11no12/05-0773_app1.htm). Blood from affected animals was collected for neutralization assays (5). Serologic cross-reactivity of antibodies to VACV–Western Reserve (WR) strain was detected in all samples, and titers of these serum samples were ≥640 U/mL (data not shown).

Transmission electron microscopy of isolates (6) showed a morphologic pattern typical of orthopoxviruses (online Appendix Figure 2; available at http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol11no12/05-0773_app2.htm). No A-type inclusion body (ATI) was seen, reinforcing the conclusion that this virus was likely not a CPXV, but a VACV. Viral DNAs were extracted (6) and used as template for *ati* gene restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis (7). The *ati* RFLP patterns of all isolates were identical to those of Araçatuba virus (ARAV) (1) and other VACV strains previously isolated in our laboratory (unpub. data); they were similar to those of VACV-WR and completely different from those of CPXV-Brighton Red (BR) (online Appendix Figure 3; available at http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol11no12/05-0773_app3.htm). Since all isolates showed the same *ati* RFLP pattern, one was cloned, purified, titrated (1,6), and named Passatempo virus (PSTV).

To better identify this etiologic agent, *ha*, *tk*, and *vgf* genes were amplified by polymerase chain reaction with Taq polymerase (Promega, Madison, WI, USA) (6,8,9). Amplicons were cloned into pGEM-T vector (Promega). Three clones were sequenced 3 times in both orientations by the dideoxy method, using M13 universal primers and ET Dynamic Terminator for MegaBACE (GE Healthcare, Fairfield, CT, USA). The nucleotide (nt) sequences of *ha*, *tk*, and *vgf* were assembled by using the CAP3 Sequence Assembling Program (10) and deposited in GenBank

*Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil; †Centro de Pesquisas René Rachou–Fundação Instituto Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil; and ‡Instituto Mineiro de Agropecuária, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil



Figure 1. Lesions caused by Passatempo virus infection. Panels 1 and 2, ulcerative lesions on cows' teats; 3, mastitis caused by bacterial secondary infection; 4 and 5, lesion on calves' muzzle and oral mucosa; 6, lesions of dairy farm milker.

under accession numbers DQ070848, DQ085461, and DQ085462, respectively. The sequences and inferred amino acid sequences were aligned with those of orthopoxviruses by using the ClustalW 1.6 program (11).

PSTV *ha* gene sequence was compared to those of ARAV, Cantagalo virus (CTGV) (1,2), VACV-WR, CPXV-BR, VACV Instituto Oswaldo Cruz (VACV-IOC), and VACV Lister (VACV-LST). VACV-IOC and VACV-LST are vaccine strains used in the Brazilian smallpox eradication program (2,6). The PSTV *ha* gene sequences presented the same 18-nt deletion found in ARAV, CTGV, and VACV-IOC and shared more similarities to ARAV and CTGV homologous sequences. Additionally, 8 amino acid substitutions were unique to PSTV, ARAV, and CTGV. Since this characteristic was not observed in the vaccine strains, an independent origin is suggested. Moreover, PSTV HA differs from that of ARAV and CTGV by 1 and 2 amino acid substitutions, respectively (online Appendix Figure 4; available at http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol11no12/05-0773_app4.htm). The percentage of

identity between *ha*, *tk*, and *vgf* nucleotide sequences and inferred amino acid sequences of PSTV with CPXV-BR and other VACV strains are presented in the Table. For the *tk* gene that is highly conserved among VACV, the PSTV nucleotide sequence had 100% identity to ARAV, VACV-LST, and VACV-WR homologous sequences. Additionally, PSTV *vgf* gene had a 3-nt deletion, corresponding to nt 7,669–7,671 of VACV-WR, causing the loss of 1 isoleucine in a stretch of 4 found in the ARAV and VACV-WR VGF sequences (Appendix Figure 4). PSTV VGF also exhibited 2 amino acid substitutions when compared to ARAV VGF sequences.

The alignments were used to construct phylogenetic trees by the neighbor-joining method using the Tamura Nei model implemented in MEGA3 (12). Trees were rooted at midpoint, and 1,000 bootstrap replications were performed. A *tk* and *vgf* genes concatenated phylogenetic tree was constructed by placing PSTV together with VACV strains (data not shown). Regarding *ha* sequences, PSTV was clustered to ARAV and CTGV (Figure 2).

Table. Passatempo virus (PSTV), Araçatuba virus (ARAV), Cantagalo virus (CTGV), Vaccinia virus IOC (VACV-IOC), vaccinia virus Lister (VACV-LST), vaccinia virus Western Reserve (VACV-WR), and cowpox virus Brighton Red (CPXV-BR) *ha*, *tk*, and *vgf* genes and amino acid sequences^a

PSTV	Identity among homologous sequences (%)					
	ARAV	CTGV	VACV-IOC	VACV-LST	VACV-WR	CPXV-BR
Genes						
<i>ha</i>	99.9	99.8	98.7	97.4	96.3	84.0
<i>tk</i>	100.0	—*	—*	99.8	100.0	98.0
<i>vgf</i>	98.6	—*	—*	98.0	98.6	95.7
Amino acids						
HA	99.7	99.3	96.6	95.0	94.0	79.9
TK	100.0	—*	—*	100.0	100.0	98.2
VGF	97.4	—*	—*	100.0	97.4	92.2

*CTGV and VACV-IOC *tk* and *vgf* nucleotide and amino acid sequences are not available in the GenBank database.

THA, hemagglutinin; TK, thymidine kinase; VGF, vaccinia growth factor.

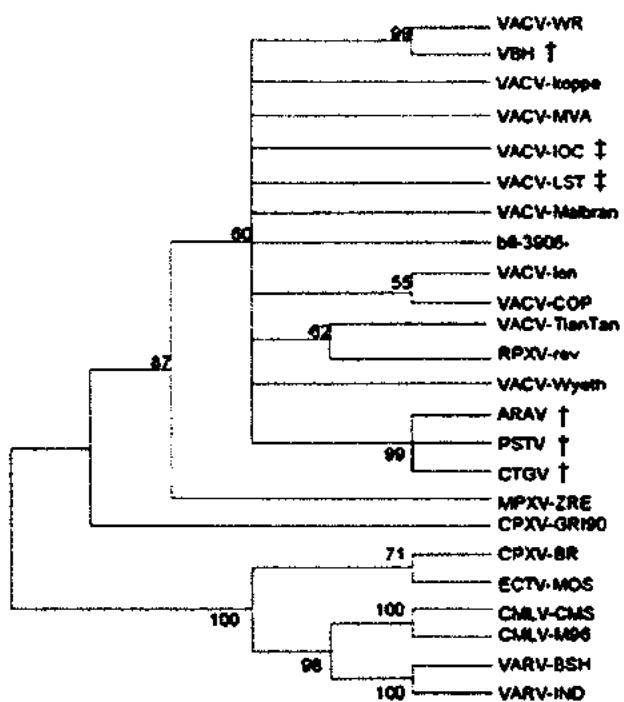


Figure 2. Consensus bootstrap phylogenetic tree based on the nucleotide sequence of *Orthopoxvirus ha* gene. The tree was constructed by the neighbor-joining method using the Tamura-Nei model of nucleotide substitutions implemented in MEGA3. The tree was midpoint-rooted, 1,000 bootstrap replicates were performed, and values >50% are shown. Nucleotide sequences were obtained from GenBank under accession numbers: PSTV (DQ070848), ARAV (AY523994), CTGV (AF229247), VACV-Wyeth (VZ99051), VACV-TianTan (U25662), VBH (AY542799), VACV-WR (AY243312), VACV-Koppe (AF375122), VACV-MVA (U94848), VACV-IOC (AF229248), VACV-LST (AF375124), VACV-Ion (AF375123), VACV-COP (M35027), bfl-3906 (AF375077), VACV-Malbran (AY146624), RPXV-rev (AF375118), CPXV-GRI90 (CVZ9904), CPXV-BR (AF482758), ECTV-MOS (AF012825), CMLV-CMS (AY009089), CMLV-M96 (AF438165), VARV-BSH (L22679), VARV-IND (X69198), MPXV-ZRE (AF380138). (†) indicates Brazilian VACV isolates and (‡) indicates Brazilian vaccine samples.

Conclusions

The phylogenetic tree analysis suggested a strong phylogenetic relationship between PSTV and other Brazilian VACV strains. However, the *vgf* and *ha* gene analysis of PSTV, ARAV, and CTGV indicated that genetic heterogeneity exists among these viruses, which suggests that the *ha* gene deletion found in PSTV, ARAV, CTGV, and VACV-IOC could be a signature of New World or Brazilian VACV strains.

Additionally, that RFLP analysis showed a pattern identical with other Brazilian strains, similar to VACV-WR and different from CPXV, suggests that a cladogenesis event may have occurred. This conclusion is feasible considering that these viruses could be circulating in the wild since

smallpox vaccination or even before, going back to the colonization of South America, when cattle and other animals were brought to the New World without quarantine or inspection. The VACV variants buffalopox and rabbitpox have originated from VACV subspeciation (13).

That humans were also infected and that these persons were all milkers, phenomena that had been observed during other Brazilian VACV outbreaks, points to an occupational zoonosis. Although parapoxvirus infection has been placed in the category of occupational zoonosis, to our knowledge no other orthopoxviruses have been reported to cause an occupational hazard. Economic losses are also a matter of concern. In addition to the reduction in milk production, extra veterinary costs are due to the usual occurrence of secondary infections on cows' teats leading to mastitis. The reduction in milk production is a concern because Brazil is a major milk exporter. Therefore, the spread of these viruses could severely impact the country's economy. In this regard, the clinical features, widespread dissemination, and epidemiology of the etiologic agent of these outbreaks must be understood.

Since 1963, all Brazilian orthopoxvirus isolates have been characterized as VACV strains (3,6,14,15). The growing geographic distribution of these outbreaks (Figure 3)



Figure 3. Brazilian states where vaccinia viruses were isolated. ES, Espírito Santo State: Espírito Santo isolates in 2004 (unpublished); GO, Goiás State: Goiás isolates after 2001 (3); MG, Minas Gerais State: Belo Horizonte virus in 1993 (15), Minas Gerais isolates after 2001 (3); Passatempo virus in 2003; PA, Pará State: BeAn 58058 virus in 1963 (6); RJ, Rio de Janeiro State: Cantagalo virus in 1999 (2); SP, São Paulo State: SPAn232 virus in 1979 (14), Araçatuba virus in 1999 (1), São Paulo isolates after 2001 (3).

indicates that these viruses may be emerging as zoonotic pathogens of cattle. This fact is especially important because a growing human population has no vaccine-derived immunity to smallpox or other orthopoxviruses. This situation could create an opportunity for these viruses to disseminate in Brazil. In addition, the isolation of another VACV strain strengthens the hypothesis that VACV is circulating in the New World and that these viruses seem to be endemic of this region.

Acknowledgments

We thank Angela S. Lopes, Ilda M.V. Gama, Daniela Lemos, and colleagues from the Laboratory of Virus for their excellent technical support and C. Jungwirth for providing VACV-WR and CPXV-BR used in this study. We also thank Rodrigo A.F. Redondo and Fabricio R. dos Santos for advice on the phylogenetic analysis, Olga Pfeilsticker for technical assistance on electron microscopy, and Denise Golher for English review.

Financial support was provided by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG). B.P. Drumond, G.S. Trindade, J.M.S. Ferreira, J.A. Leite, and M.I.M.C. Guedes received fellowships from CNPq or CAPES. C.A. Bonjardim, E.G. Kroon, F.G. da Fonseca, P.C.P. Ferreira and Z.I.P. Lobato are recipients of research fellowships from CNPq.

Ms Leite is a doctoral candidate at the Laboratory of Virus, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte-MG, Brazil. Her areas of research interest include virology, emergent viruses, molecular biology, and epidemiology.

References

- de Souza Trindade G, da Fonseca FG, Marques JT, Nogueira ML, Mendes LC, Borges AS, et al. Araçatuba virus: a vaccinia-like virus associated with infection in humans and cattle. *Emerg Infect Dis*. 2003;9:155–60.
- 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;277:439–49.
- Nagasse-Sugahara TK, Kisielius JJ, Ueda-Ito M, Curti SP, Figueiredo CA, Cruz AS, et al. Human vaccinia-like virus outbreaks in São Paulo and Goiás States, Brazil: virus detection, isolation and identification. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2004;46:315–22.
- Morellato PC, Haddad CFB. The Brazilian Atlantic Forest. *Biotropica*. 2000;32(4b Atlantic Forest Special Issue):786–92.
- Crouch AC, Baxby D, McCracken CM, Gaskell RM, Bennett M. Serological evidence for the reservoir hosts of cowpox virus in British wildlife. *Epidemiol Infect*. 1995;115:185–91.
- Fonseca FG, Lanna MC, Campos MAS, Kitajima EW, Peres JN, Golgher RR, et al. Morphological and molecular characterization of the poxvirus BeAn 58058. *Arch Virol*. 1998;143:1171–86.
- Meyer H, Ropp SL, Esposito JJ. Gene for A-type inclusion body protein is useful for a polymerase chain reaction assay to differentiate orthopoxviruses. *J Virol Methods*. 1997;64:217–21.
- da Fonseca FG, Silva RL, Marques JT, Ferreira PC, Kroon EG. The genome of cowpox virus contains a gene related to those encoding the epidermal growth factor, transforming growth factor alpha and vaccinia growth factor. *Virus Genes*. 1999;18:151–60.
- Ropp SL, Jin Q, Knight JC, Massung RF, Esposito JJ. PCR strategy for identification and differentiation of smallpox and other orthopoxviruses. *J Clin Microbiol*. 1995;33:2069–76.
- CAP3 Sequence Assembling Program. [accessed 18–22 Apr 2005]. Available from <http://deepe2.zool.iastate.edu/aat/cap/cap.html>
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*. 1994;22:4673–80.
- Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform*. 2004;5:150–163.
- The Universal Virus Database of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Orthopoxvirus. [accessed 2 May 2005]. Available from <http://www.ictvdb.rothamsted.ac.uk/ICTVdB/5811000.htm>
- da Fonseca FG, Trindade GS, Silva RL, Bonjardim CA, Ferreira PC, Kroon EG. Characterization of a vaccinia-like virus isolated in a Brazilian forest. *J Gen Virol*. 2002;83:223–8.
- Trindade GS, da Fonseca FG, Marques JT, Diniz S, Leite JA, De Bodt S, et al. Belo Horizonte virus: a vaccinia-like virus lacking the A-type inclusion body gene isolated from infected mice. *J Gen Virol*. 2004;85:2015–21.

Address for correspondence: Erna G. Kroon, Laboratório de Virus, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. Av. Antônio Carlos, 6627, Caixa Postal 486, CEP: 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil; fax: 55-31-3443-6482; email: kroone@icb.ufmg.br

All material published in Emerging Infectious Diseases is in the public domain and may be used and reprinted without special permission; proper citation, however, is required.

Search past issues of EID at www.cdc.gov/eid



Available online at www.sciencedirect.com



Journal of Virological Methods 141 (2007) 198–204



www.elsevier.com/locate/jviromet

Use of atomic force microscopy as a diagnostic tool to identify orthopoxvirus

G.S. Trindade^{a,d,1}, J.M.C. Vilela^c, J.M.S. Ferreira^{a,1}, P.H.N. Aguiar^d, J.A. Leite^{a,1}, M.I.M.C. Guedes^{a,1}, Z.I.P. Lobato^{b,2}, M.C. Madureira^{e,3}, M.I.N. da Silva^c, F.G. da Fonseca^{a,f,1,4}, E.G. Kroon^{a,*1}, M.S. Andrade^c

^a Laboratório de Vírus, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, Caixa Postal 486, CEP: 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil

^b Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, CEP: 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil

^c Laboratório de Nanoscopia da Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais (CETEC), Av. José Candido da Silveira, 2000, Bairro Horto, CEP: 31170-000 Belo Horizonte MG, Brazil

^d Laboratório de Reologia, Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais (CETEC), Brazil

^e Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA), Avenida dos Andradas, 1220-Centro, CEP: 30120-010 Belo Horizonte, MG, Brazil

^f Laboratório de Imunologia Celular e Molecular, Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ, Av. Augusto de Lima, 1715 Barro Preto, CEP: 30190-002 Belo Horizonte, MG, Brazil

Received 20 June 2006; received in revised form 8 December 2006; accepted 12 December 2006

Available online 18 January 2007

Abstract

Atomic force microscopy (AFM) is a versatile technique that permits the imaging of surfaces and generates topographical images from a variety of materials. Due to the fact that AFM requires minimum sample manipulation, it is a valuable tool for studying biological materials such as cells, DNA, bacteria and viruses. The aim of the present study was to standardize the AFM technique as a diagnostic tool for detection of naturally occurring orthopoxviruses. The samples analyzed were collected during natural outbreaks of *Vaccinia virus* (VACV) in dairy cattle in Brazil. These viruses are zoonotic infections; and therefore safe manipulation of all samples is required. The AFM technique would provide a more secure way to diagnose infection. By using the "in air" AFM technique after purification and inactivation process, relatively crude preparations of viruses were visualized rapidly. Details for efficient sample preparation and AFM imaging are described. The AFM technique provides a rapid and biosecure tool for the diagnosis of emerging orthopoxviruses and has potential as a tool for screening bioterrorism samples.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: AFM; Diagnosis; Bovine vaccinia outbreaks; Orthopoxviruses; *Vaccinia virus*; Biosecurity

* Corresponding author. Tel.: +55 31 3499 2755; fax: +55 31 3443 6482.

E-mail addresses: gitrindade@yahoo.com.br,

bjz2@cdc.gov (G.S. Trindade), jose.mario.vilela@cetec.br (J.M.C. Vilela), mckie@icb.ufmg.br (J.M.S. Ferreira), phnaguaiar@uol.com.br (P.H.N. Aguiar), jn@icb.ufmg.br (J.A. Leite), isabelgueDES@icb.ufmg.br (M.I.M.C. Guedes), ziplobat@vet.ufmg.br (Z.I.P. Lobato), mariectristinam@yahoo.com.br (M.C. Madureira), vonete.nogueira@cetec.br (M.I.N. da Silva), fafonseca@cpqrr.fiocruz.br (F.G. da Fonseca), msc.egk@terra.com.br, kroone@icb.ufmg.br (E.G. Kroon), margareth.spangler@cetec.br (M.S. Andrade).

¹ Fax: +55 31 3443 6482.

² Fax: +55 31 3499 2101.

³ Fax: +55 31 3213 6300.

⁴ Fax: +55 31 3349 7748.

1. Introduction

Currently, the emergence and re-emergence of communicable diseases highlight the need to strengthen detection of infection, surveillance and control. More recently, the increasing threat of bioterrorism and biowarfare, caused by the intentional release of various infectious agents in susceptible populations, emphasizes the need to develop new methods to detect, identify and characterize a wide range of virulent pathogens, including bacteria and viruses and pathogenic toxins. To minimize the spread of emerging viral diseases and to determine effective treatment strategies, rapid detection and identification are extremely important (reviewed in Dufrêne, 2004; reviewed in Lewis-Jones, 2004).

Although the World Health Organization (WHO) declared global smallpox eradicated in 1980, concerns over emerging poxvirus infection have increased. The possible use of *Variola virus* as a bioterrorism weapon, the emergence of *Monkeypox virus* in Africa and infections caused by zoonotic orthopoxviruses (OPVs) around the world, including *Vaccinia virus* (VACV) in Brazil, have made the scientific community aware of the threat orthopoxviruses (Hazelton and Gelderblom, 2003; Johnsen et al., 2006; Kitamoto et al., 2005; Leite et al., 2005; reviewed in Lewis-Jones, 2004). A number of different methods such as viral isolation, serological tests, DNA based techniques and electron microscopy are used commonly for identification of orthopoxvirus infections (Loparev et al., 2001; Sofi Ibrahim et al., 2003; Trindade et al., 2003).

In recent years, atomic force microscopy (AFM) has provided a wide range of new opportunities for viewing and manipulating biological systems in their native environments (reviewed in Dufrêne, 2004; Plomp et al., 2002). The possibility of visualizing biological systems in three dimensions as well the ease of sample preparation have made AFM a very important tool for imaging biological samples (Reviewed in Dufrêne, 2004). High-resolution AFM allows the discrimination of viruses based on their size and shape in a process that does not require staining, fixing or other synthetic preparations (Neftikadan et al., 2003). This technique has been used successfully to diagnose viral infections such as *West Nile* virus, herpesviruses, retroviruses and poxviruses (Reviewed in Dufrêne, 2004; Kuznetsov et al., 2005; Malkin et al., 2003; Malkin et al., 1999; Neftikadan et al., 2003; Plomp et al., 2002). The structure of intracellular mature VACV Western Reserve strain, the prototype of the poxvirus family, was previously visualized by *in situ* AFM (Malkin et al., 2003). Each virus has a specific characteristic shape and dimension, and since poxviruses are very large, it is easier to identify these viral particles.

Since the early 1990s, an increasing number of poxvirus outbreaks have been described in Brazil. The majority of cases, with the exception of an outbreak affecting laboratory mice (Trindade et al., 2004), are zoonotic diseases affecting dairy cattle and humans. Clinical symptoms and epidemiological aspects observed during outbreaks are related frequently to poxvirus infections, specifically viruses belonging to the *Orthopoxvirus* genus (Damaso et al., 2000; Leite et al., 2005; Lobato et al., 2005; Nagasse-Sugahara et al., 2004; Trindade et al., 2003, 2006).

These outbreaks have been investigated and many vesicle and dried scab samples were collected for further analysis by the Virus Laboratory, at the Institute of Biological Sciences (ICB), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Brazil. Diagnoses are based on viral isolation, molecular biology techniques and, in some cases, electron microscopy (Leite et al., 2005; Lobato et al., 2005; Trindade et al., 2003, 2006).

In Brazil, as in other parts of the world, poxvirus outbreaks are becoming common, possibly due to the decrease of cohort immunity against orthopoxviruses (Reviewed in Lewis-Jones, 2004). As a result, the use of a new technique to facilitate viral identification and characterization is desirable. The present study aimed to establish baselines to apply AFM as a novel viral identification tool and to investigate the suitability of AFM as

an additional method for safe and rapid diagnosis of naturally occurring orthopoxviruses.

2. Material and methods

2.1. Clinical samples, virus isolation and purification

Samples of vesicles and crusts (dried scabs) from cattle and milker's hands were collected during the 2005 poxvirus outbreaks in Brazil using 1 ml insulin syringes and 0.45 mm × 13 mm needles, cotton swabs or a pair of tweezers and stored in a −70 °C freezer until processed for viral isolation. Crust samples were thawed and homogenized thoroughly into the containment cabinet using a mortar and pestle, and diluted in Eagle minimal essential medium (MEM) (GibcoBRL, Invitrogen, Carlsbad, California, USA) containing a two-fold antibiotic concentration of 25 µg/ml fungizone (Amphotericin B, Cristália, São Paulo, Brazil), 500U/ml penicillin, and 50 µg/ml gentamicin (Gentamicin 280 mg Schering-Plough, Rio de Janeiro, Brazil) to avoid contamination. This material was prepared as a 20% suspension of the biological material.

One hundred microliters of suspension were inoculated onto chorioallantoic membrane (CAM) of 9-day-old embryonated chicken eggs to isolate viruses (Leite et al., 2005; Lobato et al., 2005; Trindade et al., 2003, 2006).

After 72 h incubation, CAM was ground using mortar and pestle, and inoculated onto Vero cell monolayers (ATCC CCL-81, Rockville, MD, USA) as described previously (Leite et al., 2005; Trindade et al., 2003). Vero cells were propagated at 37 °C in MEM supplemented with 5% fetal calf serum (CULTILAB, Campinas, Brazil). After propagation in Vero cells, viruses were purified in a sucrose gradient (Joklik, 1962) and titrated as described previously (Campos and Kroon, 1993). For AFM visualization, vesicle liquid, crust suspensions, ground CAM, and purified virus suspensions were submitted to physical and chemical treatments. All purified virus samples used in this work were intracellular mature virus (IMV) particles, which are the more abundant viral forms produced during infection.

2.2. AFM sample preparation

2.2.1. UV light treatment

Four different kinds of samples were used for Ultraviolet light (UV) treatment: 20 µl of vesicular liquid, 100 µl of 20% crust suspension, 100 µl of ground CAM, and 5 µl of purified virus. All samples were diluted in 1 ml of ultra pure water. UV treatment was carried out using 35 mm plates (Corning Inc., Corning, NY). A total of 100 µl of each diluted materials were placed in 35 mm plates in order to form a thin film. The UV light source (254 nm) was placed above the plates at a distance of 55 cm from the bottom of the wells for 5 min. Viruses were titrated after exposure to the UV light source, as described previously to confirm viral inactivation (Campos and Kroon, 1993).

2.2.2. Chemical treatment

An aliquot of each samples described above was mixed with an equal volume (1:1) of Triton X-100 0.2% (SIGMA,

Sigma-Aldrich Corporation, USA) detergent and incubated for 5 min at room temperature for chemical treatment.

2.3. AFM imaging

Three microliters droplets of all materials were deposited directly onto flat, freshly cleaved mica substrates. The droplets were allowed to dry for 20 min, and mica substrates were gently rinsed with 1 ml doubled-distilled water and quickly dried with a stream of argon gas. AFM images were collected using Multimode equipment and a NanoScope IIIa controller (Digital Instruments, Santa Barbara, California). Tapping mode imaging was undertaken in air using silicon cantilevers from Nanosensors (Nanoworld AG, Switzerland), with cantilevers of 122 μm in length, resonance frequencies of 297–380 kHz, spring constants of 29–61 N/m, and a nominal tip radius of curvature of 5–10 nm. Images were obtained with a scan rate of 1 Hz.

2.4. Transmission electron microscopy

Vero cells were infected with orthopoxviruses using a multiplicity of infection (m.o.i) of 0.01 PFU (plaque forming unity). After 48 h, post-infection aliquots of cellular extracts were collected and purified in a sucrose gradient (Joklik, 1962). Purified

viruses were diluted 10 and 100 times and suspensions were used in negative contrast electron microscopy (EM), as described by Brenner and Horne (1959). Samples were transferred to 200 Formvar mesh (125/85/40) grids coated with carbon. After 30 min, grids were negatively stained with 2% uranyl acetate. EM examination was conducted with a transmission electron microscope 10A/B-Zeiss (Carl Zeiss Inc., Germany).

3. Results

3.1. Viral isolation, titration and inactivation

CAMs infected with 20% homogenized crust suspensions showed typical orthopoxviruses cytopathic effect characterized mainly by the presence of white, nonhemorrhagic pocks (data not shown). After inoculation, positive CAMs were ground and used to infect Vero cells, in which the appearance of a cytopathic effect (CPE) was observed approximately 48 h after inoculation (data not shown). After viral multiplication, infected cell extracts were submitted to a sucrose purification process (Joklik, 1962). Orthopoxviruses propagated in Vero cells were titrated. The viral titer was approximately 10^8 PFU/ml. Viruses were treated with UV light or 0.2% Triton X-100 detergent. Purified viruses treated with UV light were also titrated, and a CPE was not observed.

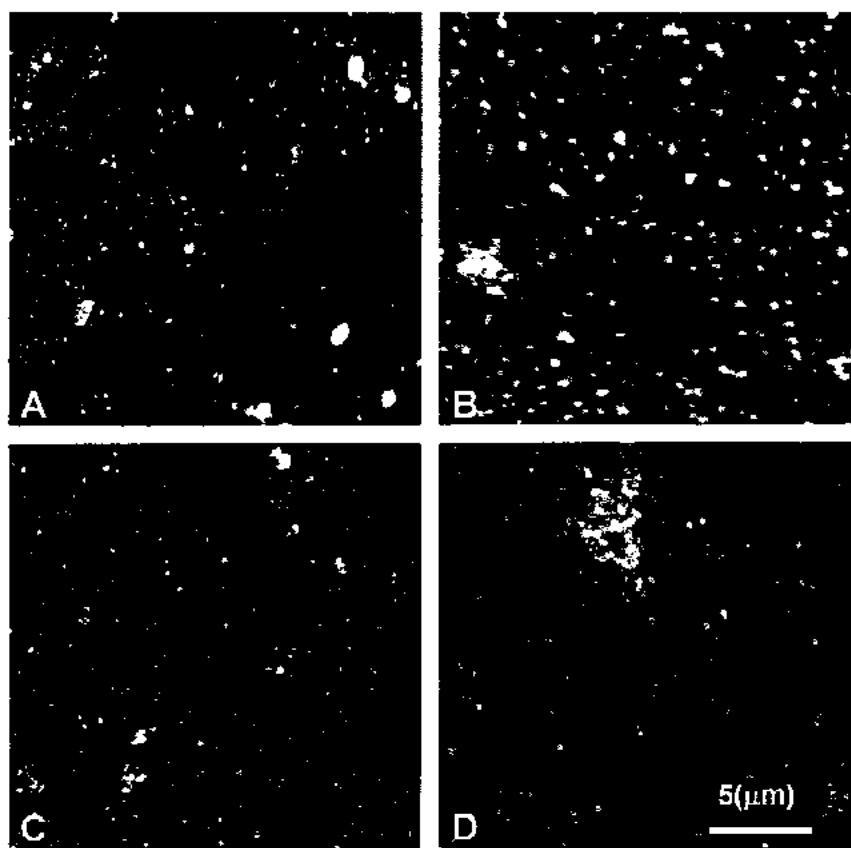


Fig. 1. Gallery of AFM images from clinical materials, including vesicles (1A), scabs (1B), CAMs (1C) suspensions and sucrose gradient purified virus (1D) treated with UV light. Clinical materials from scabs and CAMs were ground at a 20% concentration in MEM containing a two-fold antibiotic concentration, as previously described. Images are 20 $\mu\text{m} \times 20 \mu\text{m}$.

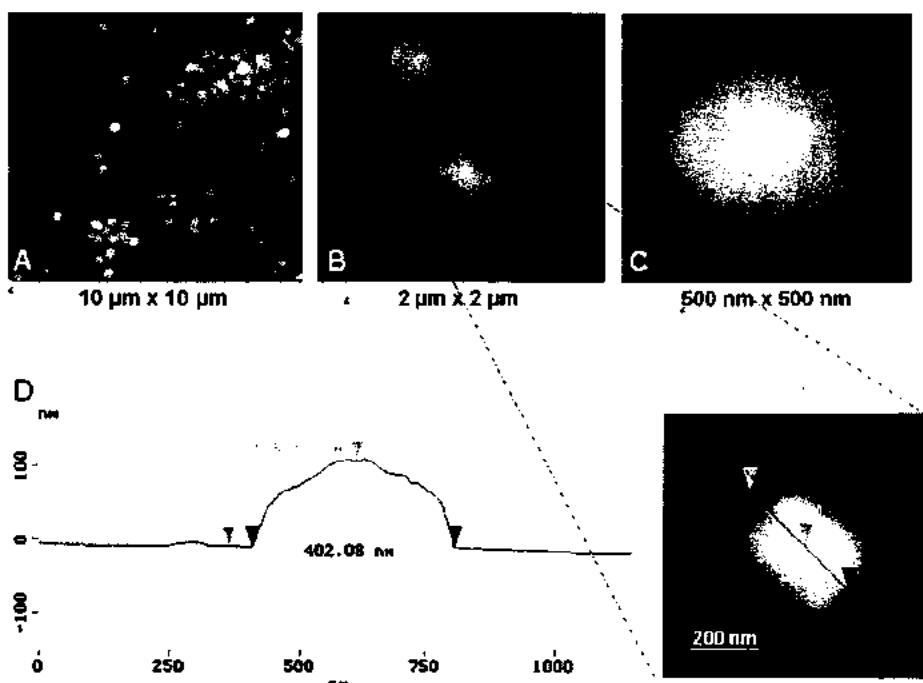


Fig. 2. AFM image of purified IMV OPXV particles adsorbed to mica in air. Purified virus at a concentration of 15,000 infectious particles per drop was adsorbed to mica and imaged "in air". Single viruses are observed. Note the typical brick shape form of orthopoxvirus. AFM images are (A) 10 $\mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$ (B) 2 $\mu\text{m} \times 2 \mu\text{m}$ and (C) 300 nm \times 300 nm. (D) AFM image (right) (800 nm \times 800 nm) and topographical profile (left) showing virus dimensions.

3.2. AFM testing of clinical specimens and infected cellular systems

After UV light treatment, initial AFM analyses were undertaken to image vesicle liquids and crust suspensions followed by imaging of infected CAM and purified viral suspensions, respectively (Fig. 1A–D). Results presented in Fig. 1 (A–D) were conducted with a 20 μm nanometer resolution. Fig. 1A–C represent AFM images obtained directly from vesicles, crust swabs and CAM suspensions, respectively. Since all suspensions could be imaged, it is important to point out that the main requirement for AFM, good substrate adhesion, was achieved. However, when crude suspensions from all clinical material and CAMs were imaged, it was not possible to distinguish typical viral particles from cellular material. As a result, only a collection of debris could be visualized. Despite the fact that it was not possible to distinguish viral particles from cellular debris, the presence of orthopoxviruses in all clinical materials and CAMs was shown by other biological and molecular tests that included viral isolation and polymerase chain reaction (PCR) of orthopoxvirus genes (data not shown) (Leite et al., 2005; Lobato et al., 2005; Trindade et al., 2003, 2006).

3.3. AFM imaging of sucrose gradient purified viruses

In an attempt to visualize orthopoxvirus particles, positive ground CAM suspensions were inoculated onto Vero cell monolayers for viral multiplication. All infected cellular extracts were processed using a sucrose gradient (Joklik, 1962). Images obtained from purified viral suspension treated with 0.2% Tri-

ton X-100 or UV light/5 min showed that preparations had a high purification level, since only viral aggregates or individual viral particles were visualized over the mica substrate (Figs. 1 and 2Fig. 1D). In general, after the dilution process, approximately 1500 infectious particles were used per 3 μl drop. Fig. 2A–C illustrates images of orthopoxvirus particles at different magnifications: 10 $\mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$, 2 $\mu\text{m} \times 2 \mu\text{m}$, 500 nm \times 500 nm. AFM images revealed typical brick-shaped and spherical IMV orthopoxvirus particles. After visualization of purified viral suspensions, particles were measured using Section Analysis software of the NanoScope IIIa controller system. The average of all AFM measurements was similar with the dimensions of IMV *Vaccinia virus* particles described in the literature by Malkin and colleagues (2003). Fig. 2D shows the AFM image (right) and topographic profile (left) of an IMV particle. Measurements performed for 100 particles resulted in average dimensions as follows: length $395 \pm 10 \text{ nm}$, width $320 \pm 10 \text{ nm}$, and height $120 \pm 20 \text{ nm}$.

3.4. Testing the effect of different treatments in AFM analysis

In order to verify that physical and chemical treatments could be used without damaging viral particle morphology, higher-magnification images were collected. Fig. 3 shows AFM images of individual virus particles after both physical (3A) and chemical treatment (3B). It is notable that detergent-treated samples showed a considerable amount of viral debris carpeting the mica substrate, while UV-treated samples showed much less particle debris (Fig. 3A and B images). Despite chemical or physical

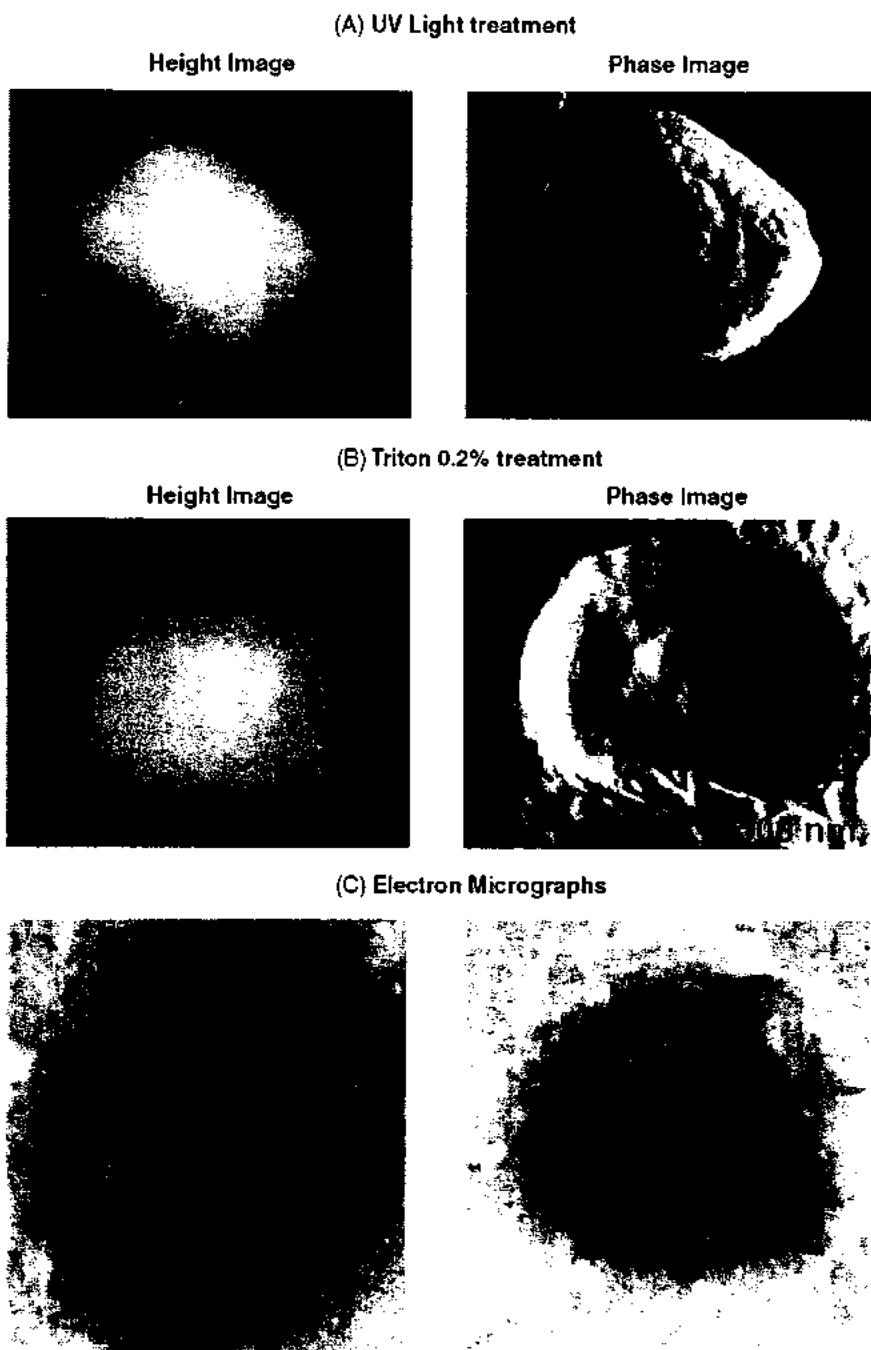


Fig. 3. High resolution height and phase air-dried pictures. Air-dried AFM images of individual IMV particles were done after both physical (4A) and chemical treatment (4B). Note the central pronounced area (4A–B). Purified IMV viruses were treated with UV light/5 min and non ionic detergent Triton 0.2%. Typical brick-shaped morphologies were observed using both treatments. AFM images are (A) 851 nm × 851 nm, (B) 500 nm × 500 nm. (C) Electron micrographs (EM) of Orthopoxviruses at 65.000x. EM Images were done at CEMEL/ICB/UFMG.

treatment, obtained images revealed viruses presenting typical poxvirus morphology. The majority of particles were similar in shape, presenting typical IMV (intracellular mature virus) spherical or brick shaped forms with a prominent central area (Fig. 3A and B). Fig. 3C illustrates images obtained by electron microscopy (EM) for comparison to virus images produced by AFM.

4. Discussion

During the last few years, concerns on the emergence of new poxvirus infections have increased (Reviewed by Lewis-Jones, 2004). In Brazil, outbreaks of an exanthematic disease affecting humans and cattle have been reported since 1999. This emerging viral zoonosis is causing serious economic losses and becoming

an important public health problem in some States in Brazil (Lobato et al., 2005). Using biological and molecular methods, including serum neutralization tests, viral DNA detection and, in some cases, electron microscopy, Orthopoxviruses were found to be the causative agent of these outbreaks (Leite et al., 2005; Lobato et al., 2005; Trindade et al., 2003, 2006).

To this end, it was decided to design a strategy employing AFM analysis for viral identification and characterization from clinical suspensions and purified viruses. Ultraviolet irradiation and detergent treatment were used to inactivate viral particles in samples in order to minimize the risk of infection and contamination, as previously described (Cardoso and Trindade, 2005; Hazelton and Gelderblom, 2003; Malkin et al., 2003; Plomp et al., 2002).

In order to apply AFM as an additional tool for the identification of poxviruses during outbreaks, poxvirus particles were visualized first from clinical samples as either vesicles or scabs, or infected CAMs. However, AFM images from material extracted directly from vesicles, scabs and infected CAMs resulted in identification ambiguities due the fact that individual viral particles were not visualized readily. Nevertheless, when purified viruses were imaged, diagnosis based upon viral morphology was rapidly possible. The unique morphological characteristics and size of Orthopoxvirus family members allowed for unequivocal diagnosis. The findings are in agreement with described AFM images of IMV particles from purified VACV Western Reserve strain including the visualization of the typical central protrusion (Malkin et al., 2003). The presence of a central protrusion observed in viral images analyzed "in air", could be due to the dehydration process. During the dehydration process particles can collapse, resulting in virus images exhibiting a pronounced central area and prominent angular morphology, similar observation by transmission electron microscopy (Malkin et al., 2003; Hazelton and Gelderblom, 2003).

To date, the only techniques used for viral particle visualization have been electron microscopy and cryo-electron microscopy (Cyrklaff et al., 2005; Dubochet et al., 1994; Hazelton and Gelderblom, 2003; Johnsen et al., 2006). Despite the fact that valuable information can be obtained using electron microscopy and cryo-electron microscopy, these assays require additional manipulation such as fixing, staining and labeling, all of which are time-consuming and unsuitable for examining specimens in aqueous solutions (Dufrêne, 2004; Hazelton and Gelderblom, 2003; Plomp et al., 2002; Kuznetsov et al., 2001). The main advantage of AFM is that it can provide, at nanometric resolution, direct images of biological specimens, including viruses, using crude preparations. In fact, application of AFM to detect viruses associated with other pathologies may, ultimately, have a significant impact on the diagnosis and treatment of virus-promoted diseases (Dufrêne, 2004).

5. Conclusion

The development of AFM as a rapid diagnostic tool for the detection and identification of pathogens is of considerable interest because it could provide an additional detection platform that is complimentary to biological and molecular techniques.

In summary, in this study EM was substituted by AFM as an additional method for the safe and rapid diagnosis of naturally occurring orthopoxviruses. The application of this technique during an Orthopoxvirus outbreak could provide a rapid and biosecure tool to diagnose emerging viruses. It may also be useful for screening samples in the case of bioterrorism.

Acknowledgments

The authors would like to thank Laboratorio de Reologia, CETEC and Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) for contributions to this work. We are so grateful to Olga Maria de Carvalho Pfeilsticker from Centro de Microscopia Eletrônica (CEMEL), ICB/UFMG for preparing electron microscopies. We also thank CAPES, CNPq and FAPEMIG for financial support. G.S. Trindade received fellowship from CAPES in the first part of this project and from NIH in the second part. E.G. Kroon, J.A. Leite, and Z.I.P. Lobato received fellowships from CNPq. M.I.M.C. Guedes received fellowship from FAPEMIG.

References

- Brenner, S., Horne, R.W., 1959. A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. *Biochim. Biophys. Acta* 34, 103.
- Campos, M.A.S., Kroon, E.G., 1993. Critical period for reversible block of vaccinia virus replication. *Rev. Brasil. Microbiol.* 24, 104–110.
- Cardoso, A.V., Trindade, G.T., 2005. Interface between adjacent UV-treated or detergent-treated *Vaccinia virus* particles. *Microsci. Microanal.* 11 (3), 86–89.
- Cyrklaff, M., Risco, C., Fernandez, J.J., Jimenez, M.V., Esteban, M., Baumeister, W., et al., 2005. Cryo-electron tomography of vaccinia virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102 (8), 2772–2777.
- Darnaso, C.R.A., Esposito, J.J., Condit, R., Moussatché, N., 2000. An emergent poxvirus from humans and cattle in Rio de Janeiro state: Cantagalo virus may derive from Brazilian smallpox vaccine. *Virology* 277, 439–449.
- Dubochet, J., Adrian, M., Richter, K., Garces, J., Wittek, R., 1994. Structure of intracellular mature vaccinia virus observed by cryoelectron microscopy. *J. Virol.* 68, 1935–1941.
- Dufrêne, Y.F., 2004. Using nanotechniques to explore microbial surfaces. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 451–460.
- Hazelton, P.R., Gelderblom, H.R., 2003. Electron microscopy for rapid diagnosis of infectious agents in emergent situations. *Emerg. Infect. Dis.* 9 (3), 294–303.
- Johnsen, C.K., Bottiger, B., Blom, J., 2006. Confirmation of electron microscopy results by direct testing of viruses adhered to grids using nucleic acid amplification techniques. *J. Virol. Meth.* 134, 92–98.
- Joklik, W.K., 1962. The purification of four strains of poxvirus. *Virology* 18, 9–18.
- Kitamoto, N., Kobayashi, T., Kato, Y., Wakamiya, N., Ikuta, K., Tanaka, T., Ueda, S., Miyamoto, H., Kato, S., 2005. Preparation of monoclonal antibodies cross-reactive with orthopoxviruses and their application for direct immunofluorescence test. *Microbiol. Immunol.* 49 (3), 219–225.
- Kuznetsov, Y.G., Malkin, A.J., Lucas, R.W., Plomp, M., McPherson, A., 2001. Imaging of viruses by atomic force microscopy. *J. Gen. Virol.* 82 (9), 2025–2034.
- Kuznetsov, Y.G., Low, A., Fan, H., McPherson, A., 2005. Atomic force microscopy investigation of isolated virions of murine leukemia virus. *J. Virol.* 79 (3), 1970–1974.
- Lewis-Jones, S., 2004. Zoonotic poxvirus infections in humans. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 17 (2), 81–89.
- Leite, J.A., Drumond, B.P., Trindade, G.S., Lobato, Z.I.P., da Fonseca, F.G., dos Santos, J.R., et al., 2005. Passatempo virus: a novel *Vaccinia* virus isolated during a zoonotic outbreak in Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 1935–1938.

- Lobato, Z.I.P., Trindade, G.S., Frois, M.C.M., Ribeiro, E.B.T., Dias, G.R.C., Teixeira, E.B., et al., 2005. Outbreak of exanthem disease caused by Vaccinia virus in human and cattle in Zona da Mata region, Minas Gerais, Brazil. *J. Vet. Anim. Sci.* 57, 423–429.
- Loparev, V.N., Massung, R.F., Esposito, J.J., Meyer, H., 2001. Detection and differentiation of Old World Orthopoxviruses: restriction fragment length polymorphism of the *crmB* gene region. *J. Clin. Microbiol.* 39 (1), 94–100.
- Malkin, A.J., McPherson, A., Gershon, P.D., 2003. Structure of intracellular mature vaccinia virus visualized by *in situ* atomic force microscopy. *J. Virol.* 77 (11), 6332–6340.
- Malkin, A.J., Kuznetsov, Y.G., Lucas, R.W., McPherson, A., 1999. Surface processes in the crystallization of turnip yellow mosaic virus visualized by atomic force microscopy. *J. Struct. Biol.* 127 (1), 35–43.
- Nagasse-Sugahara, T.K., Kisielius, J.J., Ueda-Ito, M., Curti, S.P., Figueiredo, C.A., Cruz, A.S., et al., 2004. Human vaccinia-like virus outbreaks in São Paulo and Goias States, Brazil: virus detection, isolation and identification. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 46 (6), 315–322.
- Nettikadan, S.R., Johnson, J.C., Mosher, C., Henderson, E., 2003. Virus particle detection by solid phase immunocapture and atomic force microscopy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 311 (2), 540–545.
- Plomp, M., Rice, M.K., Wagner, E.K., McPherson, A., Malkin, A.J., 2002. Rapid visualization at high resolution of pathogens by atomic force microscopy. *Am. J. Pathol.* 160 (6), 1959–1965.
- Sofi Ibrahim, M., Kulesh, D.A., Salch, S.S., Damon, I.K., Esposito, J.J., Schmaljohn, A.L., Jahrling, P.B., 2003. Real-time PCR assay to detect smallpox virus. *J. Clin. Microbiol.* 41 (8), 3835–3839.
- Trindade, G.S., da Fonseca, F.G., Marques, J.T., Nogueira, M.L., Mendes, L.C., Borges, A.S., Peiro, J.R., Pitúco, E.M., Bonjardim, C.A., Ferreira, P.C., Kroon, E.G., 2003. Aracatuba virus: a vaccinia-like virus associated with infection in humans and cattle. *Emerg. Infect. Dis.* 9 (2), 155–160.
- Trindade, G.S., da Fonseca, F.G., Marques, J.T., Diniz, S., Leite, J.A., De Bodt, S., et al., 2004. Belo Horizonte virus: a vaccinia-like virus lacking the A-type inclusion body gene isolated from infected mice. *J. Gen. Virol.* 85, 2015–2021.
- Trindade, G.S., Lobato, Z.I.P., Drumond, B.P., Leite, J.A., Trigueiro, R.C., Guedes, M.I.M.C., et al., 2006. 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.* 75 (3), 486–490.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO
ANIMAL (CETEA)

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº 095/04 relativo ao projeto intitulado "*Orthopoxvirus: produção de vacinas e avaliação da resposta imune*", que tem como responsáveis Jaqueline Maria Siqueira Ferreira e Erna Geessien Kroon, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo *Comitê de Ética em Experimentação Animal* (CETEA/UFMG), tendo sido aprovado em reunião de 01.12.2004.

Este certificado expira-se em **01.12.2009**

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **095/04** related to the project entitled "*Orthopoxvirus: production of vaccines and immune response studies*", under the supervision Jaqueline Maria Siqueira Ferreira and Erna Geessien Kroon, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the *Ethics Committee in Animal Experimentation* (CETEA/UFMG) and was approved in **01.12.2004**.

This certificate expires in **01.12.2009**.

Belo Horizonte, 01 de dezembro de 2004

Cleuza Rezende
Dra. CLEUZA MARIA F. REZENDE
PRESIDENTE DO CETEA/UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 36/2006**, relativo ao projeto intitulado "***Imunogenicidade de Orthopoxvirus em bovinos***", que tem como responsável **Erna Geessien Kroon**, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo ***Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)***, tendo sido aprovado na reunião de **17/ 05/2006**.

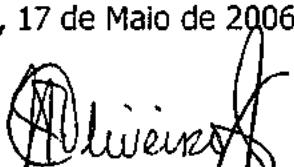
Este certificado expira-se em **17 / 05 / 2011**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 36/2006**, related to the project entitled "***Orthopoxvirus immunogenicity in bovine***", under the supervision of **Erna Geessien Kroon**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the ***Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)***, and was approved in **May 17, 2006**.

This certificate expires in **May 17, 2011**.

Belo Horizonte, 17 de Maio de 2006.


Prof. Humberto Pereira Oliveira
Presidente do CETEA/UFMG

β -Propiolactone: Viral Inactivation in Vaccines and Plasma Products

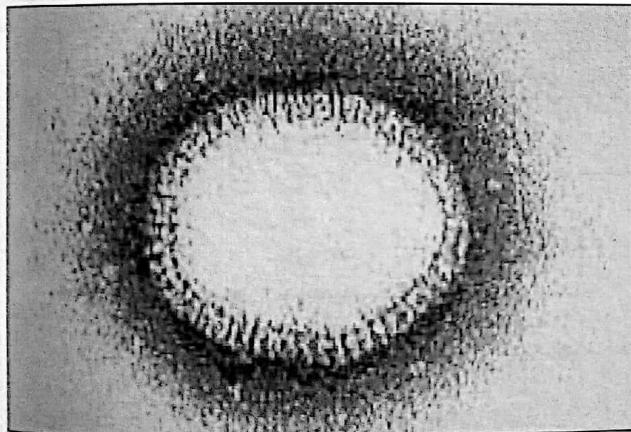
Dr. Stephen A. Lawrence

Ferak Berlin E. Grundemann, Berlin, Germany

Introduction

Viruses are small intracellular particles that consist of a nucleic acid based centre (nucleoid) contained in a protein shell (capsid). The capsid is sometimes surrounded by a lipoprotein membrane which is known as an envelope. Figure 1 shows an electron micrograph of an influenza virus in which the capsid shell can be clearly seen.

Figure 1: An electron micrograph of an influenza virus.



Reproduced by permission of F. Hoffman-LaRoche Ltd., Basle

To obtain safe vaccines and plasma products for both human and veterinary use, several procedures have been developed for viral inactivation. An ideal virus inactivation procedure must be effective against all types of virus (envelope and nonenvelope) over a wide range of conditions without adversely affecting the quality of the bioproduct. Many virus inactivation methods are relatively severe and a compromise between maximum inactivation and product degradation has to be reached. The efficiency of a purification or inactivation step is defined by the log 10 ratio of the

virus concentration in the starting material and the virus concentration in the product.

$$\text{Efficiency} = \log_{10} (V_0/V_f)$$

where V_0 and V_f are the virus concentrations in the initial and final products.

In general, a vaccine or plasma product may be considered safe if the presence of at least one infectious particle in an annual production had a probability of 0.1 to 0.02 (i.e., if the vaccine or plasma product can infect once every ten to one hundred years). The dosage required for a 50kg body weight animal is of the order of 10^{10} viroids and that 10^6 to 10^8 treatment doses are made from the initial viral suspension; this gives a required level of efficiency of $20 \log_{10}$. However, in many cases this level of inactivation cannot be practically attained, even by multistage inactivation, and so quality control procedures are essential to prevent potentially infectious products from reaching the market. For example, at Bio Products Laboratories in the UK, a minimum level of inactivation of $10 \log_{10}$ is considered satisfactory for the processing of plasma products prior to quality control, although values as high as $20 \log_{10}$ have been measured (1). There are many viral inactivation methods available for the processing of vaccines and plasma products which include the use of heat, extreme pH, radiation, detergent/solvent mixtures, formalin and β -propiolactone. Although all of these methods act by modifying the nucleic compounds of vaccines, β -propiolactone, which was first used in the 1950s by Hartmann (2), has several advantages over the other inactivation methods, as follows:

- Unlike solvent/detergent mixtures, it is effective against nonenvelope viruses such as Hepatitis A and Parvovirus B19.
- Unlike other inactivation agents, it modifies not only the nucleic acids responsible for infectivity, but also viral proteins and glycoproteins associated with DNA and so inhibits genome reassortment.
- It is easily hydrolysed to a nontoxic product (β -hydroxypropionic acid).
- Excess β -propiolactone can be neutralized by the addition of thiosulphate.
- When β -propiolactone is used for the production of immunoglobins, complement binding activity is also removed.
- It can be used in aqueous, plasma, or IgG solution.
- It can be used at low temperatures, thus minimizing thermal degradation.
- β -Propiolactone is relatively unstable at ambient temperatures and can be rapidly inactivated by heating solutions containing β -propiolactone to 37°C for two hours.
- It can be stored at -20°C for up to 24 months without any detectable degradation.

This article is concerned with the properties of β -propiolactone and its applications in viral inactivation in vaccines and plasma products.

β -Propiolactone

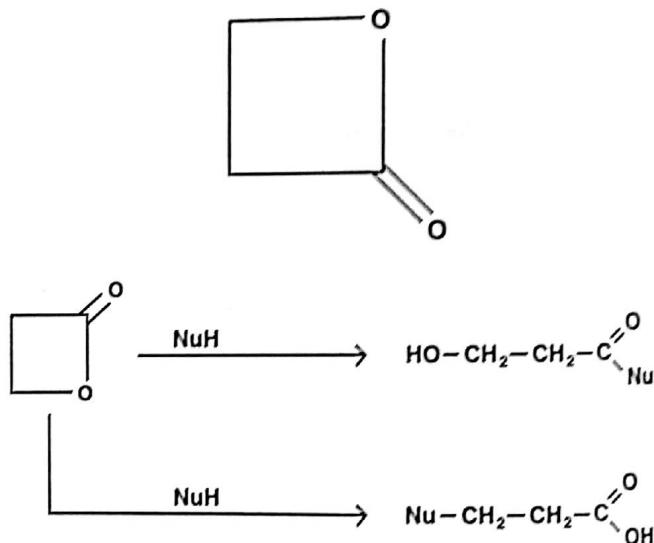
β -Propiolactone (Figure 2) can be prepared from the cyclization of 3-bromo or 3-iodo carboxylic acids with sodium carbonate, sodium bicarbonate, or silver oxide (3). An alternative synthesis of β -propiolactone is from the reaction of formaldehyde with ketene (4). β -Propiolactone is a clear, colourless liquid at ambient temperature but is

prone to rapid polymerization and is best stored at -20°C to prevent polymer formation and degradation. The purity of stored β -propiolactone can be easily determined by simple visual inspection for colour and the presence of white flakes of polymer, or by proton NMR. The proton NMR of a sample of pure β -propiolactone is shown in Figure 3.

Figure 2: β -Propiolactone: its structure and properties.

[57-57-8]

Melting Point	-33.4°C
Boiling Point	162°C
Molecular Weight	72.07



β -Propiolactone is soluble in alcohol, ether, acetone, chloroform, and water, and can be used as a strategic reagent for the synthesis of β -lactam antibiotics, macrocyclic polyamine derivatives, and organometallic complexes (5). β -Propiolactone is very toxic, is a suspected carcinogen, and must only be handled by trained personnel using appropriate protective equipment. It can be absorbed through skin and is also toxic by inhalation. The LD50 measured by inhalation in rats was found to be 25 ppm over six hours. Spillages of β -propiolactone can be neutralized with ammonia solution. When heated, β -propiolactone undergoes explosive polymerisation and for this reason is best stored at -25°C, and solutions prepared for viral

inactivation are used immediately. The reactivity of β -propiolactone is attributed to the strained ring system which opens in the presences of nucleophiles to allow either alkylation or acetylation, depending upon the reaction conditions and the position of the ring cleavage (see Figure 2).

In addition to alkylation and acetylation, there are also two mechanisms of action at DNA nitrogen sites. Unimolecular nucleophilic substitution (SN1) and bimolecular nucleophilic substitution (SN2). For SN1 reactions, the reaction rate is dependent upon the rate of generation of the active species, and for SN2 reactions, it is proportional to the concentration of the active agent.

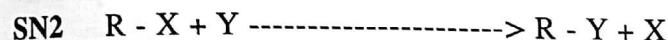
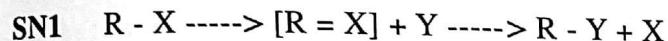
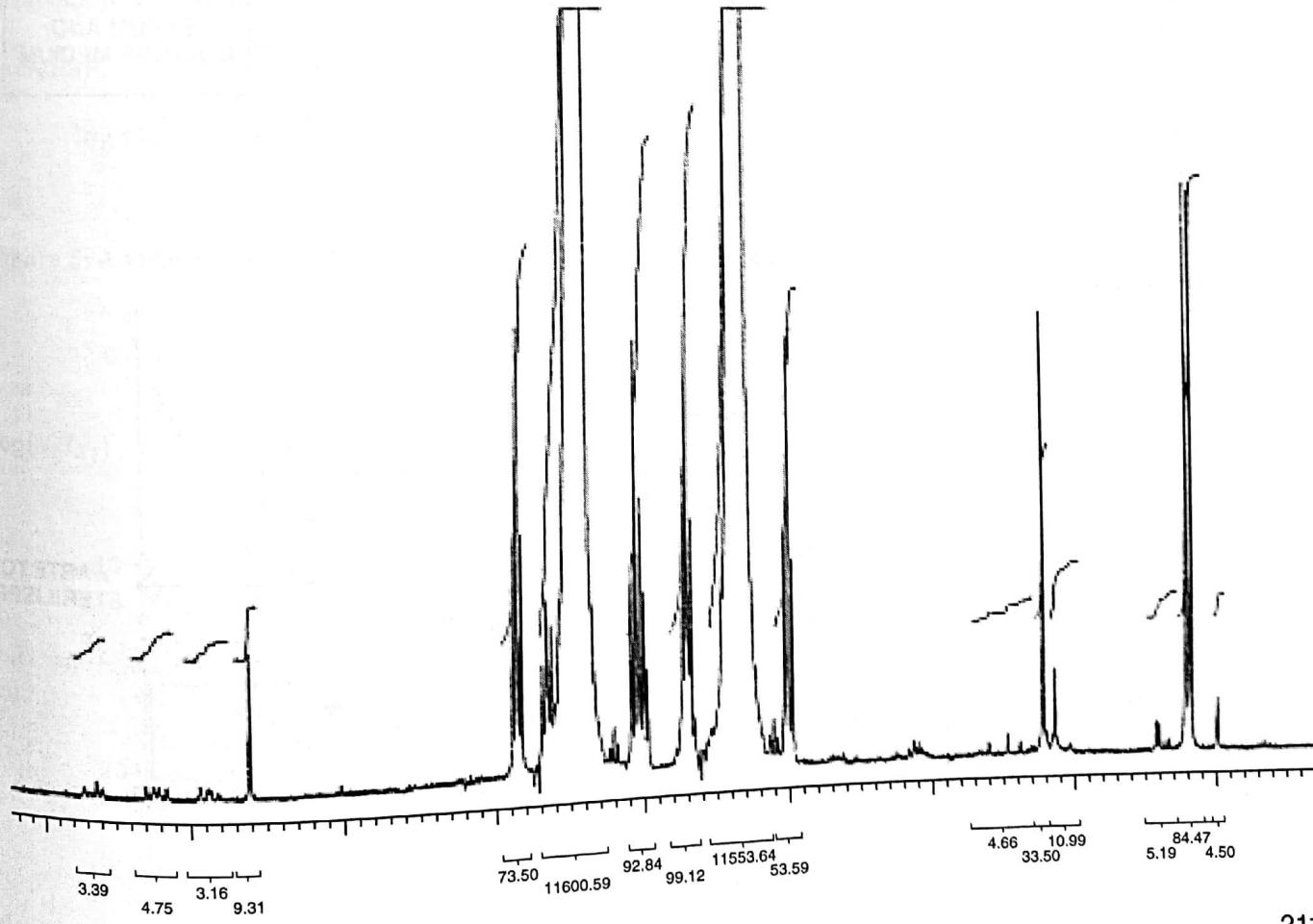


Figure 3: The proton NMR of β -propiolactone.

N-aryl amines usually react via an SN1 mechanism and N-alkyl amines usually follow SN2. In living cells, random alkylations are repairable except at 7-guanine, which renders the DNA unable to replicate. An investigation into the reaction of β -propiolactone with calf thymus DNA isolated 3-(2-carboxyethyl)-thymine and 3-(2-carboxyethyl)-cytosine (6, 7) as the major reaction products which suggest that alkylation is the predominant reaction mechanism over acetylation physiological conditions.

Vaccine Manufacturing

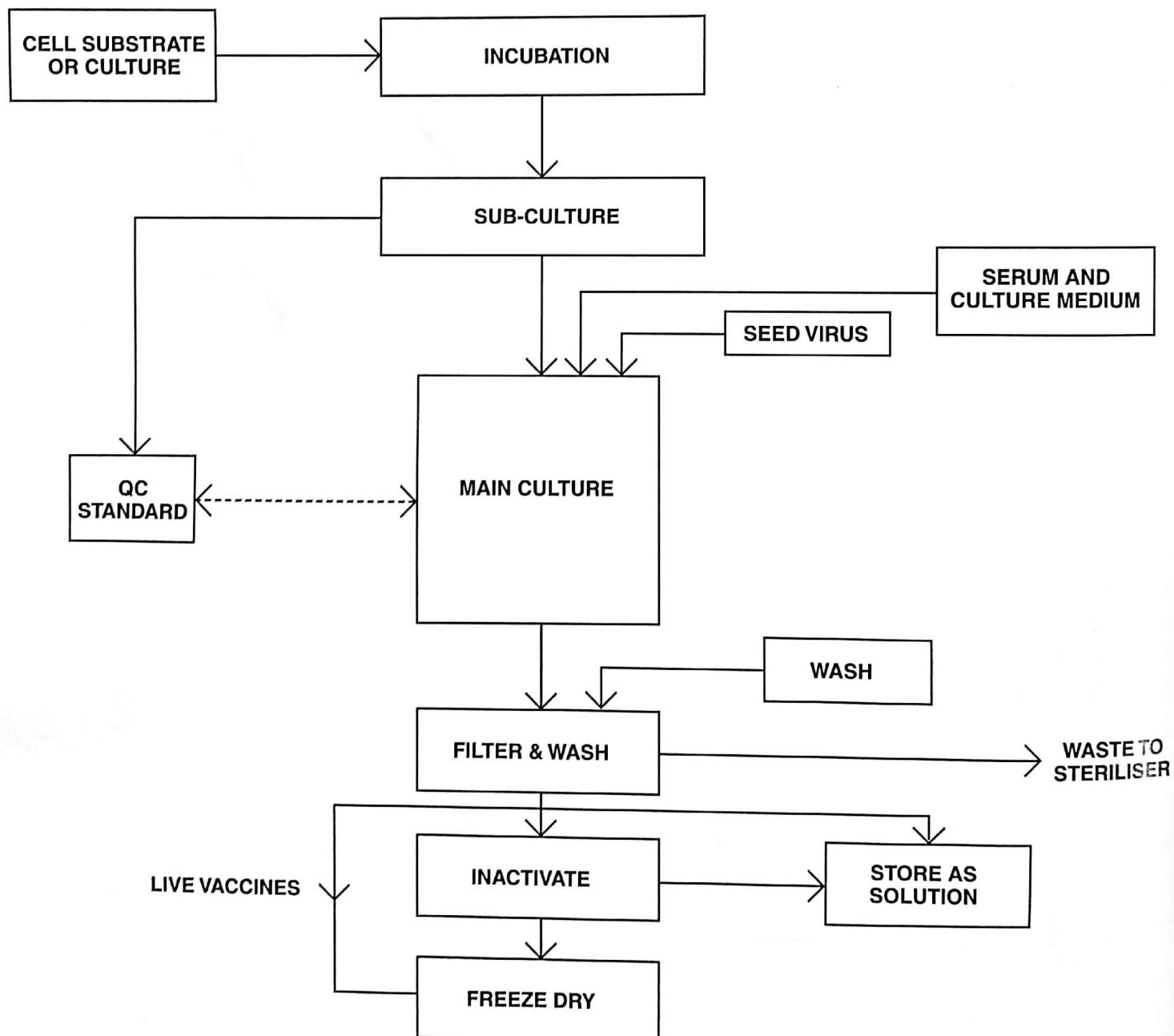
The immune system is the only organ system in humans and animals, apart from the central nervous systems, which possesses a memory. This memory capacity provides the basis for vaccinations against many common infectious diseases. Vaccination may be carried out with live or inacti-



vated (killed) bacteria or with inactivated viruses. Some inactivated vaccines in common use include those against Polio, Rabies, Cholera, Influenza, and Pertussis. Inactivated vaccines have an advantage over live vaccines in that, as they cannot replicate in the body of the host, they are generally less reactogenic, are nontransmissible, and they cannot revert to pathogenicity. In the future it may be possible to carry out vaccinations with naked DNA or peptides. Figure 4 shows a schematic representation of the manufacturing process for vaccines and the virus inactivation stage (if required). The

culture medium used for vaccine production can become contaminated in several ways: the cell substrate or seed virus may become contaminated with foreign viruses; airborne viruses may penetrate the fermentation line; and more importantly, animal sera added to the culture medium as a growth promoter, if not correctly processed, may contain contaminant viruses. Inactivation with β -propiolactone typically takes place at 4°C for 18 to 24 hours and uses a 0.1 to 0.25% aqueous solution. Chemically resistant viruses such as HIV may require a β -propiolactone concentration of up to 1% to achieve

Figure 4: A schematic representation of a vaccine manufacturing process.



inactivation. For example, a 10^8 to 10^9 titre viron can be inactivated in a 0.25% solution of β -propiolactone at pH 6 to 8, which is usually maintained using a 0.2M phosphate or carbonate-based buffer. After inactivation, heating the reaction medium to 37°C and holding for two hours is sufficient to inactivate and excess β -propiolactone or, alternatively, it can be destroyed by the addition of thiosulphate solution if the inactivated virus is heat sensitive. A single β -propiolactone treatment can remove up to 6 log 10 of enveloped viruses and 3 log 10 of nonenvelope viruses (8). Combination of β -propiolactone with UV irradiation can achieve viral inactivation of over 10 log 10 and is effective for both envelope and nonenvelope viruses (8).

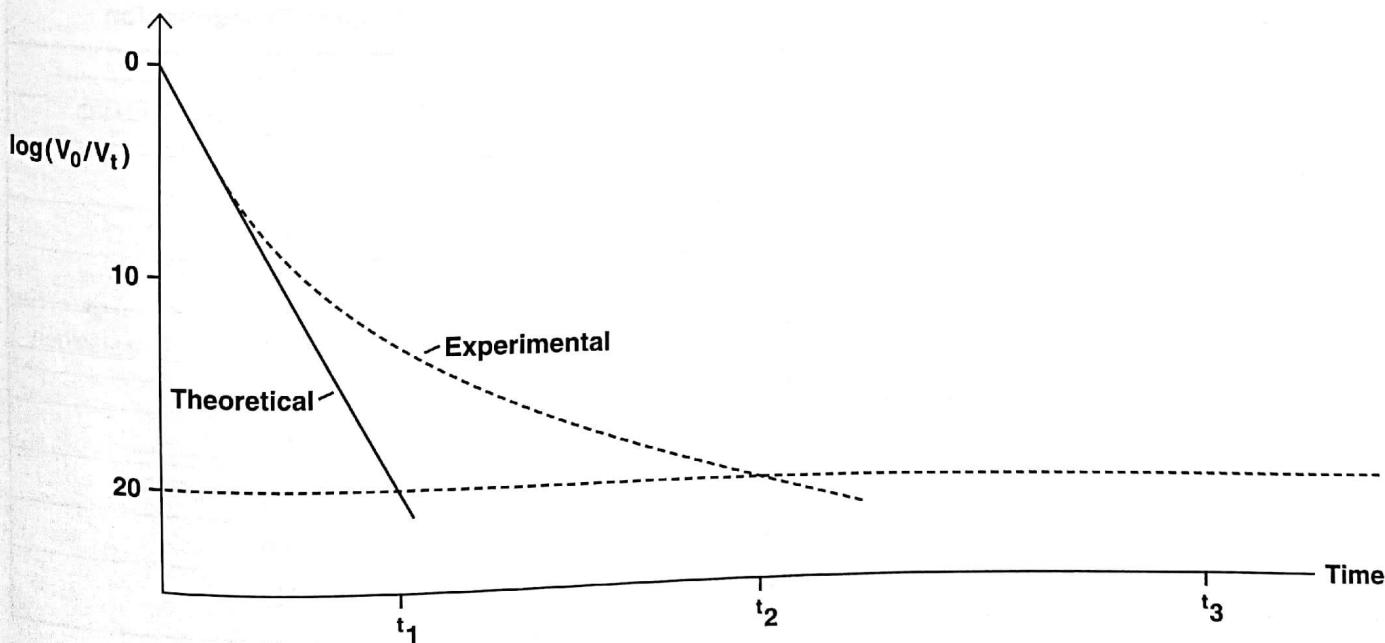
As the termination of genome replication prevents viral replication, the presence of a single irreversible modified component within the genome is sufficient to inactivate the virus. Therefore, the rate of inactivation can be assumed to be the same for all viruses:

inactivation \propto duration of action \times concentration

Therefore,

$$\log(V_0/V_t) = Akt$$

Figure 5: A viral inactivation plot.



where V_0 and V_t = the number of infective virions at times 0 and t

A = the molar concentration of β -propiolactone

k = the rate constant.

However, experimentally it is found that many plots of $\log(V_0/V_t)$ against time are nonlinear and display positive skewing with increasing time indicating that inactivation is biphasic (Figure 5). This skewing of the rate plot may be the consequence of three factors:

- (i) multiple reactivation or genome reassortment,
- (ii) heterogeneity of the viral population, and
- (iii) a decrease in the concentration of β -propiolactone with time.

If the observed decrease in the inactivation rate is due to a decrease in the β -propiolactone concentration, then

$$\log(V_0/V_t) = (k/k_1) A_0 [1 - \exp(-k_1 t)]$$

where

A_0 = the initial concentration of β -propiolactone

and

k_1 = the total rate constant.

When $k_1 = 1$, the log inactivation curve will be linear and if $k_1 \neq 1$, then the curve will be skewed and will reach a plateau at a concentration V_p (i.e., it will be parallel to the horizontal time axis).

This equation makes it possible to calculate the limiting degree of viral inactivation from a single stage β -propiolactone treatment and also to predict if multistep β -propiolactone inactivation or a combination β -propiolactone/UV irradiation is required to achieve a safe level of viral inactivation.

If $t_2 > t_3$, then the experimental conditions are not appropriate for vaccine manufacturing and there will be product degradation and loss of immunological properties. In this instance, a new treatment regime must be employed using a different pH, initial β -propiolactone concentration, or reaction temperature. This is particularly important in the preparation of naked DNA for vaccina-

tion research and it has been found that for a 16 hour treatment at 4°C, the initial β -propiolactone should not exceed 0.25%. Otherwise, this will result in an absence of gene expression from the treated DNA (9).

Blood & Plasma Derivatives

The use of an inactivation step in the manufacture of plasma derivatives such as blood clotting factors, serum, immunoglobulin, albumin, and anti-thrombin helps the recipient of these products avoid becoming infected by parenteral administration. As plasma products are manufactured from pools of over 5,000 individual blood donations, they carry a far higher risk of infective viral contamination on administration than whole blood or red cell transfusions. For the processing of plasma, a minimum inactivation efficiency of 4 log 10 is recommended per treatment step, with the total inactivation being greater than 10 log 10. A list of viruses which can be transmitted by blood or plasma is given in Table 1. The estimated risk of infection from screened blood products in Europe and the USA is 1 in 50,000 to 1 in 1,600,000; however, there is significant scope here for improvement. A schematic representation of the fractionation

Table 1: Viruses which can be transmitted by blood and plasma products.

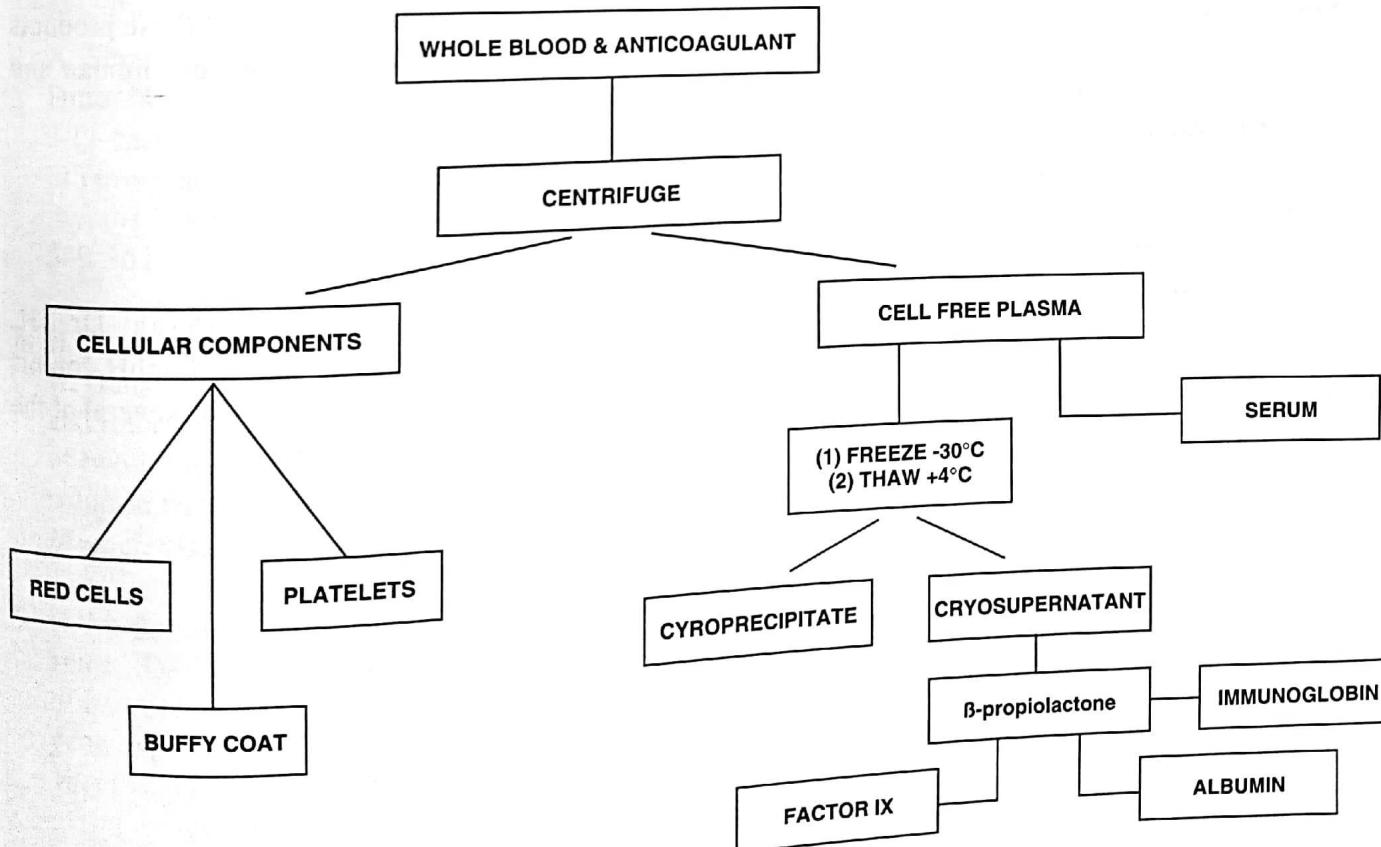
Virus	Blood Transmission	Plasma Transmission
Hepatitis A	Yes	Yes
Hepatitis B	Yes	Yes
Hepatitis C	Yes	Yes
Hepatitis D	Yes	Yes
HIV-1, HIV-2	Yes	Yes
Parvovirus B-19	Yes	Yes
HTLV-I	Yes	No
HTLV-II	Yes	No
CMV	Yes	No
EBV	Yes	No
HHV-6, -7	Yes	No

of whole blood is shown on Figure 6, and shows the stages which are amenable to β -propiolactone inactivation. Although viral inactivation can also be accomplished by thermal methods and solvent/detergent mixtures, these are ineffective against nonenvelope viruses, and the integrity of the product stream must be protected by QC procedures if these methods of inactivation are employed. The use of combined UV irradiation/ β -propiolactone to inactivate fractionated supernatant plasma has been pioneered by Biostest Pharma GmbH, where total process inactivation parameters for nonenvelope viruses of $13.4 \log_{10}$ for HIV-1 and 23.2 to $27.8 \log_{10}$ for pseudo rabies have been reported (10, 11). β -Propiolactone has another advantage over other methods of viral inactivation in that it can be carried out cold and so prevents thermal degradation; for example, the thermal inactivation step used for albumin that involves heating for 10 hours at 60°C can result in 30% denaturalization. However, it should be noted that Factor VIII is unstable in the presence of β -propiolactone and alternative inactivation

procedures have to be employed for its isolation from plasma. When using β -propiolactone to treat plasma, it is important that high purity material which is free from contamination with polymers is used, and that the inactivation procedure is rigidly followed. Where these measures are taken, the β -propiolactone inactivation of viruses contained in the plasma will be completely effective (the release of a single batch of HIV contaminated clotting factor concentrate in Germany in 1989, which subsequently infected eight people, has been demonstrated to be a consequence of a technical failure during the inactivation procedure) (12).

Conditions appropriate for the inactivation of viruses on plasma are 0.25% β -propiolactone at 4°C for five hours at pH 7.2 (buffered) (8). Control of the solution is critical to prevent product degradation as low pH β -propiolactone can become hydrolysed to 3-hydroxypropionic acid, which may then attack guanosine sites and so reduce the antibody titre of the product. In IgG, a slightly differ-

Figure 6: A schematic representation of the fractionation of whole blood.



ent inactivation regime is required (0.1% β -propiolactone at pH 8.1 at 20 to 22°C for eight hours) and inactivation factors are in general about 10% higher than measured in plasma. For example, Feline Calici Virus (FCV) has an inactivation factor of 7.2 log 10 in plasma and 8.12 in IgG, which cannot be accounted for from reaction kinetics or from the virucidal action of the IgG alone, and in some cases the instantaneous inactivation of viruses is observed (8).

Defibrinated plasma, which is known as serum, is used as an *in vitro* growth promoting supplement for cell cultures and is a complex mixture of albumin, transferrin, fatty acids, hormones, polypeptide growth promoters, and other components which help promote cell division. Although some cell production lines can be adapted to serum-free growth, often the rate of cell division is impaired and the process is uneconomic to operate unless 10% of serum is added to the culture medium. Most of the commercially available serum is obtained from animal sources such as Foetal Bovine Serum, Calf Serum, Horse Serum, Guinea Pig Serum, etc., and is fractionated and filtered to remove or reduce the virus content. Although β -propiolactone can be used to inactivate viruses in immunoglobulin solution for human use, it is not always an ideal agent for viral inactivation in serum manufacturing as it may, in some cases, alter the immunogenic activity of vaccines prepared from culture media to which it has been added (13). β -Propiolactone has been used successfully to sterilise human serum proteins (8). However, aziridine and N-acetyl aziridine can be used to treat serum at 4°C without degradation of biological activity (14, 15) and have been used for over 35 years to inactivate poliovi-

rus and foot and mouth virus contained in serum (16). Results of recent work reported by Brown *et al.* (16) suggest that N-acetyl aziridine could be used in the future to sterilise plasma products for human transfusion, although a clinical comparison with β -propiolactone was not made. For vaccines produced from serum containing culture media, however, the use of an inactivation procedure is essential to ensure that the risks of contamination from blood borne viruses is eliminated.

Conclusion

The increasing use of biopharmaceutical products as a prophylactic therapy in humans and animals against possible future infection from transmittable diseases requires that the highest standards and levels of product safety are observed to prevent infection. This is especially critical if biopharmaceutical products are to be used on individuals whose immune systems may already be compromised, for example, by HIV. The risks associated with the transmission of viral infection by plasma derivatives and vaccines with β -propiolactone represents an important method of viral inactivation to control the safety of these products and ensures their suitability for both human and veterinary applications.

Acknowledgement

The author would like to thank Dr. H. Dichtelmuller of Biostest Pharma GmbH for his assistance and for helping to provide several of the references used in this article.

References

1. P. Roberts, "Virus safety of plasma products," *Rev. Med. Virol.*, **6**, 25-28, (1996).
2. G. A. Lo-Grippo, F. W. Hartmann, and A. F. Kelley, "Four-year study concerning the inactivation of viruses in blood and plasma," *Gastroenterology*, **28**, 244-256, (1955).
3. A. J. Anciaux, A. J. Hubert, A. F. Noels, N. Petiniot, and P. Teyssie, "Cyclopropanation of double bonds," *J. Org. Chem.*, **45**, 695-702, (1980).
4. H. E. Zaug, " β -lactones," *Org. Chem.*, **8**, 305-336, (1954).
5. S. A. Lawrence, " β -propiolactone and aziridine: Their applications in organic synthesis and viral inactivation," *Chimica Oggi*, **17**, 51-54, (1999).
6. A. Segal, J. J. Solomon, and U. Mate, "Isolation of 3-(2-carboxyethyl)-thymidine following the invitro reaction of β -propiolactone with calf thymus DNA," *Chem. Biol. Interact.*, **29**, 335-346, (1980).
7. A. Segal, J. J. Solomon, J. J. Mighano, and H. Dino, "Isolation and characterisation of 3-(2-carboxyethyl)-cytosine following the *in vitro* reaction of β -propiolactone with calf thymus DNA," *Chem. Biol. Interact.*, **55**, 349-361, (1981).
8. H. Dichtelmuller, D. Rudnick, B. Breuer, and H. Ganshirt, "Validation of virus inactivation and removal for the manufacturing procedure of two immunoglobins and 5% serum protein solution treated with β -propiolactone," *Biologicals*, **21**, 259-268, (1993).
9. D. M. Fatallah, K. Zeria, M. R. Barbouche, and K. Dellagi, "A model to study the effects of a viral inactivator on DNA ligation and gene expression of *E. coli* and *Cos* cells," *Vaccine*, **17**, 95-98, (1999).
10. H. Dichtelmuller, W. Stephan, A. M. Prince, L. Gurtler, and F. Deinhardt, "Inactivation of HIV in plasma derivatives by β -propiolactone and UV irradiation," *Infection*, **15**, 367-369, (1987).
11. H. Dichtelmuller, D. Rudnick, B. Breuer, and K. H. Ganshirt, "Validation of virus inactivation and removal for the manufacturing procedure of two immunoglobins and a 5% serum protein solution treated with β -propiolactone," *Biologicals*, **21**, 259-268, (1993).
12. B. Kupfer, J. Oldenburg, H. H. Brakmann, B. Matz, K. E. Schneweis, and R. Kaiser, "Inactivated clotting factor concentrate is the source of HIV infection of 8 hemophilia B patients," *Thromb. & Haemostasis*, **74**, 1379-1380, (1995).
13. M. C. Swanson, E. Rosanoffe, M. Gurwith, M. Deitch, R. P. Schurrenberg, and C. E. Reed, "IgE and IgG antibodies to β -propiolactone and human serum albumin associated with urticarial reactions to rabies vaccine," *J. Infect. Disease*, **155**, 909-913, (1987).
14. H. G. Bahnemann, "Inactivation of viruses in serum with binary ethyleneimine," *J. Clinical Microbiol.*, **8**, 299-210, (1976).
15. H. G. Bahnemann, "Inactivation of viral antigens for vaccine preparation with particular reference to the application of binary ethyleneimine," *Vaccine*, **8**, 299-303, (1990).
16. F. Brown, R. F. Meyer, M. Law, E. Kramer, and J. F. E. Newman, "A universal virus inactivant for decontaminating blood and biopharmaceutical products," *Dev. Biol. Standards*, **99**, 119-130, (1999).



NIH Public Access

Author Manuscript

Antiviral Res. Author manuscript; available in PMC 2010 October 1.

Published in final edited form as:
Antiviral Res. 2009 October ; 84(1): 1–13. doi:10.1016/j.antiviral.2009.06.006.

Vaccinia Virus Vaccines: Past, Present and Future

Bertram L. Jacobs^{a,b,*}, Jeffrey O. Langland^{a,c}, Karen V. Kibler^a, Karen L. Denzler^a, Stacy D. White^a, Susan A. Holechek^a, Shukmei Wong^a, Trung Huynh^a, and Carole R. Baskin^{a,d,e}

^a School of Life Sciences, Arizona State University, Tempe, Arizona

^b Center for Infectious Diseases and Vaccinology, The Biodesign Institute, Arizona State University, Tempe, Arizona

^c Southwest College of Naturopathic Medicine, Tempe, Arizona

^d Department of Comparative Medicine, University of Washington, Seattle, Washington

^e Washington National Primate Research Center, University of Washington, Seattle, Washington

Abstract

Vaccinia virus (VACV) has been used more extensively for human immunization than any other vaccine. For almost two centuries, VACV was employed to provide cross-protection against variola virus, the causative agent of smallpox, until the disease was eradicated in the late 1970s. Since that time, continued research on VACV has produced a number of modified vaccines with improved safety profiles. Attenuation has been achieved through several strategies, including sequential passage in an alternative host, deletion of specific genes or genetic engineering of viral genes encoding immunomodulatory proteins. Some highly attenuated third- and fourth-generation VACV vaccines are now being considered for stockpiling against a possible re-introduction of smallpox through bioterrorism. Researchers have also taken advantage of the ability of the VACV genome to accommodate additional genetic material to produce novel vaccines against a wide variety of infectious agents, including a recombinant VACV encoding the rabies virus glycoprotein that is administered orally to wild animals. This review provides an in-depth examination of these successive generations of VACV vaccines, focusing on how the understanding of poxviral replication and viral gene function permits the deliberate modification of VACV immunogenicity and virulence.

Keywords

poxvirus; orthopoxvirus; smallpox; biodefense; vaccinia virus; vaccine vector; vaccination complications; vaccinia E3L

I. Introduction

Vaccination against smallpox, first introduced by Edward Jenner more than 200 years ago, was the single most effective public health intervention in human history. From its origin on a farm in Gloucestershire, England, vaccination spread around the world, leading eventually to a global campaign that eradicated smallpox in the late 1970s. Although the elimination of the

*Corresponding Author: Bertram L. Jacobs, School of Life Sciences, CIDV/Biodesign, Arizona State University, Box 875401, Tempe, AZ 85287-5401, Phone 480 965-4684, FAX 480 727-7615, bjacobs@asu.edu.

Publisher's Disclaimer: This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final citable form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

disease was followed by the termination of national vaccination programs, interest in VACV, the smallpox vaccine, did not end. Over the past three decades, a number of novel attenuated variants of VACV with improved safety profiles have been produced through a variety of laboratory methods. At the same time, the ability of the VACV genome to accommodate additional genetic material has enabled molecular virologists to produce a large number of candidate vaccines that target a wide range of microbial pathogens.

In this article we review how VACV has been developed over the past four decades as a candidate vaccine for a variety of uses, and discuss how genetic engineering could lead in the future to new VACV vaccines that are both safe and highly immunogenic. We first discuss the replication and immunogenicity of the wild-type (wt) VACV employed during the smallpox vaccination campaign (“first-generation” VACV) and newer forms of wt (second-generation) VACV that are now being stockpiled for defense against a possible re-introduction of smallpox by terrorists. We then review forms of third-generation VACV that were attenuated through sequential passage in an alternative host and fourth-generation viruses produced through “engineering” of the VACV genome. We then examine the potential need for rapidly immunogenic forms of VACV that could be used for postexposure vaccination in the event of a re-introduction of smallpox through bioterrorism. In the final section, we review how VACV is being used as a vehicle to develop novel vaccines against heterologous agents, and discuss how future efforts should focus on both safety and immunogenicity.

II. Orthopoxvirus antigenic cross-reactivity and replication strategy

The family *Poxviridae* is divided into 8 genera. Of greatest interest to humans is the genus *Orthopoxvirus*, which includes variola virus, the agent of smallpox, cowpox virus, the original vaccine used by Jenner, and VACV, which apparently replaced cowpox virus for use in vaccination some time in the 19th century. Because of the highly conserved nature of orthopoxvirus structural proteins, immunization with VACV provides cross-protection against variola and other orthopoxviruses, such as monkeypox.

Poxviruses have large genomes (130,000–375,000 nucleotides), allowing the insertion and high level expression of large foreign genes, making them ideal as recombinant vaccine vectors. Several features of the poxvirus replication cycle also influence how these agents are employed as vaccines. Soon after the virion core enters a cell, early gene transcription results in the production of a wide variety of immunomodulatory proteins that block innate antiviral defenses, including the type I interferon (IFN) response. As discussed below, deletion or modification of these viral genes has proved to be an effective method of modifying VACV virulence. Later in the replication cycle, infectious virus is produced first in the form of intracellular mature virions (MV), which form the basis of all VACV vaccines. Further maturation is required to produce the extracellular enveloped virions (EV) that are required for the extracellular spread of VACV. Deletion of genes encoding EV proteins such as B5R has also resulted in attenuated VACV vaccines (see below).

III. Vaccine development before the global smallpox eradication campaign

Historically, the first efforts at immunization against smallpox were practiced as early as 1000 CE involving a process known as variolation (Radetsky, 1999). This involved deliberate inoculation either by insufflation or scarification (Fenner, 1988) of an individual using variola virus obtained from the smallpox pustules of a patient with active disease, which typically resulted in a severe localized reaction, a generalized rash, and constitutional symptoms, but with a case fatality rate of 0.5–2% compared to 20–30% following natural variola infection. Despite the high incidence of complications, variolation was commonly practiced up until the beginning of the 19th century.

Because all orthopox viruses are antigenically related, immunization with nearly any orthopoxvirus can protect against challenge with other orthopoxviruses (Figure 1). In the late 1700s, Edward Jenner discovered that cowpox virus could be used successfully to protect humans against smallpox. Since vaccination with cowpox was much safer than variolation, it quickly became the primary method of conferring protection. Over time, VACV replaced cowpox virus as the agent used for vaccination. Of note, VACV is genetically distinct from either cowpox virus or variola virus, and its origin remains unknown, although it is most closely related to horsepox virus (Tulman et al., 2006). Jennerian vaccine viruses represent the 1st generation of orthopox virus vaccines as vectors (Table 1).

IV. First-generation VACV vaccines and global smallpox eradication

Humans are the only known natural reservoir for variola virus. Due to this and the effectiveness of the VACV vaccine, an intensified global smallpox eradication program was begun in 1966 (Parrino and Graham, 2006; Rotz et al., 2001). The basic strategy for this program involved mass vaccination campaigns in each country and the development of surveillance systems to detect and contain outbreaks. Thanks to these measures, the last naturally occurring case of smallpox occurred in Somalia in 1977, and in May 1980, the World Health Assembly certified that the world was free of naturally occurring smallpox (Rotz et al., 2001; Wehrle, 1980). In 1982, the only active licensed producer of VACV vaccine in the United States discontinued production for general use, and in 1983, distribution to the civilian population was discontinued (Rotz et al., 2001).

During the smallpox eradication program, the majority of the vaccine was manufactured on the skin of live animals including calves, sheep, buffaloes and rabbits (2002). Many VACV strains were used during the eradication program. The New York City Board of Health (NYCBH) strain was used in the Americas and in West Africa. Following the eradication program and continuing until August 2007, the Wyeth Laboratories, Inc. Dryvax® vaccine was the only commercially approved smallpox vaccine available for limited use in the United States (Rosenthal et al., 2001). The Dryvax® vaccine was manufactured from the lymph fluid of calves' skin infected with the NYCBH strain. The EM-63 strain used in Russia was a derivative of the NYCBH strain and was widely used in the eradication of smallpox in India (2002). The Lister or Lister/Elstree strain was developed at the Lister Institute in the United Kingdom. From 1968 to 1971, the Lister strain became the most widely used vaccine throughout the world (Rosenthal et al., 2001).

Additional vaccine strains included the Paris strain (France), the Copenhagen (Cop) strain (Denmark), the Bern strain (Switzerland), the Ankara strain (Turkey), the Temple of Heaven and the Vaccinia Tian Tan (VTT) strains (China), and the Dairen strain (Japan). A 2006 study suggested that adverse complications vary considerably among the different vaccine strains (Kretzschmar et al., 2006). Overall, vaccination with the NYCBH strain caused the lowest rate of adverse effects, whereas vaccination with the Lister strain led to an intermediate rate of adverse effects. The Copenhagen strain led to intermediate/high rates of adverse events and the Bern strain led to the highest rate of adverse reactions (Kretzschmar et al., 2006).

B. Nature of the vaccine “take” and vaccination complications

Typically following vaccination, a vesicular or pustular skin lesion at the site of inoculation is indicative of a successful vaccination or “take”. With the current concern of variola virus being reintroduced into the human population through a bioterrorism event or of the emergence of monkeypox as a significant human pathogen, the use, efficacy and safety of the VACV vaccine is being re-evaluated (Kretzschmar et al., 2006; Neff et al., 2008; Parrino and Graham, 2006). Forty to 47% of vaccinees report mild pain at the site of inoculation and 2–3% reports the pain as severe. Fever is common after vaccination with 5–9% reported above 100°F (37.7°C) and

3% above 102°F (38.8°C) (Kretzschmar et al., 2006; Rotz et al., 2001). In addition, many vaccinees report a variety of mild systemic complications, including headache, myalgia, chills, nausea and fatigue (Table 2). Moderate and severe complications of VACV vaccination include eczema vaccinatum (in vaccinees with a history of eczema or atopic dermatitis), generalized vaccinia, progressive vaccinia (in immunocompromised vaccinees), myopericarditis and postvaccinal encephalitis (mostly in children) (Table 1). Moderate to severe complications occur in approximately 1 to 250 individuals per million primary vaccines (Rotz et al., 2001). Because of the recently identified high incidence of myopericarditis, increased surveillance for cardiac events during clinical trials for future smallpox vaccines will be imperative (Sniadack et al., 2008).

C. Replication and immunogenicity of wild-type vaccinia viruses

The ability of live VACV vaccines to replicate and generate a protective immune response following challenge has been well documented. The replication capacity of these vaccines in tissue culture cells has shown a broad host range as well as ability to replicate in multiple cell types. In laboratory settings, these viruses are routinely grown in kidney-derived cell lines made from non-human primates such as Vero and BSC-1/BSC-40 cells (Abdalrhman et al., 2006; Meseda et al., 2005; Zhu et al., 2007), from rabbit such as RK-13 (Kidokoro et al., 2005), or hamster (BHK-21) (Jentarra et al., 2008; Vijaysri et al., 2008) sources. Kidney-derived fibroblast cell lines such as BHK-21 seem to be especially permissive for replication and therefore are widely used for preparation of viral stocks. This may be due to the presence of an inhibitor of the interferon-induced PKR protein that has been partially characterized in these cells in our lab (Langland and Jacobs, unpublished observations). Epithelial and fibroblast cell lines from human cervix or lung tissues (HeLa, MRC-5, A549) (Legrand et al., 2004; Sharon et al., 2007; Verardi et al., 2001; Wyatt et al., 2004) and murine fibroblastic cell lines (L929, NIH3T3) (Verardi et al., 2001; Zhu et al., 2007) are also used to grow viral stocks as well as test viral replicative capacity and host range.

The ability of a particular VACV strain to grow in certain cell lines does not always correlate linearly with local or systemic virulence *in vivo* (Abdalrhman et al., 2006; Fang et al., 2005; Verardi et al., 2001). Therefore, the replication capacity of VACVs has to be further characterized by measuring viral load in tissues after vaccination or infection. The highly neuropathogenic Western Reserve (WR) strain, originated from passaging the NYCBH strain in mice, replicates to high titers in nose, lungs, brain, ovaries, and skin of that species; (Brandt et al., 2005; Jentarra et al., 2008; Vijaysri et al., 2008). The Wyeth and Lister strains also replicate well in lungs of mice, but replicate at least three orders of magnitude lower in the brain than WR following intranasal (IN) infection (Abdalrhman et al., 2006; Hayasaka et al., 2007). NYCBH grows nearly as well as WR in skin of mice, while Wyeth strain isolates (Dryvax®) grow to 6- to 20-fold lower titers than WR (Lee et al., 1992).

Concurrent with replication on the skin is the formation of pocks that signify a positive vaccine “take”. A dose of 1×10^5 plaque-forming units (pfu) WR is required for 100% pock formation in mice, while VACV Lister requires only 2×10^3 pfu (Jentarra et al., 2008; Sharon et al., 2007). The discrepancy between these two strains could be due to the fact that WR is a neuroadapted strain and may not replicate as well on skin when administered at lower doses. Despite the higher take efficiency of the Lister strain, a 1 log higher dose is required to fully protect mice upon wild type lethal challenge (Sharon et al., 2007). In contrast, a dose of 2×10^4 pfu of the NYCBH or Cop strain gives mild pock formation but is sufficient to protect mice from lethal wild type challenge (Table 4).

In summary, a “take” may indicate a certain level of localized or systemic viral replication, but may not necessarily be enough to completely protect an animal from lethal challenge. Traditionally, a dose of 2.5×10^5 pfu of a replicating wt VACV strain is given to induce

protection in humans although it should be noted that dilutions of Dryvax® appear to provide protective immunity (Couch et al., 2007; Miller et al., 2008). Historically, protection against smallpox in humans has been found to be due to the presence of neutralizing antibodies in the sera of infected individuals (Downie and McCarthy, 1958; Mack et al., 1972). In experiments using mice vaccinated and challenged with wt VACVs, neutralizing antibodies are measurable after vaccination with VACV Lister at the 2 highest doses (5×10^4 to 5×10^5 pfu) (Abdalrhman et al., 2006), and at the higher dose, neutralizing antibody levels steadily increase during the year following vaccination (Ferrier-Rembert et al., 2008). However, the induction of protection does not always correlate with levels of neutralizing antibodies induced upon vaccination. Scarification with 1×10^6 pfu VACV WR induces high levels of neutralizing antibodies, while scarification with the same dose of either the weaker VACV NYCBH or the VACV Cop strain does not induce high levels of neutralizing antibodies but nevertheless provides protection against lethal challenge (Jentarra et al., 2008) and unpublished observations).

Immunization with wt VACVs induces activation of CD8+ lymphocytes that serve as additional correlates of protection. In humans, immunization with 2.5×10^5 pfu Dryvax® induces an effector CD8+ cell population in which 3–14% of CD8+ T cells produce IFN- γ upon ex vivo stimulation. At 1 month post-vaccination, these CD8+ cells display memory cell markers and at 6 months post-vaccination, these cells can be reactivated (Miller et al., 2008). In mice, scarification with Dryvax® and VACV Lister induce IFN- γ -secreting CD8+ cells which are measurable for 5 months post-vaccination (Ferrier-Rembert et al., 2008). The specific involvement of CD8+ cells was tested by antibody depletion studies in naïve mice followed by challenge. CD8+ cells were required for prevention of weight loss in naïve animals, presumably by providing a non-specific cell-mediated response until the advent of a humoral response (Belyakov et al., 2003). Further support for the importance of an early and non-specific cell-mediated response is seen in immunization of B-cell-deficient mice. Upon challenge, these animals display an initial weight loss but recover completely (Belyakov et al., 2003).

V. Second-generation vaccines: new forms of wild-type VACV

The use of live animals for the production of vaccine material has changed due to current unacceptability of this process and quality control issues regarding microbial contamination. This has led to the production of “second generation” smallpox vaccines using tissue culture systems or embryonated chicken eggs. VACV vaccine prepared in embryonated chicken eggs was used in large scale during the eradication campaign in South America and is the standard commercial vaccine in Israel. However, experience with vaccine material produced in cell culture is limited. Vaccine was prepared on chick embryo fibroblasts in Japan before eradication of the disease, but its effectiveness is not well documented (Fenner, 1988).

ACAM2000™ is a “second generation” smallpox vaccine licensed for use in the United States as of August 2007. The vaccine was derived from plaque purification of a Dryvax® isolate that was subsequently manufactured in the Vero monkey cell line. For the naïve population, the percentage of “takes” and complications using ACAM2000™ was similar to Dryvax® vaccinees. ACAM2000™ was also found to be acceptable as a booster in those previously vaccinated for smallpox. Nevertheless, a significant minority of the population has contraindications that prevent pre-exposure use of “first” or “second generation” smallpox vaccines (Greenberg and Kennedy, 2008). Therefore substantial work is being directed toward the development of safer, yet immunogenic vaccines. These “third generation” vaccines involve genetically altering the VACV genome in order to create non-replicating or highly attenuated VACV strains that still retain their immunizing properties against smallpox.

VI. Third-generation vaccines: attenuation through sequential passage

One commonly used technique to attenuate VACVs involves multiple passaging of the wt viruses in tissue culture cells from alternative hosts, which has been shown to alter properties such as viral host range, virulence, and genome composition. Passaging of viruses through alternative hosts has been used for over 80 years to obtain attenuated viral strains (Monath, 2005). Arguably the most effective human viral vaccine, the 17D yellow fever virus vaccine, was obtained by nearly 400 passages of the yellow fever virus through primary mouse and chicken cells in culture. In the case of VACV, there are three current vaccine candidates that have been obtained by passage through alternative hosts, Lister clone 16m8 (LC16m8), Modified Vaccinia Ankara (MVA) and Dairen I Strain (DIs).

A. LC16m8

LC16m8 was developed in Japan in 1975, by passaging the Lister strain through primary rabbit kidney epithelial cells (PRK) at a low temperature (30° C) (Kenner et al., 2006). The Lister virus was initially passaged 36 times through PRK cells, and individual clones were then evaluated for growth on monkey kidney Vero cells, in order to gauge their ability to replicate in primate tissues. LC16, which grew to the lowest titer in Vero cells, was passaged 6 more times under identical conditions. LC16m0, which formed medium-sized pocks on chick chorioallantoic membranes (CAM), was isolated from this stock and passaged 3 more times on PRK cells. LC16m8 was then isolated from this latter stock as a clone that both replicated poorly in Vero cells and formed small plaques on CAM, PRK, and RK13 cells. *In vivo*, LC16, LC16m0 and LC16m8 strains have a take rate similar to the Lister strain, but are temperature-restricted, have limited host range and greatly reduced adverse effects, including neurovirulence (Kenner et al., 2006).

The *in vitro* phenotype of the LC16m8 clone was attributed to a frame-shifting single nucleotide deletion in the B5R gene, in contrast to the Lister and LC16m0 viruses (Morikawa et al., 2005; Takahashi-Nishimaki et al., 1991). The B5R gene encodes an EV protein, with homology to complement regulatory proteins (Takahashi-Nishimaki et al., 1991) which is essential for efficient EV formation. EVs are necessary for effective virus dissemination, both in cells in culture and within an infected host (Herrera et al., 1998). Presumably the lack of EV formation in cells infected with LC16m8 leads to the small plaque phenotype in RK cells, and the failure to form plaques in Vero cells. Since this phenotype is caused by a single base pair deletion, the LC16m8 strain can easily revert to the wild type version, and the small plaque phenotype in particular is unstable on passage (Kidokoro et al., 2005). A stabilized version of LC16m8, containing a deletion of the entire B5R gene, has been developed to overcome this problem (Kidokoro et al., 2005). The mutation(s) responsible for the temperature restriction and *in vivo* attenuation phenotypes of LC16, LC16m0 and LC16m8 may be likewise unstable. While the relevant loci have not yet been mapped, there are no large deletions in the genome of LC16m8, compared to non-attenuated strains, and 192 of the 198 major Open Reading Frames (ORFs) of VACV Cop are open in LC16m8 (Morikawa et al., 2005).

VACVs containing mutations in B5R, as that found in LC16m8, may have unique utility in people with pre-existing immunity to VACV. Since B5R is the primary target of neutralizing antibodies in response to EV (Bell et al., 2004), Viner et al. theorized that deletion of the B5R gene would be a means to overcome pre-existing immunity to VACV among those who have received smallpox vaccinations. Further, they also reported that the deletion of B5R in conjunction with use of the thymidine kinase (TK) locus for expression of a heterologous protein resulted in a vector with reduced virulence (Viner et al., 2007). However, the lack of induction of immunity to B5R may make LC16m8 a less efficient vaccine for protection against orthopoxviruses.

B. Modified Vaccinia Ankara

MVA was derived in the late 1950s by passaging the chorioallantois VACV Ankara (CVA) strain of VACV more than 570 times in chick embryo fibroblast (CEF) cells, resulting in a host range restricted virus that is replication-defective in most mammalian cells (McCurdy et al., 2004). This highly attenuated strain is unable to replicate in human cells and in clinical trials presented no adverse reactions (Sutter and Moss, 1995). MVA was safely used to vaccinate over 100,000 people in Germany (Mayr, 2003), yet its effectiveness against smallpox remains untested.

An intermediate virus, CVA382, which is attenuated in mice, was obtained at the 382nd passage in CEF cells (Meyer et al., 1991). CVA382 has four large deletions, two each in the left and right species-specific terminal regions of the VACV genome, compared to CVA (Meyer et al., 1991). These regions of the genome contain non-essential genes that are often involved in evasion of the host innate immune response, and genes necessary for maintaining the broad host range of VACV. MVA has several additional large deletions in the terminal arms, and contains numerous point mutations relative to fully replication-competent VACV strains (Antoine et al., 1998; Meyer et al., 1991). In all, MVA appears to have lost nearly 30 kb of genomic information. Consequently, MVA replicates efficiently only in CEF and BHK cells. Replication is restricted in all human cells that have been tested (Meyer et al., 1991; Wyatt et al., 1998) and the virus is highly attenuated in mice (Meyer et al., 1991). In most cells MVA makes early, intermediate, and late proteins, but only immature virions are formed (Sutter and Moss, 1992). This is unique, in that most other host range restricted VACVs that have been identified lead to a block in viral protein synthesis (Meng et al., 2008), as opposed to a block in viral maturation.

Both CVA 382 and MVA contain a deletion in the K1L host range gene, a gene that is essential for replication in RK13 (Perkus et al., 1990) and other cells. While restoration of the missing sequences in the K1L gene restores replication of both viruses in RK13 cells, and partially restores replication in human Hep-2 and Vero cells, it does not restore replication of MVA in human HeLa, MRC-5 and HRT-18 cells, nor does it restore pathogenicity in mice (Meyer et al., 1991; Wyatt et al., 1998). Thus, MVA contains additional host range-restricting mutations in addition to the deletion of K1L. These additional mutations all appear to affect non-overlapping reading frames in the left terminal region of the genome, and restoration of this region in its entirety leads to a near normal host range (Wyatt et al., 1998).

MVA has been extensively studied as the “gold standard” for VACV-based vaccines. It is considered effective because it provides a complete antigenic dose by completing the already initiated replication cycle, an important characteristic for the generation of antibodies against late viral envelope proteins that are required for neutralization of VACVs, yet safe because it does not go through further cycles in primary human cells (Blanchard et al., 1998; Ludwig et al., 2005). MVA shows a similar antibody profile as Dryvax®, and produces antibodies to both membrane and core proteins (Davies et al., 2008). MVA has been shown to induce a protective immune response against monkeypox virus in non-human primates (Earl et al., 2004; Earl et al., 2008). In addition to having deletions in host range genes that may limit MVA replication in human cells, MVA lacks a number of immunomodulatory genes encoding soluble receptors for type I and type II IFNs, tumor necrosis factor (TNF), and CC chemokines (Blanchard et al., 1998). Lack of these immunomodulators affects the viral replication cycle by blocking host protein synthesis more effectively and by inducing apoptosis more rapidly which may augment antigen presentation and immunogenicity of MVA (Chahroudi et al., 2006; Larsson et al., 2001). However, a comparison study of VACV-based smallpox vaccines suggests that higher doses or multiple doses of MVA are required to achieve the immune protection seen with a single dose of wt replicating VACV. In the mouse model, MVA used at a 1–2 log higher dose than Dryvax® or in a prime-boost regimen is required to get VACV-specific CD8+ cells and

IgGs to levels comparable to that of a single administration of the commercial vaccine (Meseda et al., 2005; Wyatt et al., 2004). Similarly, another study evaluated two doses of MVA (IMVAMUNE®) given prior to Dryvax® in an attempt to reduce adverse effects from Dryvax®. This regimen indeed resulted in lessened localized reactions, but no higher neutralizing antibody titers and similar numbers of IFN- γ producing cells were measured as compared to Dryvax® alone (Frey et al., 2007) (Kennedy and Greenberg, 2009).

C. Dairen I Strain

The DI strain of VACV was obtained after 13 serial passages of the parental Dairen (DIE) vaccine strain in 1 day old eggs (Tagaya et al., 1961). The DI strain was first noticed as forming tiny plaques on CAM, in contrast to the parental strain, and was isolated after several rounds of pock formation on CAM. DIs contains a 15.4 kb deletion in the left terminal region of the VACV genome, from C9 to K5L, that apparently occurred by homologous recombination between two 16 base pair sequences that are nearly identical (Ishii et al., 2002). This deletion encompasses the well-characterized host range genes, K1L and C7L, as well as the IFN resistance gene, K3L. Consequently, DIs has a highly restricted host range, which is not simply restored with replacement of K1L and C7L, suggesting the existence of additional and yet unknown host-range genes in this region (Ishii et al., 2002). Of note, this deletion in the host-range determining region of VACV is similar to, although more extensive than, the region deleted in the left arm of the genetically engineered third generation smallpox vaccine NYVAC (Paoletti et al., 1994).

D. Comparison of 3rd-generation vaccines

LC16m8, DIs and MVA have all been obtained by passage on alternative hosts. Nonetheless, while there are some similarities among the three viruses, there are numerous differences as well. DIs and MVA were both obtained by passage in chicken cells, and both have large deletions in the host range determining region, which makes both viruses replication defective in most mammalian cells. Despite this similarity in host range, MVA contains a functional C7L host range gene, while this gene is deleted in DIs. MVA was passaged more extensively than DIs, which may be responsible for the additional large deletions, and numerous small insertions and deletions present in MVA, in both the left and right terminal arms of the virus. These additional mutations in innate immune evasion genes in MVA may be responsible for the unique ability of this virus, among non-genetically engineered orthopoxviruses, to induce proinflammatory signal transduction, proinflammatory gene expression, and to lead to an increased migration of immune cells to the site of immunization (Guerra et al., 2007) (Lehmann et al., 2009). The ability of MVA to induce proinflammatory cytokines may have a profound influence on its ability to induce adaptive immunity. Induction of proinflammatory signaling and proinflammatory gene expression by DIs has not been reported. LC16m8 was obtained by passage through rabbit kidney cells, and rather than having large deletions it has one single base pair deletion in B5R, and likely has other small mutations that alter gene function to give the temperature restriction and low pathogenicity of this virus. LC16m8 has an intact host range determining region, and appears to be replication competent in most mammalian cells. Thus, the properties of these viruses as vaccines may be very different. As a replication competent virus LC16m8 may have properties closer to a wt-VACV than DIs or MVA. However, the failure to make EV may at least potentially affect the efficacy of LC16m8 as a replacement smallpox vaccine.

VII. Fourth-generation vaccines: attenuation through genetic engineering

With the advances in biotechnology that allow insertion, deletion and interruption of genes in specific genomic sites, targeted attenuation of viruses became a practical goal. For VACV this has involved deletion of immune-modulating, host-range and accessory nucleotide metabolism

genes, as well as deletion of essential genes, that can be complemented by cell lines expressing the targeted VACV gene. The goal of deleting genes from VACV is to attenuate the virus while maintaining or increasing immunogenicity. While attenuation can certainly be attained by deleting genes from VACV, there has been limited evidence that immunogenicity can be increased by deleting genes from VACV. Deletion of one of three genes, E3L, B15R/184R, or A41L can increase T-cell responses (Clark et al., 2006; Cottingham et al., 2008; Jentarra et al., 2008; Staib et al., 2005), but other single gene deletions, such as B8R, have had minimal effect (Alcami and Smith, 1995a; Alcami and Smith, 1995b). At best, immunogenicity appears to be maintained after deleting genes from VACV, although often only at higher doses compared to a more wt parent. This may be due to the need to delete gene families rather than single genes or to the limitations of historical analyses of immune responses. A summary of modifications through genetic engineering is shown in Table 3.

A. Attenuation through deletion of immune modulating, accessory, or essential genes

One of the best characterized genetically attenuated mutants of VACV is NYVAC, which has a deletion of 18 open reading frames (ORFs) (Tartaglia et al., 1992). The deleted genes include a cassette of 12 ORFs spanning C7L through K1L, a host range region; TK; the hemorrhagic region, B13R and B14R; A26L, the A-type inclusion region; A56R, the hemagglutinin gene; and the ORF I4L, which encodes the large subunit of ribonucleotide reductase. NYVAC was derived from VAVC Cop, and is highly attenuated in human cell lines, but still retains the ability to induce strong immune responses (Paoletti et al., 1994; Tartaglia et al., 1994).

In non-permissive cells NYVAC progresses through early stages of viral replication and then stops (Najera et al., 2006). Consequently, a one log higher dose than MVA is required for seroconversion, probably due to lack of late stage protein expression (Ferrier-Rembert et al., 2008). IFN- γ -producing CD4+ and CD8+ cells are initially comparable between NYVAC, MVA, and VACV Lister but longer term studies (150 days) suggest that Lister ultimately results in higher IFN- γ -producing CD4+ cells and neutralizing antibodies. Only MVA and Lister produce neutralizing antibodies within 28 days post-vaccination, even with a NYVAC prime-boost regimen (Ferrier-Rembert et al., 2008).

The VACV B8R gene encodes a homolog of the secreted IFN- γ receptor; loss of this gene impairs the ability of the virus to block the activity of the host cytokine, thus attenuating the virus (Verardi et al., 2001). Yet the deletion of B8R did not prevent replication of the virus in human or mouse cells *in vitro*. Additionally, there were no significant differences in humoral and cellular immune responses of immunocompetent mice infected with a B8R deleted-VACV or the parental virus, and despite prior studies suggesting that the B8R gene does not affect virulence of VACV in mice (Alcami and Smith, 1995a; Alcami and Smith, 1995b), the mutant caused much less morbidity in nude mice than the wt virus, even at higher doses (Denes et al., 2006).

Deletion of either of the serine protease inhibitor (serpin) genes, B13R and B22R has been shown by Legrand, et al., to attenuate VACV for replication and pathogenicity (Legrand et al., 2004). Both mutant viruses were replication-competent in murine cells, but only the B13R-deleted virus was able to replicate in human cells. However, a later study indicated that deletion of the host immune response system modulating genes (B5R, B8R, B12R, B13R, B14R, B16R, B18R, and B19R) of VACV had little effect on virulence or pathogenicity and suggested that contrasting findings between this study and that of Legrand et al. may be a result of the model used (Jackson et al., 2005).

Most mutations of immune modulating genes have been analyzed in a WR background. Recently several mutations in the VTT strain have been analyzed. The VTT strain was used to protect millions of people in the People's Republic of China from smallpox, but as with other

strains of VACV, it is pathogenic in immune-suppressed individuals. Dai et al. deleted two non-essential immune modulatory genes, C12L (encoding an interleukin-18 [IL-18] binding protein) and A53R (encoding a TNF receptor homologue) from VTT (Dai et al., 2008). Deletion of C12L resulted in a 10-fold reduction in the intracranial (IC) lethal dose (LD_{50}) and deletion of A53R yielded a 4.6-fold reduction in the IC LD_{50} in mice, while only deletion of C12L attenuated the virus in rabbits following inoculation by scarification. Deletion of the C12L gene in ectromelia virus has also been shown to be an attenuating mutation (Born et al., 2000). In a mouse model, IN inoculation of the mouse-adapted WR VACV strain deleted of C12L caused less severe symptoms when compared to the wt virus (Reading and Smith, 2003).

Mutations in the host range region of VTT have also been used to attenuate this virus. Zhu et al. (Zhu et al., 2007) deleted a fragment containing the M1L, M2L, K1L, and K2L genes. With IC inoculation of mice, this mutant virus was attenuated by 340-fold in comparison to wild type virus. The virus was replication-incompetent in several cell lines, including HeLa (human), RK-13 (rabbit), and Vero (African green monkey). Deletion of the host range gene K1L reduces replication in RK-13 cells, and deletion of this gene along with serine protease inhibitor K2L, ankyrin-like protein M1L, and the early M2L gene reduces *in vitro* replication further. Vaccination requires a prime-boost regimen for neutralizing antibody titers and cell-mediated response to approach that observed after wt VACV vaccination (Zhu et al., 2007).

Several viruses containing mutations in accessory nucleotide metabolism genes and genes encoding membrane or secreted proteins have been analyzed for attenuation and immunogenicity. Following the work done to develop vaccinia vectors to express foreign antigens in the early 1980s (Panicali et al., 1983; Smith et al., 1983a; Smith et al., 1983b), Buller, et al. showed that VACV deleted of the TK gene could replicate to normal titers locally following inoculation by scarification, but had a decreased ability to disseminate to, or replicate in internal organs (Buller et al., 1985). This virus was attenuated by 4 logs, compared to a wt control. One of the first applications for genetic engineering of VACVs was a vaccine used to combat rabies in wildlife. The gene for the rabies virus glycoprotein was inserted into VACV in place of TK (Kieny et al., 1984). Even though the TK-deleted virus is attenuated, one case of human infection was reported (Rupprecht et al., 2001), raising the issue of potential human exposure to animal vaccines and concomitant harm to humans.

In contrast to deletion of TK, deletion of ribonucleotide reductase (RR), hemagglutinin (HA) (Lee et al., 1992) or the viral growth factor (VGF) (Buller et al., 1988) affected pock formation on the skin. VACV antibody titers for virus deleted or TK, RR or HA after high dose vaccination were similar to that achieved following vaccination with the parental viruses, but at low dose vaccinations, VACV-specific antibody levels for RR and HA deletion mutants were much lower than in animals vaccinated with wtVACV (Lee et al., 1992).

Mutations of another host range/virulence gene, E3L, has resulted in a range of attenuations of VACVs. The VACV E3L gene products prevent the induction of an antiviral state through IFN-induced pathways (Langland and Jacobs, 2002). The complete deletion of the E3L gene results in a VACV that is replication-deficient in human cells (Chang et al., 1995; Vijaysri et al., 2008). In studies in CD-1 newborn mice, the WR strain deleted of E3L was attenuated by five logs (Heck, Denzler, and Jacobs, unpublished observations). In immunocompetent mice, this virus replicates poorly in the nasal mucosa but still induces a protective immune response (Vijaysri et al., 2008) and results in increased induction of many pro-inflammatory genes compared to other mutants (Langland et al., 2006b).

Targeted mutations or deletions in either the N-terminus or C-terminus of E3L also result in attenuated yet immunogenic versions of the parental strain, with phenotypes ranging from no

disease to persistent infections and/or clinical disease at higher doses in SCID mice (Chang and Pogo, 1993; Jentarra et al., 2008; Langland and Jacobs, 2002; Langland and Jacobs, 2004; Vijaysri et al., 2008).

Another strategy to attenuate VACV without losing efficacy is to replace the E3L gene with a partially complementing eIF2 α homologue gene from *Ambystoma tigrinum* virus (VACV Δ E3L-vIF2 α). VACV Δ E3L-vIF2 α , is also sensitive to treatment of cells with type I interferon, a phenotype unique amongst mutants of VACV. During scarification studies, VACV Δ E3L-vIF2 α caused no significant weight loss and only localized symptoms. As a vaccine, it was protective in BALB/c mice, preventing disease, including weight loss after wt-VACV challenge (Jentarra et al., 2008).

Another genetically attenuated mutant is the late defective VACV vD4-ZG, which is deleted of the essential gene that encodes the enzyme uracil DNA glycosylase (UDG) from the D4R open reading frame (Holzer and Falkner, 1997). VACV vD4-ZG is unable to produce late gene products which renders it non-replicative in cells in culture. In order to overcome this obstacle vD4-ZG must be grown in a complementing cell line that expresses the missing early viral gene (Holzer and Falkner, 1997). This non-replicating late defective mutant makes it attractive as a vaccine vector due to its ability to elicit potent immune responses through the expression of early genes. In fact, the VACV mutant expressing the prM/E gene (vD4-prME) from tick-borne encephalitis (TBE) was found to protect immune-suppressed CD1 mice against a lethal challenge with 100 LD₅₀ of virulent TBE virus with just 10⁴ pfu of vD4-prME (Holzer et al., 1999). Furthermore, the virus was rapidly cleared from immune-suppressed mice even at the highest vaccination dose of 10⁶ pfu (Holzer et al., 1999). However, the lack of expression of structural gene products may make this virus unsuitable as a vaccine for protection against orthopoxviruses.

B. Attenuation through insertion of immune-modulating genes

VACV has also been attenuated through the insertion of genes encoding host immune response modulators, such as IL-2 and IFN- γ . Flexner et al. demonstrated that expression of IL-2 in VACV WR strain rendered the virus non-pathogenic in athymic nude mice (Flexner et al., 1987). Virus expressing IFN- γ was also found to be non-pathogenic in athymic nude mice (Giavedoni et al., 1992; Kohonen-Corish et al., 1990), with all mice recovering from infection. Another example is expression of IL-15 by VACVs resulting in a several-thousand-fold reduction in lethality in athymic nude mice (Perera et al., 2001), but still inducing longer-lived CD8 memory T cells (Oh et al., 2003), as well as enhanced humoral and cellular responses in immunocompetent mice compared to the unmodified virus (Perera et al., 2007). Mice vaccinated with the IL-15-expressing VACV survived a lethal IN challenge with the wt version 10 months after vaccination, whereas mice which had received a homologous vaccination succumbed (Perera et al., 2007).

Expression of immune-stimulating genes may on the other hand enhance immunogenicity of highly attenuated non-replicating VACVs. For instance, MVA has been shown to infect antigen-presenting cells, including dendritic cells, B cells, and macrophages (Chahroudi et al., 2005), which in turn activates CD4 $^+$ and CD8 $^+$ T cells and ultimately induces an antigen-specific adaptive and cell-mediated response. Therefore, expression by MVA of cytokines known to enhance activation of antigen-presenting cells could augment the overall immune response to the vaccine. Examples of such cytokines include granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, macrophage inflammatory protein 3 α , and fms-like tyrosine kinase 3 ligand, and this strategy resulted in a six- to seven-fold enhancement of MVA-specific antibody titers in a mouse experiment (Chavan et al., 2006).

Ultimately, a combination of strategies may be needed to attenuate wt-VACV while enhancing specific immune pathways. As an example, a recombinant VACV deleted for the serpin protease inhibitors B13R or B22R but expressing IFN- γ replicates to high titers in tissue culture but is avirulent in both immunodeficient and immunocompetent mice, and yet induces a potent VACV-specific immune response (Legrand et al., 2005).

VII. Post-exposure vaccination

Following September 11, 2001, the potential use of the smallpox virus (VARV) as a bioterrorism agent was brought into special attention, as it constitutes an ideal terrorist weapon of mass destruction (LeDuc et al., 2002). Moreover, there also remains a low but very real risk of VARV release, whether intentional or accidental (Thorne et al., 2003). All these reasons make the requirement of a post-exposure prophylaxis of smallpox one of the ultimate goals not only nationwide but also worldwide. Post-exposure vaccination with VACV has been suggested as an effective means to minimize casualties from smallpox exposure, as long as the vaccine is administered within four days of initial exposure (Mortimer, 2003). While there is anecdotal evidence for efficacy of post-exposure vaccination, this has not been definitively studied in humans, and while no animal model of post-exposure vaccination has thus far been consistently described, several animal studies were done and are worthy of mention.

Both IN and intramuscular (IM) vaccination with MVA have been shown to protect mice from severe disease and death when mice underwent respiratory challenge with VACV WR strain after either IM or IN vaccination. However, these immunization protocols failed to completely prevent clinical signs even when given within three hours of challenge and were completely ineffective when given one to four days post-exposure. A follow-up study was done in order to compare the relative efficacy of short-term or post-exposure vaccination between the non-replicating MVA and replication-competent VACV Lister/Elstree strain. Mice immunized by scarification with the Lister/Elstree strain 14 days prior to the challenge were protected against a respiratory challenge with VACV WR, confirming the efficacy of prophylactic vaccination, while vaccination on the same day up to two days after challenge failed to protect against mortality (Staib et al., 2006).

The lack of efficacy of the Lister/Elstree strain when given a couple of days pre- or post-challenge could be in part attributed to the route of inoculation (scarification), although IM inoculation did not improve its performance as a short-term prophylactic or therapeutic vaccine (Staib et al., 2006). Thus, post-exposure vaccination with these strains, in this particular animal model, seems to be limited.

Another study compared the effectiveness of antiviral treatment with cidofovir and a related acyclic nucleoside phosphonate analog (HPMPO-DAPy) to post-exposure vaccination using the standard dose recommended for humans of the Lister/Elstree strain of VACV after lethal monkeypox exposure. This study suggested that a multi-dose antiviral treatment within 24 hours post-infection could reduce mortality and cutaneous lesions in comparison to standard post-exposure vaccination (Stittelaar et al., 2006).

Recent studies have shown that MVA given via a subcutaneous injection at the same time as an IN lethal dose of ectromelia virus (ECTV) was able to protect mice from death and that it is able to protect TLR-9 deficient mice when administered up to two days post-challenge (Samuelsson et al., 2008). In another study, the efficacy of MVA and of the Lister/Elstree strains as post-exposure vaccines was further evaluated in mice, following IN challenge using ECTV. In this model, therapeutic immunization with the Lister/Elstree or MVA by IM provided full protection when administered the same day or one day post-infection. Moreover, protection was affected by the vaccine dose, which improved the survival rate vaccination at days two and three post-infection (Paran et al., 2009). One of the reasons that the Lister/Elstree and MVA

vaccine are effective as post-exposure treatment against ECTV and not VACV WR may rely on the different mean time to death observed upon infection of mice after infection with either ECTV (10 days) or VACV WR (6 days) as well as the absence of neurovirulence observed in ECTV-infected mice. This extended period observed for the onset of the disease may be essential to allow time for the T and B cells to mount a solid immune response as recombination activating gene 1-deficient mice fail to confer immunity after short-term vaccination (Paran et al., 2009).

Another approach for post-exposure treatment involves the use of VACV as an expression vector for foreign genes. Because cytokines play a very important role during a VACV infection, recombinant VACV expressing cytokines have been constructed. It is known that IL-2 decreases VACV virulence, while IL-4 increases both virulence and pathogenicity in a VACV infection (Muller et al., 1994; Ramshaw et al., 1987; Sharma et al., 1996). Conversely, expression of IL-18 has been shown to clear a VACV infection when co-expressed with IL-12, indicating a synergistic action of both cytokines (Gherardi et al., 2003). Other groups of cytokines include the IFNs α and β , which inhibit virus replication in VACV-infected cells (Liu et al., 2004), while IFN- γ stimulates antigen-presenting cells (Legrand et al., 2005). In a recent study, optimization of post-exposure prophylaxis in animals infected with wt VACV was successfully achieved with treatment of recombinant VACV expressing IFN- γ at one day post infection (0% mortality) (Holechek et al., 2008).

In conclusion, various approaches for post-exposure prophylaxis have shown some promise in being effective on preventing disease in some animal models. Although the ECTV model for post-exposure prophylaxis seems promising, a model using the more neuropathogenic WR strain could indeed be more useful when finding post-exposure treatment to a harsher onset of the disease. Future studies will determine if either replication competent or highly attenuated non-replicating VACV strains can be safely and effectively used as post-exposure prophylaxis approaches in humans.

IX. Genetically modified VACVs as vaccines against heterologous agents

The eradication of smallpox combined with the advent of genetically engineered recombinant poxvirus technology demonstrated the feasibility of using VACVs to protect against specific pathogens. With the relative ease of generating recombinant VACVs to express heterologous genes, widespread attention has been given to the idea of using these vectors as a vehicle for an antigen delivery system against different diseases (Moss, 1996; Paoletti, 1996). To date, recombinant poxvirus vaccine vectors have been generated to target many human and veterinary infectious diseases and cancer (Perkus et al., 1995a). For nearly twenty years, VACV Cop has been utilized in a campaign to eliminate rabies in wildlife (Pastoret and Brochier, 1996). This oral based vaccine (RABORAL-V-RG®) consisting of recombinant VACV, mildly attenuated through loss of TK gene functionality, expresses the rabies glycoprotein and has been used to immunize red foxes, raccoons, coyotes and skunks in parts of the United States and Europe. This campaign has successfully eliminated rabies in parts of Europe and significantly reduced the incidence of rabies in the United States. Consequently, this vaccine is the only oral rabies vaccine licensed for use in animals in the United States and Europe (this vaccine is not licensed for use in humans) and is still currently in use.

Safety issues have been the paramount concern in VACV-based vaccine development because of complications associated with replicating wt VACVs (Perkus et al., 1995b). In an effort to circumvent the adverse effects of VACV, technology has turned to the development of highly attenuated strains of VACV and exploited the use of divergent host-restricted poxviruses in an attempt to generate a safe vaccine platform. In addition, immunization protocols such as heterologous prime/boost regimens and the co-expression of immune-modulatory molecules

have been applied to further enhance the immune responses to these poxvirus vectors. Currently, various parameters such as mode of inoculation, routes of vaccine administration and immunization schedules are also being investigated to optimize immunization protocols and achieve efficacy and safety (Gomez et al., 2007b).

Addressing the safety issues surrounding vaccine development, extensive studies have been done using replication-deficient poxviruses as vaccine vectors. Examples of replication-deficient poxviruses are orthopoxviruses, MVA and NYVAC, and avipoxviruses, fowlpox and canarypox (ALVAC). Both MVA and NYVAC are attenuated VACVs containing multiple gene deletions that prevent a productive replication cycle in mammalian cells, whereas avipoxviruses have a natural host range restriction and cannot replicate in non-avian cells. Preclinical studies have shown these vectors induce some level of protection against many heterologous agents when used as a vaccine in both human and veterinary medicine (Bisht et al., 2004; Bublot et al., 2007; Chen et al., 2005; Kreijtz et al., 2007; Minke et al., 2007; Poulet et al., 2007; Ramos et al., 2008). MVA and NYVAC have been studied extensively and a comprehensive review has been published comparing these vectors in detail and their various applications as vaccine vectors (Gomez et al., 2008).

Due to their safety profile and immunizing potential, both MVA and NYVAC are prime candidates in HIV vaccine development and have been used in countless preclinical and clinical trial studies (Gomez et al., 2007a), and increasing attention has turned towards using avipoxvirus vectors as safe alternatives to orthopoxvirus vectors (Thongcharoen et al., 2007). Prime-boost regimens including different combinations of these non-replicating strains have become commonplace to enhance immunity and to avoid complications with preexisting immunity to VACV vectors (Webster et al., 2005; Woodland, 2004). Despite studies that show these highly attenuated vectors are capable of inducing protective immunity against a variety of pathogens, their limited replication still generates concern as to their ability to induce an immune response as effective as their replication-competent counterparts (Abaitua et al., 2006; Dai et al., 2008; Karkhanis and Ross, 2007). Studies comparing the two vectors in vaccine studies clearly demonstrate that in an effort for safety, often long term protection and efficacy are lost. For instance, in a quest for a safer rabies vaccine, a recent study compared the efficacies of various rabies vaccine candidates in different VACV strains. Recombinant MVA proved to be inferior in mounting an immune response in mice when given by oral immunization compared to Cop and WR strain. Furthermore, oral administration of this vector failed to elicit memory responses in previously vaccinated dogs and raccoons and was therefore deemed not suitable for a replacement of the current oral vaccine, V-RG (Weyer et al., 2007). In addition, a recent smallpox vaccine study has further emphasized the superiority of replication competent vectors to non replicating vectors in long term protection and immunogenicity against lethal cowpox challenge (Ferrier-Rembert et al., 2008).

Replication-competent recombinant VACV-based vaccines have received increasing attention as potential vaccine vectors for many infectious diseases, since they are presumably able to elicit potent humoral and cell mediated immune responses, and confer lasting protection. Different approaches have been taken to lower the virulence and enhance the immune response in an effort to generate a safe vaccine platform. Many have turned to deleting genes encoding virulence factors whose function is to evade the host immune response. Examples include soluble cytokine/chemokine viroceptors (Day et al., 2008; Denes et al., 2006; Symons et al., 1995), viral serine protease inhibitors (serpin) (Legrand et al., 2004), and inhibitors of cellular antiviral enzymes (Langland et al., 2006a). Immunogenicity of vectors attenuated through deletion of these genes was not greatly affected. In two independent studies, the deletion of the B8R gene (Denes et al., 2006; Verardi et al., 2001) resulted in a virus able to replicate at the same level as the wt version in vitro, yet was significantly less pathogenic in mice than the

latter. Immunologic responses between the deletion mutant and parental virus were analyzed and no substantial differences were observed.

In another study, deletion of the IL-18 binding protein C12L and the viral TNF receptor homologue A53R resulted in a virus that was attenuated, yet virus that expressed HIV genes was able to elicit a strong humoral and cell-mediated response to HIV proteins (Dai et al., 2008). Another example of attenuation by reduction of virulence factor functionality is the work performed by our group with E3L, as previously discussed (Jentarra et al., 2008; Langland and Jacobs, 2002; Langland and Jacobs, 2004; Langland et al., 2006b; Vijaysri et al., 2008). VACV deleted of serpin proteins B13R and B22R expressing IFN- γ is highly attenuated in immunocompromised mice and elicits potent immune responses and protection against challenge of both homologous and heterologous agents (Legrand et al., 2005). Collectively, these live vaccine vectors represent a promising potential as safe effective vaccine platforms.

X. Conclusion

Many of the genetically modified poxviruses are replication-defective, a characteristic which has long been considered critical in developing safe vaccines in an era of immune deficiency resulting from chemotherapy, organ transplant, HIV infection, or other diseases impacting the immune system. Unfortunately, recent animal and limited human data suggest that “third and fourth generation” replication-defective VACV vaccines are in fact less immunogenic than prior vaccine generations, although these vaccines may have utility as priming agents in individuals with contraindications to “second generation” vaccines (Artenstein, 2008). However, the necessity for replication-competence in vaccine vectors has become an increasingly theorized potential solution to the lack of efficacy in some of the vaccines that have been tested in human trials recently. One of the most scrutinized of these unsuccessful trials was that of the Merck HIV vaccine that used a replication-defective adenovirus vector for delivery of the HIV antigens (http://www.hvtn.org/science/step_review.html). Replication competence does not exclude attenuation, as was evidenced in a report by Parker et al. (Parker et al., 2007). In this study, a recombinant herpes simplex virus (HSV) was attenuated by deletion of the $\gamma 34.5$ gene, which eliminated neurovirulence; the virus was still replication-competent. The virus can be grown to higher titers than a replication-defective HSV vector and expresses the heterologous antigens at higher levels. Therefore, “third generation” attenuated replication-competent vaccine candidates are being developed to provide a strong immunological response while reducing adverse side-effects.

VACV encodes a number of proteins involved in inhibiting the host anti-viral, immunological and inflammatory responses. Mutagenesis or deletion of these genes often leads to viral constructs which are replication-competent but with reduced pathogenesis. For example, the viral E3L gene is required for inhibition of the host in IFN response. As discussed in this review, mutations of this gene in VACVs resulted in several replication-competent viruses with greatly reduced virulence in animals, which retained the ability to protect against an orthopoxvirus challenge (Vijaysri et al., 2008). Similarly, attenuated replication-competent vaccines constructed by the addition of genes to the VACV genome, such as IL-15 or IFN- γ are known to effectively modulate the host responses and improve immunogenicity (Legrand et al., 2005; Perera et al., 2007). Finally, VACV having the E3L gene replaced with the vIF2 α , which allows for a single round of replication in human cells, is not capable of dissemination but does activate immune response signal transduction pathways (Jancovich, Langland, Talasela and Jacobs, unpublished observations). Therefore, we are confident that continued efforts to genetically modify poxvirus vectors will not only improve our understanding of these viruses but also allow preservation of safety while taking advantage of the immunogenic benefits of replication competence.

Acknowledgments

The authors would like to thank Mike Bray for his helpful editorial comments, encouragement, and patience.

Bibliography

- Products, CfPMPTEAftEoM, editor. Note for Guidance on the Development of Vaccinia Virus Based Vaccines Against Smallpox, Evaluation of Medicines for Human Use. 2002. p. 1-19.
- Abaitua F, Rodriguez JR, Garzon A, Rodriguez D, Esteban M. Improving recombinant MVA immune responses: potentiation of the immune responses to HIV-1 with MVA and DNA vectors expressing Env and the cytokines IL-12 and IFN-gamma. *Virus Res* 2006;116(1-2):11-20. [PubMed: 16214252]
- Abdalrhman I, Gurt I, Katz E. Protection induced in mice against a lethal orthopox virus by the Lister strain of vaccinia virus and modified vaccinia virus Ankara (MVA). *Vaccine* 2006;24(19):4152-60. [PubMed: 16603280]
- Alcami A, Smith GL. Cytokine receptors encoded by poxviruses: a lesson in cytokine biology. *Immunol Today* 1995a;16(10):474-8. [PubMed: 7576050]
- Alcami A, Smith GL. Vaccinia, cowpox, and camelpox viruses encode soluble gamma interferon receptors with novel broad species specificity. *J Virol* 1995b;69(8):4633-9. [PubMed: 7609027]
- Antoine G, Scheiflinger F, Dorner F, Falkner FG. The complete genomic sequence of the modified vaccinia Ankara strain: comparison with other orthopoxviruses. *Virology* 1998;244(2):365-96. [PubMed: 9601507]
- Artenstein AW. New generation smallpox vaccines: a review of preclinical and clinical data. *Rev Med Virol* 2008;18(4):217-31. [PubMed: 18283712]
- Bell E, Shamim M, Whitbeck JC, Sfyroera G, Lambris JD, Isaacs SN. Antibodies against the enveloped virus B5R protein are mainly responsible for the EEV neutralizing capacity of vaccinia immune globulin. *Virology* 2004;325(2):425-31. [PubMed: 15246280]
- Belyakov IM, Earl P, Dzutsev A, Kuznetsov VA, Lemon M, Wyatt LS, Snyder JT, Ahlers JD, Franchini G, Moss B, Berzofsky JA. Shared modes of protection against poxvirus infection by attenuated and conventional smallpox vaccine viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(16):9458-63. [PubMed: 12869693]
- Bisht H, Roberts A, Vogel L, Bukreyev A, Collins PL, Murphy BR, Subbarao K, Moss B. Severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein expressed by attenuated vaccinia virus protectively immunizes mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(17):6641-6. [PubMed: 15096611]
- Blanchard TJ, Alcami A, Andrea P, Smith GL. Modified vaccinia virus Ankara undergoes limited replication in human cells and lacks several immunomodulatory proteins: implications for use as a human vaccine. *J Gen Virol* 1998;79 (Pt 5):1159-67. [PubMed: 9603331]
- Born TL, Morrison LA, Esteban DJ, VandenBos T, Thebeau LG, Chen N, Spriggs MK, Sims JE, Buller RM. A poxvirus protein that binds to and inactivates IL-18, and inhibits NK cell response. *J Immunol* 2000;164(6):3246-54. [PubMed: 10706717]
- Brandt T, Heck MC, Vijaysri S, Jentarra GM, Cameron JM, Jacobs BL. The N-terminal domain of the vaccinia virus E3L-protein is required for neurovirulence, but not induction of a protective immune response. *Virology* 2005;333(2):263-70. [PubMed: 15721360]
- Bublot M, Pritchard N, Cruz JS, Mickle TR, Selleck P, Swayne DE. Efficacy of a fowlpox-vectorized avian influenza H5 vaccine against Asian H5N1 highly pathogenic avian influenza virus challenge. *Avian Dis* 2007;51(1 Suppl):498-500. [PubMed: 17494618]
- Buller RM, Chakrabarti S, Cooper JA, Twardzik DR, Moss B. Deletion of the vaccinia virus growth factor gene reduces virus virulence. *J Virol* 1988;62(3):866-74. [PubMed: 3339716]
- Buller RM, Smith GL, Cremer K, Notkins AL, Moss B. Decreased virulence of recombinant vaccinia virus expression vectors is associated with a thymidine kinase-negative phenotype. *Nature* 1985;317 (6040):813-5. [PubMed: 4058585]
- Chahroudi A, Chavan R, Kozyr N, Waller EK, Silvestri G, Feinberg MB. Vaccinia virus tropism for primary hematolymphoid cells is determined by restricted expression of a unique virus receptor. *J Virol* 2005;79(16):10397-407. [PubMed: 16051832]

- Chahroudi A, Garber DA, Reeves P, Liu L, Kalman D, Feinberg MB. Differences and similarities in viral life cycle progression and host cell physiology after infection of human dendritic cells with modified vaccinia virus Ankara and vaccinia virus. *J Virol* 2006;80(17):8469–81. [PubMed: 16912297]
- Chang HW, Uribe LH, Jacobs BL. Rescue of vaccinia virus lacking the E3L gene by mutants of E3L. *J Virol* 1995;69(10):6605–8. [PubMed: 7666567]
- Chang PY, Pogo BG. Reintroduction of gene(s) into an attenuated deletion mutant of vaccinia virus strain IHD-W. *Microb Pathog* 1993;15(5):347–57. [PubMed: 8015416]
- Chavan R, Marfatia KA, An IC, Garber DA, Feinberg MB. Expression of CCL20 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, but not Flt3-L, from modified vaccinia virus ankara enhances antiviral cellular and humoral immune responses. *J Virol* 2006;80(15):7676–87. [PubMed: 16840346]
- Chen Z, Zhang L, Qin C, Ba L, Yi CE, Zhang F, Wei Q, He T, Yu W, Yu J, Gao H, Tu X, Gettie A, Farzan M, Yuen KY, Ho DD. Recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing the spike glycoprotein of severe acute respiratory syndrome coronavirus induces protective neutralizing antibodies primarily targeting the receptor binding region. *J Virol* 2005;79(5):2678–88. [PubMed: 15708987]
- Clark RH, Kenyon JC, Bartlett NW, Tscharke DC, Smith GL. Deletion of gene A41L enhances vaccinia virus immunogenicity and vaccine efficacy. *J Gen Virol* 2006;87(Pt 1):29–38. [PubMed: 16361415]
- Cottingham MG, Andersen RF, Spencer AJ, Saurya S, Furze J, Hill AV, Gilbert SC. Recombination-mediated genetic engineering of a bacterial artificial chromosome clone of modified vaccinia virus Ankara (MVA). *PLoS ONE* 2008;3(2):e1638. [PubMed: 18286194]
- Couch RB, Winokur P, Edwards KM, Black S, Atmar RL, Stapleton JT, Kissner JM, Shinefield H, Denny TN, Bybel MJ, Newman FK, Yan L. Reducing the dose of smallpox vaccine reduces vaccine-associated morbidity without reducing vaccination success rates or immune responses. *J Infect Dis* 2007;195(6):826–32. [PubMed: 17299712]
- Dai K, Liu Y, Liu M, Xu J, Huang W, Huang X, Liu L, Wan Y, Hao Y, Shao Y. Pathogenicity and immunogenicity of recombinant Tiantan Vaccinia Virus with deleted C12L and A53R genes. *Vaccine*. 2008
- Davies DH, Wyatt LS, Newman FK, Earl PL, Chun S, Hernandez JE, Molina DM, Hirst S, Moss B, Frey SE, Felgner PL. Antibody profiling by proteome microarray reveals the immunogenicity of the attenuated smallpox vaccine modified vaccinia virus ankara is comparable to that of Dryvax. *J Virol* 2008;82(2):652–63. [PubMed: 17977963]
- Day SL, Ramshaw IA, Ramsay AJ, Ranasinghe C. Differential effects of the type I interferons alpha4, beta, and epsilon on antiviral activity and vaccine efficacy. *J Immunol* 2008;180(11):7158–66. [PubMed: 18490714]
- Denes B, Gridley DS, Fodor N, Takatsy Z, Timiryasova TM, Fodor I. Attenuation of a vaccine strain of vaccinia virus via inactivation of interferon viroceptor. *J Gene Med* 2006;8(7):814–23. [PubMed: 16634110]
- Downie AW, McCarthy K. The antibody response in man following infection with viruses of the pox group. III. Antibody response in smallpox. *J Hyg (Lond)* 1958;56(4):479–87. [PubMed: 13611244]
- Earl PL, Americo JL, Wyatt LS, Eller LA, Whitbeck JC, Cohen GH, Eisenberg RJ, Hartmann CJ, Jackson DL, Kulesh DA, Martinez MJ, Miller DM, Mucker EM, Shamblin JD, Zwiers SH, Huggins JW, Jahrling PB, Moss B. Immunogenicity of a highly attenuated MVA smallpox vaccine and protection against monkeypox. *Nature* 2004;428(6979):182–5. [PubMed: 15014500]
- Earl PL, Americo JL, Wyatt LS, Espenshade O, Bassler J, Gong K, Lin S, Peters E, Rhodes L Jr, Spano YE, Silvera PM, Moss B. Rapid protection in a monkeypox model by a single injection of a replication-deficient vaccinia virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105(31):10889–94. [PubMed: 18678911]
- Fang Q, Yang L, Zhu W, Liu L, Wang H, Yu W, Xiao G, Tien P, Zhang L, Chen Z. Host range, growth property, and virulence of the smallpox vaccine: vaccinia virus Tian Tan strain. *Virology* 2005;335(2):242–51. [PubMed: 15840523]
- Fenner, F.; Henderson, DA.; Arita, I.; Jezek, Z.; Ladnyi, ID. Smallpox and its Eradication. World Health Organization; Geneva: 1988. p. 1460

- Ferrier-Rembert A, Drillien R, Tournier JN, Garin D, Crance JM. Short-and long-term immunogenicity and protection induced by non-replicating smallpox vaccine candidates in mice and comparison with the traditional 1st generation vaccine. *Vaccine* 2008;26(14):1794–804. [PubMed: 18336966]
- Flexner C, Hugin A, Moss B. Prevention of vaccinia virus infection in immunodeficient mice by vector-directed IL-2 expression. *Nature* 1987;330(6145):259–62. [PubMed: 3118219]
- Frey SE, Newman FK, Kennedy JS, Sobek V, Ennis FA, Hill H, Yan LK, Chaplin P, Vollmar J, Chaitman BR, Belshe RB. Clinical and immunologic responses to multiple doses of IMVAMUNE (Modified Vaccinia Ankara) followed by Dryvax challenge. *Vaccine* 2007;25(51):8562–73. [PubMed: 18036708]
- Gherardi MM, Ramirez JC, Esteban M. IL-12 and IL-18 act in synergy to clear vaccinia virus infection: involvement of innate and adaptive components of the immune system. *J Gen Virol* 2003;84(Pt 8): 1961–72. [PubMed: 12867626]
- Giavedoni LD, Jones L, Gardner MB, Gibson HL, Ng CT, Barr PJ, Yilma T. Vaccinia virus recombinants expressing chimeric proteins of human immunodeficiency virus and gamma interferon are attenuated for nude mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89(8):3409–13. [PubMed: 1565633]
- Gomez CE, Najera JL, Jimenez EP, Jimenez V, Wagner R, Graf M, Frachette MJ, Liljestrom P, Pantaleo G, Esteban M. Head-to-head comparison on the immunogenicity of two HIV/AIDS vaccine candidates based on the attenuated poxvirus strains MVA and NYVAC co-expressing in a single locus the HIV-1BX08 gp120 and HIV-1(IIIB) Gag-Pol-Nef proteins of clade B. *Vaccine* 2007a;25 (15):2863–85. [PubMed: 17113200]
- Gomez CE, Najera JL, Jimenez V, Bieler K, Wild J, Kostic L, Heidari S, Chen M, Frachette MJ, Pantaleo G, Wolf H, Liljestrom P, Wagner R, Esteban M. Generation and immunogenicity of novel HIV/AIDS vaccine candidates targeting HIV-1 Env/Gag-Pol-Nef antigens of clade C. *Vaccine* 2007b;25(11): 1969–92. [PubMed: 17224219]
- Gomez CE, Najera JL, Krupa M, Esteban M. The poxvirus vectors MVA and NYVAC as gene delivery systems for vaccination against infectious diseases and cancer. *Curr Gene Ther* 2008;8(2):97–120. [PubMed: 18393831]
- Greenberg RN, Kennedy JS. ACAM2000: a newly licensed cell culture-based live vaccinia smallpox vaccine. *Expert Opin Investig Drugs* 2008;17(4):555–64.
- Guerra S, Najera JL, Gonzalez JM, Lopez-Fernandez LA, Climent N, Gatell JM, Gallart T, Esteban M. Distinct gene expression profiling after infection of immature human monocyte-derived dendritic cells by the attenuated poxvirus vectors MVA and NYVAC. *J Virol* 2007;81(16):8707–21. [PubMed: 17537851]
- Hayasaka D, Ennis FA, Terajima M. Pathogeneses of respiratory infections with virulent and attenuated vaccinia viruses. *Virol J* 2007;4:22. [PubMed: 17326843]
- Herrera E, Lorenzo MM, Blasco R, Isaacs SN. Functional analysis of vaccinia virus B5R protein: essential role in virus envelopment is independent of a large portion of the extracellular domain. *J Virol* 1998;72(1):294–302. [PubMed: 9420227]
- Holechek, S.; Heck, M.; Yilma, T.; Buller, RM.; Jacobs, B. Effects of a vaccinia virus expressing IFN-gamma on the post-exposure prophylaxis of a lethal vaccinia virus infection. 17th International poxvirus and iridovirus conference; Grainau (Bavaria), Germany. 2008.
- Holzer GW, Falkner FG. Construction of a vaccinia virus deficient in the essential DNA repair enzyme uracil DNA glycosylase by a complementing cell line. *J Virol* 1997;71(7):4997–5002. [PubMed: 9188564]
- Holzer GW, Remp G, Antoine G, Pfleiderer M, Enzersberger OM, Emsenhuber W, Hammerle T, Gruber F, Urban C, Falkner FG, Dorner F. Highly efficient induction of protective immunity by a vaccinia virus vector defective in late gene expression. *J Virol* 1999;73(6):4536–42. [PubMed: 10233911]
- Ishii K, Ueda Y, Matsuo K, Matsuura Y, Kitamura T, Kato K, Izumi Y, Someya K, Ohsu T, Honda M, Miyamura T. Structural analysis of vaccinia virus DI strain: application as a new replication-deficient viral vector. *Virology* 2002;302(2):433–44. [PubMed: 12441087]
- Jackson SS, Ilyinskii P, Philippon V, Gritz L, Yafal AG, Zinnack K, Beaudry KR, Manson KH, Lifton MA, Kuroda MJ, Letvin NL, Mazzara GP, Panicali DL. Role of genes that modulate host immune responses in the immunogenicity and pathogenicity of vaccinia virus. *J Virol* 2005;79(10):6554–9. [PubMed: 15858042]

- Jentarra GM, Heck MC, Youn JW, Kibler K, Langland JO, Baskin CR, Ananieva O, Chang Y, Jacobs BL. Vaccinia viruses with mutations in the E3L gene as potential replication-competent, attenuated vaccines: scarification vaccination. *Vaccine* 2008;26(23):2860–72. [PubMed: 18455281]
- Karkhanis LU, Ross TM. Mucosal vaccine vectors: replication-competent versus replication-deficient poxviruses. *Curr Pharm Des* 2007;13(19):2015–23. [PubMed: 17627535]
- Kennedy JS, Greenberg RN. IMVAMUNE: modified vaccinia Ankara strain as an attenuated smallpox vaccine. *Expert Rev Vaccines* 2009;8(1):13–24. [PubMed: 19093767]
- Kenner J, Cameron F, Empig C, Jobes DV, Gurwith M. LC16m8: an attenuated smallpox vaccine. *Vaccine* 2006;24(47–48):7009–22. [PubMed: 17052815]
- Kidokoro M, Tashiro M, Shida H. Genetically stable and fully effective smallpox vaccine strain constructed from highly attenuated vaccinia LC16m8. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(11):4152–7. [PubMed: 15753319]
- Kieny MP, Lathe R, Drillet R, Spehner D, Skory S, Schmitt D, Wiktor T, Koprowski H, Lecocq JP. Expression of rabies virus glycoprotein from a recombinant vaccinia virus. *Nature* 1984;312(5990):163–6. [PubMed: 6548799]
- Kohonen-Corish MR, King NJ, Woodhams CE, Ramshaw IA. Immunodeficient mice recover from infection with vaccinia virus expressing interferon-gamma. *Eur J Immunol* 1990;20(1):157–61. [PubMed: 2106440]
- Kreijtz JH, Suezer Y, van Amerongen G, de Mutsert G, Schnierle BS, Wood JM, Kuiken T, Fouchier RA, Lower J, Osterhaus AD, Sutter G, Rimmelzwaan GF. Recombinant modified vaccinia virus Ankara-based vaccine induces protective immunity in mice against infection with influenza virus H5N1. *J Infect Dis* 2007;195(11):1598–606. [PubMed: 17471429]
- Kretzschmar M, Wallinga J, Teunis P, Xing S, Mikolajczyk R. Frequency of adverse events after vaccination with different vaccinia strains. *PLoS Med* 2006;3(8):e272. [PubMed: 16933957]
- Langland JO, Cameron JM, Heck MC, Jancovich JK, Jacobs BL. Inhibition of PKR by RNA and DNA viruses. *Virus Res* 2006;119(1):100–10. [PubMed: 16704884]
- Langland JO, Jacobs BL. The role of the PKR-inhibitory genes, E3L and K3L, in determining vaccinia virus host range. *Virology* 2002;299(1):133–41. [PubMed: 12167348]
- Langland JO, Jacobs BL. Inhibition of PKR by vaccinia virus: role of the N-and C-terminal domains of E3L. *Virology* 2004;324(2):419–29. [PubMed: 15207627]
- Langland JO, Kash JC, Carter V, Thomas MJ, Katze MG, Jacobs BL. Suppression of proinflammatory signal transduction and gene expression by the dual nucleic acid binding domains of the vaccinia virus E3L proteins. *J Virol* 2006;80(20):10083–95. [PubMed: 17005686]
- Larsson M, Fonteneau JF, Somersan S, Sanders C, Bickham K, Thomas EK, Mahnke K, Bhardwaj N. Efficiency of cross presentation of vaccinia virus-derived antigens by human dendritic cells. *Eur J Immunol* 2001;31(12):3432–42. [PubMed: 11745362]
- LeDuc JW, Damon I, Relman DA, Huggins J, Jahrling PB. Smallpox research activities: U.S. interagency collaboration, 2001. *Emerg Inf Dis* 2002;8(7):743–45.
- Lee MS, Roos JM, McGuigan LC, Smith KA, Cormier N, Cohen LK, Roberts BE, Payne LG. Molecular attenuation of vaccinia virus: mutant generation and animal characterization. *J Virol* 1992;66(5):2617–30. [PubMed: 1560521]
- Legrand FA, Verardi PH, Chan KS, Peng Y, Jones LA, Yilma TD. Vaccinia viruses with a serpin gene deletion and expressing IFN-gamma induce potent immune responses without detectable replication in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(8):2940–5. [PubMed: 15705716]
- Legrand FA, Verardi PH, Jones LA, Chan KS, Peng Y, Yilma TD. Induction of potent humoral and cell-mediated immune responses by attenuated vaccinia virus vectors with deleted serpin genes. *J Virol* 2004;78(6):2770–9. [PubMed: 14990697]
- Lehmann MH, Kastenmuller W, Kandemir JD, Brandt F, Suezer Y, Sutter G. Modified vaccinia virus ankara triggers chemotaxis of monocytes and early respiratory immigration of leukocytes by induction of CCL2 expression. *J Virol* 2009;83(6):2540–52. [PubMed: 19129447]
- Liu G, Zhai Q, Schaffner DJ, Wu A, Yohannes A, Robinson TM, Maland M, Wells J, Voss TG, Bailey C, Alibek K. Prevention of lethal respiratory vaccinia infections in mice with interferon-alpha and interferon-gamma. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2004;40(3):201–6. [PubMed: 15039095]

- Ludwig H, Mages J, Staib C, Lehmann MH, Lang R, Sutter G. Role of viral factor E3L in modified vaccinia virus ankara infection of human HeLa Cells: regulation of the virus life cycle and identification of differentially expressed host genes. *J Virol* 2005;79(4):2584–96. [PubMed: 15681458]
- Mack TM, Noble J Jr, Thomas DB. A prospective study of serum antibody and protection against smallpox. *Am J Trop Med Hyg* 1972;21(2):214–8. [PubMed: 5061278]
- Marriott KA, Parkinson CV, Morefield SI, Davenport R, Nichols R, Monath TP. Clonal vaccinia virus grown in cell culture fully protects monkeys from lethal monkeypox challenge. *Vaccine* 2008;26(4): 581–8. [PubMed: 18077063]
- Mayr A. Smallpox vaccination and bioterrorism with pox viruses. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2003;26(5–6):423–30. [PubMed: 12818626]
- McCurdy LH, Larkin BD, Martin JE, Graham BS. Modified vaccinia Ankara: potential as an alternative smallpox vaccine. *Clin Infect Dis* 2004;38(12):1749–53. [PubMed: 15227622]
- Meng X, Chao J, Xiang Y. Identification from diverse mammalian poxviruses of host-range regulatory genes functioning equivalently to vaccinia virus C7L. *Virology* 2008;372(2):372–83. [PubMed: 18054061]
- Meseda CA, Garcia AD, Kumar A, Mayer AE, Manischewitz J, King LR, Golding H, Merchlinsky M, Weir JP. Enhanced immunogenicity and protective effect conferred by vaccination with combinations of modified vaccinia virus Ankara and licensed smallpox vaccine Dryvax in a mouse model. *Virology* 2005;339(2):164–75. [PubMed: 15993917]
- Meyer H, Sutter G, Mayr A. Mapping of deletions in the genome of the highly attenuated vaccinia virus MVA and their influence on virulence. *J Gen Virol* 1991;72 (Pt 5):1031–8. [PubMed: 2033387]
- Miller JD, van der Most RG, Akondy RS, Glidewell JT, Abbott S, Masopust D, Murali-Krishna K, Mahar PL, Edupuganti S, Lalor S, Germon S, Del Rio C, Mulligan MJ, Staprans SI, Altman JD, Feinberg MB, Ahmed R. Human effector and memory CD8+ T cell responses to smallpox and yellow fever vaccines.[see comment]. *Immunity* 2008;28(5):710–22. [PubMed: 18468462]
- Minke JM, Toulemonde CE, Coupier H, Guigal PM, Dinic S, Sindle T, Jessett D, Black L, Bublot M, Pardo MC, Audonnet JC. Efficacy of a canarypox-vectored recombinant vaccine expressing the hemagglutinin gene of equine influenza H3N8 virus in the protection of ponies from viral challenge. *Am J Vet Res* 2007;68(2):213–9. [PubMed: 17269889]
- Monath TP. Yellow fever vaccine. *Expert Rev Vaccines* 2005;4(4):553–74. [PubMed: 16117712]
- Morikawa S, Sakiyama T, Hasegawa H, Saijo M, Maeda A, Kurane I, Maeno G, Kimura J, Hirama C, Yoshida T, Asahi-Ozaki Y, Sata T, Kurata T, Kojima A. An attenuated LC16m8 smallpox vaccine: analysis of full-genome sequence and induction of immune protection. *J Virol* 2005;79(18):11873–91. [PubMed: 16140764]
- Mortimer PP. Can postexposure vaccination against smallpox succeed? *Clin Infect Dis* 2003;36(5):622–9. [PubMed: 12594644]
- Moss B. Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination, and safety. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(21):11341–8. [PubMed: 8876137]
- Muller U, Steinhoff U, Reis LF, Hemmi S, Pavlovic J, Zinkernagel RM, Aguet M. Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science* 1994;264(5167):1918–21. [PubMed: 8009221]
- Najera JL, Gomez CE, Domingo-Gil E, Gherardi MM, Esteban M. Cellular and biochemical differences between two attenuated poxvirus vaccine candidates (MVA and NYVAC) and role of the C7L gene. *J Virol* 2006;80(12):6033–47. [PubMed: 16731942]
- Neff J, Modlin J, Birkhead GS, Poland G, Robertson RM, Sepkowitz K, Yancy C, Gardner P, Gray GC, Maurer T, Siegel J, Guerra FA, Berger T, Flanders WD, Shope R. Monitoring the safety of a smallpox vaccination program in the United States: report of the joint Smallpox Vaccine Safety Working Group of the advisory committee on immunization practices and the Armed Forces Epidemiological Board. *Clin Infect Dis* 2008;46(Suppl 3):S258–70. [PubMed: 18284367]
- Oguriura N, Spehner D, Drillien R. Detection of a protein encoded by the vaccinia virus C7L open reading frame and study of its effect on virus multiplication in different cell lines. *J Gen Virol* 1993;74 (Pt 7):1409–13. [PubMed: 8336123]

- Oh S, Berzofsky JA, Burke DS, Waldmann TA, Perera LP. Coadministration of HIV vaccine vectors with vaccinia viruses expressing IL-15 but not IL-2 induces long-lasting cellular immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(6):3392–7. [PubMed: 12626740]
- Panicali D, Davis SW, Weinberg RL, Paoletti E. Construction of live vaccines by using genetically engineered poxviruses: biological activity of recombinant vaccinia virus expressing influenza virus hemagglutinin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983;80(17):5364–8. [PubMed: 6310573]
- Paoletti E. Applications of pox virus vectors to vaccination: an update. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(21):11349–53. [PubMed: 8876138]
- Paoletti E, Tartaglia J, Taylor J. Safe and effective poxvirus vectors--NYVAC and ALVAC. *Dev Biol Stand* 1994;82:65–9. [PubMed: 7958484]
- Paran N, Suezer Y, Lustig S, Israely T, Schwantes A, Melamed S, Katz L, Preuss T, Hanschmann KM, Kalinke U, Erez N, Levin R, Velan B, Lower J, Shafferman A, Sutter G. Postexposure Immunization with Modified Vaccinia Virus Ankara or Conventional Lister Vaccine Provides Solid Protection in a Murine Model of Human Smallpox. *J Infect Dis* 2009;199(1):39–48. [PubMed: 19012492]
- Parker SD, Rottinghaus ST, Zajac AJ, Yue L, Hunter E, Whitley RJ, Parker JN. HIV-1(89.6) Gag expressed from a replication competent HSV-1 vector elicits persistent cellular immune responses in mice. *Vaccine* 2007;25(37–38):6764–73. [PubMed: 17706843]
- Parrino J, Graham BS. Smallpox vaccines: Past, present, and future. *J Allergy Clin Immunol* 2006;118(6):1320–6. [PubMed: 17157663]
- Pastoret PP, Brochier B. The development and use of a vaccinia-rabies recombinant oral vaccine for the control of wildlife rabies; a link between Jenner and Pasteur. *Epidemiol Infect* 1996;116(3):235–40. [PubMed: 8666066]
- Perera LP, Goldman CK, Waldmann TA. Comparative assessment of virulence of recombinant vaccinia viruses expressing IL-2 and IL-15 in immunodeficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(9):5146–51. [PubMed: 11296252]
- Perera LP, Waldmann TA, Mosca JD, Baldwin N, Berzofsky JA, Oh SK. Development of smallpox vaccine candidates with integrated interleukin-15 that demonstrate superior immunogenicity, efficacy, and safety in mice. *J Virol* 2007;81(16):8774–83. [PubMed: 17553867]
- Perkus ME, Goebel SJ, Davis SW, Johnson GP, Limbach K, Norton EK, Paoletti E. Vaccinia virus host range genes. *Virology* 1990;179(1):276–86. [PubMed: 2171207]
- Perkus ME, Tartaglia J, Paoletti E. Poxvirus-based vaccine candidates for cancer, AIDS, and other infectious diseases. *J Leukoc Biol* 1995a;58(1):1–13. [PubMed: 7616101]
- Perkus ME, Taylor J, Tartaglia J, Pincus S, Kauffman EB, Tine JA, Paoletti E. Live attenuated vaccinia and other poxviruses as delivery systems: public health issues. *Ann N Y Acad Sci* 1995b;754:222–33. [PubMed: 7625655]
- Poulet H, Minke J, Pardo MC, Juillard V, Nordgren B, Audonnet JC. Development and registration of recombinant veterinary vaccines. The example of the canarypox vector platform. *Vaccine* 2007;25(30):5606–12. [PubMed: 17227690]
- Radetsky M. Smallpox: a history of its rise and fall. *Pediatr Infect Dis J* 1999;18(2):85–93. [PubMed: 10048677]
- Ramos I, Alonso A, Marcen JM, Peris A, Castillo JA, Colmenares M, Larraga V. Heterologous prime-boost vaccination with a non-replicative vaccinia recombinant vector expressing LACK confers protection against canine visceral leishmaniasis with a predominant Th1-specific immune response. *Vaccine* 2008;26(3):333–44. [PubMed: 18093705]
- Ramshaw IA, Andrew ME, Phillips SM, Boyle DB, Coupar BE. Recovery of immunodeficient mice from a vaccinia virus/IL-2 recombinant infection. *Nature* 1987;329(6139):545–6. [PubMed: 3498904]
- Reading PC, Smith GL. Vaccinia virus interleukin-18-binding protein promotes virulence by reducing gamma interferon production and natural killer and T-cell activity. *J Virol* 2003;77(18):9960–8. [PubMed: 12941906]
- Rosenthal SR, Merchlinsky M, Kleppinger C, Goldenthal KL. Developing new smallpox vaccines. *Emerg Infect Dis* 2001;7(6):920–6. [PubMed: 11747717]
- Rotz LD, Dotson DA, Damon IK, Becher JA. Vaccinia (smallpox) vaccine: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 2001. *MMWR Recomm Rep* 2001;50(RR10):1–25. [PubMed: 15580803]quiz CE1–7

- Rupprecht CE, Blass L, Smith K, Orciari LA, Niezgoda M, Whitfield SG, Gibbons RV, Guerra M, Hanlon CA. Human infection due to recombinant vaccinia-rabies glycoprotein virus. *N Engl J Med* 2001;345(8):582–6. [PubMed: 11529212]
- Samuelsson C, Hausmann J, Lauterbach H, Schmidt M, Akira S, Wagner H, Chaplin P, Suter M, O'Keeffe M, Hochrein H. Survival of lethal poxvirus infection in mice depends on TLR9, and therapeutic vaccination provides protection. *J Clin Invest* 2008;118(5):1776–84. [PubMed: 18398511]
- Sharma DP, Ramsay AJ, Maguire DJ, Rolph MS, Ramshaw IA. Interleukin-4 mediates down regulation of antiviral cytokine expression and cytotoxic T-lymphocyte responses and exacerbates vaccinia virus infection in vivo. *J Virol* 1996;70(10):7103–7. [PubMed: 8794356]
- Sharon M, Nir P, Lior K, David BN, Tomer I, Paula S, Reuven L, Shlomo L. Tail scarification with Vaccinia virus Lister as a model for evaluation of smallpox vaccine potency in mice. *Vaccine* 2007;25(45):7743–53. [PubMed: 17928110]
- Smith GL, Mackett M, Moss B. Infectious vaccinia virus recombinants that express hepatitis B virus surface antigen. *Nature* 1983a;302(5908):490–5. [PubMed: 6835382]
- Smith GL, Murphy BR, Moss B. Construction and characterization of an infectious vaccinia virus recombinant that expresses the influenza hemagglutinin gene and induces resistance to influenza virus infection in hamsters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983b;80(23):7155–9. [PubMed: 6580632]
- Sniadack MM, Neff LJ, Swerdlow DL, Schieber RA, McCauley MM, Mootrey GT. Follow-up of cardiovascular adverse events after smallpox vaccination among civilians in the United States, 2003. *Clin Infect Dis* 2008;46(Suppl 3):S251–7. [PubMed: 18284366]
- Staib C, Kisling S, Erfle V, Sutter G. Inactivation of the viral interleukin 1beta receptor improves CD8 + T-cell memory responses elicited upon immunization with modified vaccinia virus Ankara. *J Gen Virol* 2005;86(Pt 7):1997–2006. [PubMed: 15958679]
- Staib C, Suezer Y, Kisling S, Kalinke U, Sutter G. Short-term, but not post-exposure, protection against lethal orthopoxvirus challenge after immunization with modified vaccinia virus Ankara. *J Gen Virol* 2006;87(Pt 10):2917–21. [PubMed: 16963750]
- Stittelaar KJ, Neyts J, Naesens L, van Amerongen G, van Lavieren RF, Holy A, De Clercq E, Niesters HG, Fries E, Maas C, Mulder PG, van der Zeijst BA, Osterhaus AD. Antiviral treatment is more effective than smallpox vaccination upon lethal monkeypox virus infection. *Nature* 2006;439(7077):745–8. [PubMed: 16341204]
- Sutter G, Moss B. Nonreplicating vaccinia vector efficiently expresses recombinant genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89(22):10847–51. [PubMed: 1438287]
- Sutter G, Moss B. Novel vaccinia vector derived from the host range restricted and highly attenuated MVA strain of vaccinia virus. *Dev Biol Stand* 1995;84:195–200. [PubMed: 7796954]
- Symons JA, Alcamí A, Smith GL. Vaccinia virus encodes a soluble type I interferon receptor of novel structure and broad species specificity. *Cell* 1995;81(4):551–60. [PubMed: 7758109]
- Symons JA, Tscharke DC, Price N, Smith GL. A study of the vaccinia virus interferon-gamma receptor and its contribution to virus virulence. *J Gen Virol* 2002;83(Pt 8):1953–64. [PubMed: 12124459]
- Tagaya I, Kitamura T, Sano Y. A new mutant of dermovaccinia virus. *Nature* 1961;192:381–2. [PubMed: 13918925]
- Takahashi-Nishimaki F, Funahashi S, Miki K, Hashizume S, Sugimoto M. Regulation of plaque size and host range by a vaccinia virus gene related to complement system proteins. *Virology* 1991;181(1):158–64. [PubMed: 1994573]
- Tartaglia J, Cox WI, Pincus S, Paoletti E. Safety and immunogenicity of recombinants based on the genetically-engineered vaccinia strain, NYVAC. *Dev Biol Stand* 1994;82:125–9. [PubMed: 7958466]
- Tartaglia J, Cox WI, Taylor J, Perkus M, Riviere M, Meignier B, Paoletti E. Highly attenuated poxvirus vectors. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1992;8(8):1445–7. [PubMed: 1466978]
- Thongcharoen P, Suriyanon V, Paris RM, Khamboonruang C, de Souza MS, Ratto-Kim S, Karnasuta C, Polonis VR, Baglyos L, Habib RE, Gurunathan S, Barnett S, Brown AE, Birx DL, McNeil JG, Kim JH. A phase 1/2 comparative vaccine trial of the safety and immunogenicity of a CRF01_AE (subtype E) candidate vaccine: ALVAC-HIV (vCP1521) prime with oligomeric gp160 (92TH023/LAI-DID) or bivalent gp120 (CM235/SF2) boost. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2007;46(1):48–55. [PubMed: 17909315]

- Thorne CD, Hirshon JM, Himes CD, McDiarmid MA. Emergency medicine tools to manage smallpox (vaccinia) vaccination complications: clinical practice guideline and policies and procedures. *Ann Emerg Med* 2003;42(5):665–80. [PubMed: 14581920]
- Tsang KY, Zhu M, Even J, Gulley J, Arlen P, Schliom J. The infection of human dendritic cells with recombinant avipox vectors expressing a costimulatory molecule transgene (CD80) to enhance the activation of antigen-specific cytolytic T cells. *Cancer Res* 2001;61(20):7568–76. [PubMed: 11606396]
- Tulman ER, Delhon G, Afonso CL, Lu Z, Zsak L, Sandybaev NT, Kerembekova UZ, Zaitsev VL, Kutish GF, Rock DL. Genome of horsepox virus. *J Virol* 2006;80(18):9244–58. [PubMed: 16940536]
- Verardi PH, Jones LA, Aziz FH, Ahmad S, Yilma TD. Vaccinia virus vectors with an inactivated gamma interferon receptor homolog gene (B8R) are attenuated *In vivo* without a concomitant reduction in immunogenicity. *J Virol* 2001;75(1):11–8. [PubMed: 11119568]
- Vijaysri S, Jentarra G, Heck MC, Mercer AA, McInnes CJ, Jacobs BL. Vaccinia viruses with mutations in the E3L gene as potential replication-competent, attenuated vaccines: intra-nasal vaccination. *Vaccine* 2008;26(5):664–76. [PubMed: 18096276]
- Viner KM, Girgis N, Kwak H, Isaacs SN. B5-deficient vaccinia virus as a vaccine vector for the expression of a foreign antigen in vaccinia immune animals. *Virology* 2007;361(2):356–63. [PubMed: 17188733]
- Webster DP, Dunachie S, Vuola JM, Berthoud T, Keating S, Laidlaw SM, McConkey SJ, Poulton I, Andrews L, Andersen RF, Bejon P, Butcher G, Sinden R, Skinner MA, Gilbert SC, Hill AV. Enhanced T cell-mediated protection against malaria in human challenges by using the recombinant poxviruses FP9 and modified vaccinia virus Ankara. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(13):4836–41. [PubMed: 15781866]
- Wehrle PF. A reality in our time--certification of the global eradication of smallpox. *J Infect Dis* 1980;142(4):636–8. [PubMed: 7003037]
- Weyer J, Rupprecht CE, Mans J, Viljoen GJ, Nel LH. Generation and evaluation of a recombinant modified vaccinia virus Ankara vaccine for rabies. *Vaccine* 2007;25(21):4213–22. [PubMed: 17434244]
- Woodland DL. Jump-starting the immune system: prime-boosting comes of age. *Trends Immunol* 2004;25(2):98–104. [PubMed: 15102369]
- Wyatt LS, Carroll MW, Czerny CP, Merchlinsky M, Sisler JR, Moss B. Marker rescue of the host range restriction defects of modified vaccinia virus Ankara. *Virology* 1998;251(2):334–42. [PubMed: 9837798]
- Wyatt LS, Earl PL, Eller LA, Moss B. Highly attenuated smallpox vaccine protects mice with and without immune deficiencies against pathogenic vaccinia virus challenge. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(13):4590–5. [PubMed: 15070762]
- Zhu W, Fang Q, Zhuang K, Wang H, Yu W, Zhou J, Liu L, Tien P, Zhang L, Chen Z. The attenuation of vaccinia Tian Tan strain by the removal of the viral M1L-K2L genes. *J Virol Methods* 2007;144(1–2):17–26. [PubMed: 17459491]

Table 1

Description of vaccinia virus vaccine generations.

Vaccinia virus vaccines		
Generation	Description	Examples
1st	Jennerian	Dryvax, Lister, Copenhagen
2nd	Tissue culture adapted Jennerian	ACAM2000
3rd	Attenuated by passage in an alternative host	MVA, LC16m8, DIs
4th	Attenuated through genetic engineering	NYVAC, VACVvD4-ZG, VACV Δ E3L

Table 2**Adverse events associated with primary vaccinia vaccination**

Table illustrates NYCBH strain smallpox vaccine adverse event rates from two studies done in 1968 (Lane et al., 1969; Lane et al., 1970). Current adverse event rates may be expected higher due to increased individuals with 1) immune suppression from cancer, cancer therapy, organ transplantation and other illnesses, such as HIV/AIDS, and 2) eczema or atopic dermatitis. “Common” refers to 25–75% of vaccines.

Adverse Event	Number per million vaccinees
MILD Reactions	
Sore/redness at vaccine site	Common
Swollen armpit glands	Common
Difficulty sleeping	Common
Fever, >100°F	Common
Fever, >102°F	150,000
SERIOUS Reactions	~ 1,000
Erythema multiforme	164.6
Inadvertent inoculation	25.4 – 529
Generalized vaccinia	23.4 – 241
LIFE-THREATENING Reactions	14 – 52
Eczema vaccinatum	10.4 – 38.5
Progressive vaccinia	0.9 – 1.5
Postvaccinal encephalitis	2.9 – 12.3
Fetal vaccinia	Rare
Death	1.1

Table 3
Overview of VACV modifications through genetic engineering.

Deletion of vaccinia virus genes	N-terminus of E3L	Z-DNA binding domain	At least 1,000 fold less pathogenic than wt virus. ¹
	C-terminus of E3L	dsRNA binding domain	At least 10,000 fold less pathogenic than wt virus. ¹
	E3L	Z-DNA/dsRNA binding protein	Apathogenic in SCID mice model. ¹
	B18R/B19R	IFN α/β Receptor-like protein	100 fold less virulent than wt virus in murine intranasal model. ²
	B8R	IFN γ Receptor-like protein	Deletion of B8R does not affect virulence in normal mice model. ³ However, B8R decreases virulence in nude mice model. ⁴
	C12L	IL-18 binding protein	10 fold less virulent than wt virus. Induces strong cellular immune response. ⁵
	A53R	TNF α receptor-like protein	4.6 fold less virulent than wt virus. Induces strong cellular immune response. ⁵
	B13R/B22R	Serine protease inhibitors	Replicates as well as wild type virus in vitro. Decreased virulence in normal mice model. Induces strong humoral response and cell-mediated response. ⁶
	K1L/C7L	Host Range	VACV Δ C7L/K1L does not replicate in human cell lines. ⁷ Deletion of C7L inhibits replication in hamster Dede cells. ⁷ Deletion of K1L inhibits replication in RK13 cells. ⁸
	J2R	Viral Thymidine Kinase	Deletion of TK resulted in a 4 logs attenuated in murine IP or IC model. No dissemination. ⁹
	B5R	EEV type-I membrane glycoprotein	Deletion of B5R overcomes pre-existing immunity. ¹⁰
	D4	Uracil DNA glycosylation	No expression of late genes and no DNA replication in non- UDG-complementing cells. ¹¹
	A41L	Chemokine binding protein	Slightly more virulent than wt virus. Enhance VACV immunogenicity and vaccine efficacy. ¹² (Clark et al., 2006)
	184R/B15R/B16R	IL-1 β receptor	Deletion of this gene results in avirulent phenotype in MVA. ¹³ This deletion also enhances CD8 $^+$ T cell response ^{13,14} after MVA vaccination.
	C11R	VACV epidermal growth factor (VGF)	Deletion of VGF reduces virulent. ¹⁵
Expression of immune-modulating gene delivered by rVACV	IL15	Establish and maintain peripheral NK cell populations	\approx 100 fold lower virulence compared to wt in nude mice model. Superior virus-specific cellular immune response both qualitatively and quantitatively. ¹⁶
	IL-18/IL-12	Upon infection, Induce production of IFN- γ in primed T cells and NK cells	No effect on virus replication in vitro. Decreases VACV replication in murine model. Co-expression of IL-18 and IL-12 results in a strong immune response, leading to clearance of VACV infection. ¹⁷
	IL-2	Activate specific and non-specific immune response upon antigenic stimulation	VACV expressing IL-2 is attenuated compared to wt virus. VACV-IL-2 was rapidly clear upon systemic administration in immunodeficient athymic mice. ¹⁸
	B7-1/CD80	Necessary to activate T cells by APCs.	Replication-defective avipox virus expressing CD80 can enhance the efficacy of human DCs to activate specific human T-cell populations. ¹⁹
	IFN- γ	Antiviral, immunoregulatory, and anti-tumor activity	VACV- Δ B13R/IFN- γ replicates to high titers in tissue culture but is not virulent in both immunocompromised and immunocompetent mice. ²⁰

¹(Vijaysri et al., 2008)

²(Symons et al., 1995)

³(Symons et al., 2002)

⁴(Denes et al., 2006)

⁵(Dai et al., 2008)

⁶(Legrand et al., 2004)

⁷(Oguriura et al., 1993)

⁸(Meyer et al., 1991)

⁹(Buller et al., 1985)

¹⁰(Viner et al., 2007)

¹¹(Holzer et al., 1999)

¹²(Clark et al., 2006)

¹³(Staib et al., 2005)

¹⁴(Cottingham et al., 2008)

¹⁵(Buller, et al., 1988)

¹⁶(Perera et al., 2001)

¹⁷(Gherardi et al., 2003)

¹⁸(Flexner et al., 1987)

¹⁹(Tsang et al., 2001)

²⁰(Legrand et al., 2005)

Table 4

In vivo replication and protection by VACVs used in murine studies of 1st, 2nd, and 4th generation replicating smallpox vaccines.

VACV strain	Brain Titers (pfu/g)	Skin Titers (pfu/g)	Pock formation (pfu)	Protection by scarification (pfu)	Vaccine Generation
WR*	2×10^7 (⁶)	1.1×10^8 (⁴)	1×10^5 (³)	1×10^5 (³)	
Lister	None detected (¹)	-	2×10^3 (⁵)	2×10^4 (⁵)	First
NYCBH	-	6.9×10^7 (⁴)	-	1×10^4 (³)	First
Wyeth	1×10^4 (²)	3.8×10^6 - 1.9×10^7 (⁴)	-	-	First
Copenhagen	-	-	-	1×10^4 (³)	First
Acambis 2000	-	-	-	1.1×10^6 (⁷)	Second
WRΔE3L		2.5×10^6 (³)	1×10^6 (³)	1×10^6 (³)	Fourth

* WR is listed for comparison as it has been used extensively in mouse studies. It is not a vaccine strain.

¹ Abdalrhman et al., 2006

² Hayasaka et al., 2007

³ Jentarra et al., 2008

⁴ Lee et al., 1992

⁵ Sharon et al., 2007

⁶ Vijaysri et al., 2008

⁷ Marriott et al., 2008 Note: These protection studies were performed in a Cynomolgus model.

TESE DE DOUTORADO

**Prevenção e controle do *Vaccinia virus* no
Brasil: padronização de um sistema
prime-boost para imunização e
determinação de seus hospedeiros
naturais**

Tese apresentada ao
Departamento de Microbiologia do
Instituto de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Minas
Gerais, como requisito parcial à
obtenção do título de Doutor em
Microbiologia

Orientadora: Profa. Erna Geessien Kroon

**UFMG
2010**

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO	1
1.1. Família <i>Poxviridae</i>	1
1.1.1. Classificação	1
1.1.2. Morfologia	2
1.1.3. Estrutura do Genoma	3
1.1.4. Ciclo de multiplicação dos Poxvírus	5
1.2.1. Gênero <i>Orthopoxvirus</i> (OPV)	9
1.2.2. Ocorrência Mundial dos OPV	9
1.2.2.1. <i>Variola virus</i> e <i>Monkeypox virus</i>	9
1.2.2.2. <i>Cowpox virus</i>	12
1.2.2.3. <i>Vaccinia virus</i>	13
1.3. Ocorrência de VACV no Brasil	15
1.4. Espectro de Hospedeiros de OPV	20
1.5. Vias de Infecção e Patogênese dos poxírus	23
1.6. Vias de Eliminação	24
1.7. Estabilidade das Partículas Virais sob Condições Ambientais	26
1.8. Estratégias imunomodulatórias dos poxvírus	28
1.9. Desenvolvimento de imunógenos contra <i>Orthopoxvirus</i>	29
1.9.1. Vacinas de vírus vivos	29
1.9.2. Vacinas de vírus recombinantes	32
1.9.3. Vacinas de vírus inativados e o imunógeno BAV	33
1.9.4. Vacinas de DNA e proteínas contra OPV: glicoproteínas mais promissoras	34
II. JUSTIFICATIVA	36
III. OBJETIVOS	39
3.1. Objetivo Geral	39
3.2. Objetivos Específicos	39
IV. MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1. Sistemas Celulares	41
4.1.1. Células Vero	41
4.1.2. Fibroblastos Embrionários de Galinha (CEF)	41
4.1.3. Membrana corioalantóide de ovos embrionados	42

4.2. Vírus	42
4.2.1. Origem das amostras	42
4.2.2. Multiplicação viral em cultura celular	43
4.2.3. Purificação viral	43
4.2.4. Multiplicação da amostra viral BAV em membrana corioalantóide de ovos embrionados	44
4.2.5. Purificação da amostra viral BAV multiplicada em membrana corioalantóide de ovos embrionados	45
4.2.6. Titulação viral	45
4.2.7. Ensaios de imunofluorescência	46
4.2.8. Ensaios de infectividade viral	46
4.3. Ensaios de soroneutralização e inibição da formação de cometas	47
4.4. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	48
4.5. Sequenciamento e análise das seqüências de DNA	50
4.6. Determinação de hospedeiros e reservatórios naturais de VACV	50
4.6.1. Expedições de campo: características das áreas visitadas	50
4.6.2. Captura de roedores e coleta de espécimes clínicos	53
4.6.3. Caracterização biológica e molecular de amostras de VACV isoladas de roedores capturados em áreas acometidas pela vaccínia bovina	57
4.6.3.1. Teste de virulência dos isolados virais em camundongos Balb/c	58
4.6.4. Análise de coleções de soros de espécies de vertebrados silvestres ou mantidos em cativeiro	59
4.7. Padronização de um sistema <i>prime-boost</i> de vacinação contra OPV	61
4.7.1. Imunógeno inativado BAV	61
4.7.1.1. Inativação por b-propiolactona (Thornton, 1980 - modificado)	61
4.7.1.2. Inativação térmica de BAV	61
4.7.1.3. Testes de inativação	62
4.7.2. Vacina de DNA: B5R e H3L	63
4.7.3. Preparo dos imunógenos para vacinação	64
4.7.4. Avaliação da resposta imune pós-vacinação	65
4.7.5. Desafio de camundongos vacinados	65
4.8. Clonagem e expressão das proteínas B5R e H3L em sistema procarioto	66
4.8.1. Clonagem de B5R e H3L em pQE9	66
4.8.2. Cromatografia de afinidade	68

4.8.3. Caracterização da proteína – PAGE	69
4.9. Transferência Western	69
4.10. ELISA anti-OPV utilizando B5R e H3L recombinantes	70
FLUXOGRAMA DE TRABALHO	72
V. RESULTADOS	73
5.1. Determinação de hospedeiros e reservatórios naturais de VACV	71
5.1.1. Análise de roedores e espécimes clínicos	71
5.1.1.2. Caracterização biológica e molecular dos isolados MARV	76
5.1.1.2.1. Ensaios de imunofluorescência e de infectividade viral	76
5.1.1.2.2. Isolados MARV: inoculação em MCA e PCR para a detecção de genes específicos de OPV	80
5.1.1.2.3. Sequenciamento, comparação e análises filogenéticas dos isolados MARV	82
5.1.1.3. Testes de virulência e eliminação de MARV em camundongos Balb/c	88
5.1.2. Análise de coleções de soro de espécies de vertebrados silvestres ou mantidos em cativeiro	92
5.1.2.1. Caracterização sorológica	92
5.1.2.2. Caracterização molecular das amostras do Tocantins	95
5.2. Padronização de um sistema <i>prime-boost</i> de vacinação contra OPV	97
5.2.1. Cinética da inativação térmica da amostra viral BAV	97
5.2.2. Teste de inativação da amostra BAV	98
5.2.3. Avaliação da expressão protéica das proteínas B5R e H3L clonadas nos vetores vacinais	98
5.2.4. Testes de desafio intranasal	100
5.2.5. Teste de resposta humoral: soroneutralização e inibição de cometas	106
5.2.6. ELISA anti-OPV utilizando as proteínas B5R e H3L como antígeno	110
5.2.6.1. Construção dos plasmídios pQE9-B5R e pQE9-H3L	110
5.2.6.1. Expressão, purificação e análise de B5R e H3L recombinantes	114
5.2.6.2. ELISA IgG anti-B5R ou anti-H3L utilizando proteínas recombinantes	119
VI. DISCUSSÃO	123
VII. CONCLUSÕES	135
VIII. PERSPECTIVAS	137
IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	138

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Morfologia e estrutura dos poxvírus.	3
FIGURA 2: Representação esquemática das características estruturais e funcionais do genoma do <i>Vaccinia virus</i> .	4
FIGURA 3: Diagrama do ciclo de multiplicação dos poxvírus.	7
FIGURA 4: Eletromicrografia de transmissão de IMV, IEV e EEV.	8
FIGURA 5: Lesões pustulares típicas de varíola na face e membros inferiores.	10
FIGURA 6: Lesões faciais causadas por infecção de CPXV após contato com roedor selvagem	13
FIGURA 7: Peito e abdômen de uma criança de 2 anos com lesões generalizadas provocadas por VACV, causada por <i>eczema vaccinatum</i> .	14
FIGURA 8: Estados onde amostras brasileiras de VACV foram isoladas.	17
FIGURA 9: Lesões causadas por amostras de VACV	18
FIGURA 10: Representação esquemática de algumas proteínas imunomodulatórias codificadas por poxvírus.	29
FIGURA 11: Painel ilustrando os locais onde as armadilhas para roedores foram posicionadas nas propriedades rurais visitadas.	54
FIGURA 12: Relação dos sistemas de vacinação utilizados neste estudo.	66
FIGURA 13: Ensaios de imunofluorescência de células BSC-40 infectadas com MARV-M, MARV-H, MARV-B ou VACV-WR.	78
FIGURA 14: Ensaios de fenótipo de placa e curva de ciclo único de MARV-M, MARV-H, MARV-B e VACV-WR em células BSC-40.	79
FIGURA 15: Isolados MARV: inoculação em MCA e PCR de genes específicos de OPV.	81
FIGURA 16: Alinhamento das sequências dos genes <i>vgef</i> e <i>ha</i> .	83
FIGURA 17: Percentual de identidade entre OPV, baseado nas sequências nucleotídicas dos genes <i>tk</i> e <i>vgef</i> .	85
FIGURA 18: Percentual de identidade entre OPV, baseado nas sequências nucleotídicas do gene <i>ha</i> .	86
FIGURA 19: Árvores filogenéticas baseadas nas sequências nucleotídicas dos genes <i>vgef</i> (A) e <i>ha</i> (B).	87
FIGURA 20: Variação percentual média diária do peso e curva de sobrevivência de camundongos BALB/c infectados pela via intra-nasal.	89
FIGURA 21: Títulos de anticorpos neutralizantes anti-VACV no soro de camundongos BALB/c infectados pela via intra-nasal com MARV-M, MARV-B, MARV-H, GP2V ou BAV (15ºd.p.i.).	90
FIGURA 22: Detecção de VACV em fezes de camundongos infectados com MARV-M, MARV-H, MARV-B, GP2V ou BAV por PCR ou titulação.	91

FIGURA 23: Títulos virais nos intestinos de camundongos infectados MARV-M, MARV-H, MARV-B, BAV e GP2V.	92
FIGURA 24: Títulos de anticorpos neutralizantes em amostras de soro de mamíferos silvestres amazônicos.	94
FIGURA 25: Cinética de inativação térmica da amostra viral BAV.	97
FIGURA 26: Alinhamento das sequências de aminoácidos inferidas dos genes B5R e H3L, presentes nos vetores vacinais B5R-DNA e H3L-DNA.	99
FIGURA 27: Análise da expressão das proteínas B5R e H3L em células BSC-40 transfectadas com os vetores vacinais B5R-DNA e H3L-DNA.	100
FIGURA 28: Curva de sobrevivência de camundongos Balb/c vacinados com diferentes imunógenos anti-OPV e desafiados com VACV-WR.	103
FIGURA 29: Avaliação da morbidade em camundongos Balb/c vacinados com diferentes imunógenos contra OPV e desafiados com VACV-WR.	104-105
FIGURA 30: Avaliação da produção de anticorpos neutralizante anti-IMV em camundongos Balb/c vacinados com diferentes imunógenos contra OPV.	107
FIGURA 31: Alinhamento das sequências de nucleotídeos dos genes B5R e H3L, subclonados no vetor pGEMT-easy.	111
FIGURA 32: Restrição enzimática das contruções pGEMT-B5R, pGEMT-H3L e do vetor pQE9.	112
FIGURA 33: Triagem de clones pQE9-B5R e pQE9-H3L.	113
FIGURA 34: Análise da expressão de B5R e H3L recombinantes em clones bacterianos induzidos e não induzidos com IPTG.	116
FIGURA 35: Análise da purificação de B5R e H3L recombinantes.	117
FIGURA 36: Detecção de B5R e H3L recombinantes por transferência Western.	118
FIGURA 37: ELISAs IgG anti-B5R ou -H3L – teste dos soros de camundongos imunizados com as vacinas B5R-DNA, H3L-DNA e/ou BAV.	121
FIGURA 38: Modelo hipotético do ciclo de transmissão dos VACV.	129

LISTA DE ABREVIATURAS

- µL – microlitro
ARAV – Vírus Araçatuba
ATCC – American type cell collection
BAV – Vírus BeAN 58058
BSA – albumina sérica bovina
CDC – Centro de Controle de Doenças
CEBIO-UFMG – Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais
CETEA - Comitê de Ética da UFMG
CEV – vírus envelopado célula-associado
CMC – Carboxi-Metil-Celulose
CPXV – *Cowpox virus*
CTGV – Cantagalo virus
d.p.i. – dias pós-infecção
dATP – dideoxiadenosina trifosfato
dCTP – dideoxicitosina trifosfato
dGTP – dideoxiguanidina trifosfato
DMEM - meio de Eagle modificado por Dulbeco
DNA – Ácido desoxirribonucléico
dTTP – dideoxitimidina trifosfato
ECMV – *Ectromelia virus*
ECP – Efeito Citopático
EDTA – ácido etilenodiaminotetracético
EEV – vírus envelopado extracelular
EV – vírus extracelular
FIOCRUZ – Fundação Instituto Oswaldo Cruz
GP1V – Vírus Guarani P1
GP2V – Vírus Guarani P2
ha – Hemaglutinina
ICTV – International Committee on Taxonomy of Viruses
IEV – Vírus envelopado intracelular
IMA – Instituto Mineiro de Agropecuária
IMV – Vírus maduro intracelular
ITR – Regiões terminais invertidas
IV – Vírus imaturo
MARV – Mariana virus
M.O.I. – multiplicidade de infecção
MCA – Membrana corioalantóica
MEM – Meio mínimo essencial
 $MgCl_2$ - Cloreto de Magnésio
mL – mililitro

mm – milímetros
mM – milimolar
MPXV – *Monkeypox virus*
MURV – Vírus Muriaé
MV – Vírus maduro
nm – nanômetro
OMS – Organização Mundial da Saúde
OPXV – *Orthopoxvirus*
PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida
pb – Pares de bases
PBS – Tampão salina fosfato
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
PFU / UFP – Unidade Formadora de Placas
PFU ou UFP/g - Unidades Formadoras de Placas / grama
pH – Potencial de hidrogênio
pM – picomoles
PSTV – Vírus Passatempo
r.p.m. - rotações por minuto
RNA – Ácido ribonucléico
SAV – SPAn 232 virus
SFB – Soro fetal bovino
SN – Soroneutralização
TK – Timidina quinase
UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais
UV – Ultra-violeta
VACV – *Vaccinia virus*
VACV-WR – *Vaccinia virus* amostra Western Reserve
VARV - *Variola virus*
VBH – Vírus Belo Horizonte
VGF – Fator de crescimento de *Vaccinia virus*
vgf - gene do fator de crescimento de *Vaccinia virus*
WV – Vírus envelopado

A família *Poxviridae* comprehende grandes e complexos vírus de animais, capazes de infectar hospedeiros vertebrados e invertebrados. *Orthopoxvirus* (OPXV) é um dos gêneros da família, e entre os seus representantes estão o *Cowpox virus*, o *Monkeypox virus*, o 5 *Variola virus* e o *Vaccinia virus* (VACV). O VACV é o agente causador da vaccínia bovina no Brasil, e está associado à formação de lesões ulcerativas em bovinos e ordenhadores, acarretando perdas econômicas e impactos sociais. Desde 1999, vários casos de vaccínia bovina vêm sendo notificados, e um grande número de amostras de VACV foram isoladas durante esses surtos. Todavia, apesar de todos os impactos causados pela vaccínia 10 bovina no Brasil, os hospedeiros naturais do VACV são pouco conhecidos, e a escassez de dados dificulta a proposição de modelos sólidos relativos à biologia do VACV, como a manutenção e circulação desses vírus na natureza. Além disso, atualmente não existem imunógenos seguros disponíveis no mercado contra esta doença. Desta forma, o objetivo 15 deste trabalho foi a determinação de alguns dos hospedeiros naturais do VACV, assim como o estudo de imunógenos seguros contra esta doença, buscando, portanto, por métodos de prevenção e controle da vaccínia bovina no Brasil. Os estudos sobre os hospedeiros naturais do VACV foram feitos por meio da análise de roedores peridomiciliares, capturados na proximidades de áreas com registros de surtos de VACV. Além disso, diferentes bibliotecas de soros de vertebrados foram analisadas. Para o 20 estudo de imunógenos anti-VACV foram desenvolvidas três diferentes vacinas: uma amostra de VACV, BAV, sob a forma inativada e vacinas de DNA expressando as proteínas virais B5R ou H3L. Evidências sorológicas e moleculares indicaram a presença de VACV em roedores peridomiciliares capturados em propriedades rurais em Minas Gerais, assim como em duas espécies de primatas amazônicos. No estudo dos 25 imunógenos, testes de resposta humoral e de desafio foram realizados, e demonstraram que o imunógeno contendo BAV associado com a vacina de DNA expressando B5R, sob o regime de prime-boost homólogo, apresentou os resultados mais promissores. Desta forma, os resultados obtidos no presente estudo sugerem a existência de um ciclo silvestre do VACV, e que roedores peridomiciliares podem representar os carreadores deste vírus 30 entre as áreas rurais e as florestas brasileiras. Por outro lado, os estudos relacionados a imunógenos anti-VACV sugerem que vacinas seguras contra a vaccínia bovina podem ser opções viáveis, em alternativa a utilização de vacinas contendo amostras virais atenuadas. Os resultados deste estudo podem ser utilizados para futuras ações de controle e prevenção da vaccínia bovina no Brasil.

ABSTRACT

The *Poxviridae* family comprises large and complex viruses that infect vertebrates and invertebrates. *Orthopoxvirus* (OPXV) is a *Poxviridae* family's genus, and comprises species with clinical and veterinary relevance, like *Variola virus*, *Cowpox virus*, *Monkeypox Virus* and *Vaccinia virus* (VACV). VACV has been associated with bovine vaccine outbreaks in Brazil, causing ulcerative lesions in cattle and humans, causing economical losses and social impact. Since 1999, several bovine vaccine outbreaks were notified in Brazil, and many strains of VACV were isolated during such outbreaks. There are few available data about VACV hosts and reservoirs in Brazil. In addition, little is known about how these viruses are maintained in nature and the role of wild life in the emergence of those outbreaks. Despite the impacts associated to VACV outbreaks, there are no available safe vaccines against such zoonosis. Thus, the present work aimed the search of VACV natural hosts and reservoirs, and the study of safe vaccines against bovine vaccinia. Studies for discovery VACV hosts were performed using wild animals sera collections from Brazilian forests and to capturing rodents in properties affected by bovine vaccinia outbreaks. In parallel, three vaccines against VACV were tested: an inactive Brazilian VACV strain, named BAV; and two DNA vaccines, codifying B5R and H3L viral glycoproteins. Serological and molecular evidences indicated VACV infection in peridomestic rodents, captured in Minas Gerais State rural areas, as such as in two Amazon monkey species. The vaccine studies showed that BAV in association with B5R-DNA vaccine, using prime-boost immunization, presented the best results. Therefore, the results here obtained suggest the existence of a feral VACV cycle of life, and that peridomestic rodents could carrier VACV between forests and rural areas. Our results also showed that safe vaccines against VACV could be good alternatives to prevent bovine vaccinia outbreaks. The results of the present study could be used for prevention and control programs against VACV in the future.

30

35

I. INTRODUÇÃO

1.1. Família *Poxviridae*

1.1.1. Classificação

5

A família *Poxviridae* comprehende vírus de morfologia complexa, com genoma de DNA, que se multiplicam no citoplasma da célula hospedeira. De acordo com o tipo de hospedeiro a família se divide em duas subfamílias, *Chordopoxvirinae* e *Entomopoxvirinae*, que infectam vertebrados e invertebrados, respectivamente 10 (INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES [ICTV], 2008). Os membros da subfamília *Entomopoxvirinae* apresentam como espectro de hospedeiros diversas ordens da classe *Insecta*, incluindo Diptera, Coleoptera, Orthoptera e Lepidoptera (DAMON, 2007; BECKER *et al.*, 2008). A subfamília 15 *Chordopoxvirinae* é dividida em oito gêneros (TABELA 1), dos quais quatro (*Orthopoxvirus*, *Parapoxvirus*, *Molluscipoxvirus* e *Yatapoxvirus*) incluem agentes etiológicos de infecções humanas (SARAL *et al.*, 2006; de SOUZA TRINDADE *et al.*, 2007; LENDERMAN *et al.*, 2007; NAZARIAN *et al.*, 2007).

TABELA 1: Classificação dos vírus da subfamília *Chordopoxvinae*. Fonte: ICTV, 2008

Família *Poxviridae*; subfamília *Chordopoxvinae*

Gênero	Protótipo
<i>Orthopoxvirus</i>	<i>Vaccinia virus</i>
<i>Parapoxvirus</i>	<i>Orf virus</i>
<i>Capripoxvirus</i>	<i>Sheeppox virus</i>
<i>Suipoxvirus</i>	<i>Swinepox virus</i>
<i>Leporipoxvirus</i>	<i>Myxoma virus</i>
<i>Avipoxvirus</i>	<i>Fowlpox virus</i>
<i>Yatapoxvirus</i>	<i>Tanapox virus</i>
<i>Molluscipoxvirus</i>	<i>Molluscum contagiosum virus</i>

20

Muitas doenças veterinárias são causadas por poxvírus de vertebrados, acarretando importantes perdas econômicas. Os vírus do gênero *Avipoxvirus*, por

- exemplo, afetam um amplo espectro de aves, incluindo frangos, perus e canários, causando lesões vesiculares, sobretudo na região das patas (RAPIN *et al.*, 2007; TADESE *et al.*, 2007). Os vírus do gênero *Leporipoxvirus* infectam populações de coelhos domésticos, causando infecção sistêmica, com alta mortalidade (STANFORD *et al.*, 2007). Os vírus do gênero *Parapoxvirus* atingem criações de caprinos, ovinos e bovinos (MONDAL *et al.*, 2006; HOSAMANI *et al.*, 2007, ABRAHÃO *et al.*, 2009) e os vírus do gênero *Orthopoxvirus* (OPV) causam perdas na pecuária leiteira (TRINDADE *et al.*, 2007) e em áreas de criação de camelos e búfalos (SINGH, *et al.*, 2006; AL-ZI'ABI O *et al.*, 2007; SINGH, *et al.*, 2007).
- O espectro de hospedeiros dos cordopoxvírus é notavelmente amplo, e muitas espécies virais isoladas ainda não foram classificadas dentro de um gênero, sendo que sua inserção dentro da subfamília foi possível devido a características morfológicas e biológicas. Dentre os cordopoxvírus não-classificados estão incluídos poxvírus isolados de mamíferos, como focas californianas (*California harbor seal poxvirus*), esquilos (*Squirrelpox virus*), golfinhos nariz-de-garrafa (*Dolphin poxvirus*) e cangurus cinza e vermelho (*Grey kangaroo poxvirus*, *Red kangaroo poxvirus*); e de répteis como o crocodilo do Nilo (*Nile crocodile poxvirus*) e jacarés americanos (*Spectacled caiman poxvirus*) (ICTV, 2008).

20 1.1.2. Morfologia

As partículas dos poxvírus apresentam morfologia complexa, em forma ovóide, de tijolo ou pleomórfica, com dimensões variando entre 140-260nm de diâmetro por 220-450nm de comprimento (CYRKLAFF *et al.*, 2005; ICTV, 2008). A partícula contém mais de 100 proteínas distribuídas em quatro estruturas distintas: cerne, corpúsculos laterais, membrana e envelope. O cerne apresenta configuração bicôncava (FIGURA 1A), unilateralmente côncava ou cilíndrica, e envolve o material genético, enzimas e fatores de transcrição de genes precoces. Uma membrana lipídica, contendo proteínas de superfície tubulares ou globulares arranjadas de forma helicoidal (parapoxvírus) ou irregular (FIGURA 1B), envolve o

cerne e dois corpúsculos laterais, cuja função e composição química ainda são pouco definidas (MOSS, 2001; ICTV, 2008). O esquema das estruturas que compõem a partícula viral está representado na FIGURA 1-C.

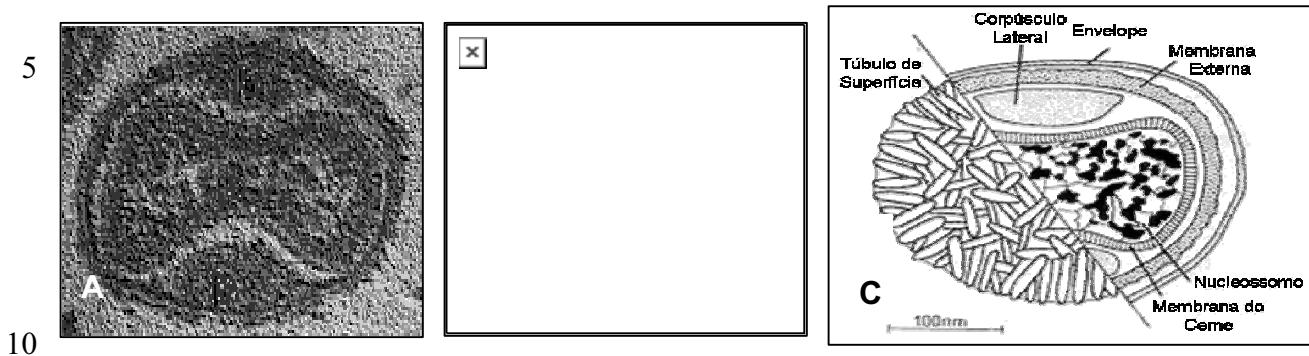


FIGURA 1: Morfologia e estrutura dos poxvírus. (A) Eletromicrografia de secção longitudinal de *Fowlpox virus*, evidenciando o cerne em forma de halter e os corpúsculos laterais. (B) Eletromicrografia em contraste negativo de *Variola virus*, apresentando os túbulos de superfície. (C) Representação esquemática de um poxvírus. Fontes: **ICTV, 2008; www.ucm.es; FENNER, 1989 – modificado.**

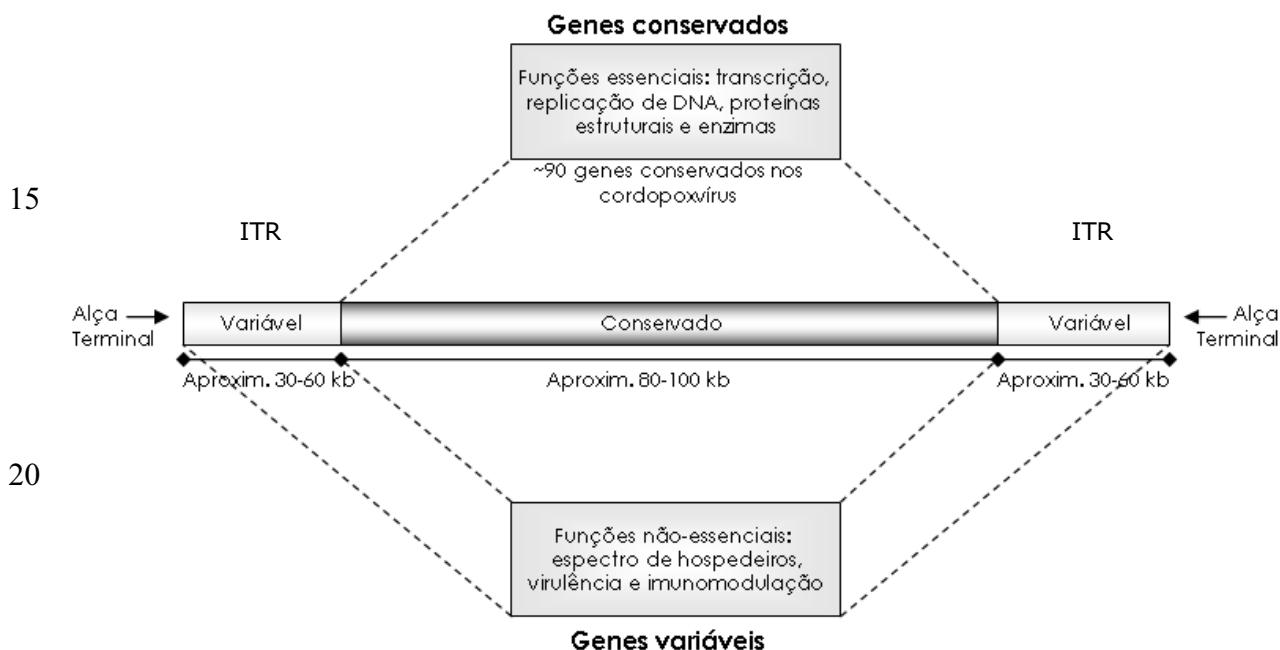
1.1.3. Estrutura do genoma

O genoma dos poxvírus é constituído por uma molécula de DNA dupla-fita linear, covalentemente ligada nas extremidades, variando de 130kb (gênero *Parapoxvirus*) a 375kb (gênero *Avipoxvirus*), e codifica aproximadamente 200 genes. O conteúdo guanina+icitosina varia de 35-64% entre os cordopoxvírus, e representa cerca de 20% do genoma dos entomopoxvírus (BECKER *et al.*, 2008; ICTV, 2008). O tamanho relativamente grande do genoma permite a codificação de proteínas não-essenciais para seu ciclo de multiplicação, mas que modulam sua patogenicidade. A ausência de infecções latentes e a não-integração no genoma do hospedeiro justificam a importância de genes que protejam os poxvírus do sistema imune durante uma infecção (MOSS, 2001; HUGHES e FRIEDMAN, 2005; ICTV, 2008).

A região central do genoma dos poxvírus, sobretudo dos vírus do gênero OPV, é altamente conservada, e codifica principalmente proteínas estruturais e enzimas

envolvidas no metabolismo do ácido nucléico. Nas extremidades do genoma se encontram as regiões terminais invertidas (ITRs), seqüências idênticas dispostas em orientações contrárias. As ITRs são regiões genômicas variáveis, que codificam genes responsáveis pela interação vírus-hospedeiro, conferindo a cada poxvírus 5 características únicas de patogênese e imunomodulação (GUBSER *et al.*, 2004).

As duas fitas de DNA são conectadas em suas porções terminais por seqüências nucleotídicas de fitas simples ricas em adenina e timina (alças), contendo aproximadamente 100 bases. Essas regiões são altamente conservadas e contêm 10 seqüências necessárias para a formação de concatâmeros durante a replicação do DNA (FIGURA 2) (revisado por MOSS, 2001; ICTV, 2008).



25 **FIGURA 2: Representação esquemática das características estruturais e funcionais do genoma do *Vaccinia virus*.** A região central do genoma apresenta genes altamente conservados, que codificam proteínas envolvidas em funções essenciais. As regiões terminais invertidas (ITRs) codificam proteínas não-essenciais, e se apresentam duplicadas no genoma. Nas extremidades são observadas as alças terminais. Fonte: Adaptado de SMITH e McFADDEN, 2002.

30 Diversos poxvírus, de ambas as subfamílias, tiveram seus genomas sequenciados de forma completa nos últimos anos, o que permitiu um avanço nos estudos de

localização e função gênica (MASSUNG *et al.*, 1994; SHCHELKUNOV *et al.*, 1995; SENKEVICH *et al.*, 1997; ANTOINE *et al.*, 1998; CAMERON *et al.*, 1999; SHCHELKUNOV *et al.*, 2000; AFONSO *et al.*, 2000; BAWDEN *et al.*, 2000). O genoma do *Vaccinia virus* (VACV), o protótipo da família, não possui íntrons e cada 5 gene contém seu próprio promotor. Não existe uma distribuição óbvia dos genes no genoma no que diz respeito à função, contudo estes estão arranjados de modo a minimizar uma possível interferência durante a transcrição (*revisado por* CONDIT e NILES, 2002).

10 1.1.4. Ciclo de multiplicação dos poxvírus

Diferentemente da maioria dos vírus de DNA, a multiplicação dos poxvírus ocorre inteiramente no citoplasma da célula hospedeira (FIGURA 3), característica compartilhada apenas com a família *Asfarviridae* (ICTV, 2008). A partícula viral 15 possui quase todos os elementos necessários para a sua multiplicação, incluindo RNA polimerase dependente de DNA, enzima de metilação, poli A polimerase e fatores de transcrição de genes precoces (FENNER, 2000; MOSS, 2001; *revisado por* SODEIK e KRIJNSE-LOCKER, 2002; MOSS, 2006).

20 O ciclo tem início com a adsorção viral na membrana da célula hospedeira, todavia, pouco se conhece acerca dos ligantes virais e receptores celulares envolvidos no processo. Ao todo, oito diferentes glicoproteínas virais parecem estar envolvidas na formação do complexo de fusão-penetrAÇÃO (SENKEVICH *et al.*, 2005). Foi demonstrado que as proteínas de membrana A21, H2, F9 e G9 são essenciais 25 para a penetração das partículas virais, uma vez que mutantes negativos para estas proteínas não foram capazes de se multiplicar (TOWNSLEY *et al.*, 2005; SENKEVICH *et al.*, 2005; BROWN *et al.*, 2006; OJEDA *et al.*, 2006). A proteína de superfície A27, presente no vírus maduro intracelular (IMV) também parece estar envolvida na adsorção viral. Além disso, uma série de outras proteínas de 30 superfície como D8 e H3 também vêm sendo relacionadas como possíveis ligantes de IMV, porém nenhuma destas três proteínas em questão se mostrou individualmente essencial (MOSS, 2005). Elementos de expressão ubíqua e de

caráter aniónico, como os glicosaminoglicanos e outros componentes da matriz extracelular, como condroitina sulfato e heparano sulfato, vêm sendo apontados como possíveis receptores celulares envolvidos na adsorção dos poxvírus (MOSS, 2001; *revisado por* McFADDEN, 2005).

5

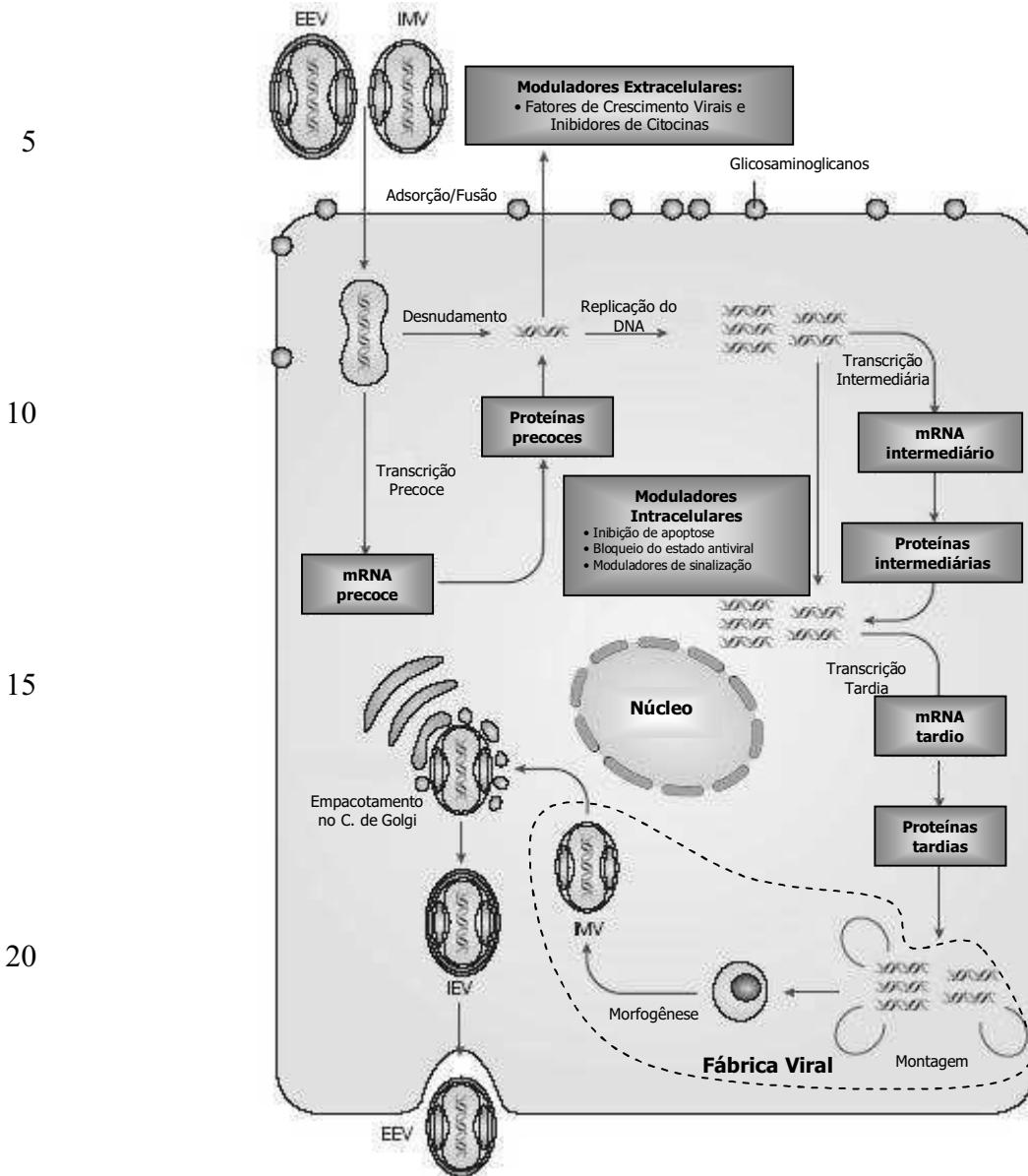
Após a adsorção, ocorre a fusão da partícula viral com a membrana plasmática, liberando o nucleocapsídeo no citoplasma celular. A proteína A28 é altamente conservada entre os poxvírus, e parece estar envolvida no processo de fusão. Experimentos envolvendo a deleção de A28 em VACV demonstraram que esta proteína está presente em todas as partículas infecciosas dos poxvírus (SENKEVICH *et al.*, 2003). TOWNSLEY e colaboradores (2006) demonstraram que o VACV também pode penetrar na célula hospedeira pelo mecanismo de endocitose mediada por receptor, em uma via endossômica que requer acidificação.

15

Após a penetração na célula, a maquinaria transcrecional do vírus é ativada pelos fatores de transcrição de genes precoces presentes no nucleocapsídeo (GUBSER *et al.*, 2007). Proteínas moduladoras de resposta imune e fatores de crescimento celular são então traduzidos (McFADDEN, 2005; McLENNAN, 2007) e, em seguida, ocorre um desnudamento secundário, e o DNA começa a ser replicado, formando concatâmeros. Os genes intermediários e tardios são transcritos e traduzidos, originando proteínas estruturais, além de elementos que serão associados às partículas virais em formação (MOSS, 2001). A morfogênese acontece em sítios celulares onde ocorre acúmulo de um material nucleoprotéico denso, embebido em uma matriz granular, conhecidos como corpúsculos de inclusão do tipo basófilo ou “fábricas virais” (*revisado por* YODER *et al.*, 2004).

Ao contrário do que ocorre com outros vírus envelopados, as membranas dos poxvírus não são exclusivamente adquiridas de forma adjacente às membranas celulares, sendo a síntese *de novo* de membranas uma hipótese ainda debatida (ICTV, 2008). A estruturação inicial das partículas dos poxvírus ocorre de forma seqüencial, a partir de estruturas lipoprotéicas denominadas crescentes, que dão

origem a partículas uniformes e esféricas, que em um estágio subsequente de maturação, formam o vírus imaturo (IV) (MOSS, 2006).



25 **FIGURA 3: Diagrama do ciclo de multiplicação dos poxvírus.** Fonte: McFADDEN, 2005 – modificado.

Após clivagens proteolíticas de elementos de capsídeo e condensação do cerne viral, os IV dão origem aos vírus maduros intracelulares (IMV), que representam a maioria das partículas virais infecciosas (MOSS, 2006). Algumas partículas IMV podem ser transportadas através de microtúbulos até o complexo de Golgi, onde adquirem uma dupla membrana, dando origem aos vírus envelopados

intracelulares (IEV), que são partículas virais não infecciosas (DUBOCHET, 1993; MOSS, 2006). Os IEV seguem para a periferia da célula direcionados por microtúbulos, e então se fundem com a membrana plasmática, formando os vírus envelopados extracelulares (EEV). Entretanto, algumas partículas podem eventualmente permanecer associadas com a membrana plasmática da célula, formando os vírus envelopados célula-associados (CEV), importantes na dispersão viral célula-célula (MOSS, 2001; MOSS, 2006; DOCEUL *et al.*, 2010). As partículas EEV, apesar de representarem apenas um pequeno percentual das partículas virais totais, são essenciais para a disseminação do vírus dentro do hospedeiro durante uma infecção (DOCEUL *et al.*, 2010).

O número e a composição das membranas presentes nas formas virais envolvidas no ciclo de multiplicação dos poxvírus é alvo de intensa pesquisa. Nos últimos anos, técnicas de microscopia eletrônica, associadas ao avanço de procedimentos bioquímicos de identificação protéica, demonstraram que a composição das proteínas de membrana dos IMV é diferente da encontrada nos IEV e CEV (MOSS, 2006). Além disso, foi demonstrado de forma consistente que os IMV apresentam apenas uma membrana, enquanto as partículas extracelulares (CEV e EEV) possuem pelo menos duas (FIGURA 4). Estes aspectos influenciam diretamente no modo pelo qual tais partículas adsorvem e penetram nas células hospedeiras (SENKEVICH *et al.*, 2003; MOSS, 2006).

25

30

35



5



10 **FIGURA 4: Eletromicrografia de transmissão de (A) IMV, (B) IEV e (C) EEV.** As setas
indicam as membranas presentes nas partículas. Fonte: **MOSS, 2006** – modificado

15 Em 2006, MOSS propôs uma nova nomenclatura para as partículas virais dos
poxvírus. Os vírus maduros intracelulares (IMV) foram classificados como vírus
maduros (MV), e há um consenso que tais partículas possuem uma única
membrana, formada por bicamada lipídica. Os vírus intracelulares envelopados
(IEV), por adquirirem um envelope composto por duas membranas que circundam
o MV, foram chamados de vírus envelopados (WV). Por fim, as partículas EEV e
20 CEV, por ocorrerem fora da célula, foram denominadas vírus extracelulares (EV), e
possuem uma membrana a menos que os WV (MOSS, 2006).

1.2.1. Gênero *Orthopoxvirus* (OPV)

25 O gênero OPV apresenta nove espécies antigenicamente relacionadas (BREMAN
e HENDERSON, 2002; ICTV, 2008), com uma ampla distribuição geográfica e um
variado espectro de hospedeiros (LOPAREV *et al.*, 2001; McFADDEN, 2005).
Quatro espécies de OPV infectam humanos: *Variola virus* (VARV) , *Monkeypox*
virus (MPXV), *Cowpox virus* (CPXV) e VACV (McFADDEN, 2005; ICTV, 2008).
30 Outras espécies, incluindo o VACV, CPXV e o MPXV são patógenos de animais:
Ectromelia virus (ECMV), *Camelpox virus*, *Racconpox virus*, *Volepox virus* e
Taterapox virus. Outras duas não estão ainda bem caracterizadas: *Skunkpox virus*
e *Uasin Gishu disease virus*, os quais são agentes etiológicos de doenças em
gambás e cavalos, respectivamente (ICTV, 2008).

35

1.2.2. Ocorrência mundial dos OPV

1.2.2.1. *Variola virus* e *Monkeypox virus*

O VARV foi um dos mais importantes patógenos da humanidade, responsável por aproximadamente 50 milhões de óbitos somente no século XIX. A origem do VARV é desconhecida, mas acredita-se que a espécie tenha surgido com os primeiros agrupamentos humanos organizados, quando a prática da agricultura permitiu a ocorrência da primeira expansão demográfica, há cerca de 6000 anos (GEDDES, 2006). Os casos mais antigos documentados remetem aos anos de 1580-1100a.C., relacionados a três múmias egípcias encontradas apresentando cicatrizes faciais típicas de varíola, incluindo a múmia do faraó Ramsés V, que possivelmente faleceu acometido pela doença (*revisado por MAHALINGAM et al., 2004; revisado por TOLEDO, 2006*). Os primeiros registros de varíola da Era Cristã coincidem com a concentração de pessoas e os surgimentos de grandes cidades no século IV, sobretudo ao longo dos vales dos rios Nilo (Egito), Tigre e Eufrates (Mesopotâmia, atual Iraque), Ganges (Índia), Amarelo e Vermelho (República Popular da China). Antes desse período, a doença possivelmente ocorria de forma esporádica, devido ao pequeno número de habitantes das cidades (*revisado por TOLEDO, 2006*). Segundo historiadores, as rotas de mercadores e o tráfego de especiarias, e a expansão islâmica nos séculos VIII e IX permitiram a disseminação e o estabelecimento da doença no continente Europeu. A disseminação da varíola no Novo Mundo ocorreu a partir das Grandes Navegações, iniciadas no século XV, sendo a doença um dos fatores responsáveis pela queda substancial das populações indígenas americanas (*revisado por TOLEDO, 2006*).

Os principais sintomas e sinais clínicos associados à varíola são a formação de pústulas dolorosas e confluentes por toda superfície corporal, com maior número de lesões nos membros e na face (FIGURA 5), além de estado febril agudo e prostração. Em 5 a 10% dos pacientes, a doença progride rapidamente de forma maligna, provocando a morte em aproximadamente 6 dias (HENDERSON *et al.*, 1999).



FIGURA 5: Lesões pustulares típicas de varíola na face (A) e membros inferiores (B).

Fontes: McFADDEN, 2005; GEDDES, 2006 - modificado

- 10 Em 1977, na Somália, foi registrado o último caso de varíola, três anos antes da Organização Mundial da Saúde (OMS) declarar a doença erradicada, graças ao Programa Intensificado para a Erradicação da Varíola (FENNER, 1989). Atualmente, apenas dois institutos estão legalmente autorizados a manterem amostras de VARV: o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), nos
- 15 Estados Unidos, e o Centro de Pesquisa do Estado para Virologia e Biotecnologia, na Rússia. Existe, no entanto, uma preocupação acerca da existência de estoques clandestinos de VARV, que poderiam ser utilizados em atentados terroristas, especialmente após os ataques de setembro de 2001, envolvendo *Bacillus anthracis* (McFADDEN, 2005). A liberação accidental ou deliberada do VARV
- 20 poderia causar uma grande epidemia, sobretudo porque a vacinação contra a varíola foi suspensa há mais de duas décadas, o que ocasionou uma geração de pessoas não imunizadas contra os OPV (BREMAN e HENDERSON, 2002).

O MPXV é um agente zoonótico emergente, podendo ocasionar manifestações clínicas sistêmicas graves, muito similares às da varíola humana (SHCHELKUNOV *et al.*, 2002; LEARNED *et al.*, 2007). Alguns roedores endêmicos da África Central e Ocidental são os reservatórios naturais deste vírus, embora infecções em populações humanas e de outros primatas vêm sendo descritas no continente africano (ARITA *et al.*, 1976; MARENKOVA, 1977; revisado por McFADDEN, 30 2005, revisado por CHASTEL, 2009). Estudos epidemiológicos recentes vêm demonstrando um aumento de aproximadamente 400% no número de casos de MPXV na África nos últimos 20 anos, provavelmente relacionado com o

crescimento da população não imunizada contra os OPV (RIMOIN *et al.*, 2010). Em junho de 2003, uma inadvertida importação de roedores africanos causou um surto de MPXV no centro-norte dos Estados Unidos (GIULIO e ECKBURG, 2004). Naquela ocasião, 81 casos humanos com sinais clínicos foram reportados, 5 acometendo principalmente veterinários e vendedores de animais. Fortuitamente, estes casos foram clinicamente mais brandos que os normalmente observados no continente africano, provavelmente devido ao truncamento de um gene viral relacionado com o escape do complemento (GUARNER, 2004; FINLAY e McFADDEN, 2006). Assim como descrito para o VARV, existe uma grande 10 preocupação quanto à utilização do MPXV em atentados bioterroristas (NALCA *et al.*, 2005).

1.2.2.2. Cowpox virus

O CPXV é endêmico na Europa e oeste da Ásia e, apesar do nome, a infecção em 15 bovinos é rara, com prevalência de anticorpos para vírus do gênero OPV no gado europeu menor que 1%. Evidências apontam que os prováveis reservatórios do CPXV sejam roedores silvestres, dos gêneros *Clethrionomys*, *Microtus* e *Apodemus* (BENNETT, 1996).

20 Nos últimos anos, é crescente o número de casos relatados de infecção humana por CPXV, associada principalmente aos gatos (CORAS, 2005; KURTH *et al.*, 2009). Os felinos exercem um importante papel de hospedeiro intermediário, transmitindo CPXV de roedores para os seres humanos, animais domésticos, tais como cães e cavalos, e para animais habitantes de zoológicos, como elefantes, 25 rinocerontes, antas, edentatas e alguns carnívoros (MARENKOVA, 1977; BAXBY, 1979; MEYER, 1998; PELKONEN, 2003; KURTH *et al.*, 2009). O primeiro caso de transmissão direta de CPXV de um roedor para um hospedeiro humano foi descrito em 2002, na Holanda, quando uma adolescente entrou em contato com 30 um rato peridomiciliar (*Rattus norvegicus*) e apresentou lesões com nódulos ulcerados na face, como ilustrado na FIGURA 6 (WOLFS, 2002). Vinte anos antes, MAIBORODA (1982) já havia sugerido que essa espécie de roedor poderia participar da circulação de uma variante biológica do CPXV na natureza. Novos

casos de transmissão de CPXV entre *R. norvergicus* e humanos foram simultaneamente descritos na França e Alemanha recentemente (NINOVE *et al.*, 2009; CAMPE *et al.*, 2009). Um surto de CPXV também foi descrito em mangustos (*Mungos mungo*) e em gatos selvagens europeus (*Herpailurus yagouaroundi*)
5 (KURTH *et al.*, 2009).

No Brasil, um caso de varíola bovina causada por CPXV foi relatado por SILVA e colaboradores, em 1986. No entanto, nenhuma caracterização molecular do agente viral foi realizada para a confirmação de que se tratava efetivamente de um CPXV,
10 e não um VACV (TRINDADE *et al.*, 2003).

15



20 **FIGURA 6: Lesões faciais causadas por infecção de CPXV após contato com roedor
selvagem - Fonte: WOLFS, 2002**

A circulação de CPXV em animais selvagens e domésticos, associada com a queda da imunidade das populações humanas, podem estar relacionadas aumento
25 do número de casos da doença (PELKONEN, 2003). Em geral, a recuperação completa da doença leva de 6 a 8 semanas, porém, em pessoas imunocomprometidas é possível ocorrer uma infecção grave e generalizada, levando até mesmo ao óbito (EIS-HUBINGER, 1990).

30

1.2.2.3. *Vaccinia virus*

O VACV é o protótipo do gênero OPV, e apresenta um amplo espectro de hospedeiros (McFADDEN, 2005). Este vírus foi utilizado na Campanha de Erradicação da Varíola da Organização Mundial de Saúde (OMS), pelo fato de oferecer alta proteção imunogênica, por produzir somente lesões localizadas e pela 5 característica de ser menos virulento que o VARV (ESPOSITO e FENNER, 2001).

A origem do VACV é desconhecida, embora algumas teorias tentem explicar o seu surgimento: (1) seria um híbrido do CPXV e VARV; (2) teria derivado de CPXV, (3) ou do VARV, após adaptação em animais; (4) seu hospedeiro natural estaria, 10 atualmente, extinto. Apesar das hipóteses levantadas, não existe concordância nessa questão (FENNER, 1989; DAMASO *et al.*, 2000; TRINDADE *et al.*, 2007).

Mesmo após a suspensão do programa mundial de vacinação contra a varíola, na década de 80, as Forças Armadas dos Estados Unidos mantêm um programa 15 interno de vacinação, visando a proteção de suas tropas contra um eventual ataque bioterrorista. Entretanto, muitos soldados, apesar de imunizados, permanecem por um longo período liberando partículas virais infecciosas supostamente a partir das crostas formadas em decorrência da administração da vacina. Por esse motivo, alguns casos de transmissão intra-familiar vêm sendo 20 descritos desde a década de 80 (EGAN, *et al.*, 2004; VORA *et al.*, 2008). Em março de 2007, um dos casos mais graves foi registrado, quando um soldado recém-vacinado transmitiu VACV para seus familiares, incluindo uma criança de 2 anos, que desenvolveu *eczema vaccinatum*, levando ao surgimento de lesões generalizadas, principalmente no ventre e nos membros (FIGURA 7) (VORA *et al.*, 25 2008).

30



10 **FIGURA 7: Peito e abdômen de uma criança de 2 anos com lesões generalizadas provocadas por VACV, causada por eczema vaccinatum.** Exemplo de transmissão intra-familiar pós-vacinação contra varíola - Fonte: **VORA et al., 2008**

15 Após a erradicação da varíola, a vacinação foi suspensa (FENNER et al., 1988), e o VACV passou a ser amplamente utilizado na pesquisa, como modelo para o entendimento de estratégias de evasão imune dos vírus em geral (YAO et al., 2007; DOMINGO-GIL et al., 2008), e mais recentemente como potenciais vetores recombinantes para a vacinação contra numerosas doenças humanas e veterinárias (ARAVINDARAM et al., 2008; CHIAN et al., 2009; KREIJTZ et al., 2009). Nos últimos anos, entretanto, começaram a ser registrados no Brasil, vários 20 surtos exantemáticos, acometendo gado leiteiro e ordenhadores, e diversos estudos vêm demonstrando que o agente etiológico dessas lesões são amostras de VACV (DAMASO et al., 2000; TRINDADE et al., 2004; LEITE et al., 2005; TRINDADE et al., 2006; TRINDADE et al., 2007; MEGID et al., 2008; MEDAGLIA et 25 al., 2009).

1.3. Ocorrência de VACV no Brasil

30 Vários trabalhos desenvolvidos em instituições de pesquisa no Brasil vêm demonstrando que amostras de VACV apresentam-se sob ativa circulação no território nacional (DAMASO et al., 2000; TRINDADE et al., 2004; LEITE et al., 2005; TRINDADE et al., 2006; TRINDADE et al., 2007; MEGID et al., 2008;

MEDAGLIA *et al.*, 2009). Durante a década de 60, foram realizados os primeiros isolamentos deste vírus, obtidos através de um programa governamental de suporte a áreas rurais com registros de zoonoses virais desconhecidas (FONSECA *et al.*, 2002). O vírus SPAn 232 (SAV) e Cotia foram isolados e re-isolados de 5 camundongos sentinelas na estação de Cotia, estado de São Paulo. O vírus BeAn58058 (BAV) foi isolado de amostras de sangue de um roedor silvestre, do gênero *Oryzomys*, capturado na floresta de Utinga, na cidade de Belém, no estado do Pará. Análises filogenéticas posteriores revelaram que todos os vírus citados são amostras de VACV (LOPES *et al.*, 1965; FONSECA *et al.*, 1998; MARQUES *et al.*, 2001; FONSECA *et al.*, 2002).

Em 1993, um surto exantemático foi notificado no Centro de Bioterismo da UFMG (CEBIO/UFMG), acometendo camundongos suíços provenientes da Universidade de Campinas, São Paulo. Testes biológicos, feitos a partir das lesões dos 15 camundongos, revelaram a presença de um poxvírus, que posteriormente foi denominado Belo Horizonte virus (VBH) (DINIZ *et al.*, 1998). Apesar dos sinais clínicos indicarem que o vírus se tratava de um ECMV, caracterizações moleculares demonstraram que o VBH representava mais uma amostra de VACV circulante no Brasil (TRINDADE *et al.*, 2004).

Todavia, desde o final da década de 90, um grande número de amostras de VACV vêm sendo isoladas e caracterizadas durante surtos de vaccínia bovina (VB) ocorridos no país (FIGURA 8). As lesões observadas em bovinos durante esses surtos são típicas de poxvírus (FIGURA 9), e sua evolução clínica geralmente 25 segue os estágios de mácula, pápula, vesícula, pústula, úlcera e crosta. Tais lesões podem favorecer o estabelecimento de infecções secundárias, como mamites bacterianas no gado, causando uma queda de até 50% na produção de leite (LOBATO *et al.*, 2005). Os bezerros comumente se infectam durante a amamentação, apresentando lesões no focinho (FIGURA 9B), gengiva e mucosa 30 oral. A infecção de ordenhadores também é comum, levando a lesões nos dedos (FIGURA 9C-D), dores no corpo, linfoadenopatia e febre acima de 40°C

(TRINDADE *et al.*, 2003; NAGASSE-SUGAHARA *et al.*, 2004; LEITE *et al.*, 2005; SILVA-FERNANDES *et al.*, 2009).

Em 1999, na região sudoeste do estado do Rio de Janeiro, foi isolada a amostra de
5 VACV denominada Cantagalo virus (CTGV), na qual as primeiras análises
filogenéticas o aproximaram da amostra vacinal VACV-Intituto Oswaldo Cruz (IOC)
(DAMASO *et al.*, 2000). No mesmo ano, o Araçatuba virus (ARAV) foi isolado a
partir de um surto exantemático afetando bovinos e humanos no estado de São
Paulo. A caracterização molecular do ARAV também mostrou íntima relação
10 filogenética com amostras de VACV, sobretudo com a amostra isolada em
Cantagalo (TRINDADE *et al.*, 2003)

No período de 2001 a 2003, o Instituto Adolfo Lutz recebeu amostras de fluído
vesicular provenientes de surtos exantemáticos ocorridos nos estados de Minas
15 Gerais, Goiás e São Paulo. Espécimes oriundos dos dois últimos estados foram
diagnosticados como positivos para poxvírus, e a posterior caracterização
molecular também os agrupou filogeneticamente com os vírus CTGV e outras
amostras de VACV (NAGASSE-SUGAHARA *et al.*, 2004).

20 Ainda em 2003, na cidade de Passa Tempo, estado de Minas Gerais, foi isolada
mais uma amostra de VACV, Passatempo virus (PSTV). Análises moleculares
demonstraram que assim como as amostras ARAV e CTGV, o PSTV apresenta
uma mesma deleção de 18 nucleotídeos no gene que codifica a proteína
hemaglutinina (*ha*), indicando que estas amostras possivelmente compartilham
25 uma origem em comum (LEITE *et al.*, 2005). Outras amostras virais também foram
isoladas em surtos recentes, como o vírus Muriaé (MURV), isolado a partir de um
surto de VB na cidade de Muriaé, na Zona da Mata mineira, em 2000 (TRINDADE
et al., 2007).

5



10

FIGURA 8: Estados onde amostras brasileiras de VACV foram isoladas.

As amostras *Guarani P1 virus* (GP1V) e *Guarani P2 virus* (GP2V), isoladas a partir de diferentes propriedades rurais durante um único surto ocorrido em 2001, 15 também na Zona da Mata mineira, suscitaram uma interessante questão acerca da origem dos VACV (TRINDADE *et al.*, 2006). A heterogeneidade genética entre duas amostras isoladas de um mesmo surto indicaria que os VACV circulantes no país provavelmente teriam mais de uma origem, e não apenas a vacinal, como proposto por DAMASO e colaboradores (2000). TRINDADE (2007) e DRUMOND 20 (2008) demonstraram, através de análises das regiões conservadas e variáveis do genoma de diversas amostras de VACV, que os VACV brasileiros até então isolados podem ser segregados em dois grandes grupos filogenéticos. GP1V e GP2V apresentaram maior similaridade filogenética com outras amostras de VACV do que entre si. Tal variabilidade genética é refletida diretamente em certas 25 características fenotípicas, como o tamanho de placa em monocamada celular (dados não publicados) e a virulência observada em camundongos Balb/c (FERREIRA *et al.*, 2008).

30

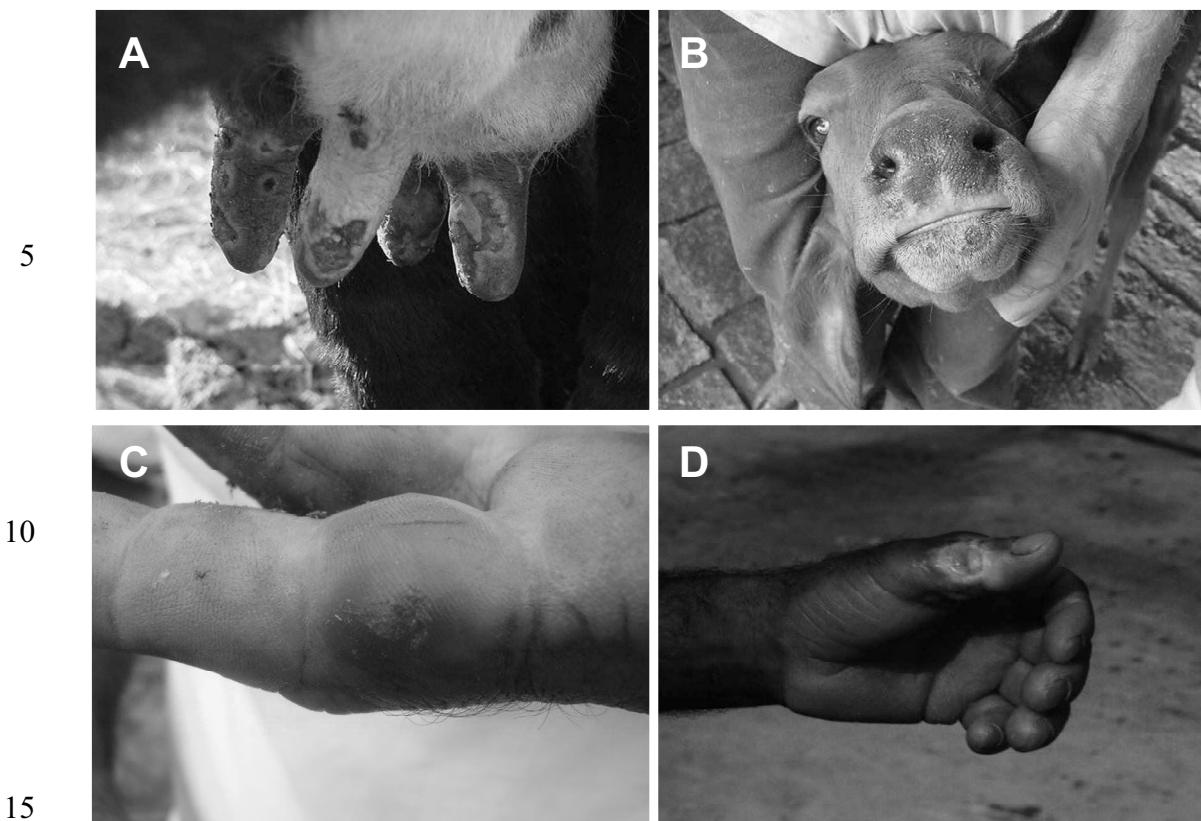


FIGURA 9: Lesões causadas por amostras de VACV: (A) Lesões ulcerativas em tetas de vacas, e (B) no focinho de um bezerro. (C) e (D) lesões nas mãos de ordenhadores. Fonte: **Madureira (2009)** – modificado.

Novos surtos exantemáticos causados por VACV, afetando bovinos e humanos, foram descritos nos Estados do Espírito Santo (DONATELE *et al.*, 2007), Pernambuco (DAMASO *et al.*, 2008), Rondônia (S. de Saúde de Rondonia, 2009), Maranhão (ASSIS *et al.*, 2009), Tocantins (MEDAGLIA *et al.*, 2009), Minas Gerais (KROON *et al.*, dados não publicados), Rio de Janeiro (SILVA-FERNANDES *et al.*, 2009) e São Paulo (MEGID *et al.*, 2008). Em janeiro de 2010, BRUM e colaboradores descreveram um surto exantemático causado por um OPV acometendo cavalos crioulos em um haras localizado em Pelotas, RS. Estudos moleculares adicionais, realizados em parceria com o Laboratório de Vírus/UFMG, demonstraram que este isolado também se tratava de uma amostra de VACV, a primeira isolada de um cavalo no Brasil (CAMPOS, 2010). Desta forma, com as recentes notificações de surtos de exantemáticos causados por VACV, é possível afirmar que o vírus está amplamente distribuído no território nacional, abrangendo

todas as regiões do país (FIGURA 8). Em 2010, MOTA e colaboradores descreveram uma alta prevalência de indivíduos OPV-soropositivos em uma área rural no Acre, região livre de notificações de vacinação bovina. O estudo demonstrou que a soropositividade anti-OPV nesta área não tinha relação direta com sexo ou 5 ocupação profissional, sugerindo um mecanismo de exposição ao vírus relacionado com atividades de caça e extrativismo nas florestas adjacentes.

Notificações sobre pessoas e animais com os sinais e sintomas característicos da VB foram feitas em várias cidades do estado de Minas Gerais durante os últimos 9 10 anos. O Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA), juntamente com a Escola de Veterinária da UFMG, a Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) e o Laboratório de Vírus da UFMG têm feito um levantamento das propriedades rurais da região e vêm alertando médicos e profissionais da saúde sobre as características e procedimentos clínicos da doença. Baseado em resultados de testes de 15 soroneutralização e diagnóstico viral pela PCR foram confirmados vários outros surtos de VB causados por amostras de VACV em diversas propriedades rurais mineiras (dados não publicados).

O estado de Minas Gerais é o maior produtor de leite do Brasil, com um rebanho 20 de mais de 3,26 milhões de vacas leiteiras. Cerca de 90% do rebanho está localizado em áreas sob o risco de vacinação bovina, e grande parte das amostras de VACV isoladas durante os surtos são derivadas desse estado. Foi demonstrado que amostras de leite coletadas de animais acometidos pela doença podem apresentar DNA e partículas infecciosas de VACV, todavia, o risco associado ao 25 consumo de leite contaminado com este vírus ainda não é desconhecido (ABRAHÃO *et al.*, 2009). Além dos aspectos econômicos envolvidos na questão, a VB é uma zoonose emergente que requer atenção dos órgãos de Saúde Pública (LOBATO *et al.*, 2005). Apesar deste grande impacto causado pela VB, não existem vacinas disponíveis contra a doença. Além disso, existem poucas 30 informações sobre os reservatórios naturais do vírus, e o modo pelo qual o VACV infecta o gado a partir da vida selvagem ainda é desconhecido.

1.4. Espectro de hospedeiros de OPV

Com exceção do VARV, que apresenta o ser humano como seu único hospedeiro conhecido, existe uma grande incógnita sobre o real espectro de hospedeiros dos demais vírus gênero OPV. Seu extenso genoma permite a codificação de um poderoso arsenal de imunomodulação, o que lhes confere uma grande versatilidade bioquímica, aumentando o espectro de tipos celulares permissivos (MOSS, 2001; HUGHES e FRIEDMAN, 2005). Tal característica usualmente se reflete em uma variada gama de hospedeiros, permitindo a infecção de vertebrados filogeneticamente distantes (McFADDEN, 2005).

Existem poucas informações sobre os hospedeiros naturais de VACV. Todavia, de forma comparativa, evidências apontam que CPXV pode estabelecer infecções persistentes ou agudas em alguns roedores silvestres, como *Apodemus sylvaticus*, *Clethrionomys glareolus* e *Microtus agrestis*, e em roedores urbanos, como *Mus musculus*, *Rattus novergicus* e *Rattus rattus* (MAIOBORODA, 1982; BENNETT et al., 1996; LAAKONENN et al., 2006). A sazonalidade climática européia exerce uma clara influência nos níveis populacionais dos roedores, o que afeta também a dinâmica infectiva viral (BENNETT et al., 1996; LAAKONENN et al., 2006).

Apesar das amostras SAV e Cotia virus terem sido isoladas a partir de camundongos sentinelas, e o VBH a partir de camundongos suíços, BAV constitui a única amostra de VACV efetivamente isolada de um roedor silvestre (FONSECA et al., 1998). Este roedor foi caracterizado como uma espécie do gênero *Oryzomys*, cuja distribuição é ampla no Brasil, incluindo os estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo (PEREIRA, 2007). O gênero agrupa outras 36 espécies, e apresenta os mais variados habitats: desde os ecossistemas dominados por savanas (Cerrado, Caatinga) até áreas de floresta ombrófila densa (Floresta Amazônica, Mata Atlântica) ou mista (Mata de Araucária), incluindo as regiões de interface entre diferentes padrões fitoecológicos (SOUZA, 2006; PEREIRA, 2007). Todavia, esses roedores podem eventualmente ter acesso a áreas peridomiciliares,

especialmente com o avanço das fronteiras agrícolas sobre regiões de borda de mata (HOMEM *et al.*, 2001; SOARES-FILHO *et al.*, 2006).

- Várias espécies de roedores são candidatas em potencial a reservatórios naturais do VACV. Além do gênero *Oryzomys*, de circulação peridomiciliar, espécies do gênero *Mus musculus*, *Rattus rattus* e *Rattus norvegicus* devem ser consideradas, sobretudo porque são reservatórios de CPXV (MAIOBORODA, 1982; BENNETT *et al.*, 1996; LAAKONENN *et al.*, 2006). Esses roedores apresentam distribuição cosmopolita, possuem hábitos peridomiciliares e representam uma fonte constante para a disseminação de outras zoonoses virais. Arenaviroses e hantaviroses, por exemplo, podem ser transmitidas através da inalação de aerossóis oriundos de excretas de *Oryzomys ssp.* e outras espécies de roedores infectados, causando febres hemorrágicas e meningites (SOUZA, 2006).
- Outro importante grupo de mamíferos se destaca como possíveis hospedeiros ou reservatórios naturais de VACV: os primatas não humanos. Durante os últimos anos da campanha da OMS para a erradicação da varíola, mais precisamente entre as décadas de 70 e 80 do século passado, foi promovido um grande estudo de campo em florestas da Ásia e África, envolvendo centros de pesquisas norte-americanos e europeus, que teve como objetivo a busca por eventuais reservatórios naturais do VARV (MARENKOVA *et al.*, 1972). Existia ainda naquela época o receio de que o VARV fosse uma zoonose, e de que a qualquer momento este vírus poderia escapar da natureza e causar novos surtos em humanos. Desta forma, uma grande coleção de animais silvestres foi coletada, incluindo roedores, primatas, marsupiais, pequenos felídeos, dentre outros (MARENKOVA *et al.*, 1972; ARITA e HENDERSON, 1976; revisado por FENNER *et al.*, 1988). Os métodos de diagnóstico viral se baseavam em ensaios de soroneutralização, que revelavam a existência de anticorpos neutralizantes anti-OPV; e inoculação em membrana corioalantóide (MCA) de ovos de galinha embrionados, na qual era possível diferenciar se o OPV isolado previamente em cultivo celular se tratava de MPXV (que produz pequenas placas hemorrágicas e opacas), VARV (que produz placas esbranquiçadas e pequenas), VACV (variável

no tamanho, mas usualmente produz grandes placas esbranquiçadas) ou CPXV (induz a formação de grandes placas hemorrágicas) (DAMON *et al.*, 2007). A grande maioria dos isolados produziram placas pequenas e hemorrágicas em MCA, seguindo o padrão de MPXV. Todavia, em alguns casos, algumas amostras 5 de OPV isoladas de chimpanzés e outras espécies de macacos sintomáticos e assintomáticos geraram placas pequenas e esbranquiçadas, seguindo o padrão de VARV ou VACV (MARENKOVA *et al.*, 1972, FENNER *et al.*, 1988).

O fato descrito gerou grande preocupação na comunidade científica, episódio que 10 ficou conhecido como “The Whitepox Problem” (revisado por FENNER *et al.*, 1988). Como estes isolados representavam apenas uma pequena parte das inúmeras amostras de OPV provenientes de macacos silvestres, MARENKOVA (1972) propôs que as placas brancas eram na verdade variantes de MPXV, que após 15 algumas mutações haviam perdido a capacidade de gerar placas do tipo hemorrágica. Entretanto, embora estudos posteriores tenham demonstrado que algumas dessas amostras isoladas de macacos se tratavam de contaminação laboratorial com amostras de VACV ou VARV (ESPOSITO *et al.*, 1985), o agente etiológico envolvido em alguns destes isolamentos permaneceu indefinido 20 (FENNER *et al.*, 1988).

Outros relatos de infecção de primatas por OPV foram feitos nos últimos anos. Um grande surto de CPXV foi descrito em 2006, acometendo diferentes espécies de macacos do Novo Mundo, mantidos em cativeiro em um centro de primatologia na Alemanha (MÄTZ-RENSING *et al.*, 2006). Em um outro estudo, GOLDBERG e 25 colaboradores (2008) descreveram que uma população de colobos vermelhos de Pennant (*Procolobus pennanti*), primatas habitantes do Parque Nacional de Kibale, oeste de Uganda, apresentavam evidências sorológicas de infecção por um OPV não-caracterizado, distinto de MPXV.

30 Diversas espécies de macacos, roedores, felinos e marsupiais são usualmente avistadas em áreas adjacentes a propriedades rurais brasileiras, incluindo àquelas já acometidas por surtos de VB. Todavia, não existem estudos sobre a

soroprevalência de OPV em espécies brasileiras de primatas não-humanos. A relação entre esses animais, os roedores-hospedeiros de VACV (como *Oryzomys*) e os surtos de VB ainda não foi investigada.

5 1.5. Vias de infecção e patogênese dos poxvírus

A infecção por poxvírus está associada a diversos sinais clínicos, variando desde lesões pustulares localizadas e auto-limitantes, a doenças sistêmicas generalizadas. Uma única espécie da família pode estar associada a diferentes 10 níveis de patogenicidade, dependendo da virulência da amostra, da via de infecção viral e do tipo de hospedeiro e seu estado imunológico (*revisado por FENNER et al., 1989*).

O trato respiratório é a via de infecção que ocorre de forma mais freqüente entre os 15 OPV, e constitui a provável via de entrada de *Camelpox virus*, VARV e MPXV. As infecções causadas por VACV e CPXV podem ocorrer através de microabrasões na pele e, como foi mencionado, estão associadas com lesões ulcerativas nas tetas e úberes do gado, e nas mãos de ordenhadores. A infecção por ECMV em camundongos também está associada com microabrasões na pele, dando origem 20 ao sítio primário de infecção (*revisado por FENNER et al., 1989*).

O trato gastrointestinal representa outra via natural de infecção conhecida para os OPV e ocorre usualmente, através de lesões na mucosa oral. Todavia, a infecção das células epiteliais do intestino delgado pode ocorrer, dependente de altos títulos 25 virais. Muitos roedores se alimentam das carcaças de animais mortos da mesma espécie, e tal comportamento pode favorecer a disseminação viral, como foi sugerido para ECMV (*revisado por FENNER et al., 1989*). A via oral é a maior fonte de infecção por CPXV em gatos domésticos e de felinos habitantes de zoológicos, através da predação de roedores contaminados (MAREKNIKOVA, *et al.*, 1977; 30 CORAS, 2005). Adicionalmente, a transmissão de MPXV entre populações de esquilos, e entre esquilos e macacos, pode ocorrer quando sementes de palmeiras

são contaminadas por um animal infectado e o restante do alimento é consumido por outro (*revisado por FENNER et al., 1989*). Em geral, as infecções causadas pelos OPV podem estar associadas a mais de uma via de transmissão, e outras vias, como a congênita, foram descritas, mas com importância epidemiológica 5 pouco significativa (*revisado por FENNER et al., 1989; BENNING e HASSETT, 2004*).

FENNER e colaboradores (1948) em um experimento clássico, utilizaram ECMV para propor um modelo de patogênese viral *in vivo*. Segundo tais estudos, as 10 partículas virais se multiplicam inicialmente em um sítio primário de infecção e em seguida, atingem a corrente sanguínea, causando viremia primária. A disseminação do vírus no organismo ocorre tanto em associação com células sanguíneas, quanto livres no plasma. Órgãos muito vascularizados, como fígado e baço, são então infectados, assim como os linfonodos regionais. Após alguns dias, 15 ocorre a viremia secundária, quando as partículas virais migram para a pele, causando lesões ulcerativas generalizadas. Neste estágio, os tecidos pulmonar, hepático e esplênico podem apresentar necrose avançada, causando falência de órgãos (FENNER et al., 1948; revisado por ESTEBAN e BULLER, 2005).

20 1.6. Vias de eliminação

A circulação e manutenção de partículas infecciosas na natureza representam 25 alguns dos desafios impostos às progêniés virais. Estratégias de eliminação, resistência ambiental e disseminação foram selecionadas e modeladas ao longo da evolução, e são fundamentais na logística infectiva (MAIBORODA, 1982). Dados referentes às vias de eliminação dos OPV ainda são escassos. Todavia, foi demonstrado que durante a infecção por VARV as partículas virais são excretadas 30 por fluidos orofaríngeos, secreções da conjuntiva e através da urina dos pacientes, ocorrendo um decréscimo na concentração de vírus eliminados durante a fase de covalescência (SARKAR, 1973; revisado por BREMAN e HENDERSON, 2002). Infecções causadas por pequenas doses de ECMV não apresentam os sinais 35 clínicos característicos, mas partículas virais podem ser detectadas em fezes, urina

e em lesões próximas ao ânus, durante algumas semanas após a infecção (revisado por FENNER *et al.*, 1989).

Em um outro estudo sobre vias de eliminação, envolvendo *Ratpox virus*, uma variante biológica de CPXV, MAIBORODA (1982) observou que o roedor *Rattus novergicus* é altamente suscetível ao vírus, com alta taxa de morbidade e mortalidade. No entanto, os animais sobrevidentes, eliminavam o vírus nas fezes e urina, por um período superior a 1 mês após a infecção, o que pode ser comprovado através da observação de lesões hemorrágicas em membranas corioalantóides, após a inoculação do material biológico em ovos embrionados de galinha. Altos títulos virais foram observados, sobretudo no reto dos animais (10^9 UFP), indicando que esta porção do intestino representa uma considerável fonte de disseminação de partículas virais (MAIBORODA, 1982). GOFF e colaboradores (2007) demonstraram, através de titulações e ensaios de imunofluorescência, intensa multiplicação do CPXV no intestino de camundongos Balb/c, assim como nos linfonodos e tecido adiposo mesentéricos.

Estudos realizados no Laboratório de Vírus/UFMG demonstraram que camundongos Balb/c inoculados com amostras brasileiras de VACV eliminam partículas e DNA viral nas fezes por pelo menos 30 dias pós-infecção (d.p.i.), e na urina, restrito ao período agudo da doença (7º-9ºd.p.i.) (ABRAHÃO, 2008). Foi demonstrado também, que camundongos sentinelas expostos à excretas contaminadas com VACV se infectam, e passam a eliminar partículas e DNA viral nas fezes (FERREIRA *et al.*, 2008). Esse estudo corroborou com dados prévios obtidos para outros OPV, que indicam que as vias de eliminação representam uma fonte de transmissão em potencial, sobretudo porque partículas infecciosas já foram detectadas em fezes, urina e fluidos orofaríngeos, conforme descrito para VARV, ECMV (revisado por FENNER *et al.*, 1989; revisado por BREMAN e HENDERSON, 2002) e VACV (FERREIRA *et al.*, 2008; ABRAHÃO, 2008).

30

1.7. Estabilidade das partículas virais sob condições ambientais

Desde a década de 50, inúmeros estudos vêm demonstrando que os poxvírus apresentam uma resistência relativamente alta a condições ambientais (MACALLUM e McDONALD, 1957; HERRLICH *et al.*, 1967; JUST e FINK, 1979; HARPER, 1961; MAHNEL, 1977; FROSTEGARD *et al.*, 1999; LEWIS *et al.*, 2000; ESSBAUER *et al.*, 2007; ABRAHÃO *et al.*, 2009). A morfologia complexa da partícula, incluindo um conjunto expressivo de proteínas estruturais, os corpúsculos laterais e a arquitetura do envelope, poderia exercer influência direta em sua estabilidade (ESSBAUER *et al.*, 2007). Variáveis físico-químicas modulam tal característica e, de uma forma geral, os poxvírus são mais estáveis quando expostos a baixa umidade relativa do ar e temperaturas reduzidas (HARPER, 1961; ESSBAUER *et al.*, 2007). Alguns autores atribuem a baixa tenacidade epidemiológica do MPXV ao clima africano, uma vez que o continente apresenta altas temperaturas e elevada umidade relativa do ar (ESSBAUER *et al.*, 2007). A sazonalidade da VB no Brasil também corrobora com os dados acima, pois os surtos ocorrem preponderantemente entre os meses de junho e outubro, época de frio e de baixa umidade.

McCALLUM e McDONALD (1957) demonstraram que VARV é estável em crostas de pacientes por um período que varia de 2 a 4 meses, dependendo da umidade que o material foi acondicionado. Assim como ocorre para outros OPV, a viabilidade do VARV também é dependente da temperatura. A 35°C, partículas virais presentes em crostas permanecem viáveis por apenas 3 semanas; a 26°C, o tempo sobe para 13 semanas; e por fim, a 4°C, é possível detectar partículas infecciosas de VARV por até 16 semanas (HUQ, 1976). HERRLICH e colaboradores (1976) isolaram partículas virais viáveis em swabs provenientes de pústulas e vesículas de pacientes com varíola 9 meses após a data da coleta. Este fato possui importante caráter epidemiológico, uma vez que material clínico de pacientes hospitalizados constituía a maior causa de novas epidemias de varíola no século passado (*revisado por ESSBAUER et al., 2007*). De forma similar, o ECMV é estável por um período de até 11 dias em gotas de sangue secas, quando ambientadas a 4°C (BHATT e JACOBY, 1987).

HARPER (1961) comprovou a estabilidade do VACV em aerossóis por aproximadamente 23 horas, sobretudo sob baixas temperaturas e umidades relativas, em ambiente não irradiado por luz UV. A resistência ambiental de VACV também foi demonstrada em amostras de água de chuva e de rios, e nestes casos, 5 outras variáveis também influenciaram na viabilidade das partículas, como a concentração iônica e o pH da solução (MAHNEL et al., 1977; ESSBAUER et al., 2007). Similarmente, VACV mostrou ser resistente em alimentos experimentalmente contaminados, como saladas, carnes, leite, queijo e pães (ESSBAUER et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2010). Todavia, apesar da elevada 10 estabilidade mencionada, o VACV é altamente susceptível aos raios ultra-violeta, e a exposição da partícula durante alguns segundos é suficiente para sua inativação (VON BRODOROTTI e MAHNEL, 1982). Desta forma, a partícula viral ao ser eliminada pelo hospedeiro no decorrer do quadro infectivo, provavelmente não permanecerá viável por um longo período na urina, uma vez que será exposto à 15 irradiação solar ou se associará com partículas do solo, o que reduz consideravelmente sua infectividade (IJZERMANN et al., 1997; FROSTERGARD et al., 1999; LEWIS et al., 2000; revisado por ESSBAUER et al., 2007). No entanto, ABRAHÃO e colaboradores (2009) demonstraram que amostras brasileiras de 20 VACV mantêm sua infectividade em fezes murinas por até 20 dias de exposição (d.d.e.) à temperatura ambiente, sendo possível detectar DNA viral por pelo menos 60 d.d.e.. Desta forma, a eliminação pela via fecal prolonga a viabilidade ambiental das partículas virais, sobretudo pela heterogeneidade química e a opacidade do espécime clínico.

25

1.8. Estratégias imunomodulatórias dos poxvírus

Imediatamente após invasão viral, mecanismos não-específicos e específicos (memória) envolvendo interferons (IFN), complemento, quimiocinas, citocinas, 30 células *Natural Killer* (NK), células T citotóxicas e anticorpos assumem importância na defesa do organismo do hospedeiro (WANG e tal, 2009). Deste modo para uma infecção viral eficiente, tendo em vista a imunidade inata e adquirida do

hospedeiro, é requerida uma capacidade de escapar, obstruir ou subverter elementos críticos que medeiam a resposta antiviral do hospedeiro (*revisado por* JOHNSTON e McFADDEN, 2003; CRAMPTOM *et al.*, 2010). Assim sendo, vírus com grandes genomas, como os poxvírus, carregam genes não essenciais para a sua multiplicação, mas que codificam várias proteínas imunomodulatórias, bloqueando ou amenizando a ação de citocinas e mecanismos do sistema imune inato (SMITH *et al.*, 1997, TURNER e MOYER, 2002, JOHNSTON e McFADDEN, 2003; CRAMPTOM *et al.*, 2010). Deste modo, os imunoduladores dos poxvírus são importantes fatores de virulência que contribuem显著mente para a manutenção de infecções virais (READING e SMITH, 2003, JOHNSTON e McFADDEN, 2003, BOOMKER *et al.*, 2005; FREBEL *et al.*, 2010).

As proteínas imunomodulatórias dos poxvírus podem ser divididas em três classes principais: proteínas de viromimetismo (virocinas e viroreceptores), proteínas de virocamuflagem e virotransdutores (*revisado por* ESPOSITO e FENNER, 2001). As virocinas são secretadas pelas células infectadas e são semelhantes às citocinas do hospedeiro (DÉNNES *et al.*, 2006; DAY *et al.*, 2008). Os viroreceptores que são receptores celulares alterados que perderam seus domínios transmembrana e consequentemente são secretados pelas células infectadas seqüestrando seus ligantes (DÉNNES *et al.*, 2006; DAY *et al.*, 2008). As proteínas de virocamuflagem subvertem as vias de apresentação de抗ígenos não-próprios das células infectadas fazendo com que estas células não sejam reconhecidas pelo sistema imune (JOHNSON e McFADDEN, 2003; JOHNSON e McFADDEN, 2004). E os virotransdutores que são proteínas intracelulares que interferem com as vias sinalizadoras ou efetoras (DÉNNES *et al.*, 2006; DAY *et al.*, 2008). A FIGURA 10 ilustra algumas proteínas imunomoduladoras codificadas pelos poxvírus (JOHNSTON e McFADDEN, 2003).

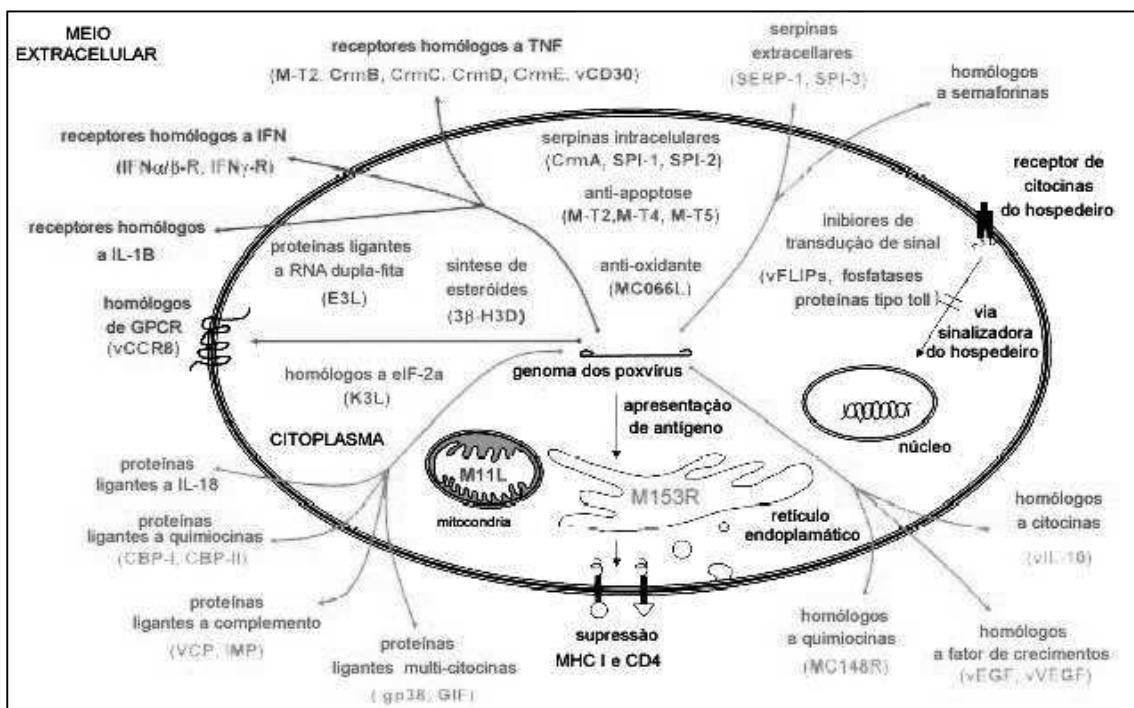


FIGURA 10: Representação esquemática de algumas proteínas imunomodulatórias codificadas por poxvírus. Proteínas virais que participam da virocamuflagem (laranja), virotransdução (verde) e viromimetismo (vioreceptores em vermelho e virocinas em azul) estão indicadas. Fonte: JOHNSTON e McFADDEN, 2003 -modificado.

1.9. Desenvolvimento de imunógenos contra *Orthopoxvirus*

1.9.1. Vacinas de vírus vivos

Embora durante na Campanha de Erradicação da Varíola da Organização Mundial de Saúde (OMS) tenham sido utilizadas inúmeras amostras de VACV naturalmente ou artificialmente atenuadas, a história da imunização contra a varíola remete à Antiguidade, quando era praticado na China um processo denominado insuflação (FENNER et al., 1988; revisado por TOLEDO, 2006). A prática da insuflação consistia na aspiração de material vesicular de lesões variólicas, conferindo proteção contra a doença. Alguns registros apontam que surgiu simultaneamente na região sul da Índia um processo muito semelhante à insuflação, denominado variolação (FENNER et al., 1989; revisado por TOLEDO, 2006). Este processo consistia na inoculação de material vesicular de lesões variólicas pelo método da escarificação, o que também conferia proteção contra a doença. Durante os

- séculos seguintes, tais práticas foram difundidas por vários países da Europa e Ásia, onde foram aperfeiçoadas, através da busca empírica por amostras cada vez menos virulentas de VARV. Todavia, tanto a insuflação quanto a variolação, apresentavam altos índices de mortalidade, mesmo utilizando material de lesões obtidos de pacientes acometidos pelas formas menos severas da doença (FENNER *et al.*, 1988; revisado por TOLEDO, 2006; JACOB *et al.*, 2009). Apesar disso, tais práticas serviram de base para os estudos clássicos desenvolvidos por Edward Jenner no XVIII.
- Na Era Moderna, a varíola ainda era a maior causa de óbitos na Europa, afetando principalmente crianças habitantes de grandes cidades. Entretanto, nas áreas rurais européias, outras doenças exantemáticas também eram observadas, afetando o homem e animais de criação, dentre elas a varíola bovina (FENNER *et al.*, 1988; JACOB *et al.*, 2009). Esta doença, causada pelo CPXV, agente desconhecido na época, causava lesões semelhantes às variólicas, todavia restritas aos tetos de vacas leiteiras. Os trabalhadores que ordenhavam os animais acometidos pela varíola bovina também desenvolviam lesões, normalmente localizadas e restritas às mãos. No final do século XVIII, o médico inglês Edward Jenner observou que o índice de ordenhadores acometidos pela varíola humana era curiosamente menor do que o observado para o restante da população européia. Jenner, como a maioria dos médicos da época, conhecia as antigas práticas de insuflação e variolação, e viu uma relação direta entre as lesões de varíola bovina em ordenhadores, e um possível mecanismo de proteção contra a varíola humana (revisado por TOLEDO, 2006). Baseado em tais observações, em 1876, Jenner inoculou em James Phipps, um garoto de 8 anos, com material pustular obtido de uma lesão de varíola bovina observada nas mãos de uma ordenhadora, Sarah Nelmes (FENNER *et al.*, 1988; GEDDES, 2006; JACOB *et al.*, 2009). Posteriormente Jenner comprovou que Phipps estava protegido contra a varíola. A publicação deste trabalho foi feita no ano de 1798, quando Jenner chamou o procedimento descrito de “vacinação”, do termo latim *vacca*, ou vaca. Durante os 80 anos seguintes, a vacinação era feita quase que exclusivamente de braço a braço, através da coleta de material pustular (FENNER *et al.*, 1988;

revisado por TOLEDO, 2006). Ocasionalmente, outros agentes eram confundidos com o CPXV e, inadvertidamente, utilizados como vacina, incluindo sífilis, VARV, varicela, sarampo e bactérias gram-positivas (revisado por TOLEDO, 2006). Em institutos vacinais, o vírus era mantido e multiplicado em bezerros. Após décadas de vacinação, o início do século XX marcou a emergência do VACV como amostra vacinal, vírus até então desconhecido, mas que estava sendo utilizado como vacina anti-variólica em alguns locais do mundo (FENNER *et al.*, 1988; GEDDES, 2006; JACOB *et al.*, 2009).

Como apresentava menor virulência que o CPXV, o VACV foi selecionado pela OMS como vírus vacinal da Campanha de Erradicação da Varíola. No Brasil, até 1968, 4 laboratórios produziam a vacina utilizando as amostras Paris, New York e Lister. Contudo, em 1971, outros dois laboratórios passaram também a usar a amostra Lister, e outros dois continuaram a usar a amostra New York (revisado por FENNER *et al.*, 1988). Essa vacina antivariólica consistiu em uma amostra liofilizada produzida a partir dessa linhagem semente, sendo este vírus denominado vírus Lister-Butantã (LST-BTT) (LANNA, 1980). Outra amostra vacinal utilizada no país foi a VACV-IOC, que foi produzida pelo Instituto Oswaldo Cruz, no Rio de Janeiro, durante a campanha da OMS, porém existem poucas informações a respeito deste vírus, exceto a sua suposta origem francesa (DAMASO *et al.*, 2000). Na Argentina, foi utilizada a amostra Malbran, derivada da amostra Lister. Em ocasiões de desabastecimento, o Brasil importava a amostra Malbran da Argentina. Desta forma, de quatro a cinco tipos de amostras vacinais foram utilizadas durante a campanha da OMS no Brasil (TRINDADE *et al.*, 2007).

A procura por uma redução da patogenicidade das amostras de VACV, por meio de atenuação através de passagens seriadas, resultou no surgimento de novas amostras vacinais: VACV River, VACV Ankara, VAVC LC 16m8, MVA, entre outros (revisado por BREMAN E HENDERSON, 2002; revisado por HENDERSON e MOSS, 1999; STITTELAAR e OSTERHAUS, 2001; revisado por ROSENTHAL *et al.*, 2001; JACOB *et al.*, 2009). Entretanto, mesmo utilizando uma amostra vacinal atenuada, a vacinação de indivíduos imunossuprimidos gerava, ocasionalmente,

complicações graves. Entre estes indivíduos, susceptíveis à ocorrência de efeitos adversos devido à vacinação, podem ser citados pacientes transplantados, portadores do vírus HIV, com leucemia, com linfoma, com desordens imunológicas de origem celular ou humoral, ou indivíduos em terapia com anti-metabólitos, 5 radiações e altas doses de corticosteróides (HENDERSON e MOSS, 1999; ROSENTHAL *et al.*, 2001; BARTLETT, 2003; PASTORET e VANDERPLASSCHEN, 2003; VORA *et al.*, 2008).

Assim, com a erradicação mundial da varíola, a vacinação utilizando o VACV foi 10 suspensa, uma vez que os riscos de efeitos adversos passaram a ser maiores que a própria possibilidade de infecção pelo VARV. Deste modo, a vacinação passou a ser recomendada apenas para militares e funcionários de laboratórios que manipulam diretamente culturas ou animais infectados com o VACV ou outro OPV zoonótico (FULGINITI *et al.*, 2003).

15

1.9.2. Vacinas de vírus recombinantes

A complexidade do genoma dos poxvírus permite a codificação de genes não essenciais para sua multiplicação. Desta forma, alguns poxvírus, como VACV, 20 *Fowlpox virus* e *Canarypox virus* vêm sendo utilizados como vetores modificados para expressão de genes exógenos, inseridos em *locus* gênicos não essenciais (MULLBACHER e LOBIGS, 2001; ROCHA *et al.*, 2004; DREXLER *et al.*, 2004; ARAVINDARAM *et al.*, 2008; CHIAN *et al.*, 2009; KREIJTZ *et al.*, 2009). Muitos desses vetores vêm sendo utilizados no desenvolvimento de vacinas polivalentes, 25 com a possibilidade de expressão de grandes quantidades das proteínas de interesse, uma vez que esses vírus recombinantes conservam a capacidade de infectar células do hospedeiro (RUPPRECHT *et al.*, 2001; MEEUSEN *et al.*, 2007). Poxvírus recombinantes vêm sendo utilizados para a expressão de proteínas imunizantes para *Herpesvirus*, hepatite B, vírus da raiva, HIV e *Dengue virus* 30 (ARAVINDARAM *et al.*, 2008; CHIAN *et al.*, 2009; KREIJTZ *et al.*, 2009; VAN *et al.*, 2009; BRIDGEMAN *et al.*, 2009). Apesar das vantagens mencionadas, as vacinas de vírus recombinantes , assim como as vacinas de vírus atenuados, podem sofrer

recombinação genética com outros vírus relacionados filogeneticamente (BAXBY *et al.*, 1986; PASTORET e VANDERPLASCHEN, 2003).

1.9.3. Vacinas de vírus inativados e o imunógeno BAV

5

Uma vez que a multiplicação do VACV pode ser exacerbada em pessoas imunossuprimidas, a administração de uma vacina, mesmo que atenuada pode resultar em diversas complicações secundárias (ROSENTHAL *et al.*, 2001). Deste modo, uma vacina utilizando VACV inativado se torna uma alternativa viável, não existindo a possibilidade de multiplicação do vírus no animal vacinado. Adicionalmente, devido à inativação viral, a possibilidade de recombinação desta amostra vacinal com outros poxvírus circulantes ou o estabelecimento e manutenção destes vírus na natureza torna-se improvável (TSUNG *et al.*, 1997).

10 15 Vários estudos envolvendo inativação do VACV e o mecanismo de proteção imunológica têm sido realizados (ROSENTHAL *et al.*, 2001; BELYAKOV *et al.*, 2003). Diversas metodologias para inativação viral tem sido desenvolvidas durante várias décadas, entre elas inativação por luz ultra-violeta (UV), calor, pressão e produtos químicos como formalina, hidroxilamina, β -propiolactona, 20 paraformaldeído, etilenimina binária e psoraleno (TURNER *et al.*, 1970; TURNER e SQUIRES, 1971; THORNTON, 1980; TSUNG *et al.*, 1996; HULSKOTTE *et al.*, 1997; BOUDET *et al.*, 2001). Porém, é importante ressaltar que algumas destas metodologias de inativação viral podem levar à desnaturação protéica, levando o animal vacinado a desenvolver anticorpos contra a forma desnaturada das 25 proteínas virais, o que pode resultar em uma resposta imunológica menos eficiente.

Em 2008, Ferreira descreveu a elaboração de uma vacina anti-OPV utilizando a amostra de VACV BeAn 58058 (BAV), em sua forma inativada, administrada sob a dose de 10^7 UFP para camundongos. A vacina se mostrou eficiente na proteção de 30 camundongos Balb/c imunizados e posteriormente desafiados pela via intranasal e por escarificação. Além disso, o imunógeno foi produzido em MCA de ovos embrionados, reduzindo os custos de produção e eliminando a possibilidade de

contaminação por príons. A inativação da amostra vacinal foi feita através de método físico, utilizando luz UV, ou químico, pela beta-propiolactona, sendo o segundo método mais viável, apesar de laborioso. Todavia, apesar de conferir proteção, os animais imunizados e desafiados pela via intranasal com a amostra 5 VACV-Western Reserve (VACV-WR) ainda apresentaram certa morbidade, sendo observada pilo-ereção acentuada, arqueamento de dorso e perda de peso durante os primeiros dias pós-desafio. Apesar disso, o imunógeno BAV se mostrou promissor como uma possível vacina anti-OPV, que poderia ser utilizada na prevenção da VB no Brasil.

10

1.9.4. Vacinas de DNA e proteínas contra OPV: glicoproteínas mais promissoras

Vacinas de DNA e proteínas contra os poxvírus vêm sendo descritas como 15 alternativas às vacinas virais vivas e inativadas (HOOPER *et al.*, 2000; HOOPER *et al.*; 2003; PULFORD *et al.*, 2004; DAVIES *et al.*, 2005). Os alvos mais freqüentes são proteínas presentes na superfície das formas infectivas dos poxvírus, IMV e EEV e CEV. Dentre as vacinas de DNA que expressam um único gene de VACV, PULFORD e colaboradores (2004) obtiveram os melhores resultados, com 20 proteção de 100% em camundongos Balb/c desafiados com uma LD₅₀ da amostra VACV-IHD. Foi analisada nesse estudo a proteção conferida por 11 proteínas virais de superfície de VACV, cujos genes foram inseridos no vetor pTARGET (Promega, E.U.A.), e a que obteve os melhores resultados foi a glicoproteína B5R (vacina pTB5R). A glicoproteína B5R, presente nos EEV, está relacionada com a inibição 25 do complemento. Apesar de conferir 100% de sobrevivência frente ao desafio com VACV, a vacina de DNA contendo o gene B5R não inibiu completamente a morbidade nos camundongos desafiados com VACV-IHD. Além disso, são requeridas de 3 a 4 doses da vacina, administradas por via intramuscular de 3 em 3 semanas, para que os menores índices de morbidade sejam atingidos. Não 30 foram detectados anticorpos neutralizantes nos camundongos vacinados com pTB5R, o que sugere que a resposta celular também seja essencial para proteção contra infecções por OPV.

Dentre as vacinas recombinantes protéicas anti-VACV, DAVIES e colaboradores (2005) demonstraram que a administração da glicoproteína de VACV H3L, presente nos IMVs, promove 100% de proteção em camundongos desafiados com 5 1LD50 de VACV-WR (CHERTOV *et al.*, 1991). Foi demonstrado que a deleção do gene H3L não causa perda de infectividade de VACV, mas reduz significativamente o tamanho das placas de lise e os títulos virais, quando comparados com VACV selvagem (FONSECA *et al.*, 2000). Ao contrário da vacina de DNA-B5R, H3L purificada gera uma resposta de anticorpos neutralizantes significativa em 10 humanos. Outras vacinas protéicas conferiram proteção contra infecção de VACV, mas nenhuma delas alcançou o patamar de proteção conferido por H3L (DAVIES *et al.*, 2005).

Curiosamente, a indução de resposta imune 100% protetora somente foi obtida 15 quando B5R foi utilizada sob a forma de vacina de DNA, e no caso de H3L, sob a forma de imunógeno protéico (PULFORD *et al.*, 2004; DAVIES *et al.*, 2005). As formulações vacinais H3L-DNA e B5R-protéica apresentaram resultados intermediários, no que se refere à proteção. A via de administração do imunógeno, 20 a sua dose, e a maneira que o desafio é feito parecem interferir diretamente na indicação da proteína mais imunogênica e protetora, o que vem gerando resultados divergentes na literatura (PULFORD *et al.*, 2004; DAVIES *et al.*, 2005). Entretanto, de uma forma geral, mesmo aqueles que foram considerados os melhores imunógenos, de DNA ou proteína, não reduziram completamente a morbidade dos modelos desafiados, sobretudo nos 10 primeiros dias pós-infecção (PULFORD *et* 25 *al.*, 2004; DAVIES *et al.*, 2005).

II. JUSTIFICATIVA

Desde o início da formação das sociedades humanas cooperativas, há aproximadamente 6000 anos, a história vem sendo profundamente marcada pelos 5 poxvírus. A determinação de rotas migratórias, a intensificação das relações humanas e a expansão demográfica, proporcionada pelo advento da agricultura e da pecuária, representaram fatores altamente favoráveis para o estabelecimento e disseminação da varíola no planeta. Surtos recorrentes da doença foram registrados durante toda a Idade Média, persistindo até o século XX, período em 10 que o VARV foi a causa de cerca de 500.000 mortes anuais. Apesar da erradicação da doença no final da década de 70, é crescente a preocupação de instituições de Saúde e Segurança Pública acerca da utilização do VARV como arma biológica, sobretudo pela possibilidade da existência de estoques clandestinos do vírus. Adicionalmente, a suspensão do programa mundial de 15 vacinação, nos anos 80, acarretou a emergência de gerações não imunizadas contra os OPV.

Outros membros da família *Poxviridae* circulam ativamente na natureza e são responsáveis por surtos de interesse médico e veterinário em todo o mundo. 20 Diferentemente do VARV, um patógeno estritamente humano, os outros poxvírus apresentam um amplo espectro de hospedeiros. Dentre os representantes do gênero OPV, do qual o VARV faz parte, outras três espécies são capazes de infectar humanos: MPXV, CPXV e VACV. O MPXV causa um quadro clínico semelhante ao da varíola humana e, apesar de ser endêmico do continente 25 africano, foi a causa de um grande surto nos Estados Unidos em 2003, acometendo 81 pessoas. O episódio foi associado à importação de roedores africanos, alguns dos prováveis reservatórios naturais da espécie. Outro OPV causador de infecções em seres humanos de extrema relevância é o CPXV. Esta espécie é endêmica da Europa e também está associada a infecções de animais 30 domésticos e habitantes de zoológicos. Em hospedeiros imunodeficientes CPXV pode causar quadro clínico grave e generalizado.

No Brasil, um número crescente de amostras de VACV vem sendo isoladas durante surtos de vacúnia bovina, sobretudo no estado de Minas Gerais, o maior produtor de leite do país. A doença causa lesões ulcerativas no gado leiteiro e em ordenhadores, podendo também ocasionar uma série de outros sintomas e sinais 5 clínicos. Durante o episódio da doença, o gado apresenta queda na produção de leite, e o ordenhador normalmente é afastado do serviço por alguns dias, acarretando grandes perdas econômicas. A vacúnia bovina também constitui um problema social, pois as pequenas propriedades são as mais atingidas pela doença, sobretudo as que praticam a ordenha de subsistência em que o leite 10 representa um dos pilares da alimentação familiar. Apesar de sua relevância econômica e social, a vacúnia bovina é muitas vezes negligenciada, e os surtos nem sempre são relatados. Os hospedeiros naturais do VACV são pouco conhecidos, e a escassez de dados dificulta a proposição de modelos sólidos da biologia do VACV, como a manutenção e circulação desses vírus na natureza.

15

A eliminação de partículas virais durante um processo infeccioso constitui uma fonte em potencial de transmissão entre hospedeiros. As vias de eliminação dos poxvírus já foram bem caracterizadas para o VARV, CPXV e ECMV, sendo fezes, urina, fluídos orofaríngeos e secreções da conjuntiva algumas das possíveis vias 20 relacionadas. Em animais infectados com ECMV e CPXV, partículas virais podem ser excretadas nas fezes por até 35 dias. O Grupo de Poxvírologia do Laboratório de Vírus ICB/UFMG demonstrou que amostras brasileiras de VACV são eliminadas nas fezes e urina de camundongos Balb/c, exercendo possivelmente um importante papel na transmissão horizontal desses vírus. Nesse mesmo estudo, foi 25 observado que DNA e partículas de VACV se mantêm conservadas em fezes murinas. No entanto, não foi demonstrado se o modelo de eliminação e transmissão de VACV se aplica a roedores silvestres. Caso esse modelo de eliminação e transmissão seja observado também em outros roedores, o monitoramento epidemiológico da vacúnia bovina poderia ser feito através da 30 análise das fezes de roedores silvestres e peridomiciliares, habitantes de áreas adjacentes a propriedades acometidas pela doença.

Vacinas contra OPV vêm sendo desenvolvidas, sobretudo pela re-emergência de vírus zoonóticos e pela possibilidade de utilização do VARV em atos de bioterrorismo. Vacinas de vírus inativados, de DNA e de proteínas são alternativas válidas às vacinas de vírus vivos atenuados, que historicamente causam uma série 5 de efeitos colaterais. Com o aumento do número de pessoas imunossuprimidas, a utilização de vacinas atenuadas é cada vez menos recomendada pela OMS. Estudos recentes, utilizando imunógeno inativado (BAV), vacinas de DNA e de 10 proteína, obtiveram, isoladamente, sucesso na imunização de roedores contra VACV, com proteção de 100% dos animais desafiados com VACV. Todavia, em todos os casos morbidade foi observada, em contraste com as amostras vacinais controle. A associação do imunógeno BAV inativado com vacinas de DNA, em um sistema de *prime boost* heterólogo ou homólogo, poderia conferir proteção efetiva 15 contra infecções por OPV. Foi demonstrado que *prime boost* heterólogos resultam em um aumento expressivo de células T CD8 de memória antígeno-específicas, muito maior do que quando comparado com vacinas administradas em dose única 20 ou por *boost* homólogos. Assim, a combinação do imunógeno BAV inativado com vacinas de DNA poderia requerer menor número de *boosts*, com doses menores de imunógeno, mantendo entretanto, a proteção de 100% dos camundongos.

25 Dessa forma, considerando todos os impactos causados pela circulação dos OPV no mundo e a relevância da vacínia bovina no Brasil, o estabelecimento de métodos de controle e prevenção de poxvíroses são importantes no âmbito econômico e social. Assim, o presente trabalho possui como objetivos o estudo de possíveis hospedeiros naturais de VACV no Brasil, e a padronização de um sistema de *prime-boost* para imunização contra VACV, com futura aplicação destes conhecimentos no controle e prevenção da vaccínia bovina no país.

III. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

- 5 • Identificar alguns dos hospedeiros naturais do *Vaccinia virus* e padronizar um sistema dose-reforço para a imunização contra este vírus.

3.2. Objetivos Específicos

10

1- Verificar a soroprevalência OPV em roedores capturados em áreas próximas a propriedades acometidas por vaccínia bovina;

15

2- Isolar amostras de VACV a partir de órgãos de roedores capturados em áreas próximas a propriedades acometidas pela vaccínia bovina, e compará-las com amostras virais isoladas de bovinos e humanos afetados pela doença;

20

3- Avaliar se fezes de roedores coletadas em propriedades acometidas pela vaccínia bovina contêm DNA ou partículas infecciosas de VACV;

4- Verificar a soropositividade para OPV em uma coleção de soros de animais silvestres amazônicos;

25

5- Verificar a soropositividade para OPV em uma coleção de soros de animais mantidos em cativeiro na Fundação Zoobotânica de Belo Horizonte;

30

6- Avaliar a proteção conferida pelo imunógeno inativado BAV (FERREIRA, 2008) associado com a vacina B5R-DNA ou H3L-DNA (PULFORD *et al.* 2004) em camundongos Balb/c desafiados com VACV-WR;

7- Avaliar a produção de anticorpos neutralizantes anti-IMV nos camundongos vacinados conforme descrito em 6;

5 8- Avaliar a produção de anticorpos neutralizantes anti-EEV nos camundongos vacinados conforme descrito em 6;

9- Avaliar a morbidade em camundongos vacinados e desafiados;

10 10- Comparar a proteção conferida pelos sistemas de vacinação, com a proteção conferida pela vacina Lister-Butantã;

11- Comparar os métodos da inativação térmica e por β -propiolactona do imunógeno BAV;

15 12- Clonar e expressar as proteínas virais H3L e B5R em sistema procarioto, e utilizar estas proteínas em testes sorológicos.

20

25

30

IV. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Sistemas celulares

4.1.1. Células vero

5

As células Vero e BSC-40, linhagens contínuas derivadas de células epiteliais de rim de macaco verde africano (*Cercopthecus aeothiops*) foram obtidas da “American Type Culture Collection” (ATCC), (Maryland, E.U.A.). O cultivo celular foi feito em garrafas redondas contendo 50 mL de meio mínimo essencial de Eagle (MEM) (GibcoTM, USA) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Brasil), glutamina, gentamicina (50 µg/mL), penicilina potássica (200 U/mL) e anfotericina B (2,5 µg/mL), sob incubação a 37°C, em atmosfera com 5% de CO₂ em estufa de tambor rolante. Os subcultivos foram feitos três vezes por semana sendo a monocamada celular lavada com solução tampão fosfato salina (PBS) (NaCl 137mM; kCl₂ 7mM; Na₂HPO₄ 1,4mM; pH 7,2) e tratada com solução de tripsina contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (NaCl 136mM; kCl 5mM; glicose 55mM; NaHCO₃ 69mM; 0,5g p/v tripsina 1:250 [Difco]; EDTA 0,5mM; 1% vermelho de fenol). Estas células foram utilizadas para multiplicação, titulação viral, ensaios de soroneutralização ou imunofluorescência, quando apresentaram 85-100% de confluência da monocamada.

4.1.2. Fibroblastos embrionários de galinha (CEF)

Para a produção de fibroblastos embrionários de galinha (CEF), ovos embrionados com 10 dias foram higienizados com solução de iodo glicerinado 2%. Em capela de fluxo laminar, após a retirada da parte superior da casca e da membrana subjacente, os embriões foram removidos cuidadosamente para que o vitelo não se rompesse, e colocados em uma placa de Petri contendo MEM autoclavado sem SFB. A cabeça, os membros superiores, inferiores e os órgãos internos dos embriões, foram removidos com o auxílio de tesoura e pinça cirúrgicas estéreis. Em seguida, as carcaças remanescentes foram transferidas e mantidas em uma segunda placa de Petri contendo MEM 0% de SFB, para a remoção do excesso de

sangue. As carcaças foram então trituradas com o auxilio de uma seringa de 10 mL (sem agulha) e incubadas em um erlemeyer com cerca de 5 mL de solução de tripsina/EDTA por carcaça, sob agitação constante, a 37°C durante 15 minutos. A ação da tripsina foi interrompida com a adição de igual volume de meio MEM com 5 10% de SFB. A suspensão foi posteriormente filtrada em um béquer com gaze (remoção de fragmentos sólidos das carcaças) e então centrifugada por 10 minutos a 1750g. O sobrenadante foi descartado e o sedimento suspenso em MEM 10% de SFB. A suspensão foi subdividida em garrafas de 150 cm² na proporção de três carcaças para cada garrafa. As células foram incubadas a 37°C em atmosfera de 10 5% de CO₂ até atingirem a confluência de 90 a 100%. Os subcultivos foram realizados por no máximo 3 vezes, a intervalos máximos de 3 dias. Essas células foram utilizadas para ensaios de isolamento viral e para testes de inativação de imunógenos.

15 4.1.3. Membrana corioalantóide de ovos embrionados

Os ovos embrionados de galinha utilizados para inoculação de vírus em membrana córioalantóide (MCA) foram obtidos do setor de aves do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG. Estes ovos 20 foram mantidos em incubadora Petersime (SC, Brasil), por 9 dias à temperatura de 37°C, para infecção viral.

4.2. Vírus

4.2.1. Origem das amostras

25

A amostra *Vaccinia virus* Western Reserve (VACV-WR) foi gentilmente cedida pelo Dr. C. Jungwirth (Universitat Würzburg, Alemanha).

A amostra Lister Butantã (LST-BTT) foi gentilmente cedida pelo Instituto Butantã, 30 SP.

A amostra BeAn 58058 (BAV) foi isolada durante a década de 60 de um roedor silvestre, do gênero *Oryzomys*, em Belém (PA), e posteriormente caracterizada como uma amostra de VACV (FONSECA *et al.*, 1998), sendo gentilmente cedida pelo Dr. Francisco de Paula Pinheiro.

5

A amostra de VACV Guarani P2 foi isolada pelo Laboratório de Vírus durante um surto de vaccínia bovina na cidade de Guarani, Minas Gerais, no ano de 2001 (TRINDADE *et al.*, 2006)

10 **4.2.2. Multiplicação viral em cultura celular**

Os estoques de vírus foram obtidos após a multiplicação em células Vero cultivadas em 30 garrafas redondas de 500 mL, a 37°C, em estufa de tambor rolante. Monocamadas contendo cerca de 40 milhões de células Vero foram lavadas duas vezes com PBS e infectadas com multiplicidade de infecção (MOI) de 0,01, em 5 mL de MEM, acrescido de antibióticos. Após 1 hora de adsorção, a 37°C, foram acrescentados 50 mL de MEM suplementado com 1% SFB. Novamente, as células foram incubadas a 37°C e monitoradas diariamente, ao microscópio óptico até a detecção de 90% de efeito citopático (ECP), aproximadamente, 48 horas após a infecção. Em seguida, o meio de cultivo foi desprezado, as células foram lavadas com PBS e desprendidas das garrafas com auxílio de um raspador e utilizando Tris-HCl 10mM, pH 8,0. A suspensão obtida foi centrifugada durante 10 minutos a 1500 rpm (rotor H1000B - Sorvall RT6000 B), a 4°C e o sedimento obtido foi mantido a – 70°C para posterior purificação das partículas virais.

20 **4.2.3. Purificação viral (JOKLIK, 1962)**

30 O sedimento de células infectadas (**item 4.2.2.**) foi homogeneizado em 8mL de Tris-HCl 10mM, pH 8,0 e centrifugado a 2.500 rpm (rotor H1000B - Sorvall RT6000 B) durante 15 minutos a 4°C. O sobrenadante obtido foi mantido em banho de gelo e o sedimento celular foi lisado duas vezes em 10 mL de solução de lise (MgCl₂

1mM; Tris10mM, pH 7,0; KCl 10mM). Após a adição desta solução, a suspensão foi incubada em banho de gelo, durante 10 minutos e as células lisadas mecanicamente em homogeneizador do tipo “Douncer” (Wheaton, USA) por 80 vezes. A suspensão viral resultante foi centrifugada a 14.000 rpm (rotor AH 629 5 Sorvall), 4°C, por 2 horas sobre um colchão de sacarose a 36% em Tris-HCl 10mM, pH 8,0 para separação dos restos celulares. Utilizando-se uma pipeta Pasteur, o sobrenadante e a interface foram coletados e desprezados e o restante foi descartado por inversão do tubo. Os sedimentos obtidos foram homogeneizados 10 em 1mL de Tris 10mM, pH 8,0 e submetidos a 2 ciclos de sonicação por 30 segundos, com 40% de potência de saída (Sonic Desmembrator-50, Fisher Scientific – USA). Posteriormente, os sedimentos foram centrifugados em gradiente de sacarose (25% a 40%) a 12.000 rpm (rotor AH 629 – ultracentrífuga Sorvall), 15 4°C, por 45 minutos. As bandas relativas aos vírus foram coletadas com pipeta Pasteur e adicionadas de Tris 10mM, pH 8,0 e centrifugadas a 20.000 rpm (rotor AH 629 – ultracentrífuga Sorvall), 4°C por 45 minutos. Os sobrenadantes foram desprezados e os sedimentos homogeneizados em até 500µL de Tris 10mM, pH 8,0 e distribuídos em alíquotas de 2 µL em microtubos e estocados a – 70°C.

20 **4.2.4. Multiplicação da amostra viral BAV em membrana corioalantóide de ovos embrionados**

A inoculação da amostra BAV em MCA foi feita por deslocamento da câmara de ar dos ovos embrionados pela técnica convencional, utilizando um ovoscópio. Um volume de 100 µL contendo 1000 pfu de vírus BAV foi inoculado, utilizando seringa 25 de 1 mL com agulha 0,45 x 13mm (26 Gauge). Os ovos foram mantidos em estufa úmida, a 37°C, por um período de 72 horas e, posteriormente, incubados a 4°C durante 24 horas. As MCAs foram retiradas ovos assepticamente e armazenada a - 70°C.

4.2.5. Purificação da amostra viral BAV multiplicada em membrana corioalantóide de ovos embrionados (JOKLIK, 1962 – modificado)

A MCA infectada foi macerada em nitrogênio líquido e adicionada de 1 mL de
5 tampão Tris, 10mM, pH 8,0. Esta foi triturada utilizando homogeneizador Politron
(Brinkmann Homogenizer, Suíça), primeiramente com a sonda maior por 90
segundos e, posteriormente, utilizando intervalo de 30 segundos e, novamente,
com a sonda menor por 90 segundos. Posteriormente, o material foi centrifugado a
10 1.500 rpm (Sorvall RT-6000) por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi colocado
sobre um colchão de sacarose 36% e centrifugado a 14.000 rpm (rotor AH 629 -
ultracentrífuga Sorvall) por 2 horas a 4°C. Com o auxílio de uma pipeta Pasteur, o
sobrenadante e a interface foram coletados e desprezados, e o restante foi
descartado por inversão do tubo. Os sedimentos obtidos foram homogeneizados
em 1mL de Tris 10 mM, pH 8,0 e submetidos a 2 ciclos de sonicação por 30
15 segundos com 40% de potência de saída (Sonic Desmembrator-50, Fisher
Scientific – USA). A solução foi então distribuída em alíquotas de 2 µL em
microtubos, sendo 2 µL do vírus purificado retirada para determinação do título e o
restante foi estocado a – 70°C.

20 4.2.6. Titulação viral (CAMPOS e KROON, 1993)

A titulação viral foi feita em placas de 6 câmaras, em triplicata, contendo
aproximadamente $1,5 \times 10^6$ células Vero/ câmara cultivadas por 16 a 24 horas, a
37°C em MEM, contendo 5% SFB (Cultilab, Brasil). Em cinco câmaras da placa, o
25 meio foi desprezado e 200 µL de uma série de diferentes diluições dos vírus, na
razão de 10, em meio MEM, foram adicionados às células. Uma câmara não foi
infectada, ficando reservada para o controle da viabilidade celular. Após 1 hora de
adsorção a 37°C, 2 mL de MEM contendo 1% de SFB foram adicionados e as
placas foram novamente incubadas a 37°C e monitoradas por 48 horas. Em
30 seguida, as células foram fixadas com solução 10% de formol em PBS por 30
minutos, lavadas com água e, posteriormente, coradas com solução 1% (p/v) de
cristal violeta por 15 minutos. O título viral foi calculado pelo número de placas

obtidas na câmara da diluição que apresentou entre 30 a 300 placas de lise, multiplicado pelo inverso da diluição, em 200 µL, sendo posteriormente convertido para o volume final de 1 mL. As titulações foram feitas em triplicata.

5 **4.2.7. Ensaios de imunofluorescência**

Células BSC-40 foram cultivadas, a uma densidade de $4,5 \times 10^4$ células, sobre lamínulas de microscopia de 13 mm, por 16 a 24 horas, a 37°C, em MEM contendo 5% SFB (Cultilab). Após o crescimento celular, o meio foi descartado e a 10 monocamada infectada com diferentes amostras de VACV, na M.O.I. de 3. Após 24 horas, as células foram fixadas com solução de 4% de paraformaldeído e incubadas com anticorpos anti-B5R ou anti-H3L (gentilmente cedidos pelo Dr. Bernard Moss, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, E.U.A.). Após 1 15 hora de incubação, foram adicionados anticorpos secundários conjugados com rodamina ou FITC. Após 30 minutos de incubação com os anticorpos secundários, as células foram tratadas com DAPI (Sigma, E.U.A.) por 10 minutos, para marcação de ácidos nucléicos. As imagens das células preparadas foram então obtidas em um microscópio de imunofluorescência (Olympus BX51, E.U.A.). Este 20 ensaio foi feito em duplicita.

20

4.2.8. Ensaios de infectividade viral

A determinação das curvas de ciclo único das amostras de VACV isoladas em expedições de campo e das amostras controle foi feita em células BSC-40, 25 implantadas em placas de 6 câmaras, a uma densidade de 10^6 células por câmara. Após o crescimento celular, o meio foi descartado e a solução viral inoculada no volume de 200µL, na M.O.I. de 10. Após 1 hora de adsorção, a monocamada foi lavada com PBS, e então foi adicionado 2 mL de MEM 1% SFB. As placas foram incubadas à 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂. Após 3, 6, 12, 24, 36 ou 48 horas 30 de infecção, o meio de cultura foi descartado, as monocamadas infectadas foram lavadas com PBS, e em seguida foram raspadas e coletadas para ensaios de titulação, conforme descrito no **item 4.2.6**. Em paralelo, as amostras virais foram

inoculadas em células BSC-40 sob a M.O.I. de 0,01 para a observação do fenótipo de placas virais. Após 48 horas de incubação, as células infectadas foram fixadas com solução de 4% de paraformaldeído e coradas com cristal violeta. Estes ensaios foram feitos em triplicata.

5

4.3. Ensaio de soroneutralização e inibição da formação de cometas

Amostras de soro foram aquecidas a 56°C por 30 minutos para a inativação do complemento e testadas, em triplicata, pelos testes de soroneutralização e inibição de cometas para detecção da presença de anticorpos contra OPV. Os ensaios foram feitos utilizando a amostra VACV-WR.

Para cada soro, foram utilizadas placas de 6 câmaras, nas quais foram implantadas 10^6 células Vero por câmara. Os vírus, diluídos seriadamente em MEM, foram acrescidos de gentamicina (50 μ g/mL), penicilina potássica (200U/mL) e fungizona (2,5 μ g/mL). Os soros foram diluídos também seriadamente, nas diluições de 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640 e 1:1280. Para cada diluição de soro, foi preparada uma mistura que consistiu de 200 μ L de diluição de soro mais 200 μ L de suspensão viral contendo $1,5 \times 10^2$ UFP, que foram mantidas sob agitação a 37°C, por 1 hora e, em seguida, inoculadas nas células. As placas foram incubadas a 37°C e após 1 hora de adsorção das partículas virais, foi acrescentado meio MEM suplementado com 1% SFB. Novamente, as placas foram incubadas a 37°C no período de 48 a 72 horas até o aparecimento de ECP. Após esta incubação, as células foram fixadas por 15 minutos em solução 3,7% de formaldeído e em seguida, a monocamada de células foi corada com solução de cristal violeta durante 15 minutos. Foram feitos controles com amostras de soro sabidamente positivas ou negativas para OPV. A atividade neutralizante contra as partículas IMV foi determinada e expressa como concentração de soro requerida para atingir 50% de redução de unidades formadoras de placa (UFP) por mililitro.

20

Os testes de inibição de cometas foram feitos em placas de 6 câmaras contendo células BSC-40, sob a confluência de 85-90%. A amostra VACV-WR foi diluída em

MEM 0% de SFB, e inoculada sobre as monocamadas, em um total de aproximadamente 40 UFP por câmara. Após 1 hora de adsorção, o inóculo foi removido e a monocamada foi lavada com PBS duas vezes. As amostras de soros testadas foram utilizadas no teste sob três diluições: 1:50, 1:250 e 1:500. As 5 diluições de soro foram adicionadas em 2 mL de meio MEM 1% de SFB, e aplicadas sobre a monocamada. As placas foram incubadas por 72-96 horas, a 37°C, 5% CO₂, e então fixadas com solução de formaldeído a 3,7%, e coradas com cristal violeta. A inibição de cometas foi classificada como completa, parcial ou inexistente, considerando cada uma das diluições de soro utilizadas.

10

4.4. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para a amplificação de diferentes genes virais de OPV, foram utilizados iniciadores específicos para os genes da timidina quinase (*tk*) e do fator de crescimento viral 15 (*vgf*), seguindo as condições químicas e térmicas descritas por FONSECA e colaboradores (1998). O gene viral codificador da proteína hemaglutinina (*ha*) foi amplificado utilizando os iniciadores específicos denominados EACP-1 e EACP-2, descritos por ROPP (1995). O produtos das reações foram fracionados em gel de 20 agarose (1-2%), a uma voltagem de 100V, por 15 a 40 minutos. A visualização dos resultados foi feita em um transiluminador (UV), através da excitação do fluoróforo Gel-Red (Uniscience, Brasil) intercalado no material amplificado.

Todas as amostras de soro, órgãos e excretas utilizadas neste estudo foram primeiramente submetidas a uma triagem, utilizando uma PCR do tipo semi-nested 25 para a detecção do gene *vgf* de OPV. A reação *semi-nested* PCR para a amplificação do gene *vgf* apresenta duas etapas. Na primeira, são utilizados os iniciadores VGF F e E, que amplificam um fragmento de 1536 pb. O produto desta reação foi utilizada como molde para a segunda etapa de amplificação, que utiliza os iniciadores VGF F e VGF R, cujo produto final é um amplificado de 381pb 30 (TABELA 2) (ABRAHÃO *et al*, 2010).

TABELA 2: Relação dos iniciadores utilizados para a amplificação do gene *vif* - PCR semi-nested

Iniciador	Seqüência	Tamanho amplicon (pb)	Referência
VGF R	3'CCAGAAGCTTGGCACACCAATATC 5'	381	FONSECA <i>et al.</i> , 1998
VGF F	5' CGCAGGATCCATAATCAGTCATT 3'		
E	3' ACAATGGATATTACGAC 5'	1536	DRUMOND, 2007

Nas duas etapas de amplificação foram utilizadas as mesmas condições salinas e
 5 enzimáticas, descritas a seguir: 2,0mM de MgCl₂, 10mM dos nucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 2U de *Taq* DNA polimerase (Promega), 2,0µL de Tampão 10X de *Taq* polimerase, 4pmol dos iniciadores específicos, 1µL de amostra e 500ng de albumina sérica bovina (BSA), em um total de 20µL de reação.

- 10 As seguintes condições térmicas foram utilizadas para a amplificação do gene *vif* na primeira reação: desnaturação inicial de 94°C por 9 minutos, seguido por 30 ciclos de 94°C por 1 minuto (desnaturação), 45°C por 1 minuto (pareamento), 72°C por 2 minutos (polimerização), e uma extensão final de 72°C por 7 minutos. O volume de 1µL desta 1^a reação foi utilizado, sem diluição, como amostra na 2^a
 15 reação, cujas condições de amplificação foram: 94°C por 5 minutos; 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 45°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto, seguido de uma extensão final de 72°C por 7 minutos.

Como controle positivo foi utilizado 10⁴ UFP/µL de VACV-WR purificado por
 20 reação. Nos controles negativos, 1µL de água foi utilizado para substituir as amostras correspondentes. Os fragmentos amplificados foram fracionados por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) 8%, sob voltagem de 100V e corados pela prata.

4.5. Sequenciamento e análise das seqüências de DNA

O sequenciamento foi feito pelo método de dideoxi descrito por SANGER *et al.*, (1977) em seqüenciador automático capilar Mega Bace1000 (Amersham/Pharmacia, Suécia), utilizando o Kit *Dye Enzyme ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for Megabace* e obedecendo as condições de reação e leitura indicadas pelo fabricante.

Para cada fragmento foram feitas seis reações de sequenciamento, três com cada um dos iniciadores. As seqüências obtidas foram sobrepostas e o consenso foi obtido utilizando a plataforma Asparagin-Cenargen (EMBRAPA, 2010). As seqüências obtidas foram comparadas com as depositadas no banco de dados do “National Center for Biotechnology Information” através do programa BLAST 2.0 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST.- Basic Local Alignment Tool> (ALTSUCHL *et al.*, 1990). As seqüências nucleotídicas foram analisadas pelo programa BLAST N e as de aminoácidos foram analisadas pelo programa BLAST X. As seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos foram analisadas e utilizadas para a construção de árvores filogenéticas utilizando o programa MEGA 4.0 (KUMAR *et al.*, 1994).

20 4.6. Determinação de hospedeiros e reservatórios naturais de VACV

4.6.1. Expedições de campo: características das áreas visitadas

Com o intuito de verificar se espécies de roedores poderiam representar hospedeiros ou reservatórios naturais de VACV, quatro expedições de campo foram feitas para a captura desses animais em propriedades afetadas pela VB, no estado de Minas Gerais. Durante estes surtos, além da captura de roedores, foram coletadas amostras de sangue, crostas, líquido vesicular e swabs de úlceras, de bovinos e humanos acometidos pela doença. Além disso, baseado em estudos que demonstraram que partículas de VACV permanecem estáveis por longos períodos em fezes de camundongos experimentalmente infectados (ABRAHÃO *et al.*, 2009), foram coletadas excretas de roedores encontradas nas dependências das

propriedades visitadas. As equipes que participaram das expedições de campo foram formadas por biólogos, médicos veterinários e enfermeiros, em uma parceria do Laboratório de Vírus/ICB/UFMG, da Escola de Veterinária/UFMG e do Instituto René Rachou (FIOCRUZ-MG), contando com o apoio do Instituto Mineiro de 5 Agropecuária (IMA).

A primeira expedição aconteceu no ano de 2005, durante um grande surto de VACV que aconteceu nas proximidades da cidade de Mariana ($20^{\circ}22'40''S$ – $43^{\circ}24'57''W$), centro do estado. Vários pequenos distritos da região registraram 10 casos da doença, principalmente as localidades de Acaiaca e Goiabeiras. A região é localizada em uma área de transição de biomas, entre Mata Atlântica e Cerrado, alternando fragmentos de mata ombrófila densa e savanas. A altitude média da região é de aproximadamente 720 m, apresentando clima subtropical com médias de temperatura entre 15 e 18°C. O surto aconteceu durante a estação seca, que 15 dura aproximadamente quatro meses do ano. A área apresenta alto nível de impacto antropogênico, com diversas áreas de pastos e lavouras (cana-de-açucar, café e milho). Em algumas propriedades, porções de florestas limitam os quintais, currais e pastos, e segundo os moradores, animais selvagens eram 20 frequentemente avistados nas redondezas, incluindo camundongos, ratos, gatos do mato, capivaras, siriemas, gambás, micos e garças-boiadeiras. De uma forma geral, as propriedades apresentavam infra-estrutura muito precária, e uma grande quantidade de entulho e lixo era observada nos quintais e em volta dos currais. Em todas as propriedades em que houve notificações de infecções por VACV a ordenha era manual, e o processo apresentava baixo nível de tecnificação. 25 Roedores peridomiciliares e suas excretas, sobretudo *Mus musculus* e *Ratus norvergicus*, foram observados em diversas instalações das propriedades, incluindo os currais, armazéns e granjas de suínos. Algumas das propriedades, localizadas em Acaiaca, foram visitadas novamente pela equipe do Laboratório de Vírus/UFMG em 2009, e a situação permanecia muito semelhante com a 30 observada em 2005. Segundo o IMA, foi o primeiro surto de vaccínia bovina notificado na região.

A segunda expedição aconteceu no ano de 2008, em um surto de VB que ocorreu na cidade de Paraguaçu ($21^{\circ}31'59"S$ e $45^{\circ}45'59"W$), e representou o primeiro surto notificado na região sul do estado de Minas Gerais. O perfil das propriedades rurais visitadas foi muito semelhante ao observado no surto de Mariana, com baixo nível de tecnificação na ordenha. Todavia, a região apresenta-se, exclusivamente, em uma área de Mata Atlântica, com altitude média de 825 m. O surto também aconteceu durante o inverno, e durou aproximadamente 2 meses. A temperatura média durante os dois dias de expedição foi de 17°C (dia). Dentre as regiões visitadas, esta foi a que apresentava maior impacto antropogênico, uma vez que a prática da pecuária leiteira era dívida com extensas áreas de lavoura cafeeira, produto tradicional do sul do estado. Foram observadas excretas de roedores em todas as propriedades visitadas. Em uma das propriedades que a comercialização do leite foi vetada pelo IMA, o proprietário descreveu a utilização do mesmo na alimentação de cães e gatos da propriedade. Apesar disso, nenhum desses animais apresentou sinais aparentes de infecção por VACV.

A terceira expedição de campo aconteceu na região de Doresópolis ($20^{\circ}17'13"S$ e $45^{\circ}54'10"W$), centro-oeste de Minas Gerais, em 2009. Mais de 15 propriedades foram afetadas pela doença, e durante os dois meses em que os surtos foram notificados, mais de 15 pessoas foram hospitalizadas (população de 1200 pessoas [IBGE, 2008]). A região está inserida integralmente em uma área de campos Cerrados, com altitude aproximada de 752 m, e temperatura média de 25°C . O inquérito epidemiológico revelou que a área já havia sido acometida por surtos exantemáticos semelhantes, porém nenhum registro oficial de confirmação do agente etiológico foi encontrado pelos funcionários do IMA. A maioria das propriedades afetadas também apresentava sinais de infestação por roedores, e algumas delas estavam localizadas muito próximas a áreas urbanas.

A última expedição foi realizada em setembro de 2009, e diferentemente das demais, não aconteceu em uma área em que estava ocorrendo um surto de VACV. As coletas aconteceram na cidade de Curvelo ($18^{\circ}45'21"S$ e $44^{\circ}25'51"W$), em uma área que, segundo moradores, uma doença com sinais clínicos muito semelhantes

à VB havia ocorrido em 2006. A região está localizada em uma área de Cerrado (subtipo cerradão), altitude média de 632 m, e temperatura média de 25°C durante o dia. Na ocasião, os proprietários relataram que uma grande quantidade de roedores silvestres e peridomiciliares estavam invadindo as propriedades em busca de alimento. Em algumas propriedades, mais de 40 roedores foram encontrados em piscinas e tanques de armazenamento de água, em uma única noite. Segundo os produtores rurais, a infestação de roedores causou perdas de mais de 60% em lavouras de milho e feijão. Apesar da ausência de relatos de VB durante a expedição, o estudo foi feito porque a detecção VACV em roedores poderia estar relacionada com o surto relatado em 2006 pelos proprietários.

A relação das amostras coletadas de roedores capturados durante as quatro expedições será apresentada no **item 4.6.2..**

15 **4.6.2. Captura de roedores e coleta de espécimes clínicos**

Para a captura de roedores, armadilhas do tipo Sherman (40x60x30cm) foram distribuídas nas propriedades rurais visitadas durante as expedições de campo. Foi utilizado como atraente uma composição contendo pasta de amendoim, bacon, 20 banana e óleo de fígado de bacalhau. As armadilhas foram posicionadas em salas de ordenha, em armazéns, locais próximo a silagens, bordas de matas, lavouras de grãos ou cana, currais, granjas de suínos e pastagens (FIGURA 11).

As armadilhas foram preparadas e posicionadas nos locais indicados no período da 25 tarde. Para evitar que os animais capturados ficassem prolongadamente expostos ao sol, a equipe verificava se haviam roedores nas armadilhas no início da manhã. No caso de armazéns e outros locais onde as armadilhas não ficavam expostas sol, a conferência foi feita, em alguns casos, após as 13 horas.

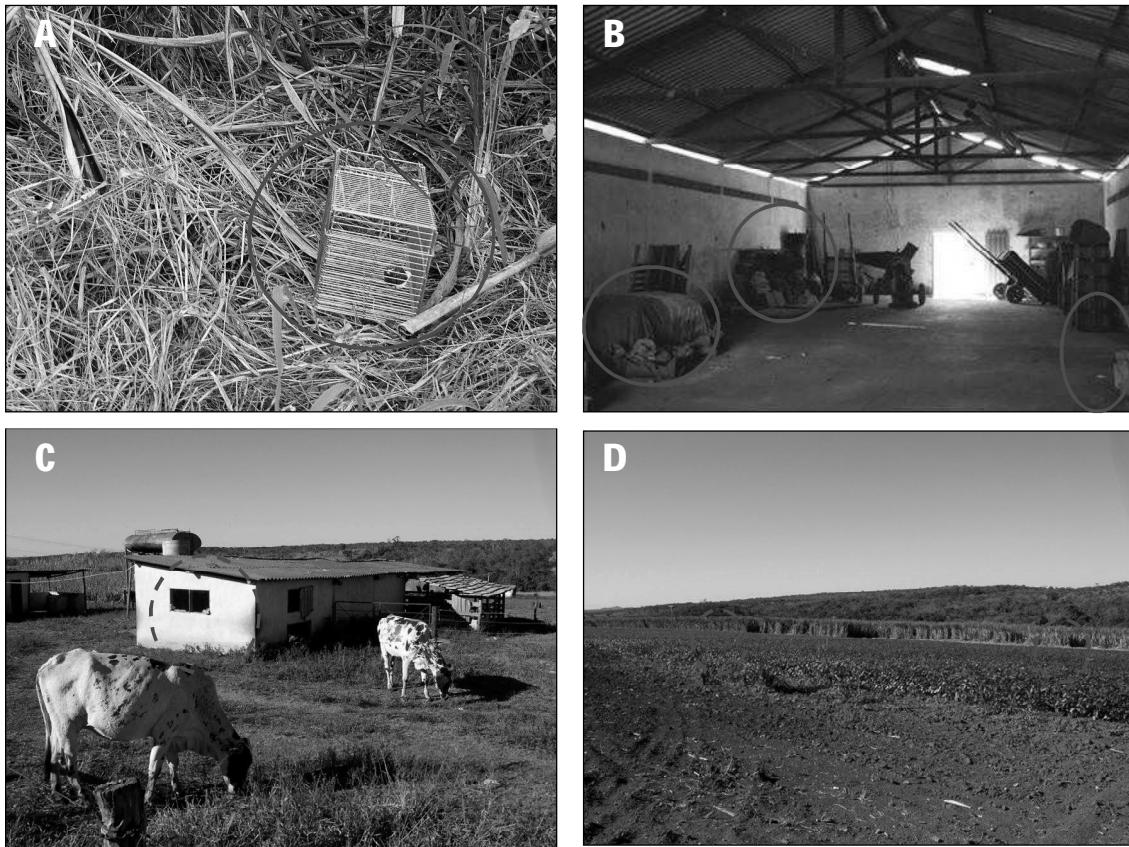


FIGURA 11: Painel ilustrando os locais onde as armadilhas para roedores foram posicionadas nas propriedades rurais visitadas. Os círculos indicam exatamente onde as armadilhas foram montadas. (A) lavoura de cana-de-açúcar; (B) armazém; (C) curral; 5 (D) lavoura de feijão. Fotos obtidas durante a expedição de campo feita em Curvelo (MG), em 2009. Fotos gentilmente cedidas por Turrini, F.

Visando o início do processo de sedação dos roedores, as armadilhas contendo animais capturados foram colocadas dentro de uma caixa de isopor com tampa, 10 onde foi então adicionado um algodão embebido em éter. Após 5 minutos, a armadilha era retirada do isopor e apoiada sobre uma bancada, para a administração de uma solução contendo anestésico e sedativo. Esta solução foi feita pela adição de 1.300 μ L de Ketamina (Vertanarcol®) a 50 mg/mL, 200 μ L de Cloridrato de Xilazina (Kensol®) a 20mg/mL e 1.500 μ L de PBS1x (RAMIREZ *et al.*, 15 2003 - modificado). Dependendo do tamanho do roedor capturado, um total entre 50 a 300 μ L desta solução foi inoculada pela via intraperitoneal.

Após a administração do anestésico, foi feita a coleta de sangue, através de punção cardíaca, utilizando uma seringa de insulina (500 μ L). Os animais foram então sacrificados por deslocamento cervical. Órgãos como fígado, baço, intestino, cérebro, pulmões, gônadas e peritônio foram coletados, acondicionados em tubos de microcentrífuga, e armazenados sob refrigeração até serem processados no Laboratório de Vírus/UFMG. Alguns animais foram fotografados para auxiliar no processo de identificação das espécies de roedor.

Amostras de fezes de roedores também foram coletadas em diversos locais das propriedades, sobretudo em armazéns, silos e currais. Este material foi acondicionado e armazenado conforme descrito para os órgãos dos roedores. Todo manuseio de roedores e suas fezes foi feito utilizando luvas e máscaras de proteção contra partículas biológicas. A TABELA 3 sumariza as espécies de roedores capturadas durante este estudo.

Em paralelo à captura de roedores, foi feita a coleta de amostras biológicas de humanos e bovinos. Amostras de crostas foram coletadas utilizando tesouras e pinças estéreis e acondicionadas em tubos de microcentrífuga; amostras de líquido vesicular foram coletadas utilizando seringas de insulina (500 μ L). Nos casos em que as lesões encontravam-se no estágio de úlcera, foram feitos swabs, que posteriormente foram acondicionadas em microtubos, sem a adição de qualquer solução. As amostras foram armazenadas sob refrigeração até serem processados no Laboratório de Vírus/UFMG.

25

30

TABELA 3: Relação dos roedores capturados e analisados neste estudo

	Localidade	Ano	Espécie	Identificação	Sexo
1	Mariana / Acaiaca	2005	<i>Mus musculus</i>	<i>MmA1</i>	ND
2	Mariana / Acaiaca	2005	<i>Mus musculus</i>	<i>MmA2</i>	ND
3	Mariana / Acaiaca	2005	<i>Mus musculus</i>	<i>MmA3</i>	ND
4	Mariana / Acaiaca	2005	<i>Mus musculus</i>	<i>MmA4</i>	macho
5	Mariana / Acaiaca	2005	<i>Rattus rattus</i>	<i>RrA1</i>	macho
6	Mariana / Acaiaca	2005	<i>Rattus rattus</i>	<i>RrA2</i>	ND
7	Mariana / Goiabeiras	2005	<i>Mus musculus</i>	<i>MmG1</i>	ND
8	Mariana / Goiabeiras	2005	<i>Rattus rattus</i>	<i>RrG1</i>	ND
9	Mariana / Goiabeiras	2005	<i>Rattus rattus</i>	<i>RrG2</i>	ND
10	Mariana / Goiabeiras	2005	<i>Mus musculus</i>	<i>MmG2</i>	ND
11	Mariana / Goiabeiras	2005	<i>Rattus sp.</i>	<i>RG1</i>	ND
12	Mariana / Goiabeiras	2005	<i>Rattus sp.</i>	<i>RG2</i>	ND
13	Mariana / Goiabeiras	2005	<i>Mus musculus</i>	<i>MmG3</i>	ND
14	Curvelo	2009	<i>Rattus norvergicus</i>	<i>RnC1</i>	macho
15	Curvelo	2009	<i>Mus musculus</i>	<i>MmC1</i>	fêmea
16	Curvelo	2009	<i>Mus musculus</i>	<i>MmC2</i>	fêmea
17	Curvelo	2009	<i>Mus musculus</i>	<i>MmC3</i>	macho
18	Curvelo	2009	<i>Rattus norvergicus</i>	<i>RnC2</i>	macho
19	Curvelo	2009	<i>Mus musculus</i>	<i>MmC4</i>	macho

ND= não determinado

- 5 O processamento dos espécimes clínicos bovinos e humanos foi feito conforme descrito por TRINDADE e colaboradores (2007). O processamento dos órgãos dos roedores foi feito segundo FERREIRA e colaboradores (2008). As amostras processadas foram submetidas ao isolamento viral em células Vero, CEF ou BSC-40 (FERREIRA *et al.*, 2008). Ao todo, foram feitas pelo menos duas passagens cegas visando o isolamento. As amostras de soro murinas, bovinas e humanas foram submetidas a ensaios de soroneutralização para a detecção de anticorpos anti-OPV, conforme descrito no **item 4.3..** A TABELA 4 sumariza os espécimes clínicos coletados durante as expedições feitas em Mariana, Paraguaçu, Doresópolis e Curvelo.

15

20

TABELA 4: Relação das amostras coletadas e analisadas neste estudo

	Localidade	Ano	Amostra/detalhes	Espécie
1	Mariana / Acaíaca	2005	Crosta	<i>Bos taurus</i>
2	Mariana / Acaíaca	2005	Liq Vesicular	<i>Homo sapiens</i>
3	Mariana / Acaíaca	2005	Sangue	<i>Bos taurus</i>
4	Mariana / Acaíaca	2005	Sangue	<i>Homo sapiens</i>
5	Mariana / Acaíaca	2009	Fezes de roedor/Curral	NI
6	Mariana / Acaíaca	2009	Fezes de roedor/armazém	NI
7	Mariana / Acaíaca	2009	Fezes de roedor/armazém2	NI
8	Mariana / Acaíaca	2009	Fezes de roedor/quintal	NI
9	Mariana / Acaíaca	2009	Fezes de roedor/galinheiro	NI
10	Mariana / Acaíaca	2009	Fezes de roedor/granja suína	NI
11	Mariana / Acaíaca	2009	Sangue	<i>Bos taurus</i>
12	Mariana / Acaíaca	2009	Sangue	<i>Bos taurus</i>
13	Paraguaçu	2008	Fezes de roedor/armazém	NI
14	Paraguaçu	2008	Fezes de roedor/quintal	NI
15	Paraguaçu	2008	Fezes de roedor/Curral	NI
16	Paraguaçu	2008	Fezes de roedor/granja suína	NI
17	Paraguaçu	2008	Crosta	<i>Bos taurus</i>
18	Paraguaçu	2008	Liq Vesicular	<i>Homo sapiens</i>
19	Paraguaçu	2008	Sangue	<i>Bos taurus</i>
20	Paraguaçu	2008	Sangue	<i>Homo sapiens</i>
21	Doresópolis	2009	Fezes de roedor/armazém	NI
22	Doresópolis	2009	Fezes de roedor/quintal	NI
23	Doresópolis	2009	Fezes de roedor/galinheiro	NI
24	Doresópolis	2009	Fezes de roedor/Curral	NI
25	Doresópolis	2009	Sangue	<i>Homo sapiens</i>
26	Doresópolis	2009	Crosta	<i>Bos taurus</i>
27	Doresópolis	2009	Sangue	<i>Bos taurus</i>
28	Doresópolis	2009	Sangue	<i>Homo sapiens</i>
29	Doresópolis	2009	Sangue	<i>Homo sapiens</i>
30	Curvelo	2009	Sangue	<i>Bos taurus</i>
31	Curvelo	2009	Sangue	<i>Bos taurus</i>
32	Curvelo	2009	Sangue	<i>Bos taurus</i>
33	Curvelo	2009	Sangue	<i>Bos taurus</i>
34	Curvelo	2009	Fezes de roedor/armazém	NI
35	Curvelo	2009	Fezes de roedor/armazém	NI
36	Curvelo	2009	Fezes de roedor/armazém	NI
37	Curvelo	2009	Carcaça roedor/armazém	<i>Mus musculus</i>

NI: não identificada

5

4.6.3. Caracterização biológica e molecular de amostras de VACV isoladas de roedores capturados em áreas acometidas pela vaccínia bovina

Amostras de VACV isoladas de roedores foram comparadas com amostras isoladas de bovinos e humanos, isoladas durante o mesmos surtos de vaccínia bovina. As amostras murinas, bovinas e humanas foram multiplicadas separadamente em Vero, purificadas, e então submetidas a testes biológicos e

moleculares. Após a purificação, as amostras foram inoculadas em MCA (**item 4.2.4.**), submetidas a testes de curva de ciclo único e de fenótipo de placas virais (**item 4.2.8.**). Os isolados também foram submetidos a testes de imunofluorescência (**item 4.2.7.**). A comparação molecular foi feita baseada nos genes *tk*, *vgf* e *ha* (**item 4.4.**), que foram amplificados e sequenciados (**item 4.5.**). As sequências obtidas dos isolados murinos, humanos e bovinos foram alinhadas, comparadas e analisadas filogeneticamente (**item 4.5.**). A amostra VACV-WR foi utilizada como controle positivo em todos os testes acima descritos.

10 **4.6.3.1. Teste de virulência dos isolados virais em camundongos Balb/c**

Os testes de virulência dos isolados murinos, bovinos e humanos foram feitos em camundongos Balb/c, como descrito por FERREIRA e colaboradores (2008). Desta forma, grupos de 4 camundongos Balb/c machos com 4 semanas, foram 15 inoculados pela via intranasal, com 10^6 UFP de cada isolado. A inoculação foi feita posicionando o focinho dos animais, previamente anestesiados (**item 4.6.2**), sobre uma gota de $10\mu\text{L}$ de solução viral aplicada na superfície de uma placa de Petri. Após inspirar a solução viral, os animais foram colocados dentro de gaiolas contendo microisoladores, e levados para o biotério do Departamento de 20 Microbiologia/ICB/UFMG. De forma comparativa, grupos de 4 camundongos também foram infectados com as amostra de VACV GP2V e BAV. Um grupo foi inoculado com PBS.

Todos os camundongos foram examinados e pesados diariamente para a 25 observação do aparecimento dos sinais clínicos. Para verificar a eliminação de dos isolados virais em excretas murinas (FERREIRA *et al.*, 2008), as fezes dos camundongos foram coleadas no 1º, 5º, 10º e 15º dias pós-infecção (d.p.i.). As fezes foram processadas (FERREIRA *et al.*, 2008) e submetidas a ensaios de PCR (**item 4.4.**) e titulação viral (HUTSON *et al.*, 2009). No 15º d.p.i. os camundongos 30 foram anestesiados e sacrificados por deslocamento cervical, para a coleta de sangue, visando ensaios de soroneutralização (**item 4.3.**).

Em paralelo, grupos de 3 animais foram infectados pela via intranasal com as mesmas amostras virais, conforme acima descrito. No 5ºd.p.i., os animais foram sacrificados e amostras de intestino foram coletadas. Esses órgãos foram submetidos à titulação viral em células BSC-40 (FERREIRA *et al.*, 2008). Todas as 5 amostras foram armazenadas em freezer -70°C até serem processadas.

4.6.4. Análise de coleções de soros de espécies de vertebrados silvestres ou mantidos em cativeiro

10 Com o intuito de determinar se outras espécies de vertebrados poderiam representar hospedeiros ou reservatórios de VACV, coleções de soros de animais silvestres ou mantidos em cativeiro foram submetidas a testes sorológicos e moleculares, a fim de analisar a presença de anticorpos anti-OPV e DNA de viral. A primeira coleção analisada foi gentilmente cedida pela Profa. Zélia Lobato (Escola
15 de Veterinária, UFMG), sendo composta por amostras de soro de várias espécies de animais silvestres. Estas amostras foram coletadas durante um projeto de resgate de fauna, em decorrência do alagamento de uma área de floresta Amazônica, durante a construção de uma usina hidroelétrica no Rio Tocantins, nos municípios de Lajeado e Ipueiras (09°44'58"S e 48°21'23"O) (TO). Na ocasião da
20 coleta, não existiam notificações de surtos de vacínia bovina na região. O primeiro surto de VACV notificado neste estado aconteceu no ano de 2009 (MEDAGLIA *et al.*, 2009). Ao todo, foram coletadas 344 amostras de soro, como apresentado na TABELA 5. Todas as amostras foram submetidas a ensaios de soroneutralização
(item 4.3.) e PCR (item 4.4.) para a detecção dos genes *vif* e *ha* de OPV.
25 Algumas das amostras positivas na PCR foram sequenciadas e analisadas, conforme descrito no item 4.5.

A outra coleção analisada foi gentilmente cedida pela Fundação Zoobotânica de Belo Horizonte. As amostras de soro foram coletadas por veterinários da
30 instituição, e abrange uma grande variedade de táxons de vertebrados, incluindo aves, mamíferos e répteis. A análise da soroprevalência de animais de zoológico OPV-positivos foi feita uma vez que surtos de CPXV têm sido descritos em animais

mantidos em cativeiro na Europa (ZWART *et al.*, 1971; MARENKOVA *et al.*, 1977; MÄTZ-RENSING *et al.*, 2006). Assim como descrito para a coleção anterior, os soros dos animais da Fundação Zoobotânica também foram submetidos a ensaios de soroneutralização (**item 4.3.**) e PCR (**item 4.4.**). A relação dos soros 5 desta coleção também foi sumarizada na TABELA 5.

TABELA 5: Relação das amostras de soro de vertebrados silvestres ou mantidos em cativeiro, analisadas no presente estudo.

Espécie	Nome popular	Nº de soros	Ano da coleta	Local
<i>Cebus apela</i>	macaco-prego	269	2001-2002	Lajeado-Ipueiras (TO)
<i>Alouatta caraya</i>	macaco guariba	27	2001-2002	Lajeado-Ipueiras (TO)
<i>Nasua nasua</i>	quati	12	2001-2002	Lajeado-Ipueiras (TO)
<i>Dasyprocta sp.</i>	cotia	20	2001-2002	Lajeado-Ipueiras (TO)
<i>Didelphis albiventris</i>	gambá	2	2001-2002	Lajeado-Ipueiras (TO)
<i>Euphractus sexcinctus</i>	tatu	5	2001-2002	Lajeado-Ipueiras (TO)
<i>Tamandua tetradactyla</i>	tamanduá-mirim	5	2001-2002	Lajeado-Ipueiras (TO)
<i>Cerdocyon thous</i>	raposa cinzenta	4	2001-2002	Lajeado-Ipueiras (TO)
<i>Eunectes murinus</i>	sucuri	2	2004	Fundação Zoo-Bot.BH (MG)
<i>Caiman latirostris</i>	jacaré do papo-amarelo	3	2004	Fundação Zoo-Bot.BH (MG)
<i>Amazona brasiliensis</i>	papagaio de cara-roxa	1	2004	Fundação Zoo-Bot.BH (MG)
<i>Boa constrictor</i>	jibóia	1	2004	Fundação Zoo-Bot.BH (MG)
<i>Crocodylus acutus</i>	crocodilo	1	2004	Fundação Zoo-Bot.BH (MG)
<i>Rhea americana</i>	ema	1	2004	Fundação Zoo-Bot.BH (MG)
<i>Panthera onca</i>	onça pintada	1	2004	Fundação Zoo-Bot.BH (MG)
<i>Chrysocyon brachyurus</i>	lobo guará	6	2004	Fundação Zoo-Bot.BH (MG)
<i>Tapirus terrestris</i>	anta	4	2004	Fundação Zoo-Bot.BH (MG)
<i>Lama glama</i>	lhama	2	2004	Fundação Zoo-Bot.BH (MG)
<i>Panthera leo</i>	leão	1	2004	Fundação Zoo-Bot.BH (MG)
<i>Taurotragus oryx</i>	elande	2	2004	Fundação Zoo-Bot.BH (MG)
<i>Loxodonta africana</i>	elefante	1	2004	Fundação Zoo-Bot.BH (MG)
<i>Pan troglodytes</i>	chimpanzé	1	2004	Fundação Zoo-Bot.BH (MG)
<i>Panthera pardus</i>	leopardo	1	2004	Fundação Zoo-Bot.BH (MG)
<i>Blastocerus dichotomus</i>	cervo do pantanal	1	2004	Fundação Zoo-Bot.BH (MG)
<i>Myrmecophaga tridactyla</i>	tamanduá-bandeira	3	2004	Fundação Zoo-Bot.BH (MG)
<i>Cebus apela</i>	macaco-prego	1	2004	Fundação Zoo-Bot.BH (MG)
<i>Mandrillus sphinx</i>	mandril	1	2004	Fundação Zoo-Bot.BH (MG)
<i>Speothos venaticus</i>	cachorro do mato	1	2004	Fundação Zoo-Bot.BH (MG)
<i>Tamandua tetradactyla</i>	tamanduá-mirim	1	2004	Fundação Zoo-Bot.BH (MG)
<i>Gorilla gorilla</i>	gorila	1	2004	Fundação Zoo-Bot.BH (MG)

25

30

4.7. Padronização de um sistema *prime-boost* de vacinação contra OPV

4.7.1. Imunógeno inativado BAV

4.7.1.1. Inativação por β -propiolactona (THORNTON, 1980 - modificado)

5 O vírus BAV previamente titulado em 10^7 UFP/ μ L foi transferido para um erlenmeyer e em seguida, adicionado β -propiolactona (Sigma) na proporção de 1:100 (ISLAS *et al.*, 1995; FRAZATTI-GALLINA *et al.*, 2004). A solução foi mantida sob agitação por 2 horas a 37°C, sendo o pH monitorado por meio de um potenciômetro (MB-10-Marte, Brasil), corrigido para pH 7,2 pela adição de K₂HPO₄

10 1M estéril, quando necessário. Após este período, o vírus foi incubado à temperatura de 25°C e a agitação foi mantida por mais 4 horas.

A suspensão viral inativada foi coletada e dialisada em PBS 0,8% por 24 horas, a 4°C (SAMBROOK *et al.*, 1989). A diálise da amostra inativada foi feita com o objetivo de se retirar a β -propiolactona, e seus produtos de degradação. A membrana de diálise (12000-14000 MWCO) foi preparada conforme instruções do fabricante (Spectral Medical Industries Inc., E.U.A.), autoclavada após o preparo, e em seguida, armazenada imersa em água Milli-Q estéril a 4°C. Ao final da diálise, a amostra foi armazenada a -70°C.

20

O imunógeno inativado BAV foi desenvolvido e testado por FERREIRA (2008), no Laboratório de Vírus – ICB/UFMG. No protocolo padrão, são administradas 2 doses com 10^7 UFP de BAV inativado, em 100 μ L, pela via subcutânea, em intervalos de 4 semanas.

25

4.7.1.2. Inativação térmica de BAV

Visando reduzir o tempo utilizado para inativação de BAV, uma metodologia de inativação térmica de VACV foi testada em paralelo à inativação química. Segundo PULFORD (2004), a inativação consiste em aquecer a 60°C, por 2 horas, alíquotas virais de 100 μ L, contendo 10^7 UFP/ μ L. Para isso, foram utilizados tubos de microcentrífuga pequenos (200 μ L), e o aquecimento foi feito em um termociclador

(Eppendorf, Mastercycler, Alemanha). O tempo necessário para inativação de BAV foi testado, e alíquotas desse vírus foram expostas ao aquecimento por 15, 30, 45, 30, 90, 120 ou 150 minutos. Ao final de cada tempo a alíquota viral foi titulada em células CEF (**item 4.2.6.**). O experimento foi feito em triplicata.

5

4.7.1.3. Testes de inativação

Para a avaliação e comprovação da inativação viral foram utilizados células CEF e ovos embrionados.

10

Para inoculação em células, um volume de 100 µL de BAV inativado por betapropiolactona e termicamente (2 horas de aquecimento) foi diluído em 0,4 mL de MEM acrescido de glutamina, antibióticos e antifúngico. A inoculação da suspensão viral foi feita em monocamadas de CEF com confluência de 90%, 15 implantadas em garrafas de cultivo celular de 25cm². O meio de cultura foi removido e a monocamada lavada com PBS. Em seguida, foram acrescentados 0,1 mL da suspensão viral inativada e, em paralelo, feito um controle da viabilidade celular e um controle de vírus, em duplicata. As células foram incubadas a 37°C, homogeneizadas por 1 hora, de 15 em 15 minutos. Em seguida, o volume de meio 20 foi completado para 5 mL suplementado com 1% de SFB (Cutilab). As células foram observadas quanto ao aparecimento de ECP por um período de 48 a 96 horas. Uma das garrafas de cada teste foi fixada em formol e corada com cristal violeta para contagem de placas. Da outra garrafa, o meio foi descartado, as células foram congeladas e descongeladas por três vezes em Tris 10 mM pH8,0 e, 25 posteriormente, centrifugadas a 1.500 rpm (Sorvall, RT6000) a 4°C. O sobrenadante foi coletado, sendo 1 mL deste, repassado em 6 vezes sucessivas em células Vero. Esse processo foi feito para as garrafas com as suspensões virais inativadas, com os controles positivos, inoculados com o BAV não-inativado e com os controles negativos, inoculados com PBS (THORNTON, 1980; SOMEKH *et al.*, 30 2004).

Para inoculações em MCA, foram utilizados 10^7 UFP de vírus BAV inativado, por ambos os métodos. Após incubação por 72 horas a 37°C, as MCA infectadas foram retiradas assepticamente, e armazenada a -70°C. Foram feitas duas passagens consecutivas em MCA, em duplicata, as quais foram coletadas e maceradas com areia autoclavada para inoculação em CEF para confirmação da inativação viral.
5 Os controles negativos consistiram na inoculação da MCA com PBS e os controles positivos, na inoculação com 1000 UFP do vírus BAV não inativado (THORNTON, 1980).

10 4.7.2. Vacina de DNA: B5R e H3L

As vacinas B5R-DNA e H3L-DNA foram descritas por PULFORD e colaboradores (2004). O protocolo cujos melhores resultados foram observados utilizou 4 doses, com intervalos de 3 semanas, com 50 μ g do plasmídeo pTarget (Promega, E.U.A.)
15 com o gene B5R em janela de leitura. A administração da vacina foi feita pela via intramuscular, com um volume de 100 μ L, nos membros traseiros.

As vacinas de DNA expressando as proteínas B5R ou H3L utilizadas no presente estudo foram obtidas de uma biblioteca de ORFs de VACV (gentilmente cedidos 20 pelo Dr. Bernard Moss, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, E.U.A.). As ORFs foram clonadas no plasmídeo pcDNA3.1-V5-his-TOPO (Invitrogen), e encontram-se sob a regulação de um promotor de citomegalovírus, e portanto são expressas em células eucariotas. Algumas vacinas de DNA utilizando este vetor foram descritas (FRAGAKI *et al.*, 2001; LI *et al.*, 2004, LIU *et al.*, 2004).

25 Os plasmídeos contendo B5R ou H3L foram inseridos em bactérias *E.coli* DH5 α e, posteriormente, clones bacterianos foram triados por PCR, utilizando os iniciadores T7-F e BGH-R (pcDNA3.1). Ao todo, 5 clones bacterianos de cada gene foram submetidos a extração plasmidial em pequena escala (MiniPreps DNA plasmidial 30 extraction kit, Promega). Para confirmar a integridade das sequências nucleotídicas de B5R e H3L nas construções, os plasmídeos foram sequenciados e as sequências obtidas comparadas com outras disponíveis no GenBank (**item 4.5.**).

Para confirmar a expressão das proteínas B5R e H3L, células BSC-40 implantadas em lamínulas de microscopia foram transfetadas com as construções separadamente, utilizando um kit de transfecção de células eucariotas (Lipofectamina, Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante. Após a transfecção, as células foram incubadas com meio Opti-MEM (Gibco) contendo 1% SFB, por 24 horas, a 37°C, 5% de CO₂. Após este período, as lamínulas, contendo as células transfetadas, foram fixadas e submetidas a ensaios de imunofluorescência, utilizando anticorpos específicos para a detecção de B5R e H3L (**item 4.2.7.**).

Os clones bacterianos selecionados, contendo as sequências de B5R ou H3L, foram propagados em meio LB por 18 horas, e então submetidos à extração de DNA plasmidial em larga escala (Maxi-Preps Qiagen endotoxin-free). O DNA obtido foi quantificado em espectrofotômetro Nanodrop (ND-1000) e conservado a -70°C.

4.7.3. Preparo dos imunógenos para vacinação (FERREIRA, 2008)

Para o preparo dos imunógenos foi utilizado como adjuvante Emulsigen® (Laboratórios MVP, Ralston, NE), que é autorizado pelo Ministério da Agricultura Americano para uso em vacinas veterinárias para ser administrado pelas vias intramuscular e subcutânea. A fórmula utilizada foi composta (% p/p) de 5% de Rehydragel LV® (Reheis, U.S.A) - dispersão coloidal de hidróxido de alumínio - , 25% de Emulsigen® (Laboratórios MVP, Ralston, NE) e 70% de suspensão viral inativada e/ou B5R DNA e/ou H3L-DNA. Inicialmente, sob fluxo laminar, o Rehydragel® foi vertido em um bêquer, seguido da adição do imunógeno inativado ou das vacinas de DNA. Esta mistura foi mantida à temperatura ambiente, sob agitação de 2000 rpm utilizando o aparelho Eurostar Basic, Brasil. Após 1 hora, a suspensão obtida foi vertida em um bêquer contendo o Emulsigen® e a agitação foi mantida por mais 1 hora a 2000 rpm (Eurostar Basic, Brasil) à temperatura ambiente. Ao término do processo, o imunógeno foi envasado e conservado a 4°C até o momento do uso. A administração dos imunógenos, simples ou compostos,

foi feita pela via subcutânea, na parte interna da coxa esquerda, utilizando o volume de 100 μ L. Cada dose de imunógeno contém 10⁷ UFP de BAV inativado, 40 μ g de B5R-DNA ou 40 μ g de H3L-DNA.

5 **4.7.4. Avaliação da resposta imune humoral pós-vacinação (FERREIRA, 2008)**

Grupos contendo quatro camundongos Balb/c machos, com 4 semanas de idade, foram imunizados pela via subcutânea. Os imunógenos foram administrados utilizando os sistemas de dose única, prime-boost homólogo ou prime-boost-10 heterólogo, conforme indicado na FIGURA 12.

Um grupo de 4 animais foi imunizado com amostra VACV-LST (10⁶ PFU/100 μ L) em um sistema de prime-boost homólogo, e um grupo de camundongos foi imunizado apenas com adjuvante. Em todos os grupos, o intervalo entre as imunizações foi de 15 três semanas. Três semanas após a última dose, os animais foram sacrificados, e amostras de sangue foram coletadas para ensaios de soroneutralização, testes de inibição de cometas e ELISA.

20 **4.7.5. Desafio de camundongos vacinados**

A proteção dos sistemas de vacinação sumarizados na FIGURA 12 foi avaliada através do desafio dos camundongos com a amostra viral VACV-WR. Foram utilizados 4 camundongos por grupo, e o desafio foi feito 3 semanas após a última dose. Foi avaliada a proteção contra 5x10⁶ UFP de VACV-WR. Após o desafio, 25 foram analisados parâmetros como a perda de peso e mortalidade. Além disso, foi utilizada uma metodologia descrita por PULFORD (2004) na qual o score da doença foi avaliado, baseado em 5 níveis distintos, que variam entre 0 e 100%: 20% - pilo ereção discreta; 40% - pilo-ereção substancial; 60% -arqueamento de dorso; 80% - edema facial ou plantar e dificuldade respiratória; 100% - morte. A 30 pontuação foi atribuída, considerando que pelo menos 50% dos animais do grupo devessem apresentar os sinais clínicos acima relacionados. Os camundongos imunizados e desafiados foram avaliados até o 14º d.p.i., e então foram

sacrificados por aprofundamento de anestésico (**item 4.6.2.**) seguido por deslocamento cervical.

Prime	Boost
LST-BTT	LST-BTT
BAV	-
BAV	BAV
BAV	B5R-DNA
BAV	H3L-DNA
BAV + H3L-DNA	BAV + H3L-DNA
BAV + B5R-DNA	BAV + B5R-DNA
BAV + B5R-DNA	-
BAV + H3L-DNA	-
BAV + H3L-DNA + B5R-DNA	-
BAV + H3L-DNA + B5R-DNA	BAV + H3L-DNA + B5R-DNA
H3L-DNA	-
H3L-DNA	H3L-DNA
B5R-DNA	-
B5R-DNA	B5R-DNA
B5R-DNA + H3L-DNA	-
B5R-DNA + H3L-DNA	B5R-DNA + H3L-DNA
BAV Inativação térmica	BAV Inativação térmica
BAV + H3L-DNA	BAV + B5R-DNA
Adjuvante	Adjuvante

5

FIGURA 12: Relação dos sistemas de vacinação utilizados neste estudo.

4.8. Clonagem e expressão das proteínas B5R e H3L em sistema procarioto

10 4.8.1. Clonagem de B5R e H3L em pQE9

Visando a expressão de B5R e H3L em sistema procarioto as ORFs completas destes genes foram amplificadas e clonadas no sistema de expressão pQE9 (QIAGEN, EUA). Iniciadores específicos foram designados a partir da análise do 15 genoma completo da amostra VACV-WR (AY243312). As ORFs de B5R e H3L foram analisadas quanto a presença de sítios de restrição internos utilizando a plataforma WebCutter (bio.lundberg.gu.se/cutter2/). A partir destas análises, foi adicionado, a cada iniciador, sítios de restrição específicos para clonagem em pQE9.

20

As sequências dos iniciadores utilizados são: B5R F Sall: 5' GTCGACAAACGATTCCGTTG 3' e B5R R HindIII: 5' AAGCTTTACGGTAGCAATTATGGAAC 3', contendo sítios de Sall e HindIII, respectivamente; para a amplificação e clonagem de H3L em pQE9 foram utilizados os iniciadores: H3L F HindIII: 5' AAGCTTTAGATAAATGC CGGTAAC 3' e H3L R BamHI: 5' GGATCCCGCGCGCGCGCGAAA ACT 3', com os sítios de HindIII e BamHI, respectivamente. Nas reações foram utilizados 2mM de MgCl₂, 10mM de dNTP, 4pmol de cada iniciador, 2U de Taq DNA polimerase e tampão dessa enzima. Como amostra, foram utilizados 50ng de DNA de VACV-WR purificado. As condições térmicas utilizadas foram: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos; seguido por 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, pareamento dos iniciadores a 45°C por 1 minuto e síntese de DNA a 72°C por 1 minuto; por fim, 7 minutos de extensão final a 72°C. Os amplificados foram submetidos a fracionamento por eletroforese (100V) em gel de agarose 1%.

15

Após a amplificação de B5R e H3L a partir de VACV-WR, os fragmentos com tamanho esperado (~950pb) foram extraídos do gel de agarose (Qiagen Gel Extraction Kit), quantificados em espectrofotômetro (Nanodrop 1000), e então subclonados em pGEM-T easy, seguindo as instruções do fabricante. Após a ligação, as contruções pGEMT-B5R e pGEMT-H3L foram propagadas em bactérias *E. coli* DH5α (SAMBROOK *et al.* 1989), e então submetidas a extração de DNA plasmidial, utilizando o Kit Minipreps Plasmidial Extraction (Promega), segundo instruções do fabricante.

25 As contruções pGEMT-B5R e pGEMT-H3L, assim como o vetor plasmidial de expressão pQE9, foram então submetidos a digestão enzimática, utilizando as enzimas HindIII e BamHI ou Sall e HindIII (Fermentas). Após 3 horas de incubação a 37°C, os amplificados foram fracionadas por eletroforese (100V) em gel de agarose 1%. Os fragmentos de interesse, correspondentes aos insertos B5R ou H3L digeridos, e ao vetor pQE9 digerido, foram extraídas do gel de agarose (Qiagen Gel Extraction Kit) e quantificadas em espectrofotômetro (Nanodrop 1000). Em seguida, foi feita a ligação de B5R ou H3L no vetor pQE9, utilizando o Kit T4

DNA ligase (Promega), nas proporções 1:3 e 1:8 (vetor:inserto). Após 12 horas a 4°C, as construções foram submetidas a transformação bacteriana (SAMBROOK et al., 1989), utilizando a linhagem *E. coli* M15. Os clones contendo a construção foram triados por PCR, utilizando iniciadores específicos e/ou do plasmídio (pQE-F 5 e pQE-R).

4.8.2. Cromatografia de afinidade (HOCHULI, 1990)

Clones bacterianos contendo os plasmídios de expressão pQE9 ligados a H3L ou 10 B5R foram inoculados em meio de cultura, contendo antibióticos e incubados por 18 horas a 37 °C sob agitação de 180 rpm. Após este período foi feita a diluição na proporção de 1:10, em meio de cultura, contendo antibióticos e novamente 15 incubado a 37 °C, sob agitação de 180rpm até atingir a DO_{600nm}. Neste momento, foi retirada uma amostra (1mL) da cultura não-induzida, utilizada como controle negativo da expressão e, ao restante da cultura, foram adicionados 4mM de IPTG. O restante foi centrifugado a 4000 rpm (Sorvall RC-5B, rotor GS3) por 30 min. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi homogeneizado com 10% do volume inicial da cultura de tampão A (6M Guanidina HCl, 0.1M fosfato de sódio, 0,01M tris /HCl pH 8,0), e incubado por 30 min sob agitação de 100 rpm. O lisado 20 bacteriano obtido foi centrifugado a 8000 rpm (Sorvall RC-5B, rotor SS34) por 30min a 4°C, o sobrenadante coletado e armazenado, e o pellet utilizado na purificação (FENG et al., 2002). O sedimento foi então resuspendedido em tampão A e submetido a 2 ciclos de sonicação (potência 50%), por 12 minutos cada.

25 A esta solução foi então adicionada resina de quelato de níquel (QIAGEN, EUA) carregada com Ni₂₊. A mistura resina/proteína foi colocada em um tubo cônico de 50 mL, selado e incubado durante 1h à temperatura ambiente sob agitação constante e lenta. Após a ligação da resina as proteínas recombinantes, por intermédio da cauda de histidina, presente na extremidade amino-terminal da 30 proteína, a resina/proteína foi então transferida para uma coluna de 1 cm de diâmetro e 6 cm altura onde foi compactada. Para proceder a eluição da proteína, foram adicionados à coluna tampão de eluição (8M uréia, 0.1M fosfato de sódio,

0,01M tris/ HCl) em diferentes valores de pH, aumentando gradativamente a acidez da solução. O eluato foi coletado em diversas alíquotas, de acordo com o pH. Estas foram mantidas a 4 °C até o momento do uso.

5 **4.8.3. Caracterização da proteína – PAGE (LAEMMLI, 1970).**

Para controle da purificação de B5R e H3L, os eluatos proteicos foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE). Após fervura em tampão de amostra (20% glicerol, 20% SDS, 0,375M Tris pH 8,8, 0,75M, mercaptoetanol e 10 0,25 % v/v do corante azul de bromofenol) (Sigma, EUA), as amostras foram separadas por fracionamento eletroforético em gel de poliacrilamida bifásico a 10% (acrilamida/bisacrilamida na proporção 30:0,8) em tampão Tris-glicina (Tris base 25 mM pH 8,3, glicina 250 mM, SDS 0,1%). O fracionamento foi feito por 3 horas a 100V. O gel foi corado em solução coomassie blue (0,25% p/v do corante 15 coomassie blue R 250) (Sigma, EUA) durante 1 hora, à temperatura ambiente e sob agitação constante. Em seguida, foi descorado por 2h em solução fixadora I (40% metanol, 10% ácido acético glacial, 50% água) e então transferido para outra solução descorante por 2 h, fixadora II (etanol 10%, ácido acético 5%, água 85%) 20 até a visualização das bandas, ao fundo do gel. Os géis foram desidratados entre duas folhas de papel celofane e presas sobre uma placa de vidro, a temperatura ambiente durante 48 h.

25 **4.9. Ensaio de Western blot**

Para caracterizar as protéinas H3L e B5R recombinantes, estas foram submetidas à ensaios de Western blot utilizando anticorpos monoclonais específicos. Com este intuito, tampão LB (“loading buffer”) 5× (Tris-HCl 0,5M pH 30 6,8; β-mercaptoetanol 5%; azul de bromofenol 0,1% (p/v); glicerol 20% (p/v)) foi adicionado a alíquotas de cerca de 50ng das proteínas recombinantes, que foram então desnaturadas por 5 min a 99°C. As proteínas foram fracionadas em gel de 10% poliacrilamida/SDS (PAGE) a 100V e transferidas para membrana de

nitrocelulose (Hybond ECL, GE Healthcare), conforme o protocolo do “*Kit Bio-Rad Transferency*” (Bio-Rad Laboratories, USA). Após a transferência, as membranas foram coradas com Ponceau 1% para a verificação da eficiência da mesma. A seguir, as membranas foram bloqueadas durante 1 hora em solução de leite em pó
5 desnatado a 5% (p/v) e Tween-20 a 0,1% (v/v) em PBS. Após o bloqueio, as membranas foram lavadas três vezes em PBS/Tween-20 a 0,1% e incubadas com os anticorpos primários desejados por 24h a 4°C, na diluição de 1:3000, em albumina sérica bovina (BSA) a 5% (p/v) em PBS/Tween-20. As membranas foram novamente lavadas três vezes em PBS/Tween-20 e incubadas, por 1h a
10 temperatura ambiente, com o anticorpo secundário conjugado a peroxidase, na diluição recomendada pelo fabricante em leite em pó desnatado a 5% (p/v) em PBS/Tween-20. Após nova sessão de lavagens por três vezes em PBS/Tween-20, as membranas foram incubadas em solução reveladora ECL Plus (GE Healthcare)
15 pelo tempo recomendado pelo fabricante, expostas contra filme de raio X (Hyperfilm ECL-GE Healthcare) e reveladas de acordo com as instruções do fabricante (Kodak). Os anticorpos primários monoclonais anti-B5R e –H3L foram gentilmente cedidos pelo Dr. Bernard Moss (National Institute of Allergy and Infectious Diseases, E.U.A.)

20 4.10. ELISA anti-OPV utilizando B5R e H3L recombinantes

Visando avaliar a presença de anticorpos totais anti-VACV em camundongos imunizados com as vacinas BAV, B5R-DNA e/ou H3L-DNA (**item 4.7.5.**), um ELISA foi padronizado utilizando como抗ígenos as proteínas recombinantes B5R e H3L.
25 Para isso, um total de 50ng de B5R ou H3L recombinantes foi diluído em tampão carbonato (0,01M, pH6) e então adicionadas em placas para ELISA (Maxisorp Nunc, Apogent, EUA). Após 15 horas, o antígeno foi retirado e a placa foi lavada 3 vezes com uma solução de Tween-20 0,05% em PBS. O bloqueio foi feito utilizando uma solução de leite em pó desnatado (1%) diluído em PBS-Tween
30 0,05%. Após 2 horas de incubação a 37°C, a solução de bloqueio foi retirada e a placa foi lavada três vezes. Em seguida foram adicionadas as amostras de soro murino, diluídas 100 vezes em PBS-Tween 0,05%. Após 1 hora de incubação, as

amostras de soro foram retiradas e a placa foi novamente lavada 3 vezes com PBS-Tween 0,05%. Foi então adicionado conjugado anti-IgG murino, na diluição de 1:20000 (Sigma-Aldrich, Alemanha). As placas foram lavadas 4 vezes, e em seguida adicionado o substrato o-phenilenediamina dihidroclídrico (Sigma-Aldrich, 5 Alemanha) e 0,03% de peróxido de hidrogênio. Após 10 minutos, a reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico 2M. A leitura dos resultados foi feito em espectrofotômetro (492nm).

10

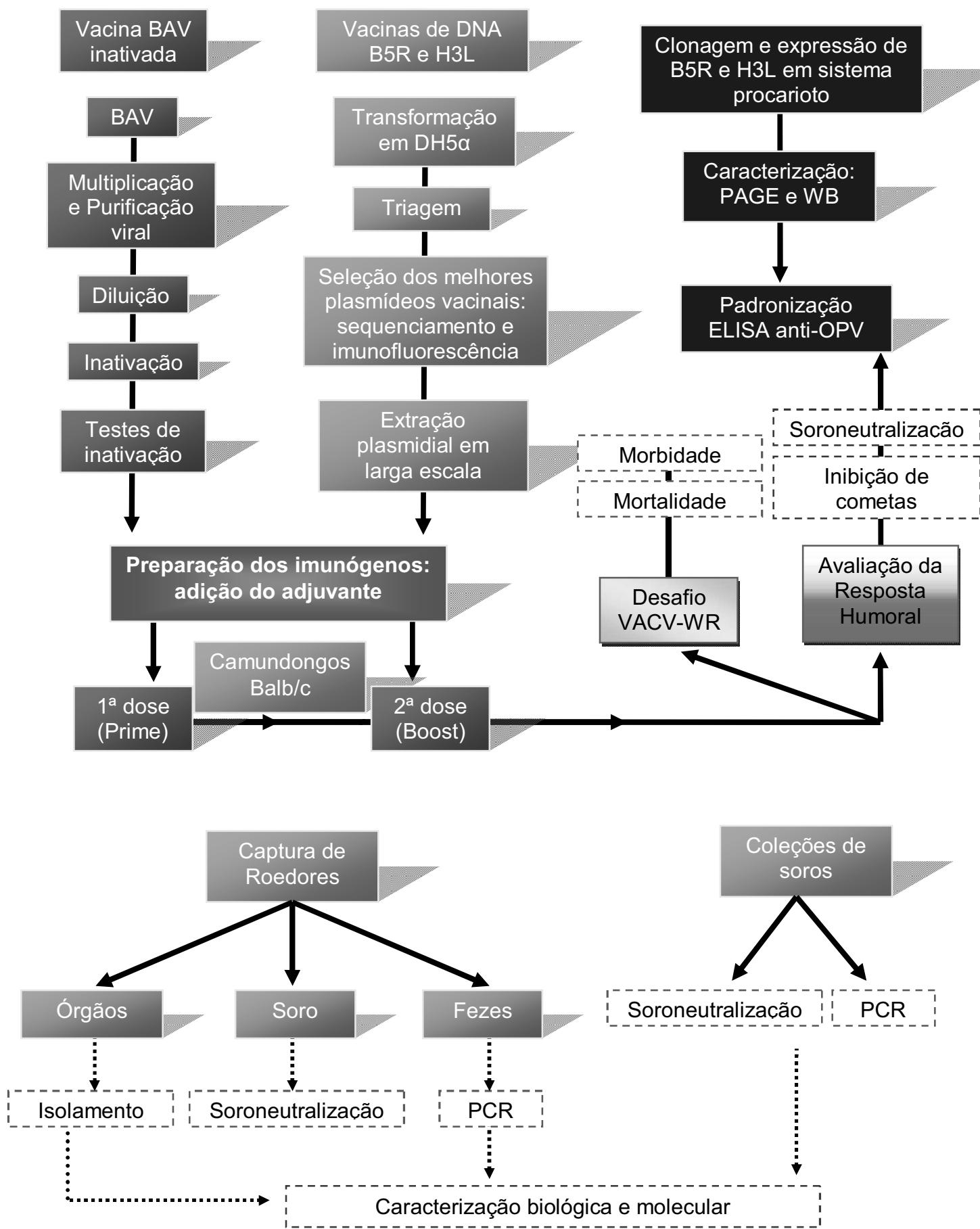
15

20

25

30

FLUXOGRAMA DE TRABALHO



V. RESULTADOS

5.1. Determinação de hospedeiros e reservatórios naturais de VACV

5.1.1. Análise de roedores e espécimes clínicos

5

Objetivando analisar se espécies de roedores poderiam representar alguns dos hospedeiros de VACV, foram feitas quatro expedições de campo visando a captura desses animais. As expedições foram feitas em Paraguaçu (2008), Doresópolis (2009), Curvelo (2006) e em Acaiaca/Goiabeiras, dois distritos de Mariana (2005 e 10 2009). Amostras de fezes de roedores também foram coletadas nas propriedades rurais visitadas, com o objetivo de verificar a presença de VACV nas mesmas. Amostras de crosta, líquido vesicular e sangue também foram coletadas de humanos e bovinos afetados pela VB durante os surtos. Ao todo, foram capturados 15 19 roedores, todos peridomiciliares, pertencentes às espécies *Mus musculus*, *Rattus rattus* ou *Rattus norvergicus*. Esses animais foram capturados em instalações próximas às sedes das propriedades, como currais, armazéns, granjas de porcos e galinheiros, e também nas adjacências, em locais como bordas de matas, plantações de milho, cana e feijão. Após a captura, foram coletadas amostras de sangue e órgãos dos roedores, que posteriormente foram analisados 20 no Laboratório de Vírus, UFMG.

Embora não tenham sido observadas lesões epidérmicas aparentes em nenhum dos roedores capturados, os ensaios de soroneutralização revelaram a presença de anticorpos neutralizantes anti-OPV nos soros de dois roedores, capturados 25 durante a expedição feita em Acaiaca em 2005 (TABELA 6). Os títulos dos soros positivos foram de 1:40 e 1:320, correspondentes a dois camundongos da espécie *Mus musculus* (MmA1 e MmA2 [TABELA 3]), capturados nas proximidades de uma lavoura de milho. As outras 17 amostras de soro de roedores não apresentaram nenhuma atividade neutralizante contra VACV-WR, a amostra viral utilizada nos 30 ensaios de soroneutralização. Entretanto, a análise dos soros humanos e bovinos coletados durante as expedições mostraram altos títulos de anticorpos neutralizantes, variando de 1:160 a 1:640 (TABELA 6), incluindo as amostras de

soro bovino coletadas em Curvelo, local onde não estava ocorrendo surto de VB na ocasião da expedição. A análise dos soros bovinos coletados em Acaíaca em 2009 revelou que bovinos expostos ao surto em 2005 (segundo os proprietários), ainda apresentavam títulos altos de anticorpos anti-OPV (1:180) (TABELA 6).

5

TABELA 6: Títulos de anticorpos neutralizantes anti-OPV em amostras de soro murino, bovino e humano, coletadas durante as expedições de campo.*

Localidade	Ano	Espécie	Título de anticorpos neutralizantes
Mariana / Acaíaca	2005	<i>Mus musculus</i>	1:320
Mariana / Acaíaca	2005	<i>Mus musculus</i>	1:40
Mariana / Acaíaca	2005	<i>Bos taurus</i>	1:320
Mariana / Acaíaca	2005	<i>Homo sapiens</i>	1:640
Mariana / Acaíaca	2009	<i>Bos taurus</i>	1:160
Mariana / Acaíaca	2009	<i>Bos taurus</i>	1:160
Paraguaçu	2008	<i>Bos taurus</i>	1:160
Paraguaçu	2008	<i>Homo sapiens</i>	1:320
Doresópolis	2009	<i>Homo sapiens</i>	1:160
Doresópolis	2009	<i>Bos taurus</i>	1:160
Doresópolis	2009	<i>Homo sapiens</i>	1:160
Doresópolis	2009	<i>Homo sapiens</i>	1:160
Curvelo	2009	<i>Bos taurus</i>	1:160
Curvelo	2009	<i>Bos taurus</i>	1:320
Curvelo	2009	<i>Bos taurus</i>	1:160
Curvelo	2009	<i>Bos taurus</i>	1:160

*As amostras de soro OPV-negativas não estão representadas na TABELA.

10

Após os ensaios de soroneutralização, foram feitas tentativas de isolamento viral, a partir dos órgãos coletados dos roedores capturados. Foram utilizados, em paralelo, três tipos celulares para o isolamento, BSC-40, CEF e Vero, com o mínimo de duas passagens cegas. As células de cultivo primário, CEF, mostraram maior sensibilidade, e os resultados apresentados na TABELA 7 correspondem às tentativas de isolamento feitas nesta célula.

15

Ao todo, foram testadas 118 amostras de órgãos, incluindo cérebro, fígado, rins, gônadas, intestino, peritônio, estômago, pulmões e traquéia. Os testes de isolamento revelaram efeito citopático típico de poxvírus nas células infectadas com as gônadas ou com o peritônio coletados do camundongo MmA1, um dos

20

animais positivos nos ensaios de soroneutralização. Estes efeitos correspondem à formação de placas de lise, apresentando bordas com células em proliferação e uma região central com células arredondadas ou mortas. O mesmo efeito foi observado nas células onde foram inoculadas amostras de crosta ou líquido vesicular, humanas e bovinas, coletadas durante os surtos de VACV. Entretanto, não foi possível detectar efeito similar nas células infectadas com outros órgãos de MmA1, nem quaisquer órgão de outro roedor, incluindo MmA2 (TABELA 7).

Amostras de fezes de roedores coletadas durante as expedições, assim como uma 10 carcaça de camundongo coletada na cidade de Curvelo, foram submetidas à detecção de DNA viral pela PCR *semi-nested vgf*, e isolamento em células CEF, Vero ou BSC-40. Todavia não foi possível detectar VACV em nenhuma dessas amostras.

15 **TABELA 7: Teste de isolamento viral a partir de órgãos de roedores capturados.**
Ensaios feitos em CEF. Resultados correspondentes à 2^a passagem cega.

Espécie	Identificação	Cérebro	Fígado	Rins	Gônadas	Intestino	Peritônio	Estômago	Pulmões	Traquéia
<i>Mus musculus</i>	MmA1	-	-	-	+	-	+	-	S	-
<i>Mus musculus</i>	MmA2	-	-	-	NF	NF	NF	-	-	NF
<i>Mus musculus</i>	MmA3	-	-	-	NF	NF	NF	-	-	NF
<i>Mus musculus</i>	MmA4	-	-	-	NF	NF	NF	-	-	NF
<i>Rattus rattus</i>	RrA1	-	-	-	NF	NF	NF	-	-	NF
<i>Rattus rattus</i>	RrA2	-	-	-	NF	NF	NF	-	S	NF
<i>Mus musculus</i>	MmG1	-	S	-	NF	NF	NF	-	-	NF
<i>Rattus rattus</i>	RrG1	S	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Rattus rattus</i>	RrG2	-	-	-	NF	NF	NF	-	-	NF
<i>Mus musculus</i>	MmG2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Rattus sp.</i>	RG1	-	S	-	NF	NF	NF	-	-	NF
<i>Rattus sp.</i>	RG2	-	-	-	NF	NF	NF	-	-	NF
<i>Mus musculus</i>	MmG3	-	-	-	NF	NF	NF	-	-	NF
<i>Rattus norvergicus</i>	RnC1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Mus musculus</i>	MmC1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Mus musculus</i>	MmC2	-	-	-	-	-	-	-	S	-
<i>Mus musculus</i>	MmC3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Rattus norvergicus</i>	RnC2	-	-	-	S	-	-	-	-	-
<i>Mus musculus</i>	MmC4	-	-	-	-	-	-	-	-	-

NF: não feito; S: suspeito, mas não confirmado em passagens posteriores; +: positivo; -:negativo

20 A amostra viral isolada do peritônio de MmA1 foi denominada Mariana vírus murino (MARV-M). Esta amostra foi multiplicada e purificada em colchão de sacarose para posteriores testes de caracterização biológica e molecular. Com o intuito de analisar se MARV-M era o mesmo agente etiológico das lesões exantemáticas observadas durante o surto em Mariana, também foram multiplicadas e purificadas 25 uma amostra bovina (MARV-B) e uma amostra humana (MARV-H), oriundas de

lesões exantemáticas observadas durante o mesmo surto. MARV-M, MARV-H e MARV-B foram comparados por testes biológicos e moleculares. PCR dos órgãos dos camundongos capturados, de fezes coletadas nas propriedades visitadas e de líquido vesiculures e crostas bovinas e humanas confirmaram os resultados dos 5 testes de isolamento viral.

5.1.1.2. Caracterização biológica e molecular dos isolados MARV

5.1.1.2.1. Ensaio de imunofluorescência e de infectividade viral

10 Com o intuito de confirmar se os isolados MARV-M, MARV-H e MARV-B poderiam ser classificados como membros do gênero OPV, foram feitos testes de imunofluorescência, utilizando anticorpo monoclonal anti-B5R. B5R é uma glicoproteína viral de superfície dos poxvírus, que fica ancorada em membranas celulares durante o ciclo de multiplicação do vírus. As células foram infectadas sob
15 a M.O.I. de 3, incubadas por 24 horas, e então tratadas com os anticorpos primário anti-B5R e secundário, seguido pela incubação com DAPI, um marcador de ácido nucléico.

20 Os ensaios de imunofluorescência revelaram que células BSC-40, infectadas com MARV-M, MARV-B e MARV-H, apresentavam, 24 horas após a infecção, a marcação da proteína B5R pontualmente distribuída pela membrana plasmática e pelo complexo de Golgi (FIGURA 13), indicando a multiplicação de algum OPV. O mesmo resultado foi observado nas células infectadas pela amostra VACV-WR, utilizada como controle positivo. A coloração com DAPI, marcador de ácido 25 nucléico, revelou a presença de fábricas virais nas células infectadas com os isolados MARV ou com VACV-WR. As fábricas virais são pequenos concentrados de DNA próximo ao núcleo, e correspondem ao sítio celular onde é feita a maior parte da montagem da progénie viral dos poxvírus. Não foram visualizadas fábricas virais nem a marcação de B5R nas células não infectadas (FIGURA 13).

30

Paralelamente aos testes de imunofluorescência, ensaios de infectividade viral foram feitos em células BSC-40. Os isolados MARV-M, MARV-H e MARV-B foram

comparados entre si e com VACV-WR, através de ensios de curva de ciclo único e fenótipo de placas virais. Neste último teste, células BSC-40 foram infectadas com a M.O.I. de 0,01, e analisadas 48 horas após a infecção. As três amostras testadas, MARV-M, MARV-H e MARV-B apresentaram placas pequenas, com o diâmetro médio de 0,6 mm. Todavia, a monocamada infectada com VACV-WR apresentou placas maiores, com o diâmetro médio de 1,4 mm (FIGURA 14). Nenhuma placa viral foi observada na monocamada infectada com PBS.

O outro ensaio de infectividade viral *in vitro*, também feito em células BSC-40, revelou que os isolados MARV apresentam curvas de ciclo único muito similares entre si, e distintas estatisticamente de VACV-WR ($p<0,04$, PRISM). Enquanto MARV-M, MARV-H e MARV-B apresentaram um crescimento final de aproximadamente 1 log, VACV-WR cresceu 1,5 log (FIGURA 14). Nenhuma placa foi observada na monocamada infectada com PBS (dados não mostrados).

15

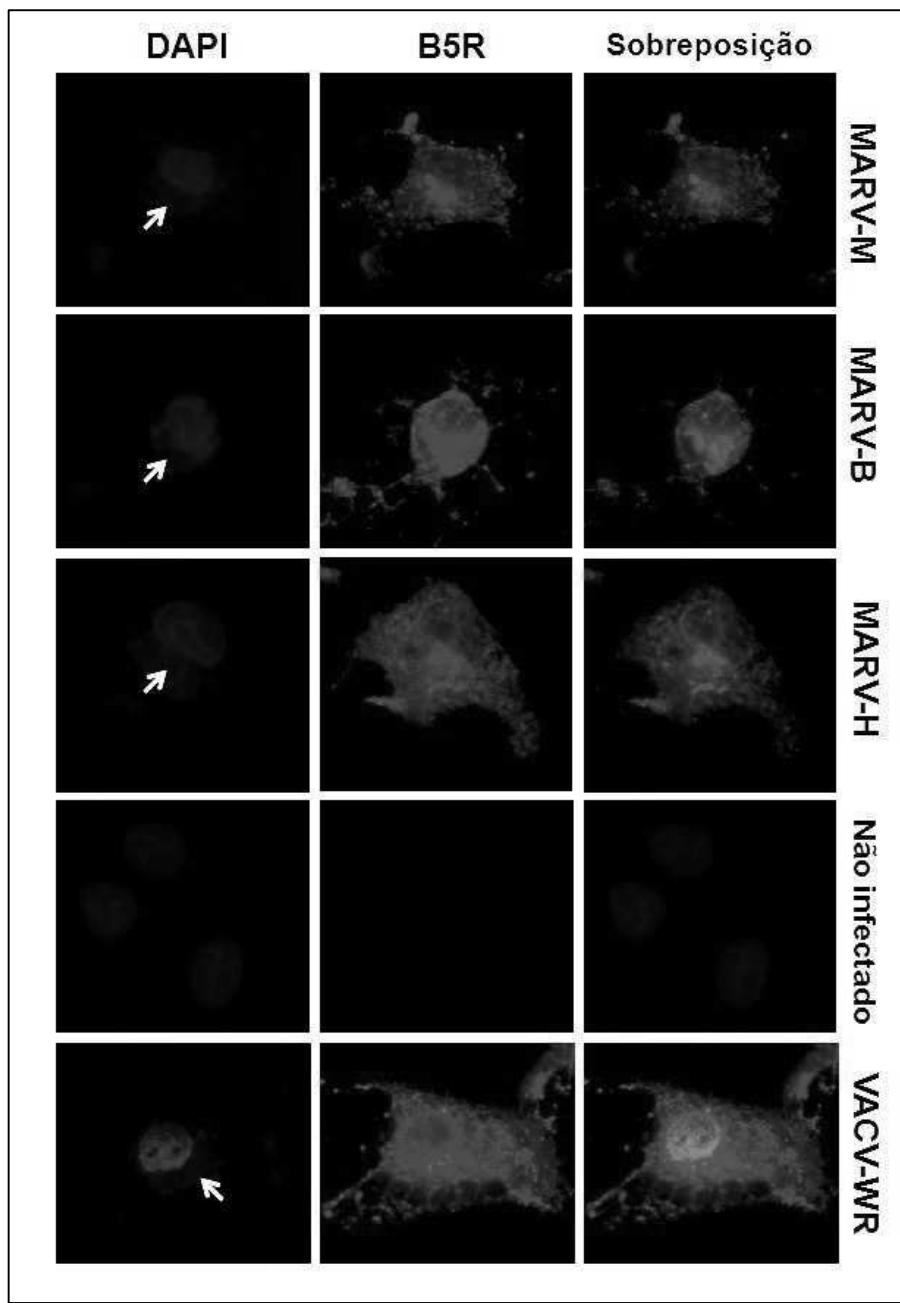


FIGURA 13: Ensaios de imunofluorescência de células BSC-40 infectadas com MARV-M, MARV-H, MARV-B ou VACV-WR. Células BSC-40 foram infectadas com MARV-M, MARV-H ou MARV-B, além de VACV-WR como controle positivo. 24 horas após a infecção, as células foram incubadas com um anticorpo primário anti-B5R, e posteriormente com um anticorpo secundário anti-mouse conjugado com rodamina. Para a marcação de ácidos nucléicos foi utilizado DAPI. As imagens foram obtidas no microscópio de fluorescência Olympus BX51. As setas indicam as fábricas virais. Em vermelho, a glicoproteína viral B5R de OPV.

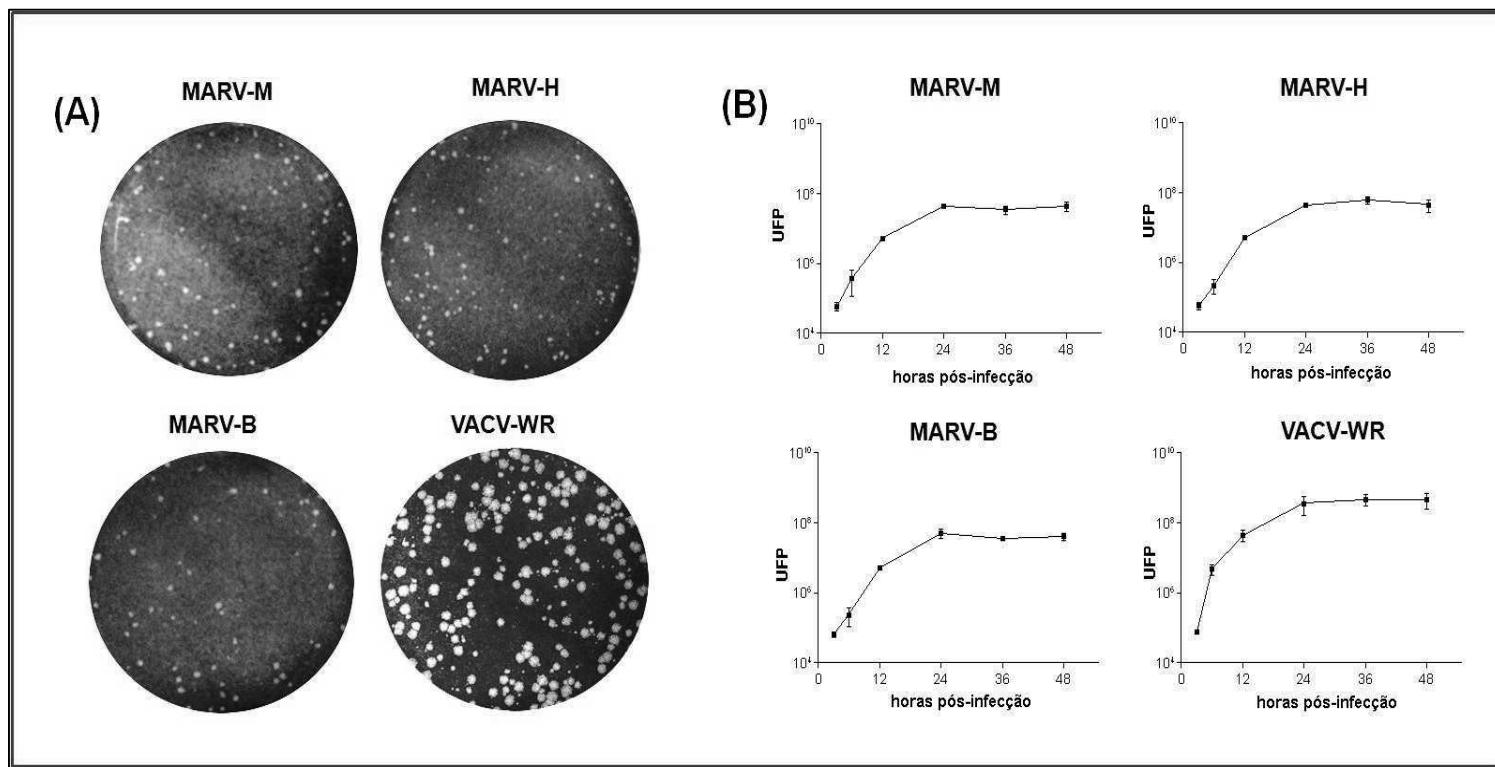


FIGURA 14: Ensaios de fenótipo de placa e curva de ciclo único de MARV-M, MARV-H, MARV-B e VACV-WR em células BSC-40. (A) Os ensaios de fenótipo de placa de MARV-M, MARV-H e MARV-B e VACV-WR, foram determinados feitos utilizando células BSC-40 infectadas com a M.O.I. de 0,01 e incubadas por 48 horas. Após este período, as monocamadas foram fixadas. A coloração com cristal violeta revelou que os isolados MARV apresentam placas de tamanho pequenas e similares entre si, mas diferentes de VACV-WR. (B) Os ensaios de curva de ciclo único foram feitos com células BSC-40 infectadas com a M.O.I. de 10, incubadas por até 48 horas. O título viral foi determinado em diferentes períodos da infecção, mostrando que os isolados MARV apresentaram um crescimento final de 1 log, enquanto VACV-WR cresceu 1,5 log.

5.1.1.2.2. Isolados MARV: inoculação em MCA e PCR para a detecção de genes específicos de OPV

Levando em conta os resultados apresentados no item anterior, a caracterização dos isolados MARV prosseguiu com a inoculação dessas amostras em membrana córioalantóide (MCA) de ovos de galinhas embrionados, para a observação de *pocks* virais. Um total de 10^4 partículas de MARV-M, MARV-H, MARV-B ou VACV-WR foi inoculado por ovo, que permaneceu em incubação por 72 horas após a inoculação. Após este período, os ovos foram mantidos por 24 horas a 4°C para causar a morte do embrião.

Os ovos inoculados com MARV-M, MARV-H ou MARV-B revelaram *pocks* grandes e esbranquiçados, típicos de VACV, disseminados por toda a superfície da MCA (FIGURA 15). Este resultado foi igualmente observado nos ovos inoculados com VACV-WR. Nenhum *pock* foi visualizado nas membranas inoculadas com PBS.

Avançando na caracterização dos isolados, MARV-M, MARV-B e MARV-H foram submetidas a ensaios de PCR, visando a identificação de genes virais específicos de OPV. Foram utilizados iniciadores para a amplificação dos genes *tk*, *vif* e *ha*, e as reações foram feitas utilizando 10^2 UFP dos vírus purificados como amostra. Os amplificados foram fracionados em gel de agarose 1%, sob a voltagem de 100V.

As PCRs dos genes *tk*, *vif* e *ha* revelaram a amplificação de fragmentos de 528, 381 e 960 pb, respectivamente, a partir dos isolados MARV-M, MARV-B e MARV-H, assim como a partir do controle positivo, VACV-WR (FIGURA 15). Nenhuma amplificação foi observada nos controles negativos das três reações. As reações foram feitas em triplicata, e os amplificados foram utilizados para reações de sequenciamento.

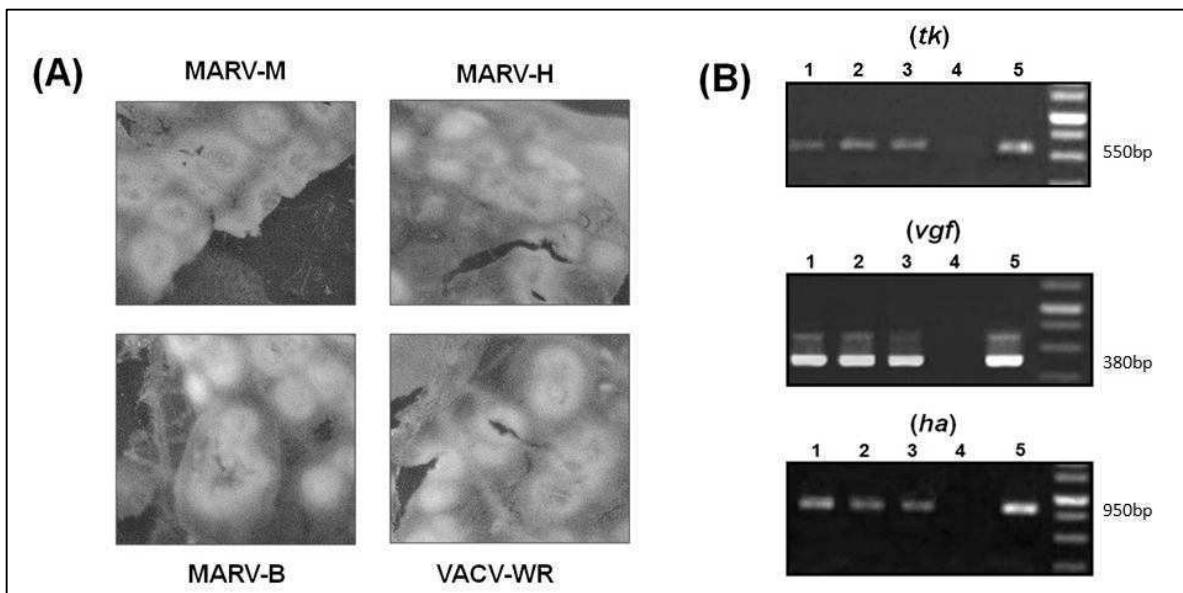


FIGURA 15: Isolados MARV: inoculação em MCA e PCR de genes específicos de OPV. (A) MCA de ovos de galinha embrionados foi inoculada com 10^4 UFP dos isolados MARV ou VACV-WR. Após 72 horas de incubação, foi possível observar que todas as amostras induziram a formação de pocks esbranquiçados, típicos de VACV. **(B)** Os isolados MARV foram submetidos a ensaios de PCRs, nas quais foram utilizados iniciadores específicos para os genes *tk*, *vgf* e *ha*, de OPV. Canaleta 1: MARV-M; Canaleta 2: MARV-H; Canaleta 3: MARV-B; Canaleta 4: água (controle negativo); Canaleta 5: VACV-WR (controle positivo). Os amplificados foram fracionados em gel de agarose 1%, sob a voltagem de 100V.

5.1.1.2.3. Sequenciamento, comparação e análises filogenéticas dos isolados MARV

Visando avaliar a semelhança genética entre os três isolados MARV, e a relação desses isolados com outras amostras de OPV, os amplificados obtidos a partir das PCRs de *tk*, *vfg* e *ha* foram sequenciados de forma direta, sem clonagem molecular. O método de sequenciamento direto foi selecionado para garantir que as sequências nucleotídicas obtidas fossem mais fidedignas aos genes virais que foram amplificados, uma vez que a clonagem e a multiplicação plasmidial em bactérias podem levar ao acúmulo de erros nas sequências clonadas. Cada gene foi sequenciado 6 vezes, e um consenso foi feito utilizando a plataforma online Asparagin-Cenargen (genoma.embrapa.br/phph/). Sequências consenso de alta qualidade foram obtidas e analisadas utilizando o programa MEGA 4.0.

A análise das sequências dos genes *tk*, *vfg* e *ha*, obtidas a partir de MARV-M, MARV-H e MARV-B, revelou alta identidade entre esses isolados e amostras de VACV disponíveis no GenBank. As sequências de aminoácidos inferidas (MEGA 4.0) de *vfg* e *ha* (FIGURA 16) mostram um perfeito alinhamento entre os isolados MARV, sem nenhuma inserção, deleção ou alteração de elementos. As sequências nucleotídicas de *tk*, *vfg* e *ha* de MARV foram depositadas no GenBank e receberam os números de acesso GQ226042, GQ226041 e GQ226040, respectivamente.

O alinhamento das sequências de *ha* revela que os isolados MARV apresentam uma deleção de 6 aminoácidos no final da região codificadora do gene, presente também em diversas amostras de VACV isoladas durante surtos de VB no Brasil, como ARAV, CTGV, Serro, GP2 e MURV; mas ausente nas amostras GP1, VBH, BAV e SAV. Embora a amostra vacinal IOC apresente esta deleção em *ha*, outras amostras de VACV utilizadas como vacinas no Brasil, como Malbran e LST-BTT, não a possuem (FIGURA 16).

VACV-TO_CA1	IIRSFADSGN AIEETTLPEIT NATTDIPAIR LCGPEGDGYC LHGDCIHARD IDGMYCRCSH GYTGIROQHV VLVDYCRSEN PNTTTSYIPS PGIMLVLVGI IIT--CCCLS VYKETRRTK- LPIQ	[124]
VACV-TO_CA2		[124]
VACV-TO_CA3		[124]
VACV-TO_CA4		[124]
VACV-TO_AC1		[124]
VACV-TO_AC2		[124]
VACV-WR_(AY243312)	S.	[124]
VACV-MURV_(DQ247772)	S.	[124]
VACV-GP1V_(DQ206440)	S.	[124]
VACV-LST_(DQ121394)		[124]
VACV-GP2V_(DQ206441)		[124]
VACV-SAV_(AY523995)	S.	[124]
VACV-MARV-M	S.	[124]
VACV-MARV-B	S.	[124]
VACV-MARV-H	S.	[124]
VACV-ARAV_(AF503170)		[124]
VACV-PSTV_(DQ08562)		[124]
HPXV_(DQ792504)		[124]
CPXV-Germany_(DQ437593)	S. I. G.	[124]
CPXV-BR_(AF482758)	S.	[124]
MPXV-Zaire_(AF3801380)	L. S.	[124]
MPXV-Congo_(AY743598)	L. S.	[124]
VARV-Pakistan_(DQ437589)	N. S. T.	[124]
VARV-Somalia_(DQ437590)	N. S. T.	[124]
VACV-BAV_(U79140)	S.	[124]
ECMV_(AF163845)	S. V.	[124]

VACV-TO_CA	LSGSTHSPEI SSEKPEDII N FNCSSVFEIA TPEPITIONVE DHTDTVYTTS DSINTVSASS EESTTDETPE PITDK-EDHT VTDTVSYTTV STSSGIVTTK LTTDDADLY-	D-TV [240]
VACV-TO_AC	K.	[240]
VACV-CTGV-MU07_(FJ545689)		[240]
VACV-GP1V_(DQ206436)	K. DY. S.	[240]
VACV-VBH_(DQ206435)	K. DY. S.	[240]
VACV-SPAN232_(DQ222922)	K. DY. S.	[240]
VACV-BeAn58058_(DQ206442)	K. DY. S.	[240]
VACV-RIA_(DQ810280)		[240]
VACV-MURV_(DQ247770)		[240]
VACV-CTGV_(AF229247)		[240]
VACV-LOR_(DQ810281)		[240]
VACV-ARAV_(AY523994)		[240]
VACV-MARV-M		[240]
VACV-MARV-H		[240]
VACV-MARV-B		[240]
VACV-SV2_(EF063677)		[240]
VACV-PSTV_(DQ070848)		[240]
VACV-GP2V_(DQ206437)		[240]
VACV-IOC_(AF225248)	DY. S.	[240]
VACV-Bf13906_(AF375077)	Y. DY. S.	[240]
VACV-Bf181_(AF375078)	F. DY. S.	[240]
VACV-Ankara_(U944848)	DY. S.	[240]
VACV-WR_(AY243312)	K. DY. S.	[240]
VACV-LST_(AY678276)	DY. S.	[240]
VACV-Acamis_3_(AY313848)		[240]
VACV-MALBRAN_(AY146624)	DY. S.	[240]
VACV-LBT_(EF175985)	DY. S.	[240]
VACV-DUKE_(DQ439815)		[240]
HSPV_(DQ79250)		[240]
Rabbitpox_(AF37511)		[240]
MPXV_mpv3945_(AF375098)	--. I. S.	[240]
MPXV_zaire_(DQ011155)	--. I. S.	[240]
MPXV_Congo_(DQ011154)	--. I. S.	[240]
MPXV_Sierra Leone_(AY741551)	--. I. S.	[240]
CPXV-cowHA12_(AY902253)	DY. S.	[240]
CPXV-Germany_(DQ437593)	DY. S.	[240]
CPXV-90-1_(AF375087)	DY. S.	[240]
VARV_(DQ437589)	S. DY. N. L. G. N.	[240]
	I. T. G. E. N.	[240]
	I. T. G. E. N.	[240]
	I. T. G. E. N.	[240]
	I. T. G. E. N.	[240]
	I. T. G. E. N.	[240]
	E. S. AN.	[240]

FIGURA 16: Alinhamento das sequências dos genes *vgf* (A) e *ha* (B). As sequências inferidas de aminoácidos obtidas no presente estudo foram alinhadas com sequências de outros OPV disponíveis no GenBank, utilizando o programa MEGA 4.0. Em destaque (vermelho, azul e vinho) as sequências obtidas e analisadas no presente trabalho, a partir de amostras coletadas em Mariana (MG) e Ipueiras/Lajeado (TO).

A análise do percentual de similaridade do gene *ha* (FIGURA 18) entre os OPV mostra que os isolados MARV apresentam 100% de identidade com amostras de VACV isoladas durante surtos de VB, como Cantagalo-Mu07, RIA, LOR, ARAV e Serro. A análise dos percentuais de similaridade dos genes *tk* e *vgf* (FIGURA 17) entre os OPV revela que ainda mais amostras de VACV possuem valores de identidade igual ou muito próximos de 100% quando comparadas aos MARV, uma vez que esses genes são mais conservados.

10

Baseado nas sequências nucleotídicas dos genes *vgf* e *ha*, duas árvores filogenéticas foram construídas, utilizando o programa MEGA 4.0 (FIGURA 19). As árvores foram construídas utilizando a metodologia da máxima parcimônia, com valores de significância baseados em 1000 replicatas.

15

A análise da árvore filogenética construída baseada no gene *ha* mostra que MARV se agrupa com diversas amostras de VACV. É possível observar que as amostras de VACV formam um grande ramo, segregado de VARV, CPXV e MPXV. Além disso, a árvore baseada em *ha* mostra uma clara separação das amostras brasileiras de VACV em dois grupos: um composto por MARV, ARAV, PSTV, CTGV, MURV, Serro, GP2V, entre outros; e outro grupo formado por VBH, GP1V, BAV e SAV. A amostra IOC, apesar de apresentar a deleção de 6 aminoácidos no gene *ha*, se agrupa com outras amostras vacinais, como Lister e Ankara (FIGURA 19). Pelo fato do gene *vgf* ser mais conservado, a visualização de tal separação das amostras de VACV não pode ser visto na árvore construída baseada nas sequências nucleotídicas deste gene. Todavia, assim como foi observado para *ha*, na árvore de *vgf* é possível ver que MARV se agrupa com diversas amostras de VACV.

<i>timidina quinase (tk)</i>																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1 VACV-GP2V	100,00															
2 VACV-MARV	100,00															
3 VACV-S2V	100,00	100,00														
4 VACV-GP1V	100,00	100,00	100,00													
5 CPXV	100,00	100,00	100,00	100,00												
6 VACV-WR	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00											
7 VACV-Cotia	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00										
8 VACV-BAV	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00									
9 VACV-PSTV	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00								
10 VACV-MURV	99,80	99,80	99,80	99,80	99,80	99,80	99,80	99,80	99,80							
11 VACV-LST	99,80	99,80	99,80	99,80	99,80	99,80	99,80	99,80	99,80	99,80	99,80					
12 ECMV	99,80	99,80	99,80	99,80	99,80	99,80	99,80	99,80	99,80	99,80	99,80	99,80				
13 HSV	99,00	99,00	99,00	99,00	99,00	99,00	99,00	99,00	99,00	99,00	99,00	99,00	99,00	99,00		
14 MPXV	97,70	97,70	97,70	97,70	97,70	97,70	97,70	97,70	97,70	97,70	97,70	97,70	97,70	97,70	97,70	
15 VARV	97,50	97,50	97,50	97,50	97,50	97,50	97,50	97,50	97,50	97,50	97,50	97,50	97,50	97,50	97,50	
16 TATV	97,50	97,50	97,50	97,50	97,50	97,50	97,50	97,50	97,50	97,50	97,50	97,50	97,50	97,50	97,50	98,40

<i>fator de crescimento viral (vgf)</i>																		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1 VACV-TO*																		
2 VACV-WR	99,40																	
3 VACV-MARV*	99,40	100,00																
4 VACV-MURV	99,40	100,00	100,00															
5 VACV-GP1V	99,40	100,00	100,00	100,00														
6 VACV-LST	99,40	99,40	99,40	99,40	99,40													
7 VACV-GP2V	100,00	99,40	99,40	99,40	99,40	99,40												
8 VACV-BAV	98,90	99,40	99,40	99,40	99,40	98,90	98,90											
9 VACV-SA9	98,30	98,90	98,90	98,90	98,90	98,30	98,30	98,60										
10 VACV-ARAV	99,40	99,40	99,40	99,40	99,40	99,40	99,40	99,40	99,40	99,40	99,40	99,40						
11 VACV-PSTV	100,00	99,40	99,40	99,40	99,40	99,40	99,40	100,00	98,90	98,30	99,40							
12 HPXV	99,70	99,70	99,70	99,70	99,70	99,70	99,70	99,70	99,70	99,70	99,70	99,70	99,70					
13 CPXV-Germany	94,10	94,70	94,70	94,70	94,70	94,10	94,10	94,10	94,40	94,10	94,40	94,10	94,40	94,10	94,40			
14 CPXV-BR	95,80	96,40	96,40	96,40	96,40	95,80	95,80	96,10	95,80	96,10	95,80	96,10	96,10	96,10	96,10	96,00		
15 MPXV-Zaire	98,40	96,90	96,90	96,90	96,90	96,40	96,40	96,60	96,40	96,60	96,40	96,50	95,50	97,20				
16 MPXV-Congo	96,10	96,60	96,60	96,60	96,60	96,10	96,10	96,40	96,10	96,40	96,10	96,40	95,20	96,90	99,70			
17 VARV-Pakistan	94,10	94,10	94,10	94,10	94,10	94,10	94,10	93,80	93,60	94,40	94,10	94,40	90,80	92,40	92,70	92,40		
18 VARV-Somália	94,10	94,10	94,10	94,10	94,10	94,10	94,10	93,80	93,60	94,40	94,10	94,40	90,80	92,40	92,70	92,40	100,00	

FIGURA 17: Percentual de identidade entre OPV, baseado nas sequências nucleotídicas dos genes *tk* e *vgf*. As sequências nucleotídicas obtidas no presente estudo foram comparadas com as sequências de outros OPV disponíveis no GenBank, utilizando o programa MEGA 4.0. Em destaque (vermelho e azul) as sequências obtidas e analisadas no presente trabalho, a partir de amostras coletadas em Mariana (MG) e Ipueiras/Lajeado (TO).

FIGURA 18: Percentual de identidade entre OPV, baseado nas sequências nucleotídicas do gene *ha*. As sequências nucleotídicas obtidas no presente estudo foram comparadas com as sequências de outros OPV, utilizando o programa MEGA 4.0. Em destaque (vermelho, azul e verde) as sequências obtidas e analisadas no presente trabalho, a partir de amostras coletadas em Mariana (MG) e Ipueiras/Lajeado (TO).

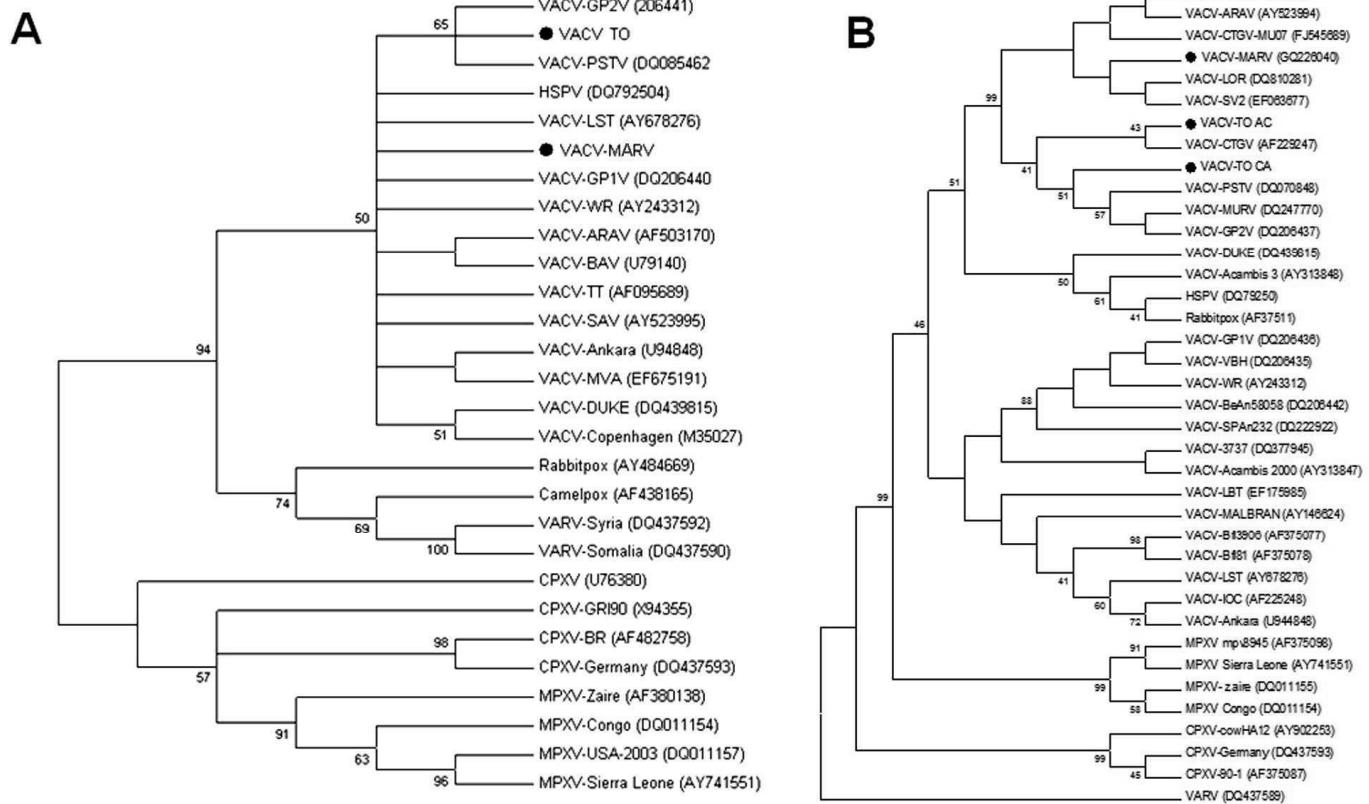


FIGURA 19: Árvores filogenéticas baseadas nas sequências nucleotídicas dos genes *vgf* (A) e *ha* (B). As sequências nucleotídicas obtidas no presente estudo foram alinhadas com as sequências de outros OPV disponíveis no GenBank, e utilizadas para a construção das árvores filogenéticas, Neighbor-joining, com valor de bootstrap de 1000 replicatas (MEGA 4.0). Em destaque (pontos pretos) as amostras de VACV analisadas no presente trabalho, obtidas em Mariana (MG) e Ipueiras/Lajeado (TO).

5.1.1.3. Testes de virulência e eliminação de MARV em camundongos Balb/c

Objetivando analisar a virulência de MARV-M, MARV-H e MARV-B, grupos de 4 camundongos Balb/c foram inoculados pela via intranasal com 10^6 PFU/10 μ L das amostras virais mencionadas. Apesar da inoculação, os animais foram pesados diariamente, amostras de fezes foram coletadas, e os sinais clínicos, quando presentes, registrados. As amostras GP2V e BAV foram utilizadas para estudos comparativos de virulência. Os camundongos de todos os grupos foram mantidos no biotério do Departamento de Microbiologia da UFMG, em gaiolas com microisoladores, e fluxo de ar individualizado.

O grupo controle, no qual PBS foi inoculado, não apresentou qualquer sinal, e os animais ganharam peso gradualmente até o 15ºd.p.i. (FIGURA 20). O grupo de animais inoculados com a amostra BAV apresentou mortalidade de 25%, uma vez que um dos animais infectados chegou ao óbito no 9ºd.p.i. (FIGURA 20). Todos os camundongos do grupo apresentaram arqueamento de dorso e pilo-ereção, do 2º-3º ao 10ºd.p.i., ou até a data do óbito. Dois animais apresentaram alopecia periocular, do 5º ao 9º d.p.i., sendo que um desses corresponde ao animal que chegou ao óbito em decorrência da infecção. Os camundongos infectados com BAV apresentaram perda de peso até o 9ºd.p.i., com decréscimo médio de 34% nesta ocasião (FIGURA 20). Os três animais sobreviventes recuperaram peso a partir do 10º-11ºd.p.i. (FIGURA 20).

Os camundongos infectados intra-nasalmente com amostra GP2V ou pelos isolados MARV não apresentaram quaisquer sinais clínicos, sendo observado um ganho médio de 15,5% no peso desses animais, ao final dos 15 dias analisados (FIGURA 20).

No 15ºd.p.i., o soro dos camundongos foi coletado para confirmar o sucesso do procedimento de inoculação viral, através da detecção de anticorpos neutralizantes, pela técnica da soroneutralização. A coleta não pode ser feita no animal que chegou ao óbito em decorrência da infecção, devido à coagulação post-

mortem. Todos os camundongos inoculados com as amostras virais, e que tiveram seus soros coletados, apresentaram anticorpos neutralizantes contra VACV, variando entre 40 a 640 unidades neutralizantes por mL. Os animais do grupo controle foram negativos nos testes de soroneutralização. A FIGURA 21 apresenta 5 os títulos de anticorpos obtidos nos ensaios mencionados.

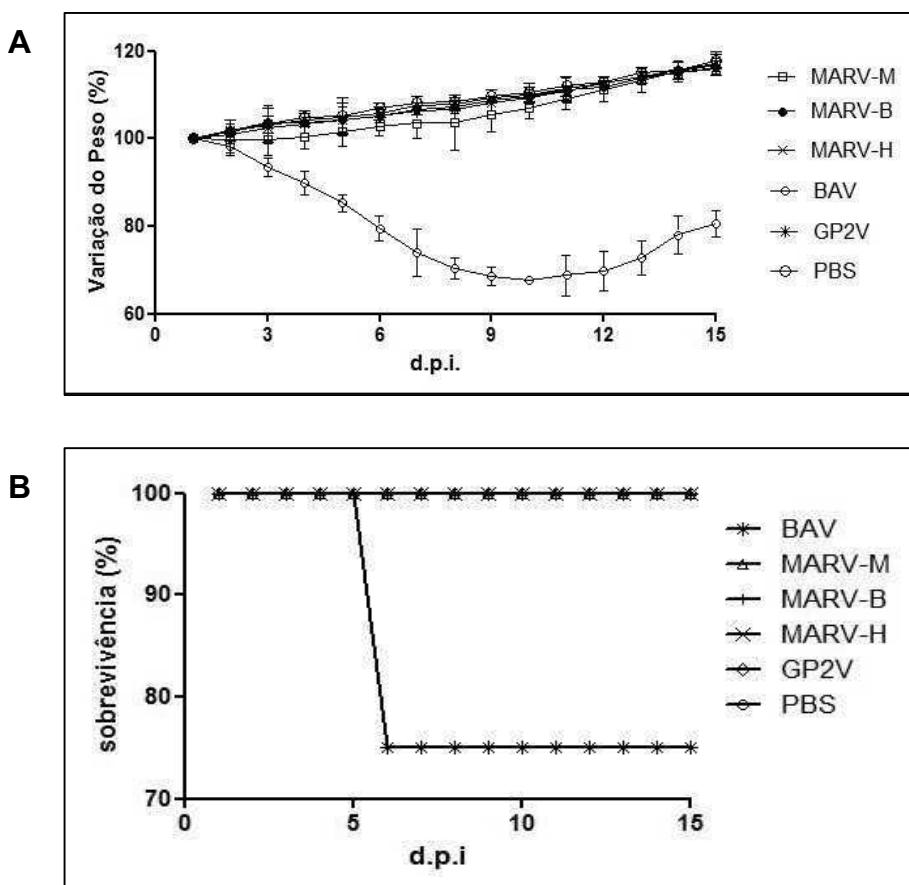


FIGURA 20: Variação percentual média diária do peso (A) e curva de sobrevivência (B) de camundongos Balb/c infectados pela via intra-nasal. Grupos de 4 camundongos Balb/c foram inoculados pela via intra-nasal com 10^6 PFU/10 μ L das amostras MARV-M, MARV-B, MARV-H, GP2V ou BAV. O peso dos animais foi monitorado por 15 dias. O grupo controle foi inoculado com PBS.

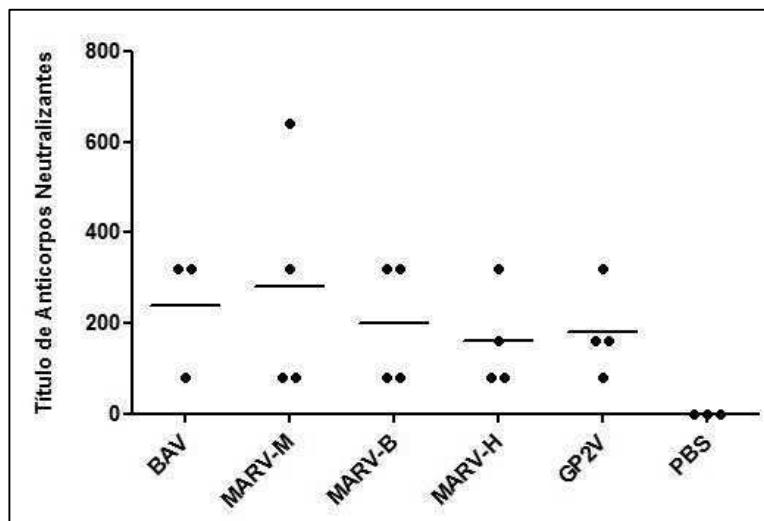


FIGURA 21: Títulos de anticorpos neutralizantes anti-VACV no soro de camundongos Balb/c infectados pela via intra-nasal com MARV-M, MARV-B, MARV-H, GP2V ou BAV (15ºd.p.i.). Grupos de 4 camundongos Balb/c foram inoculados pela via intra-nasal com 10^6 PFU/10µL das amostras MARV-M, MARV-B, MARV-H, GP2V ou BAV. Amostras de sangue foram coletadas no 15º d.p.i.. O grupo controle foi inoculado com PBS.

Amostras de fezes foram coletadas diretamente do ânus dos camundongos infectados por MARV-M, MARV-H ou MARV-B no 1º, 5º, 10º e 15º d.p.i., e então processadas e submetidas às PCR *semi-nested vgf* e a testes de titulação em células BSC-40. Para esta análise foram feitos *pools* de fezes de cada grupo, em todos os dias de coleta mencionados. Não foram isolados ou detectados DNA ou partículas virais nas fezes coletadas do grupo inoculado com PBS.

Todavia, DNA de VACV foi detectado nas fezes dos animais infectados com MARV-M, MARV-H ou MARV-B, nos quatro dias analisados (FIGURA 22). Em todos casos, a PCR das fezes produziu um fragmento de aproximadamente 380 pb, assim como o controle positivo da reação (VACV-WR). Nenhuma amplificação específica foi visualizada no controle negativo da reação (FIGURA 22).

Entretanto, nos ensaios de titulação, só foi possível detectar VACV a partir do 5ºd.p.i., em amostras de fezes de camundongos infectados com MARV-M, MARV-

H ou MARV-B (FIGURA 22). As médias dos títulos virais foram muito semelhantes no 5º, 10º e 15º, variando entre 400 e 650 UFP por grama de fezes.

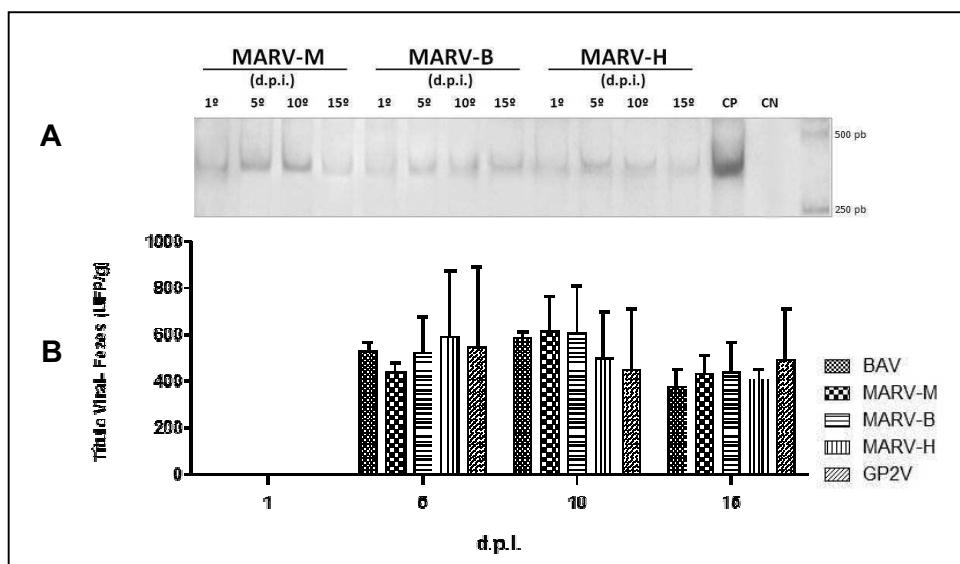


FIGURA 22: Detecção de VACV em fezes de camundongos infectados com MARV-M, MARV-H, MARV-B, GP2V ou BAV por PCR (A) ou titulação (B). Grupos de 4 camundongos Balb/c foram inoculados pela via intra-nasal com 10^6 PFU/10 μ L das amostras MARV-M, MARV-B, MARV-H, GP2V ou BAV. Amostras de fezes foram coletadas no 1º, 5º, 10º e 15º d.p.i., e então submetidas a PCR semi-nested *vgf* e titulação viral em células BSC-40. O grupo controle foi inoculado com PBS. Em (A) foi mostrado apenas os resultados das PCR feitas com fezes coletadas dos grupos infectados com os isolados MARV, uma vez que a detecção de DNA de GP2V e BAV em fezes de camundongos infectados já foi descrita (ABRAHÃO, 2008).

Em paralelo, grupos de 3 camundongos Balb/c machos, com 4 semanas, foram inoculados pela via intranasal com as mesmas amostras virais, conforme previamente descrito. No 5ºd.p.i., os animais foram sacrificados, e amostras de intestino foram coletadas. Estes órgãos foram titulados em BSC-40. Os resultados obtidos pelos ensaios de titulação sugerem que todas as amostras de VACV testadas multiplicam no intestino dos camundongos (FIGURA 23). A média dos títulos virais obtida a partir dos intestinos de camundongos infectados com BAV foi de 4×10^6 UFP/g. Os animais infectados com as amostras MARV-M, MARV-H, MARV-B e GP2V apresentaram títulos virais no intestino muito similares, variando

entre 4×10^5 e 8×10^5 UFP/g. Nenhuma partícula viral foi detectada nos intestinos dos animais inoculados com PBS.

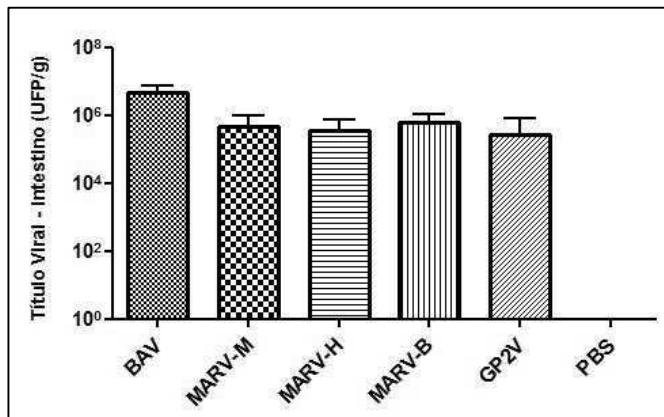


FIGURA 23: Títulos virais nos intestinos de camundongos infectados com MARV-M, MARV-H, MARV-B, BAV e GP2V. Grupos de 3 camundongos Balb/c foram inoculados pela via intra-nasal com 10^6 PFU/ $10\mu\text{L}$ das amostras MARV-M, MARV-B, MARV-H, GP2V ou BAV. Os intestinos desses animais foram coletados no 5º d.p.i. para ensaios de titulação em células BSC-40. O grupo controle foi inoculado com PBS.

5.1.2. Análise de coleções de soro de espécies de vertebrados silvestres ou mantidos em cativeiro

5.1.2.1. Caracterização sorológica

Com o intuito de determinar se outras espécies de vertebrados poderiam representar hospedeiros ou reservatórios de VACV, coleções de soro de animais silvestres ou mantidos em cativeiro foram submetidas a testes sorológicos e moleculares, a fim de analisar a presença de anticorpos anti-OPV e DNA de viral. Como controles positivos foram utilizados soros de humanos acometidos por infecções de VACV; e como controles negativos foram utilizados soros de bovinos OPV-negativos (SILVA-FERNANDES *et al.*, 2009).

Amostras de soro de mamíferos silvestres, coletadas em uma região de floresta Amazônica em Ipueiras e Lajeado (TO), em 2001 e 2002, foram analisadas pela

técnica de soroneutralização. Ao todo foram avaliadas 344 amostras de soro, sendo 269 provenientes de macaco-prego (*C. apela*), 27 de macaco guariba (*A. caraya*), 12 de quati (*N. nasua*), 20 de cotia (*Dasyprocta sp.*), 2 de gambá (*D. albiventris*), 2 de tatu (*E. sexcinctus*), 5 de tamanduá (*T. tetradactyla*) e 4 de raposa-cinzenta (*C. thous*).

Os testes de soroneutralização revelaram uma alta prevalência de macacos OPV-soropositivos. Das 269 amostras de macaco-prego, 68 (25,3%) apresentaram anticorpos anti-OPV, enquanto 13 das 27 amostras de macaco guariba (48,1%) foram sorologicamente positivos. Soropositividade também foi verificada em 2 quatins (16,6%) e uma cotia (5%) (TABELA 8). Anticorpos anti-OPV não foram detectados nas outras espécies analisadas.

Em geral, os soros de animais amazônicos mostraram altos títulos de anticorpos neutralizantes (FIGURA 24). Ao todo, 55,95% das amostras positivas (47 soros) apresentaram título entre 1:80 e 1:320. Apenas 5,95% (5 soros) apresentaram títulos menores que 1:40 (FIGURA 24).

Testes de soroneutralização, feitos utilizando amostras provenientes de animais mantidos em cativeiro na Fundação Zoobotânica de Belo Horizonte, revelaram que nenhum dos soros testados apresentava atividade neutralizante contra OPV. Essas amostras foram também submetidas à PCR semi-nested *vgf*, e nenhum dos 37 soros apresentou amplificação do gene *vgf* (~381pb).

TABELA 8: Detecção de anticorpos anti-OPV e DNA viral em amostras de soro de mamíferos silvestres amazônicos

Espécie	n	SN positivos (%)	PCR positivos (%)
<i>Cebus apela</i>	269	68 (25.3)	11 (4.1)
<i>Allouata caraya</i>	27	13 (48.1)	7 (25.9)
<i>Nasua nasua</i>	12	2 (16.6)	0 (0)
<i>Dasyprocta sp.</i>	20	1 (5.0)	0 (0)
<i>Didelphis albiventris</i>	2	0 (0)	0 (0)
<i>Euphractus sexcinctus</i>	5	0 (0)	0 (0)
<i>Tamandua tetradactyla</i>	5	0 (0)	0 (0)
<i>Cerdocyon thous</i>	4	0 (0)	0 (0)
Total	344	84 (24.4)	18 (5.2)

SN: soroneutralização; PCR: PCR semi-nested vgf; n: números de amostras testadas.

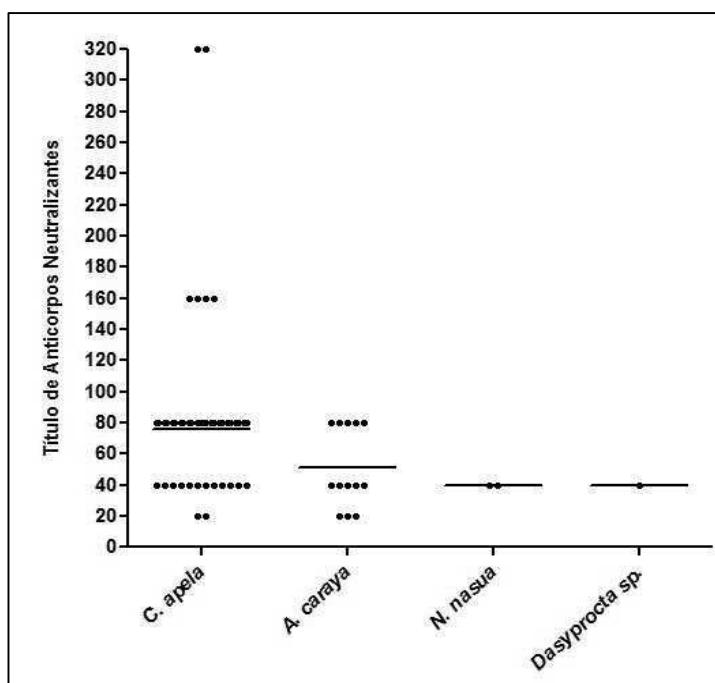


FIGURA 24: Títulos de anticorpos neutralizantes em amostras de soro de mamíferos silvestres amazônicos. Amostras de soro de animais silvestres foram coletadas durante um programa de resgate de fauna em Ipueiras e Lajeado (TO), nos anos de 2001 e 2002. Essas amostras foram submetidas a ensaios de soroneutralização para a detecção e quantificação de anticorpos neutralizantes anti-OPV. De 344 amostras, 84 apresentaram atividade anti-OPV. Na figura estão representadas apenas as espécies em que anticorpos anti-OPV foram detectados. A barra indica a média dos títulos de anticorpos neutralizantes.

5.1.2.2. Caracterização molecular das amostras do Tocantins

Baseado em estudos prévios que demonstraram a detecção de DNA de OPV em diferentes hospedeiros infectados (SAVONA *et al.*, 2006; VORA *et al.*, 2008), todas as 344 amostras de soro de animais silvestres do Tocantins foram submetidas à PCR *semi-nested vgf*, para a detecção de OPV. Amostras de soro humano VACV DNA-positivas e negativas, coletadas durante surtos de vaccínia bovina (SILVA-FERNANDES *et al.*, 2009), foram utilizados como controles das reações. Todas as amostras laboratoriais e de campo foram manipuladas separadamente para evitar contaminação.

Um total de 18 amostras de soro de animais silvestres apresentaram a amplificação de um fragmento de aproximadamente 381 pb: 11 de macaco-prego e 7 de macaco guariba, todas também positivas nos ensaios de soroneutralização. Destas 18 amostras de soro positivas na PCR *vgf*, seis foram sequenciadas e analisadas filogeneticamente, sendo quatro de macaco-prego e duas de macaco guariba. Adicionalmente, utilizando os iniciadores descritos por ROPP e colaboradores (1995), o gene *ha* também foi amplificado de duas amostras de soro, uma de cada espécie de macaco. Os produtos das PCRs de *vgf* e *ha* foram克lonados no vetor pGEM-T-easy e então sequenciados.

As análises das sequências obtidas do gene *vgf* (ClustalW, MEGA 4.0) mostraram um perfeito alinhamento de nucleotídeos e aminoácidos entre todas as amostras obtidas a partir dos soros de macaco-prego ou macaco guariba, apresentando 100% de identidade entre elas. Quando comparadas com sequências nucleotídicas disponíveis no GenBank, as sequências obtidas de macacos silvestres apresentaram alta identidade com diversas amostras de VACV, variando entre 98,3 e 100% (FIGURA 17).

As sequências de *ha*, obtidas a partir dos soros de macaco-prego ou macaco guariba, apresentam uma deleção de 6 aminoácidos, também presente em várias amostras brasileiras de VACV (FIGURA 16). As sequências de *ha* obtidas a partir desses animais silvestres apresentaram, entre si, 99,6% e 99,7% de similaridade considerando o alinhamento de nucleotídeos e aminoácidos, respectivamente.

(foram analisados 736 pb do gene *ha*). Como apresentaram diferenças genéticas (SETA, FIGURA 16), os amplificados de VACV obtidos a partir de macaco-prego e de macaco guariba foram denominados VACV-TO CA e VACV-TO AC, respectivamente.

Árvores filogenéticas foram construídas baseadas nos genes *vif* ou *ha*, utilizando o método da máxima parcimônia, com valor de 1000 replicatas de bootstrap (MEGA 4.0.). As árvores feitas para os gene *vif* ou *ha*, mostram que VACV-TO CA e VACV-TO AC se agrupam com várias amostras de VACV, isoladas durante surtos de VACV, como CTGV, PSTV, GP2, ARAV, Serro, entre outras (FIGURA 19). Os amplificados de VACV do Tocantins apresentaram também alta identidade com a amostra MARV (99,7% com VACV-TO CA e 99,9% com VACV-TO AC), considerando as sequências nucleotídicas do gene *ha* (FIGURA 18). As sequências de *vif* e *ha* obtidas a partir do soro de macacos amazônicos foram depositadas no GenBank, e reberam os seguintes número de acesso: VACV-TO CA *vif*: GQ465372; VACV-TO AC *vif*: GQ465373; VACV-TO CA *ha*: GU322359; VACV-TO AC *ha*: GU322360.

VI. DISCUSSÃO

A circulação e manutenção de partículas infecciosas na natureza representam alguns dos desafios impostos às progêneres virais. Estratégias de eliminação, resistência ambiental e disseminação foram selecionadas e modeladas ao longo da evolução e são fundamentais na logística infectiva (MAIBORODA, 1982). A complexidade do genoma dos VACV permite a codificação de inúmeros fatores de virulência e imunomodulação, além de proteínas essenciais para a multiplicação viral (HUGHES & FRIEDMAN, 2005), subsidiando a infecção de uma diversidade de sistemas celulares (McFADDEN, 2005). A variedade de tecidos e órgãos permissivos e susceptíveis à multiplicação viral (McFADDEN, 2005), permite a existência de diversas vias de infecção para os VACV (*revisado por FENNER et al., 1989*), e ao mesmo tempo dificulta a proposição de um modelo de transmissão destes vírus na natureza.

Relatos existentes de transmissão de VACV na natureza se restringem à via da epiderme e mucosas, associados aos surtos de vaccínia bovina (VB) (TRINDADE *et al.*, 2006) e *Buffalopox virus* (SINGH *et al.*, 2007), além dos casos de *eczema vaccinatum* (CDC, 2007b). A utilização do VACV como amostra vacinal no Programa Internacional de Erradicação da Varíola Humana da OMS (ESPOSITO & FENNER, 2001), historicamente direcionou os estudos envolvendo esse vírus para o manejo e estratégias de imunização (*revisado por METZGER & MORDMUELLER, 2007*), negligenciando a origem e os possíveis hospedeiros naturais dos VACV. No entanto, a VB se consolidou como zoonose emergente brasileira nos últimos anos (GUEDES, *et al.*, 2006) e a elucidação de aspectos biológicos dos VACV circulantes no país, como seus hospedeiros naturais e mecanismos de circulação, alicerça a busca por métodos de controle e prevenção da doença.

Desta forma, o presente estudo introduz um novo elemento na complexa e ainda pouco compreendida cadeia de transmissão do VACV no Brasil: o roedor peridomiciliar. A busca por roedores infectados por VACV em áreas afetadas pela VB foi baseada em uma estratégia racional, uma vez que (I) roedores têm sido descritos como reservatórios de CPXV na Europa, promovendo a transmissão viral para humanos, felinos e animais de zoológico (HAENSSLE *et al.*, 2006); (II) ratos e

camundongos são frequentemente avistados em propriedades afetadas pela VB, e estão em constante contato com a vida silvestre, humanos e animais de criação (SILVA-FERNANDES, 2008; MADUREIRA, 2009); e (III) estudos laboratoriais demonstraram que roedores peridomiciliares podem eliminar e transmitir OPV pelo contato direto com excretas contaminadas (MAIBORODA, 1982; FERREIRA *et al.*, 2008). Embora algumas amostras de VACV tenham sido consistentemente isoladas e re-isoladas em florestas brasileiras utilizando camundongos sentinelas (LOPES *et al.*, 1965; da FONSECA *et al.*, 1998; FONSECA *et al.*, 2002), o presente trabalho foi o primeiro a descrever o isolamento de uma amostra de VACV a partir de um camundongo da espécie *Mus musculus*, capturado no contexto de um surto de VB. Análises filogenéticas prévias, utilizando sequências de genes conservados e variáveis de OPV, demonstraram que algumas amostras de VACV isoladas a partir de roedores silvestres se agrupam com VACV isolados de bovinos durante surtos exantemáticos ocorridos em áreas rurais brasileiras (TRINDADE *et al.*, 2008; DRUMOND *et al.*, 2008). Todavia, o presente trabalho é o primeiro a estabelecer uma conexão entre amostras de VACV isoladas de um ser humano, de um bovino e de um roedor, temporalmente e espacialmente relacionados (TABELA 7).

A detecção de MARV em um camundongo peridomiciliar assintomático (TABELA 7; FIGURA 13) sugere que amostras de VACV podem circular na natureza sem necessariamente causar infecções agudas, de maneira similar a estudos laboratoriais feitos em modelo animal (FERREIRA *et al.*, 2008; ABRAHÃO, 2008). A infecção experimental de camundongos Balb/c (*Mus musculus*) com os isolados MARV não causou nenhum tipo de sinal clínico (FIGURA 20), e os animais infectados eliminaram partículas de VACV viáveis nas fezes por um longo período (FIGURA 22), provavelmente em decorrência da multiplicação viral no intestino dos animais (FIGURA 23). Um hospedeiro assintomático pode ser de grande importância epidemiológica, uma vez que circula ativamente entre sua população, eliminando partículas, e auxiliando na manutenção e circulação viral na natureza (MAIBORODA, 1982). Estudos de patogênese feitos utilizando CPXV demonstraram que vísceras são alvos de intensa multiplicação viral (GOFF *et al.*, 2008), o que poderia explicar a detecção de MARV no peritônio e gônadas de *MmA1* (TABELA 7).

Investigações epidemiológicas e filogenéticas envolvendo espécies do gênero OPV vêm utilizando como principal marcador molecular sequências nucleotídicas e de aminoácidos do gene da hemaglutinina viral (*ha*), visando a identificação de espécies virais e para estimar o parentesco evolutivo entre elas (TRINDADE *et al.*, 2008; DRUMOND *et al.*, 2008). Recentemente, notificações de transmissão de CPXV entre roedores e elefantes, e roedores e humanos foram descritas, baseadas na perfeita similaridade das sequências de aminoácidos de *ha* entre amostras de CPXV, isoladas a partir de diferentes hospedeiros (KURTH *et al.*, 2008; NIVOYE *et al.*, 2009). Assim, baseado neste modelo, o presente estudo analisou o gene *ha* e os genes conservados *vif* e *tk* (FIGURAS 17-19), em paralelo com ensaios biológicos (FIGURAS 13-16), visando caracterizar e comparar os isolados VACV-MARV, obtidos de diferentes hospedeiros. As análises dos genes *tk*, *vif* e *ha* mostraram que os isolados MARV apresentam perfeita similaridade não só em suas respectivas sequências de aminoácidos, mas também em suas sequências de nucleotídeos (FIGURAS 17-19). A similaridade genética observada entre esses isolados foi corroborada por resultados obtidos em ensaios de curva de ciclo único (FIGURA 14), fenótipo de placa de lise viral (FIGURA 14), imunofluorescência (FIGURA 13) e infecção de MCA (FIGURA 15), indicando que os três isolados são na verdade uma única amostra de VACV, que circulou entre diferentes hospedeiros durante o surto de VB na cidade de Mariana, em 2005.

Como mencionado anteriormente, alguns surtos de VB ocorrem temporalmente e espacialmente distantes de áreas previamente afetadas, e nesses casos em específico, a vida silvestre poderia representar a fonte original de manutenção e circulação viral. A circulação de amostras de VACV entre animais silvestres foi descrita durante as décadas de 60 e 70 do século passado (LOPES *et al.*, 1965; da FONSECA *et al.*, 1998; FONSECA *et al.*, 2002), e pelo inquérito sorológico apresentado no presente trabalho, na qual foi observada uma alta soropositividade anti-OPV em mamíferos amazônicos brasileiros. Neste contexto, amostras de VACV poderiam ser introduzidas nas áreas rurais brasileiras, quando seus hospedeiros silvestres deixam seus habitats naturais e se aventuram em busca de alimentos, sobretudo em lavouras, ou migram errantes em decorrência do processo de desflorestamento de seu habitat original (SOARES-FILHO *et al.*, 2006). Todavia, a presença de animais silvestres é usualmente restrita às bordas das propriedades

rurais, sendo estes raramente avistados em locais como currais, pastos e sedes das fazendas (MADUREIRA, 2009). Desta forma, como explicar a transmissão de VACV entre animais silvestres e populações humanas/bovinas? Uma possível explicação: se amostras de VACV estão circulando primariamente entre animais silvestres, o isolamento da amostra MARV a partir de um camundongo do gênero *Mus* indica que roedores peridomiciliares poderiam representar uma possível conexão entre a vida silvestre e as propriedades afetadas pela VB, uma vez que esses animais circulam ativamente pelas fazendas e suas adjacências, compartilhando ambientes com seres humanos, bovinos e animais silvestres. Embora não existam dados sobre a circulação de VACV em ambiente silvestre na região de Mariana/MG, é provável que ela ocorra, considerando o amplo espectro de hospedeiros do VACV (McFADDEN, 2005) e as evidências de circulação viral em outras regiões de floresta no Brasil (LOPES *et al.*, 1965; FONSECA *et al.*, 1998).

No Brasil, o avanço das fronteiras agrícolas está intimamente associado com a degradação de biomas naturais e florestas secundárias, causando perdas para biodiversidade e ocasionando o deslocamento de nichos ecológicos pré-estabelecidos (SOARES-FILHO *et al.*, 2006). O bioma amazônico é um dos que mais sofre com os processos de queimadas e desflorestamento, em decorrência de atividades agropecuárias e extrativistas (SOARES-FILHO *et al.*, 2006). Além disso, extensas áreas são eventualmente alagadas para a construção de usinas hidroelétricas, impactando a vida silvestre local. Neste contexto, foram capturados os mamíferos amazônicos analisados no presente estudo. Os resultados dos ensaios de neutralização demonstraram soropositividade anti-OPV de aproximadamente 27%, quando considerados os primatas pertencentes às espécies *C. apela* e *A. caraya* (TABELA 8; FIGURA 24). Este percentual relativamente alto pode ser explicado pelo fato de que os primatas dessas duas espécies apresentam o comportamento de bandos, caminhando pela floresta e compartilhando alimentos (e provavelmente infecções) entre grupos de até 20 indivíduos (HILÁRIO *et al.*, 2010). Desta forma, é provável que na ocasião do programa de resgate de fauna, durante a construção da hidroelétrica, tenham sido capturados primatas pertencentes a alguns poucos bandos. Portanto, a captura dos animais não foi feita por amostragem espacial, e por isso não reflete

necessariamente a condição anti-OPV de todos os indivíduos e bandos dessas espécies de primatas na região amazônica. Um estudo muito semelhante foi realizado no Parque Nacional de Kibale, oeste de Uganda. GOLDBERG e colaboradores (2008) descreveram que uma população de colobos vermelhos de Pennant (*Procolobus pennanti*), primatas habitantes desse parque, apresentava evidências sorológicas de infecção por um OPV não-caracterizado, com percentuais de positividade de aproximadamente 25%. A amostragem utilizada por GOLDBERG foi de apenas 28 animais, caracterizando apenas 2 ou 3 grupos, o que indica que apenas um dos grupos apresentavam evidências de infecção por OPV. Infecções de primatas não-humanos por outros OPV não são incomuns, e normalmente estão associados a uma alta taxa de transmissibilidade dentro de uma determinada população (MÄTZ-RENSING *et al.*, 2006).

Em corroboração com os dados do presente estudo, que sugerem a circulação silvestre do VACV na região amazônica, MOTA e colaboradores (2010) descreveram uma soropositividade anti-OPV de aproximadamente 25% entre uma população humana de uma região rural em Acrelândia, Estado do Acre. Até a ocasião desse estudo, nenhum caso de vacínia bovina havia sido registrado no Estado do Acre. Os autores sugeriram que os indivíduos soropositivos teriam sido expostos ou infectados por algum OPV, provavelmente VACV, em decorrência de atividades em florestas adjacentes ao povoado, como extrativismo e caça de animais silvestres (MOTA *et al.*, 2010).

A avaliação de DNAemia nos soros das espécies de macacos amazônicos (TABELA 8) foi baseada em estudos prévios que demonstraram a presença de DNA viral em amostras de sangue de humanos vacinados contra varíola, e em sangue de camundongos infectados com amostras brasileiras de VACV (SILVA-FERNANDES *et al.*, 2009; COHEN *et al.*, 2007; SAVONA *et al.*, 2006). A análise das sequências obtidas referentes ao gene *ha* mostraram a existência de uma deleção de 18 nucleotídeos na porção final do gene, presente também em diversas amostras de VACV isoladas durante surtos de VB no Brasil (FIGURAS 17-19). A relação entre primatas amazônicos infectados com VACV e emergência de surtos de VB no Brasil é incerta. Entretanto, a circulação de VACV no norte e nordeste do Brasil vem sendo notificada, e surtos foram recentemente registrados nos Estados

do Mato Grosso, Pernambuco, Maranhão, Rondônia e Tocantins (KROON, dados não publicados; MEDAGLIA *et al.*, 2009). Algumas das amostras isoladas durante esses surtos podem ter relação com os VACV circulantes na Amazônia, uma vez que apresentam a mesma assinatura molecular no gene *ha* (FIGURA 16).

Baseado nos dados apresentados no presente trabalho, e em estudos epidemiológicos relacionados a outros OPV, um modelo hipotético de transmissão de VACV será proposto pelo presente estudo (FIGURA 38) (SOUZA-TRINDADE *et al.*, 2003; LEITE *et al.*, 2005; LOBATO *et al.*, 2005); FERREIRA *et al.*, 2008). Neste modelo, os roedores peridomiciliares poderiam se infectar com VACV a partir de animais silvestres nas adjacências das fazendas, em decorrência de lutas territoriais (WSDE, 2008), ingestão de fezes ou carcaças contaminadas (FENNER, 1989) ou compartilhamento de alimentos (FENNER, 1989). A eliminação e transmissão de VACV e CPXV têm sido consistentemente demonstradas em modelos murinos (MAIBORODA, 1982; FERREIRA *et al.*, 2008), o que parcialmente explicaria a disseminação de VACV entre populações de roedores peridomiciliares. Alguns desses roedores eventualmente retornariam às fazendas, introduzindo VACV entre populações bovinas e humanas. Por outro lado, roedores peridomiciliares poderiam ser infectados com VACV após manterem contato com fragmentos de lesões bovinas e humanas, leite contaminado (ABRAHÃO *et al.*, 2009) ou fômites (tanque de expansão, latão, tecidos contaminados com sangue, ou material relacionado com a ordenha). Subsequentemente, tais roedores peridomiciliares infectados poderiam disseminar VACV para animais silvestres pelas fezes (FERREIRA *et al.*, 2008), carcaças (FENNER, 1989), durante lutas territoriais (WSDE, 2008) ou quando são predados (FENNER, 1989). Embora menos provável, a possibilidade de transmissão de VACV entre animais silvestres e humanos/bovinos não pode ser descartada, se considerarmos os dados apresentados por MOTA e colaboradores (2010). Novos estudos são necessários para elucidar a complexa dinâmica de transmissão do VACV, especialmente se seu amplo espectro de hospedeiros for considerado (McFADDEN, 2005). A presença de mamíferos amazônicos infectados com VACV pode representar, portanto, tanto a causa quanto a consequência dos surtos de VB. O monitoramento de roedores peridomiciliares poderia ser utilizado para predizer surtos de VB ou para indicar o risco de introdução de VACV em ambientes silvestres.

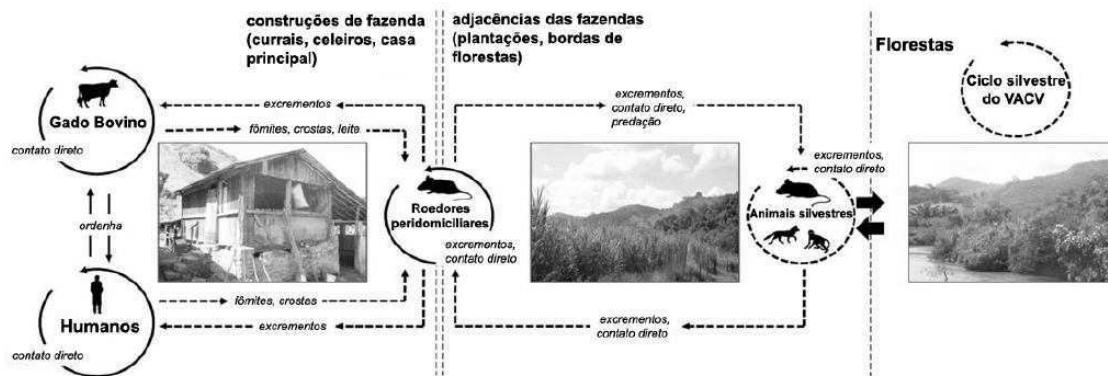


FIGURA 38: Modelo hipotético do ciclo de transmissão dos VACV. As linhas representam dados experimentalmente comprovados, enquanto as linhas pontilhadas representam proposições que ainda estão sendo investigadas.

Uma vez que os dados apresentados sugerem uma ativa circulação do VACV em ambientes silvestres, e que roedores peridomiciliares poderiam disseminar o vírus entre o meio silvestre e o meio rural (FIGURAS 13-19), se torna difícil o controle desta zoonose, por mais bem estruturada que seja uma determinada propriedade rural. Assim, a busca por imunógenos seguros contra a VB vem se tornando uma necessidade crescente para a prevenção desta doença. À primeira vista, as vacinas utilizadas durante a campanha da OMS para a erradicação da varíola humana poderiam representar boas opções. Entretanto, as consequências relacionadas ao escape e recombinação entre amostras vacinais e as que circulam de forma autóctone no território nacional são imprevisíveis. Além disso, muitos efeitos colaterais foram associados à maioria das amostras vacinais de VACV utilizadas pela OMS (PASTORET e VANDERPLASSCHEN, 2003).

Desta forma, no presente trabalho foi proposta a elaboração de imunógenos “não-vivos” contra a VB, e a execução de um estudo piloto em camundongos Balb/c. Foram analisadas duas vacinas de DNA, expressando B5R (glicoproteína da partícula EEV) ou H3L (glicoproteína da partícula IMV); e uma vacina inativada, utilizando a amostra brasileira VACV-BAV. O imunógeno BAV foi inicialmente proposto por FERREIRA (2008) e mostrou resultados promissores em testes em que camundongos foram desafiados com a amostra VACV-WR. Além disso, BAV inativado apresenta como vantagem o fato de ser produzido em MCA de ovos

embrionados, reduzindo os custos e eliminando a possibilidade de ocorrência de príons bovinos em sua composição. As vacinas de DNA expressando as glicoproteínas B5R e H3L foram desenvolvidas baseadas em estudos prévios que demonstraram que estas proteínas virais são as que melhor induzem a produção de anticorpos totais ou neutralizantes anti-VACV, respectivamente. Desta forma B5R-DNA e H3L-DNA foram testadas em associação com BAV, visando a redução da morbidade frente ao desafio com VACV-WR; e também foram testadas isoladamente com intuito de fornecer informações a respeito da importância da indução de resposta protetora anti-IMV ou anti-EEV.

Um dos maiores desafios do presente estudo foi a escolha da via de inoculação dos compostos vacinais. Os mecanismos de ação e indução de resposta imune pelas vacinas de DNA ainda são alvo de estudo e debate (FYNAN *et al.*, 1993; ULMER *et al.*, 1997; UCHIJIMA *et al.*, 1998; REN *et al.*, 2002; YOSHIDA *et al.*, 2000; CONG *et al.*, 2005, LI, *et al.*, 2006). A hipótese mais aceita seria que, após a imunização, o antígeno sintetizado é apresentado aos linfócitos T pelas células apresentadoras de抗énios (APCs) ou células somáticas eventualmente transfectadas com o DNA plasmidial expressando抗énios. Estas células, particularmente as células somáticas, podem liberar antígeno para outra APC, pela secreção ou por apoptose das células transfectadas. Estas APCs podem então, apresentar antígeno para células T CD4+ e CD8+, direcionando e amplificando a resposta. Entretanto, muitas vias de inoculação foram descritas para as vacinas de DNA, incluindo intratraqueal, intravenosa, intrabursal, intraorbital, intradérmica, intramuscular, oral, subcutânea e via mucosa, com sucesso na indução da resposta imune em todas as vias testadas (FYNAN *et al.*, 1993; ULMER *et al.*, 1997; UCHIJIMA *et al.*, 1998; REN *et al.*, 2002; YOSHIDA *et al.*, 2000; CONG *et al.*, 2005, LI, *et al.*, 2006). Embora PULFORD (2004) tenha descrito a utilização da via intramuscular com sucesso na imunização de camundongos contra VACV, outros estudos mostram que a via subcutânea seria mais auspíciosa, uma vez que seria mais provável o encontro entre células dendríticas e as vacinas de DNA, assim como os抗énios por ela sintetizados (LIU, 2003). A localização celular do抗énio, influenciada pela via de administração da vacina de DNA, parece ser crítica para a resposta imune gerada, e existe discordância na literatura sobre este assunto (LEWIS *et al.*, 1999, LIU *et al.*, 2003; MOREL *et al.*, 2004).

De uma forma geral, estudos mostram que a imunização pela via intramuscular com as vacinas de DNA induz preferencialmente a resposta do tipo Th1, enquanto as vias intradérmica ou subcutânea estimulariam a resposta Th2 ou uma resposta balanceada Th1/Th2 (NAFTZGER *et al.*, 1996; WEBER *et al.*, 1998; KANO *et al.*, 2007). Entretanto, MOREL e colaboradores demonstraram que a imunização de camundongos por sistema *gene gun* (intradérmica) com plasmídios que codificam proteínas citoplasmáticas e transmembrana induziu forte resposta imune Th1 e CD8+ (MOREL *et al.*, 2004). Desta forma, não havendo um consenso na literatura, foi escolhida a via subcutânea, uma vez que FERREIRA (2008) obteve resultados promissores utilizando esta via para o imunógeno BAV. Além disso, é importante mencionar que não foi objetivo do presente estudo a análise do perfil de citocinas ou marcadores indicadores de resposta celular ou humoral. Neste primeiro momento, objetivamos a análise da geração de proteção e redução de morbidade frente ao desafio intranasal com VACV-WR, e uma possível associação entre estes dados com a presença de anticorpos neutralizantes e totais anti-EEV ou anti-IMV.

Quando analisados individualmente, BAV se mostrou mais eficiente que B5R e H3L na geração de resposta protetora contra o desafio com VACV-WR (FIGURAS 28 e 29). Apesar de protegidos, todos os animais imunizados com BAV ainda apresentaram morbidade, mesmo sob o regime de *prime-boost* (FIGURAS 28 e 29). Todavia, a associação de BAV com B5R-DNA, sob o regime de 2 doses, reduziu de forma discreta o score da doença nos animais desafiados (FIGURA 29), constituindo um dos únicos grupos em que foi observada a recuperação completa dos animais antes do 14º d.p.i. (FIGURA 29). Uma possível explicação para este resultado seria o fato de que B5R-DNA induz mais robustamente a proteção contra as partículas do tipo EEV, como pode ser visto nos testes de inibição da formação de cometas (TABELA 9). Desta forma, anticorpos anti-B5R, e provavelmente uma resposta celular específica contra esta proteína, inibiriam a disseminação viral dentro de um organismo infectado, uma vez que este é o principal papel atribuído às partículas virais do tipo EEV.

É importante mencionar que durante o processo de multiplicação de BAV em ovos embrionados de galinha foram coletados somente os *pocks* esbranquiçados virais

e, portanto, foram encaminhados para a purificação viral somente tecidos e células da MCA, sem frações de sobrenadante. Desta forma, na produção de BAV, são purificadas principalmente partículas do tipo IMV. Este detalhe técnico poderia explicar a resposta quase exclusivamente anti-IMV induzida pelo imunógeno BAV, quando considerados os testes *in vitro* (FIGURAS 30 e 36; TABELA 9). Embora IMV e EEV compartilhem proteínas do cerne viral, anticorpos eventualmente produzidos contra estas proteínas não apresentaram atividade neutralizante em testes *in vitro* e, portanto, não previnem a formação de cometas (TABELA 9). Desta forma, roedores imunizados com BAV apresentaram anticorpos neutralizantes somente contra a forma IMV, como sugerem os ensaios de soroneutralização (FIGURA 30).

Apesar de induzir a produção de altos títulos de anticorpos neutralizantes anti-IMV (FIGURA 30), os grupos de camundongos imunizados somente com a vacina H3L-DNA apresentaram altos percentuais de morbidade e mortalidade (FIGURAS 28 e 29). Esses dados sugerem, mais uma vez, que a resposta humoral anti-EEV e a resposta celular (não avaliada no presente estudo) poderiam desempenhar um importante papel na proteção contra infecções por VACV. Outra possibilidade seria que outras proteínas de superfície do IMV também seriam importantes para a geração de resposta protetora *in vivo*, conforme observado para BAV.

Os resultados obtidos nos testes de ELISA (FIGURA 37), soroneutralização (FIGURA 30) e inibição de cometas (TABELA 9) sugerem que a elaboração de um imunógeno anti-VACV, que reduza de forma considerável os percentuais de mortalidade e morbidade frente a um desafio, deva contemplar mecanismos induidores de resposta anti-IMV e anti-EEV. Curiosamente, os grupos de animais inoculados com B5R-DNA + H3L-DNA apresentaram alta mortalidade e morbidade (FIGURAS 28 e 29). Todavia, é importante mencionar que foram utilizadas doses 20% menores que as descritas por PULFORD (2004) e foram administradas apenas duas doses do imunógeno, ao invés de quatro. Além disso, como mencionado, outras proteínas do IMV parecem ser importantes no processo de indução de resposta protetora *in vivo*. Estudos prévios demonstraram que a glicoproteína H3L é melhor indutora de resposta protetora frente a desafios quando administrada sob a forma de proteína purificada (e não na forma de vacina de

DNA), na dose de 50-200 μ g, em 3 ou 4 doses (PULFORD *et al.*, 2004; DAVIES *et al.*, 2005). Portanto, imunógenos que utilizam抗ígenos exclusivamente de IMV ou EEV requerem altas doses vacinais, e vários reforços. Até o momento, nenhum estudo descreve a utilização somente de partículas EEV em testes de desafio, provavelmente pela dificuldade em purificar esta partícula e pela sua pouca estabilidade e relevância epidemiológica (McFADDEN, 2005). Todavia, embora IMV corresponda a 90% da progénie viral, EEV parece ser importante no que diz respeito à gravidade e duração de uma infecção por VACV em modelo murino, e por isso a resposta contra esta partícula deve ser mais bem explorada por futuros estudos. A existência de dois tipos de partículas virais, contendo diferentes glicoproteínas de membrana, poderia operar como mais um mecanismo de escape associado ao VACV.

Os resultados de imunização e desafio obtidos com BAV inativado termicamente sugerem que esta forma de inativação viral pode substituir a β -propriolactona, reduzindo tempo e custo (FIGURA 25). Outras associações ao imunógeno BAV serão testadas no futuro, como a administração de B5R e H3L sob a forma de proteínas purificadas. Além disso, a adição de partículas EEV ao imunógeno BAV inativado poderia também ser explorada, com o aperfeiçoamento dos métodos de purificação e concentração dessas partículas virais. Os dados obtidos e discutidos no presente trabalho reforçam os estudos referentes à vacinologia anti-OPV, e abrem as portas para futuros estudos imunológicos que permitam avaliar as respostas celular, humoral e inata anti-VACV de uma forma integrada. O preenchimento das lacunas deixadas pelo presente trabalho auxiliarão na construção de um modelo sólido de circulação dos VACV assim como na elaboração de métodos seguros e eficazes para o combate de novas infecções, abrindo perspectivas para o controle e prevenção da vaccínia bovina no Brasil.