

**ENSAIO QUANTITATIVO MULTIPLEX FLUORESCENTE DA REAÇÃO
EM CADEIA DA POLIMERASE (QF-PCR) PARA DETECÇÃO E
DIFERENCIAÇÃO DE MEMBROS DA FAMÍLIA *POXVIRIDAE*
(*Orthopoxvirus* E *Parapoxvirus*)**

EDSON OLIVEIRA DELATORRE

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO – UENF
CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
NOVEMBRO DE 2009**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**ENSAIO QUANTITATIVO MULTIPLEX FLUORESCENTE DA REAÇÃO
EM CADEIA DA POLIMERASE (QF-PCR) PARA DETECÇÃO E
DIFERENCIAÇÃO DE MEMBROS DA FAMÍLIA *POXVIRIDAE*
(*Orthopoxvirus* E *Parapoxvirus*)**

EDSON OLIVEIRA DELATORRE

Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO – UENF
CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
NOVEMBRO DE 2009**

**ENSAIO QUANTITATIVO MULTIPLEX FLUORESCENTE DA REAÇÃO
EM CADEIA DA POLIMERASE (QF-PCR) PARA DETECÇÃO E
DIFERENCIAÇÃO DE MEMBROS DA FAMÍLIA *POXVIRIDAE*
(*Orthopoxvirus* E *Parapoxvirus*)**

EDSON OLIVEIRA DELATORRE

Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.

Aprovada em 27 de novembro de 2009.

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Carlos Eurico Pires Ferreira Travassos
(Doutor, Ciências – Microbiologia) – UENF

Prof. Dr. Milton Masahiko Kanashiro
(Doutor, Biociências e Biotecnologia – Imunologia) – UENF

Prof. Dr. Dirlei Molinari Donatele
(Doutor, Produção Animal – Sanidade Animal) – UFES

Prof. Dr. Enrique Medina-Acosta
(PhD, Parasitologia Médica e Molecular) – UENF
(orientador)

Aos meus pais, Edno e Maria Cristina, pelo apoio, força e amor desde o início de minha caminhada.

À Maria Clara pelo apoio e companheirismo nessa etapa tão importante de minha vida.

Ao professor Enrique, pelos ensinamentos, discussões e conselhos neste início da minha vida acadêmica.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus pelas oportunidades concedidas.

Aos meus pais, Edno e Cristina, por serem as bases que sustentam minha vida. Todo apoio, atenção, força e conselhos foram fundamentais. Ao meu irmão Edgar, por toda ajuda e companheirismo.

À Maria Clara, minha companheira, agradeço pelo amor, paciência, carinho, amizade, cumplicidade, ajuda e dedicação.

Ao Prof. Dr. Enrique Medina Acosta, pela orientação, apoio, críticas, ensinamentos e incentivo ao meu aprimoramento profissional. Pelo exemplo de responsabilidade no cumprimento do dever.

Ao Prof. Dr. Carlos Eurico Pires Ferreira Travassos e Dr. André Tavares Silva Fernandes, pela contribuição neste trabalho enviando amostras para estudo.

À Dr. Cláudia Maria Costa de Almeida, pela ajuda e ensinamentos nas etapas iniciais na manipulação dos vírus e Inarei José Paulini Júnior auxílio com as amostras controle.

Aos meus companheiros do NUDIM: Antônio, Felipe, Maria, Laís, Luciana, Hazel, Viviane, pelo convívio e carinho.

A todos os meus amigos da UENF pelo convívio, tornando o curso mais prazeroso e divertido.

A CAPES, CNPq, FAPERJ e NUDIM pelos auxílios concedidos.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) e ao Centro de Biociências de Biotecnologia (CBB), por disponibilizar este curso.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE TABELAS	XI
LISTA DE ABREVIATURAS	XII
RESUMO	XIV
ABSTRACT	XV
I – INTRODUÇÃO	1
II – REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 – CLASSIFICAÇÃO DOS POXVÍRUS.....	3
2.2 – MORFOLOGIA DA PARTÍCULA VIRAL DA FAMÍLIA <i>Poxviridae</i>	5
2.3 – ESTRUTURA GENÔMICA DA FAMÍLIA <i>Poxviridae</i>	7
2.4 – IMUNOMODULAÇÃO MEDIADA POR PROTEÍNAS VIRAIS	11
2.5 – CICLO REPLICATIVO DOS POXVÍRUS	12
2.5.1 – Adsorção, penetração e desnudamento do vírus	14
2.5.2 – Replicação do DNA e síntese das proteínas virais	14
2.5.3 – Montagem e maturação	14
2.5.4 – Liberação	15
2.6 – CARACTERÍSTICAS E ASPECTOS CLÍNICOS DE MEMBROS DA FAMÍLIA <i>Poxviridae</i>	17
2.6.1 – Gênero <i>Orthopoxvirus</i>	16
2.6.2 – Gênero <i>Parapoxvirus</i>	20
2.7 – POXVIROSES NO BRASIL	22
2.8 – RISCOS BIOLÓGICOS NA ERA PÓS-GENÔMICA	23
2.9 – DIAGNÓSTICO DE POXVÍRUS	24

III – OBJETIVO GERAL	28
3.1 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
IV – JUSTIFICATIVA	29
V – MATERIAIS E MÉTODOS	30
5.1 – AMOSTRAS CLÍNICAS.....	30
5.2 – DNA GENÔMICO REFERÊNCIA.....	30
5.4 – EXTRAÇÃO DO DNA	30
5.4.1 – Protocolo 1	31
5.4.2 – Protocolo 2	31
5.4.3 – Protocolo 3	32
5.5 – QUANTIFICAÇÃO DO DNA	32
5.6 – PROCURA IN SILICO DE SEQUÊNCIAS DE DNA REPETIDAS EM TANDEM (ELEMENTOS STR, MICROSSATÉLITES) EM GENOMAS DA FAMÍLIA POXVIRIDAE.	32
5.7 – VALIDAÇÃO IN SILICO DOS POLIMORFISMOS	32
5.8 – SEQUÊNCIAS AMPLIPRIMER.....	33
5.9 – INICIADORES	33
5.10 – AMPLIFICAÇÃO DAS REGIÕES ALVO NOS ESPÉCIMES CLÍNICOS.....	36
5.11 – ANÁLISE DOS AMPLICONS	36
5.12 – IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS PERFIS ALÉLICOS.....	36
5.13 – ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS GÊNICAS DOS ORTÓLOGOS DO GENE F1L.....	37
VI – RESULTADOS.....	38
6.1 – PROCURA DE SEQUÊNCIAS POLIMÓRFICAS NOS GENOMAS DE POXVIRUS.....	38
6.1.2 – Iniciadores preditos para VACV e CPXV	41

6.2 – ANÁLISE DOS ORTÓLOGOS DO GENE F1L (VACCINIA VIRUS)	43
6.2.1 – Variabilidade das repetições.....	46
6.2.3 – Índices de Hidrofobicidade	49
6.2.4 – Polimorfismos encontrados no ortólogo de <i>Variola virus</i> (C5L)	51
6.2.5 – Análise filogenética dos ortólogos do gene F1L	55
6.2.6 – Desenho dos iniciadores.....	56
6.3 – DIAGNÓSTICO VIRAL POR QF-PCR	58
6.3.1 – Desenho do ensaio de QF-PCR	58
6.3.2 – Otimização da PCR	59
6.3.3 – Amplificação do DNA viral	61
6.3.4 – Sensibilidade do teste molecular	63
6.3.5 – Aplicabilidade do teste em espécimes clínicos	65
VII – DISCUSSÃO	67
7.1 – MINERAÇÃO DE REPETIÇÕES NO GENOMA DE <i>POXVIRUS</i>	67
7.2 – HISTÓRIA DA REPETIÇÃO NOS DIFERENTES ORTÓLOGOS DE F1L	67
7.3 – DETECÇÃO MOLECULAR POR QF-PCR MULTIPLEX.....	70
VIII – CONCLUSÃO	73
IX – BIBLIOGRAFIA	74

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação volumétrica das partículas virais reconstituídas por crioeleto-tumografia	5
Figura 2 - Diagrama da estrutura do vírion do gênero <i>Orthopoxvirus</i>	6
Figura 3 - Microscopia eletrônica dos vírions pertencentes aos gêneros <i>Orthopoxvirus</i> (A) e <i>Parapoxvirus</i> (B).....	7
Figura 4 - Representação esquemática do genoma dos poxvírus.....	8
Figura 5 - Alinhamento do genoma de 20 poxvírus, mostrando o arranjo de 92 famílias de genes	10
Figura 6 - Ciclo de replicação dos poxvírus e síntese de suas macromoléculas.....	13
Figura 7 - Alinhamento do <i>locus</i> polimórfico encontrado em Orf vírus próximo às RTI	40
Figura 8 - Alinhamento da região de anelamento do iniciadores P2F (vermelho) e P2R (rosa) entre os genomas referência de CPXV-BR (NC_003663.2) e VACV-WR (NC_006998.1).....	42
Figura 9 - Gráfico de entropia dos diferentes ortólogos de F1L de VACV.....	46
Figura 10 - Alinhamento das sequências de aminoácidos dos ortólogos de F1L.....	48
Figura 11 - Índices de hidrofobicidade de diferentes ortólogos do gene F1L	50
Figura 12 - Distribuição do número de repetições sobre o relacionamento filogenético dos isolados de VARV.....	51
Figura 13 - Distribuição geográfica dos isolados de VARV agrupados segundo o número de elementos STR no gene F1L	54
Figura 14 - Relações filogenéticas dos 82 ortólogos de F1L	56
Figura 15 - Representação esquemática do eletroferograma esperado em ensaio QF-PCR biplex	58
Figura 16 - Comparação entre eletroferogramas obtidos com a utilização dos diferentes protocolos de extração de DNA.....	60
Figura 17 - Eletroferogramas gerados utilizando a combinação de iniciadores em ensaios multiplex.....	62

Figura 18 - Relação entre a quantidade de amplicon produzido e a concentração de DNA alvo	63
Figura 19 - Eletroferogramas das diluições seriadas da amostra C1 (A) e do vírus cultivado VACV WR (B).....	64
Figura 20 - Eletroferograma do QF-PCR realizado em amostras sem extração de DNA.....	65
Figura 21 - Eletroferogramas das amostras que apresentaram co-infecção por PPV e OPV.....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação e tamanho médio do genoma dos membros da família <i>Poxviridae</i>	4
Tabela 2 - Iniciadores desenhados para detecção viral.....	35
Tabela 3 - Número de repetições encontradas nos genomas de <i>Cowpox virus</i> e <i>Vaccinia virus</i>	39
Tabela 4 - Tamanho predito dos amplicons minerados <i>in silico</i> para o locus POX008 em VACV e CPXV.....	41
Tabela 5 - Tamanho predito dos amplicons minerados <i>in silico</i> para o locus POX002 em CPXV.....	43
Tabela 6 - Características dos ortólogos de F1L de VACV analisados.....	44
Tabela 7 - Diferentes repetições encontradas entre os ortólogos de F1L de VACV .	47
Tabela 8 - Grupos formados por isolados de VARV, CMPV, ECTV e TATV com mesmo número de repetições nos ortólogos de F1L	52
Tabela 9 - Tamanho do amplicon gerado pelos iniciadores gêneros-específicos em diferentes genomas preditos da família <i>Poxviridae</i>	57
Tabela 10 - Conteúdo de DNA das amostras quantificadas por fluorimetria.	63
Tabela 11 - Amostras clínicas analisadas para avaliar a performance do QF-PCR multiplex	66

LISTA DE ABREVIATURAS

CAPXV:	<i>Capripox virus</i>
ChPV:	<i>Chordopoxvirinae</i>
CMPV:	<i>Camelpox virus</i>
CPXV:	<i>Cowpox virus</i>
ECTV:	<i>Ectromelia virus</i>
EnPV:	<i>Entomopoxvirinae</i>
EPBV:	vírus da Estomatite Papular Bovina
fg:	fentograma (10^{-15} g)
FWPV:	<i>Fowlpox virus</i>
IL:	interleucina
Kb:	quilobases
Kpb:	quilo pares de bases
MHC:	Complexo principal de histocompatibilidade
MOCV:	<i>Molluscum contagiosum</i> vírus
MPXV:	Monkeypox vírus
NCBI:	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ng:	nanograma (10^{-9} g)
nt:	nucleotídeo
OMS:	Organização Mundial de Saúde
OPV:	<i>Orthopoxvirus</i>
PAGE:	eletroforese em gel de poliacrilamida
PCR:	Reação em cadeia da polimerase
pM:	picomolar (M^{-9})
RCNV:	<i>Raccoonpox virus</i>
RNA _m :	RNA mensageiro
RTI:	repetições terminais invertidas
RT-PCR:	PCR em tempo real
STR:	sequência de DNA repetidas em tandem
TATV:	<i>Taterapox virus</i>
TNF:	Fator de necrose tumoral
TRF:	programa <i>Tandem Repeat Finder</i>

URF:	unidade relativa de fluorescência
URSS:	União das Repúblicas Socialistas Soviéticas
UV:	luz ultravioleta
VACV:	<i>Vaccinia virus</i>
VARV:	<i>Variola virus</i>
VE:	vírus encapsulado
VEE:	vírus envelopado extracelular
VEI:	vírus envelopado intracelular
VM:	vírião maduro
VMI:	vírião maduro intracelular
VPXV:	<i>Volepox virus</i>

RESUMO

A família *Poxviridae* consiste de um grupo de vírus de DNA dupla fita, com morfologia semelhante, que se replicam inteiramente no citoplasma de células de vertebrados e invertebrados. Membros desta família são importantes patógenos causadores de doenças pústulo-vesiculares em gado bovino leiteiro, ordenhadores e seus familiares. No Sudeste brasileiro, há indícios epidemiológicos de prevalência em ascensão, destas infecções. O crescente risco de transmissão por contato com infecções em animais, por *Orthopoxvirus* (OPV) e *Parapoxvirus* (PPV) para seres humanos, requer o desenvolvimento de métodos eficientes para a rápida detecção e identificação destes vírus patogênicos. Por meio de uma análise comparativa abrangente *in silico* de 80 genomas dos membros dos gêneros OPV e PPV disponíveis em bancos de dados públicos identificou-se *loci* polimórficos espécie- e gênero-específico com potencial uso como marcadores de DNA para o diagnóstico molecular. O *locus* específico do gênero OPV (POX005) se mostrou altamente variável na espécie *Variola virus*, correlacionando a origem geográfica do isolado viral e a história da dispersão mundial da doença. Dois *loci* específicos para os gêneros OPV e PPV foram escolhidos para o desenvolvimento de um teste de diagnóstico diferencial por meio de ensaio da PCR quantitativa fluorescente (QF-PCR) multiplex. DNA genômico foi extraído de espécimes coletados de crostas, vesículas e soros de bovinos com sinais sugestivos de infecção por poxvirus. Como controle positivo utilizamos a cepa VACV WR, mantida em cultura celular. Os iniciadores foram modificados com diferentes fluorocromos para facilitar a identificação dos produtos da amplificação. O ensaio se mostrou altamente sensível, permitindo amplificação alvo-específica em amostras com menos de 1 pg de DNA. O ensaio também permitiu a detecção de co-infecção natural por OPV e PPV. A aplicabilidade do ensaio desenvolvido foi demonstrada para amostras clínicas coletadas durante surtos de varíola bovina na região Norte Fluminense. O teste genético tem aplicação em saúde humana e animal com relevância em vigilância epidemiológica.

ABSTRACT

The *Poxviridae* family consists of a group of double-stranded DNA virus with similar morphology, which replicate entirely in the cell cytoplasm of vertebrates and invertebrates. Members of this family are important pathogens that cause pustule-vesicular diseases in dairy cattle, milkers and their families. In southeastern Brazil, there is epidemiological evidence of a rising prevalence of these infections. The increased risk of human transmission by contact with infected animals with *Orthopoxvirus* (OPV) and *Parapoxvirus* (PPV) requires the development of efficient methods for rapid detection and identification of pathogenic viruses. Through a comprehensive comparative *in silico* analysis of 80 genomes of the OPV and PPV genera available in public databases polymorphic loci were identified that are species- and genus-specific, with potential application as DNA markers for molecular diagnostic. The specific locus for the genus OPV (POX005) proved to be highly variable in *Variola virus*, correlating with the geographical origin of viral isolates and the history of global disease spread. Two specific loci to OPV and PPV were chosen for the development of a differential diagnosis test using multiplex quantitative fluorescent PCR (QF-PCR). Genomic DNA was extracted from specimens collected from scabs, vesicles and plasma of cattle with suggestive signs of poxvirus infection. As positive control was used the isolate VACV WR maintained in cell culture. The primers were custom-modified with different fluorochromes to facilitate the identification of amplification products. The assay exhibited high sensitivity, enabling target-specific amplification in samples with less than 1 pg of DNA. The assay also allowed the detection of natural co-infection by OPV and PPV. The applicability of the assay developed was demonstrated in clinical samples collected during bovine vaccinia outbreaks in the Northern region of the State of Rio de Janeiro. The genetic test has applications in human and animal health, with relevance in epidemiological surveillance.

I - INTRODUÇÃO

A família *Poxviridae* compreende um fascinante grupo de vírus de DNA dupla fita que consegue replicar-se inteiramente no citoplasma de células de vertebrados e invertebrados. Dois membros desta família estão relacionados com doenças exantemáticas agudas em humanos e animais distribuídos mundialmente, causando perdas econômicas importantes e impacto na saúde pública (Moss, 2002; McFadden, 2005): *Orthopoxvirus* (OPV) e *Parapoxvirus* (PPV).

O gênero OPV conta com três espécies relacionadas: *Monkeypox virus* (MPXV), *Cowpox virus* (CPXV) e *Vaccinia virus* (VACV). Estas causam doenças ou infecções que se transmitem naturalmente, entre animais vertebrados e o homem ou vice-versa, constituindo importantes zoonoses. A severidade varia dependendo da espécie viral, cepa, e do estado do sistema imune do hospedeiro. Outros dois membros deste gênero, *Camelpox virus* (CMPV) e *Ectromelia virus* (ECMV), são também importantes patógenos animais (Mercer *et al.*, 2007).

As doenças causadas por infecções com membros do gênero PPV incluem dermatite pustular contagiosa (*Orf virus*) em cabras e ovelhas, a pseudovaríola bovina e a estomatite papular bovina, em gado bovino (Mercer *et al.*, 2007).

O modo de transmissão dos gêneros OPV e PPV é semelhante, ocorrendo através de fômites ou contato direto. Os sinais clínicos, lesões exantemáticas, causados por estes dois gêneros se assemelham, especialmente em hospedeiros humanos e gado bovino, o que é crítico em regiões onde estes vírus co-circulam (Inoshima *et al.*, 2002; Abrahão *et al.*, 2009).

O crescente risco de transmissão para seres humanos por contato com lesões em animais infectados por OPV e PPV requer o desenvolvimento de métodos eficientes para a rápida detecção e identificação destes vírus patogênicos.

Os métodos biológicos e sorológicos convencionais de detecção e diagnóstico possuem uma efetividade insuficiente para a identificação e diagnóstico rápido de poxviroses. A análise biológica dura um tempo longo (3-6 dias) e envolve a manipulação de espécies virais patogênicas. Os métodos sorológicos, como regra, permitem somente uma identificação ao nível de gênero; entretanto, sua sensibilidade se apresenta frequentemente insuficiente para ensaios realizados com amostras clínicas (Fedorko *et al.*, 2005).

A amplificação do DNA por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) permite o desenho de diversas técnicas apropriadas para a rápida identificação de poxvírus. Por exemplo, a aplicação da PCR para detecção de OPV utilizando oligonucleotídeos para as regiões de genes que codificam hemaglutinina (Ropp *et al.*, 1995), a proteína de inclusão do tipo A (Meyer *et al.*, 1997) e o homólogo do receptor do fator de necrose tumoral (Loparev *et al.*, 2001), já foram descritos. Para aumentar o poder de discriminação, os produtos de amplificação de DNA obtidos pela PCR são submetidos à digestão com endonucleases de restrição e os produtos da digestão são separados por eletroforese; desta forma, os padrões resultantes dos subfragmentos permitem a identificação de espécies de OPV. Atualmente a técnica de PCR em tempo real (RT-PCR) é a mais utilizada nos laboratórios de referência distribuídos mundialmente (Niedrig *et al.*, 2006).

Neste trabalho descrevemos um ensaio para detecção e diferenciação de OPV e PPV baseado na PCR quantitativa fluorescente. A procura por repetições nos diferentes genomas de poxvírus revelou um número significativo de polimorfismos no gene F1L, que codifica uma proteína envolvida na inibição da resposta apoptótica do hospedeiro (Kvansakul *et al.*, 2008).

Através de uma única reação foi possível detectar o DNA viral de OPV e PPV em concentrações compatíveis com as detectadas em trabalhos semelhantes utilizando RT-PCR (Putkuri *et al.*, 2009), em diluições apresentando menos de 1 pg de DNA.

II – REVISÃO DE LITERATURA

2.1 - CLASSIFICAÇÃO DOS POXVÍRUS

As propriedades características da família *Poxviridae* incluem a ocorrência da replicação no citoplasma e um vírion grande e complexo, que contém enzimas de síntese do RNAm e um genoma composto de uma única molécula de DNA dupla-fita de comprimento entre 130 a 300 quilobases (kb) com uma volta tipo grampo-de-cabelo em cada terminação (Moss, 2002).

Os poxvírus são agrupados em duas subfamílias: *Chordopoxvirinae* (ChPV) e *Entomopoxvirinae* (EnPV). A divisão destas duas subfamílias baseia-se no tipo de hospedeiro infectado, que consiste de vertebrados em ChPV e insetos em EnPV.

O sequenciamento de DNA e análises de bioinformática confirmam o relacionamento genético entre as subfamílias e sugerem que os poxvírus apresentam uma relação distante com outros vírus de DNA grandes, como os membros das famílias *Iridoviridae*, *Phycodnaviridae* e o recém descoberto *Mimivírus* (Xing *et al.*, 2006; Iyer *et al.*, 2006).

A subfamília *Chordopoxvirinae* consiste de oito gêneros: *Orthopoxvirus*, *Parapoxvirus*, *Avipoxvirus*, *Capripoxvirus*, *Leporipoxvirus*, *Suipoxvirus*, *Molluscipoxvirus* e *Yatapoxvirus* (Tabela 1). Membros do mesmo gênero são geneticamente relacionados, apresentando morfologia e hospedeiros similares, além de compartilharem alguma relação antigênica. Todavia, há outros poxvírus que ainda não estão bem classificados, incluindo novos vírus, em constante descoberta, como os isolados de lagartos, rãs, cervos, cangurus, entre outros (Moss, 2002).

O gênero *Orthopoxvirus* inclui vários patógenos virulentos de importância médica veterinária e humana com ampla distribuição geográfica (Moss, 2002; Piskurek e Okada, 2007). As espécies *Variola virus* (VARV), CPXV, VACV e MPXV são capazes de infectar seres humanos. Adicionalmente, além do CPXV e VACV, as espécies CMPV, ECMV, *Raccoonpox virus* (RCNV), *Volepox virus* (VPXV), *Taterapox virus* (TATV), *Uasin Gishu disease virus* (UGDV) e *Horsepox virus* (HSPV) são patógenos de grande importância animal (Moss, 2002).

Tabela 1 - Classificação e tamanho médio do genoma dos membros da família *Poxviridae*

Subfamília	Gênero	Espécies	Características
Chordopoxvirinae	<i>Orthopoxvirus</i>	<i>camelpox^a</i> , <i>cowpox^a</i> , <i>ectromelia^a</i> , <i>monkeypox^a</i> , <i>raccoonpox</i> , <i>skunkpox</i> , <i>vaccinia^{a,b}</i> , <i>variola^a</i> , <i>bufalopox</i> e <i>volepox^a</i>	DNA~200 kpb, G+C ~36%, distribuição ampla (<i>Vaccinia</i>) e restrita (<i>Variola</i>)
	<i>Parapoxvirus</i>	Auzduk disease, <i>bovine papular stomatitis^a</i> , <i>chamois contagious ecthyma</i> , <i>orf^{a,b}</i> , <i>pseudocowpox</i> , <i>parapox of red deer</i> , <i>sealpox</i> , <i>squirrelparapox</i>	DNA ~140 kpb, G+C ~64%
	<i>Avipoxvirus</i>	<i>canarypox^a</i> , <i>crowpox</i> , <i>fowlpox^{a,b}</i> , <i>juncopox</i> , <i>mynahpox</i> , <i>pigeonpox</i> , <i>psittacinepox</i> , <i>quailpox</i> , <i>peacockpox</i> , <i>penguinpox</i> , <i>sparrowpox</i> , <i>starlingpox</i> , <i>turkeypox</i>	DNA~260 kpb, G+C~35%, aves, transmissão por artrópodes
	<i>Capripoxvirus</i>	<i>goatpox</i> , <i>lumpy skin disease</i> , <i>sheeppox^{a,b}</i>	DNA~150 kpb, ungulados, transmissão por artrópodes
	<i>Leporipoxvirus</i>	<i>hare fibroma</i> , <i>myxoma^{a,b}</i> , <i>rabbit fibroma</i> , <i>squirrel fibroma</i>	DNA ~160 kpb, G+C ~40%, coelhos e esquilos
	<i>Suipoxvirus</i>	<i>swinepox^{a,b}</i>	DNA ~170 kpb, hospedeiros restritos
	<i>Molluscipoxvirus</i>	<i>Molluscum contagiosum^{a,b}</i>	DNA ~180 kpb, G+C ~60%, hospedeiro humano, tumores localizados, transmissão por contato
	<i>Yatapoxvirus</i>	<i>tanapox</i> , <i>yaba monkey tumor^{a,b}</i>	DNA ~145 kpb, G+C ~33%, primatas e roedores (?)
Entomopoxvirinae	<i>Alphaentomopoxvirus</i>	<i>Melontha melontha^b</i>	DNA ~260 - 370 kpb, Coleoptera
	<i>Betaentomopoxvirus</i>	<i>Amsacta moorei^{a,b}</i> , <i>Melanoplus sanguinipes^{a,b}</i>	DNA ~232 kpb, G+C ~18%, Lepidoptera e Orthoptera
	<i>Gammaentomopoxvirus</i>	<i>Chrionimus luridus^b</i>	DNA ~250 - 380 kpb, Diptera

^a Completamente sequenciado. ^b Membro protótipo (modificado de Moss, 2002).

Os VACV causam perdas na pecuária leiteira no Brasil (Damaso *et al.*, 2000; Schatzmayr *et al.*, 2000; Donatele *et al.*, 2005; Donatele *et al.*, 2007) e em criações de búfalos na Índia (Singh *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2007).

2.2 - MORFOLOGIA DA PARTÍCULA VIRAL DA FAMÍLIA *POXVIRIDAE*

Comparados a maioria dos outros vírus animais, os vírions dos poxvírus são maiores e distinguíveis por microscopia óptica. Com uma maior resolução, conseguida através da microscopia eletrônica, é possível a visualização de características ultra-estruturais: um vírion retangular (OPV) ou cilíndrico (PPV) de 250 – 280nm de largura por 290 – 350 nm de comprimento, coberto irregularmente com proteínas tubulares (Hazelton e Gelderblom, 2003; Mercer *et al.*, 2007).

A forma básica de infecção dos poxvírus é o vírion maduro (VM). O vírion extracelular envelopado consiste essencialmente do VM enclausurado por uma membrana adicional. Crio-preparações, que diminuem a formação de artefatos, têm sido combinadas com tomografias eletrônicas para prover uma reconstrução tridimensional do vírion da *Vaccinia*, geralmente consistente com as descrições clássicas da estrutura viral de amostras fixadas (Cyrklaff *et al.*, 2005).

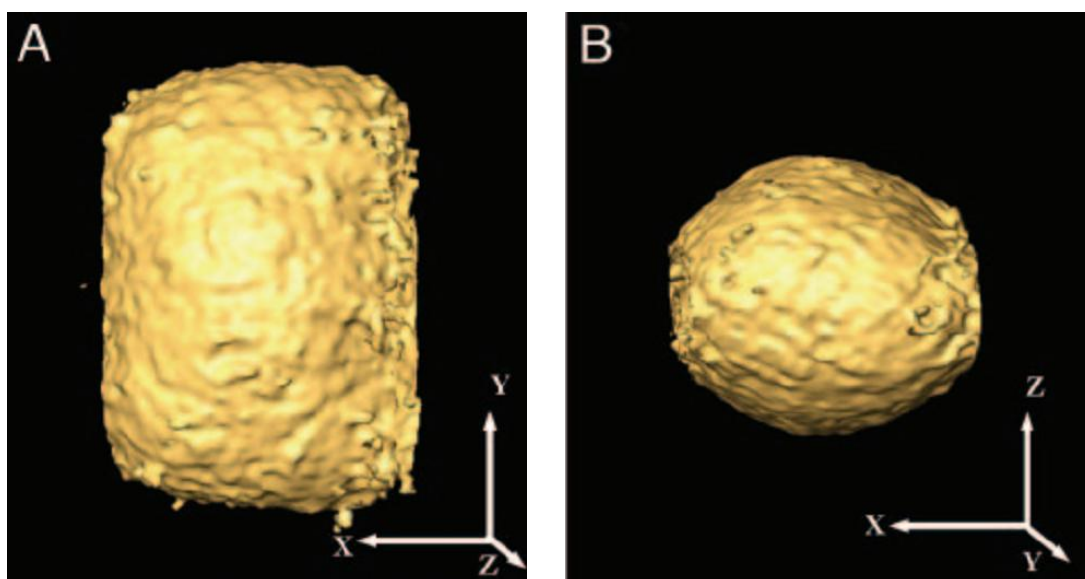


Figura 1 - Representação volumétrica das partículas virais reconstituídas por crio-eletrotomografia. (Cyrklaff *et al.*, 2005)

Imagens reconstruídas dos vírions demonstram um formato de barril, com dimensões aproximadas de ~360 x 270 x 250 nm (Figura 2). A largura (5-6 nm) e a densidade da membrana externa são consistentes com uma bicamada lipídica, que aparece enrugada devido a protruções irregulares que se estendem sobre a mesma.

A estrutura interna do vírion é complexa, consistindo de um cerne bicôncavo e agregados de materiais heterogêneos, denominados corpos laterais, entre as concavidades e a membrana externa. O cerne parece ser composto por duas camadas, com uma largura de 18 a 19 nm. A membrana interna parece ser contínua, exceto pela presença de um pequeno número de canais. A face externa possui uma estrutura paliçada que possivelmente é constituída de espículas em formato de T (8 nm de comprimento e 5 nm de largura), que estão ancoradas em uma provável membrana inferior (Figura 3) (Moss, 2002).

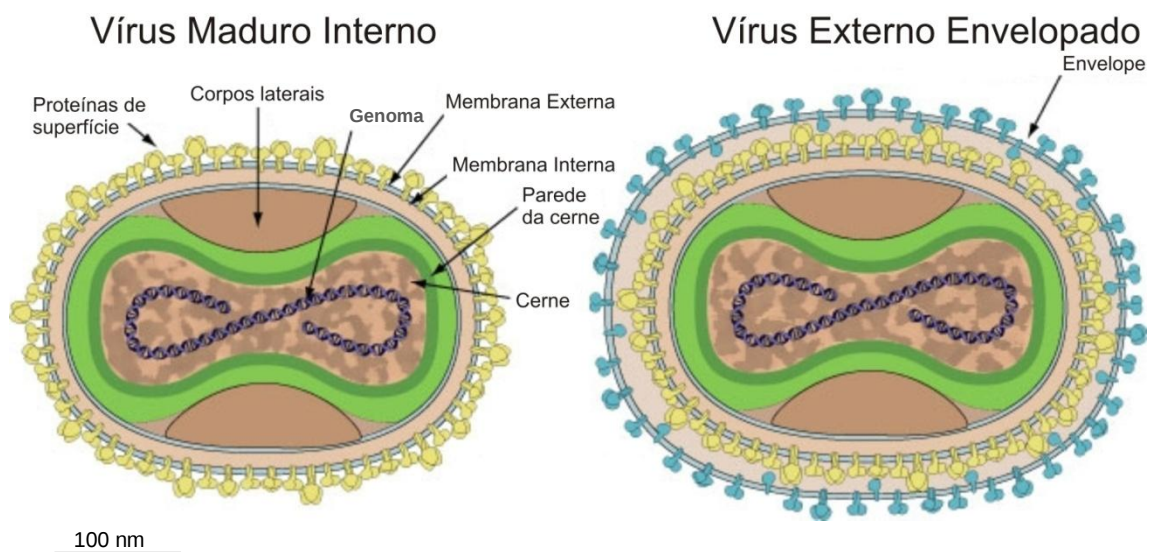


Figura 2 - Diagrama da estrutura do vírion do gênero *Orthopoxvirus* (adaptado de Swiss Institute of Bioinformatics <http://www.expasy.ch/viralzone/all_by_species/174.html>).

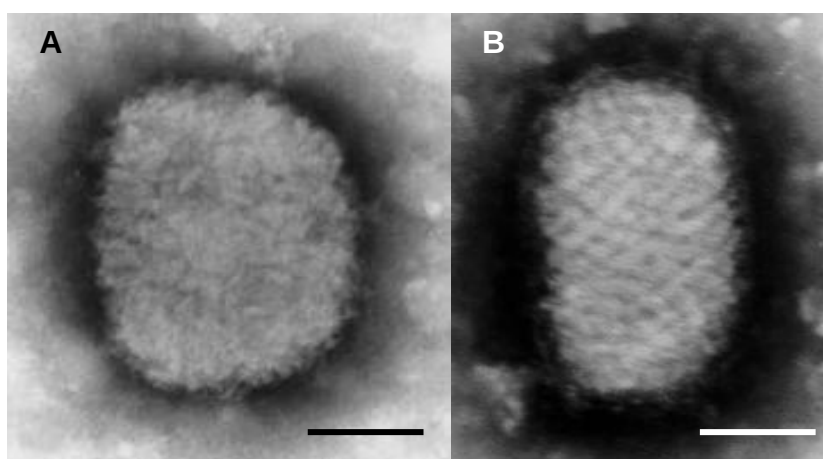


Figura 3 - Microscopia eletrônica dos vírions pertencentes aos gêneros *Orthopoxvirus* (A) e *Parapoxvirus* (B). Barra = 100nm (Schatzmayr *et al.*, 2000).

A composição química dos poxvírus assemelha-se ao das eubactérias. A massa de um VM de VACV é 9,5 fg, e os principais componentes são proteínas, lipídios e DNA, ocupando cerca de 90%, 5% e 3,2% do peso seco, respectivamente. Os componentes lipídicos do VM de VACV são predominantemente colesterol e fosfolipídios, enquanto outros poxvírus podem conter esqualeno e ésteres de colesterol. Carboidratos também estão presentes no vírus encapsulado (VE) de VACV e estão contidos nas glicoproteínas (Fenner *et al.*, 1988; Moss, 2002).

2.3 – ESTRUTURA GENÔMICA DA FAMÍLIA *POXVIRIDAE*

Os poxvírus estão entre os mais complexos vírus conhecidos. O tamanho do genoma das diferentes espécies é muito variável, apresentando valores de aproximadamente 134 kpb nos *Parapoxvirus* a mais de 300 kpb em alguns *Avipoxvirus*, característica compartilhada com outras famílias de vírus com grandes genomas (Moss, 2002).

O genoma dos poxvírus se constitui de uma molécula de DNA dupla fita linear. As fitas são covalentemente ligadas, produzindo uma terminação do tipo grampo-de-cabelo. Estas regiões situadas nas terminações do genoma contêm repetições terminais invertidas (RTI) de tamanho variável (<0,1 - 12,4 kpb) idênticas

e em orientação oposta possuindo diversas bases extra-hélices e um conteúdo rico em repetições de DNA. Os mecanismos envolvidos na gênese das RTI, assim como sua manutenção são ainda desconhecidos, porém as RTI são importantes durante a replicação do DNA viral (Mercer *et al.*, 2007)

Geralmente, os genes localizados na região central do genoma são conservados, sendo em sua maioria essenciais para a replicação viral. Esta região codifica, principalmente, proteínas estruturais e enzimas envolvidas no metabolismo do ácido nucléico. Em contraste, os genes localizados próximos às regiões terminais são mais variáveis, não essenciais à multiplicação viral *in vitro* e são geralmente transcritos em direção às regiões terminais (Figura 4). Estes genes estão relacionados com o tropismo por hospedeiros, imunomodulação e virulência (McFadden, 2005).

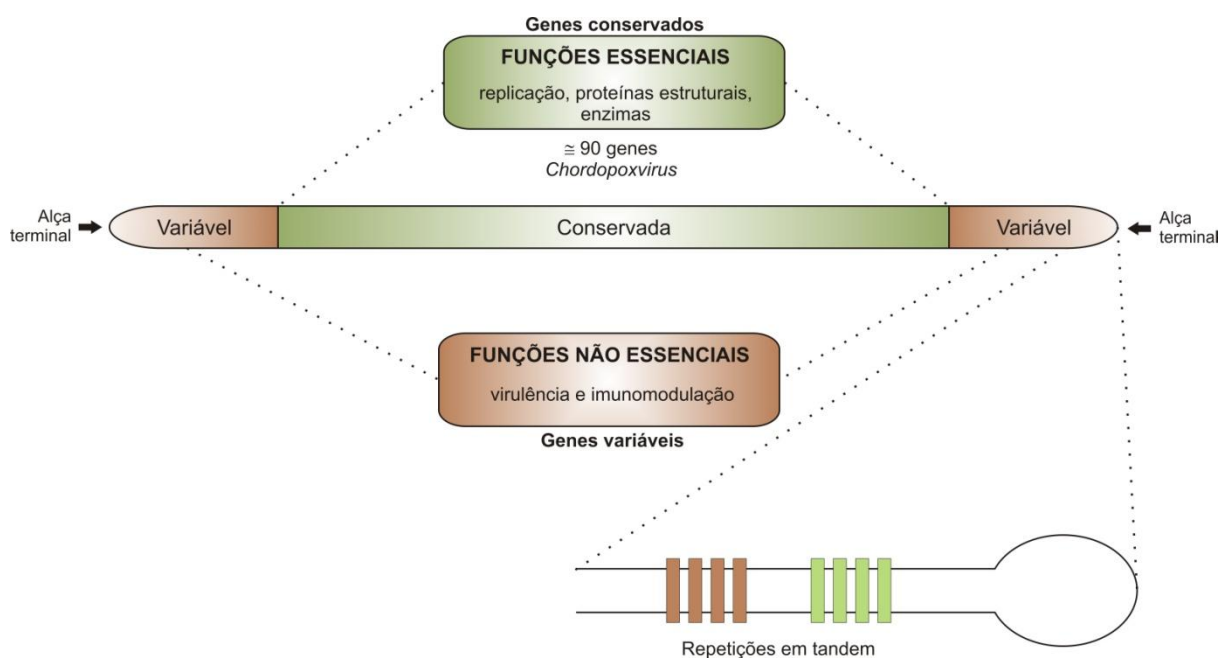


Figura 4 - Representação esquemática do genoma dos poxvírus. O genoma possui aproximadamente 200 kb, apresentando uma região central conservada e regiões terminais variáveis. (Adaptado de Smith & McFadden, 2002).

O número de genomas de poxvírus sequenciados tem aumentado consideravelmente nos últimos anos, com mais de 100 sequências genômicas completas, representando múltiplos gêneros, espécies e isolados disponíveis em bancos de dados de domínio público (<http://www.poxvirus.org/>, Lefkowitz *et al.*, 2005, acesso em outubro de 2009). As sequências de dois EnPVs, e de no mínimo um exemplar de cada gênero da subfamília ChPV, também estão disponíveis para comparação, permitindo a análise dos relacionamentos filogenéticos destes vírus (Xing *et al.*, 2006).

Por meio de análises filogenéticas do gênero OPV visualiza-se um íntimo relacionamento entre o CMPV e VARV um grupo mais relacionado entre si do que com outras espécies de OPV. As espécies CPXV, MPXV e ECMV não formam grupos próximos com nenhum outro OPV. Embora, mesmo as duas cepas de VARV se agrupando, as cepas de CPXV, BR e GRI-90, formam grupos divergentes. Desta forma os autores sugerem uma nova forma de classificação de CPXV, bem como sua localização dentro do gênero OPV (Gubser *et al.*, 2004; Xing *et al.*, 2006).

Mesmo que os representantes desta família viral contenham frequentemente mais de 150 genes, somente 49 destes constituem o repertório comum a todos os poxvírus totalmente sequenciados. Esse repertório permanece constante mesmo após novos genomas estarem sendo sequenciados e analisados (McLysaght *et al.*, 2003; Iyer *et al.*, 2006).

Existem, entretanto, aproximadamente 90 genes que são comuns para todos os membros da subfamília ChPVs. Estes genes estão envolvidos em funções chaves como replicação, transcrição e montagem do vírion, estando agrupados na região central do genoma. Em oposição, os genes que são espécie- ou gênero-específico estão usualmente distribuídos próximos aos dois fins do cromossomo (Figura 5) (Gubser *et al.*, 2004).

Muitos destes genes terminais codificam proteínas com a função de reduzir os processos antivirais do hospedeiro que incluem apoptose, reconhecimento e apresentação de antígenos, funções de algumas citocinas e processos de sinalização do sistema imune e, assim, têm sido denominados *genes de virulência* (Hughes e Friedman, 2005).

Os mecanismos pelos quais estes genes de poxvírus são incorporados ao fim do genoma ou capturados do hospedeiro não foram ainda totalmente

compreendidos. É possível que estas descobertas simplesmente reflitam o fato que a maior parte da região central do genoma codifica genes essenciais e que, como os espaços intergênicos são curtos, a inserção de DNA neste local inviabilize a formação de uma progênie (Hughes e Friedman, 2005).

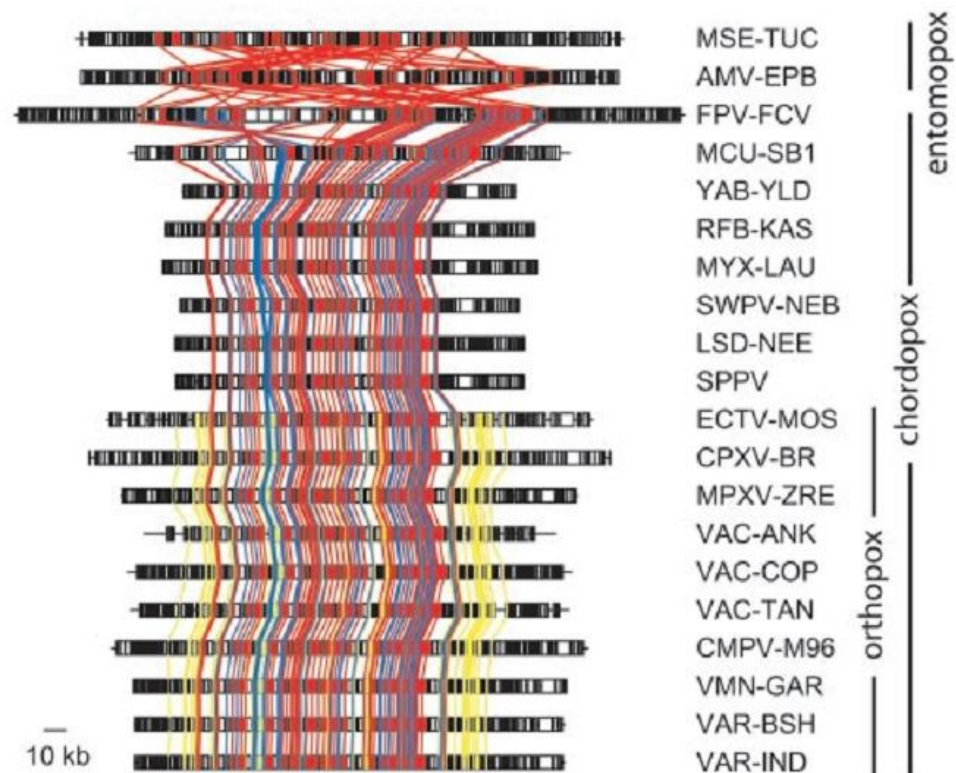


Figura 5 - Alinhamento do genoma de 20 poxvírus, mostrando o arranjo de 92 famílias de genes. Todos os genomas estão na mesma ordem e as distâncias horizontais são proporcionais às distâncias dos pares de bases. Os 34 ortólogos presentes em todos os poxvírus são mostrados em vermelho. Os 29 genes ortólogos, presentes em todos os genomas pertencentes à subfamília *Chordopoxvirinae*, mas não a *Entomopoxvirinae* estão mostrados em azul. Os 29 ortólogos presentes em todos os *Orthopoxvirus* são mostrados em amarelo. As linhas verticais conectam os ortólogos (McLysaght *et al.*, 2003).

2.4 – IMUNOMODULAÇÃO MEDIADA POR PROTEÍNAS VIRAIS

Os vírus codificam uma variedade de genes que interagem com vários componentes celulares que interferem com a resposta imune e inflamatória do hospedeiro (Turner e Moyer, 1998).

Certos vírus de DNA dupla fita, parasitas de vertebrados, expressam proteínas homólogas a moléculas sinalizadoras ou receptores do sistema imune, codificadas por genes que foram provavelmente capturados do hospedeiro (Bratke e McLysaght, 2008). Alguns destes genes presentes em poxvírus, incluem o MHC de classe I, IL-10/IL-24, IL-18, o receptor para interferon gama e o receptor do TNF II, além de inibidores de serina proteases, envolvidas em processos antiinflamatórios, glutathione peroxidase, com efeito anti-apoptótico na presença de estresse oxidativo (Bugert e Darai, 2000; Hughes e Friedman, 2005).

Apoptose é a principal resposta antiviral utilizada por organismos multicelulares para a remoção coordenada de células infectadas. Desta forma, muitos vírus, incluindo os poxvírus, desenvolveram mecanismos para inibir esta via, através de proteínas cujo alvo se encontra nos componentes cruciais da cascata apoptótica (Galluzzi *et al.*, 2008).

Dentro da família *Poxviridae* destacam-se as proteínas anti-apoptóticas CrmA, capaz de inibir efetivamente caspases 1 e 8; proteína M11L, uma proteína localizada na mitocôndria que inibe a liberação do citocromo c e a recém descrita proteína F1L, que também se localiza na mitocôndria e inibe a liberação do citocromo c através da interação com Bak, uma proteína pro-apoptótica que pertence à família do gene Bcl-2 (Turner e Moyer, 1998; Galluzzi *et al.*, 2008).

As proteínas relacionadas à F1L são encontradas somente no gênero *Orthopoxvirus*, sendo altamente conservadas, com mais de 95% de identidade de sequência dos últimos 220 aminoácidos. A grande diversidade de sequência entre os vários ortólogos de F1L está localizada no interior da região N-terminal, onde VARV, CPXV, ECMV e FWPV possuem repetições únicas de função desconhecida (Stewart *et al.*, 2005).

2.5 – CICLO REPLICATIVO DOS POXVÍRUS

A replicação dos poxvírus pode ser compreendida em etapas, temporalmente separadas, que envolvem a interação do vírus com a célula hospedeira, replicação do material genético e síntese de proteínas virais e liberação do vírion formado.

Todos os poxvírus replicam-se no citoplasma das células infectadas por uma complexa, mas largamente conservada, via morfogênica. Duas partículas virais infecciosas distintas - o vírus maduro intracelular (VMI) e o vírus envelopado extracelular (VEE) - podem iniciar a infecção. Os vírions VMI e VEE diferem em suas glicoproteínas de superfície e no número de suas membranas. A ligação do vírion é determinada por várias proteínas do vírion e por glicosaminoglicanas (GAGs) presentes na superfície da célula alvo ou por componentes da matriz extracelular. A replicação viral é caracterizada por três ondas de síntese de RNAs e proteínas virais (conhecidas como precoce, intermediária e tardia), que são seguidas pela morfogênese das partículas infecciosas (Figura 6).

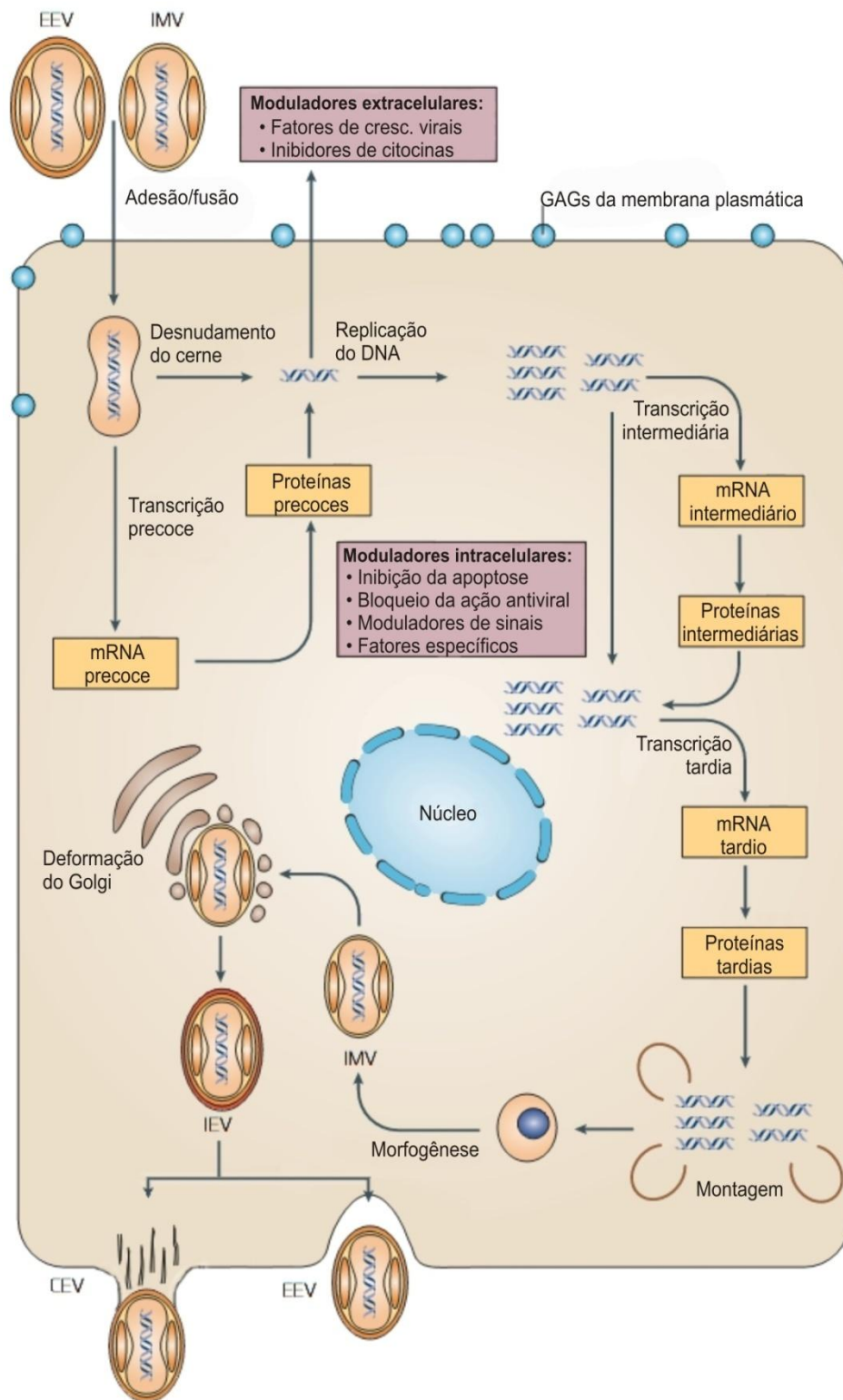


Figura 6 - Ciclo de replicação dos poxvírus e síntese de suas macromoléculas. (modificado de McFadden, 2005).

2.5.1 - Adsorção, penetração e desnudamento do vírus

O primeiro estágio da infecção viral consiste da adsorção e penetração das partículas virais, envelopadas ou nuas, nas células hospedeiras. Mesmo que ambas sejam infecciosas, se comportam de forma diferente. A membrana externa das partículas não envelopadas funde-se com a membrana plasmática da célula, ou com a concavidade formada pela invaginação da membrana plasmática, liberando o cerne viral no citoplasma. Vírions envelopados são adsorvidos mais rapidamente e eficientemente, o que explica porque eles são importantes na disseminação da infecção, tanto em células cultivadas quanto em animais (Mercer *et al.*, 2007).

No interior dos poxvírus a RNA-polimerase de origem viral transcreve metade do genoma viral em RNAm precoce. Esses RNAs após serem transcritos no interior do cerne, são liberados no citoplasma da célula. A proteína de desnudamento produzida após a infecção viral libera o DNA dos cernes, finalizando a primeira parte do ciclo de replicação (Fenner *et al.*, 1988; Moss, 2002; Moss, 2006).

2.5.2 - Replicação do DNA e síntese das proteínas virais

Análises por microscopia eletrônica de seções delgadas de células infectadas sugerem que os estágios iniciais da formação do vírion ocorrem circunscritos em áreas granulares elétricas densas no citoplasma (Fenner *et al.*, 1988). Entre as proteínas produzidas inicialmente após a infecção pelo vírus, destacam-se a DNA-polimerase e a timidina quinase, enzimas envolvidas na replicação viral. A replicação inicia-se logo após o processo de desnudamento, ocorrendo em regiões distintas do citoplasma. Posteriormente ocorre a transcrição dos RNAs intermediários, que precede a dos RNAs virais tardios. Os RNAs virais tardios são traduzidos em grande quantidade, acumulando-se proteínas estruturais e, em menor quantidade, outras proteínas e enzimas virais (Moss, 2002).

2.5.3 - Montagem e maturação

Os estágios iniciais da montagem dos vírions ocorrem em um local granular e

elétron denso do citoplasma, denominado corpúsculo de inclusão basófilo (Corpúsculo de Guarnieri) ou “fábrica de vírus”. As proteínas estruturais organizam-se para acondicionar o DNA, formando as partículas virais, denominadas vírions maduros intracelulares infectivos (VMI) (Moss, 2002).

As primeiras estruturas morfológicamente distintas que surgem com o acúmulo de proteínas estruturais são cúpulas consistindo de: uma membrana formada por duas camadas com uma borda coberta de espículas na superfície convexa e material granular adjacente na superfície côncava. As espículas conferem a membrana seu formato convexo rígido, que determina o tamanho da partícula viral imatura. A membrana dos vírus imaturos parece circular, com uma massa composta de nucleoproteína embebida numa matriz granular. Mudanças morfológicas adicionais ocorrem com a partícula imatura, que se reorganiza para formar um vírion maduro (Mercer *et al.*, 2007).

2.5.4 - Liberação

Os VMI são transportados pelos microtúbulos até o Complexo de Golgi, onde podem adquirir as membranas do Complexo, formando o vírus envelopado intracelular (VEI) que ao chegar à periferia da célula fundem com a membrana citoplasmática, o que resulta na liberação dos VEE (Moss, 2002).

2.6 – CARACTERÍSTICAS E ASPECTOS CLÍNICOS DE MEMBROS DA FAMÍLIA *Poxviridae*

Infecções por poxvírus em humanos produzem lesões cutâneas similares, na maioria das vezes associadas com adenopatia local e sintomas sistêmicos (Buller e Palumbo, 1991). A maioria destas infecções é branda e autolimitante, mas pode causar prostrações severas e uma variedade de complicações em potencial, incluindo disseminação descontrolada e morte, particularmente em indivíduos imunocomprometidos (Moss, 2002).

Uma pequena parte dos poxvírus que infectam outras espécies de mamíferos conclusivamente produzem infecções clínicas em humanos (McFadden, 2005). Estes são: MPXV, CPXV, *Bufalopox virus* (BPV) (todos *Orthopoxvirus*); *Cantagalo* e *Araçatuba virus* (*Orthopoxvirus* relacionados com VACV); *Orf virus*, *Pseudocowpox virus*, vírus da Estomatite Papular Bovina (EPBV), *Sealpox virus* (todos *Parapoxvirus*); e *Tanapox virus* (*Yatapoxvirus*).

Somente os vírus *Orf*, *Pseudocowpox* e da EPB são mundialmente endêmicos. CPXV é restrito a algumas partes da Eurásia, e MPXV é endêmico no continente africano (Fenner *et al.*, 1988; Moss, 2002).

A maioria das zoonoses causadas por poxvírus é adquirida através de cortes cutâneos ou lesões após contato direto com animais infectados vivos ou carcaças. Os reservatórios naturais são usualmente roedores, porém se propõe um inseto vetor como possível agente transmissor de Tanapox (McFadden, 2005). Os casos de poxviroses zoonóticas são esporádicos e isolados, sendo a transferência pessoa a pessoa pouco comum, exceto para MPXV (Buller e Palumbo, 1991).

2.6.1 - Gênero *Orthopoxvirus*

2.6.1.2 - *Vaccinia virus*

A origem de VACV é incerta. Ele parece ter surgido do extinto *Horsepox virus* ou do BPV, que é antigenicamente muito semelhante ao VACV (Moss, 2002). Existem numerosos isolados de VACV que diferem em suas propriedades biológicas e virulência em seres humanos e em outros modelos animais. Os isolados virais

mais amplamente utilizados em laboratórios são Western Reserve (WR) e Copenhagen (Moss, 2002).

Não existem reservatórios naturais para o VACV, porém, recentemente foram descritos viroses emergentes como *Cantagalo* (Damaso *et al.*, 2000) e *Araçatuba* (Trindade *et al.*, 2003), cujos vírus associados possuem genes que compartilham 99% de homologia com genes de VACV. Acredita-se que tais vírus se originaram pelo estabelecimento de VACV em gado bovino no Brasil durante a campanha de vacinação contra varíola. Os vírus *Cantagalo* e *Araçatuba* produzem lesões cutâneas que apresentam similaridade com lesões de CPXV.

Durante a erradicação da varíola humana, a vacinação foi praticada em tão grande escala que, ocasionalmente, animais domésticos, incluindo vacas, porcos, coelhos e búfalos, foram, acidentalmente, infectados com o vírus. Na ocasião, humanos foram infectados a partir das lesões nos animais domésticos e também via humanos por meio do *eczema vaccinatum* (Fenner *et al.*, 1988).

Na vacinação, VACV vivo é inserido na membrana basal da epiderme para obtenção do máximo efeito (Fenner *et al.*, 1988). A vacinação primária produz uma lesão cutânea que é similar, porém menos hemorrágica que a ocasionada por CPXV, produzindo uma cicatriz típica. O uso de vírus vivo tem muitas complicações, especialmente o *eczema vaccinatum* em algumas crianças. A vacinação de indivíduos imunossuprimidos pode ser letal e é contra-indicada a não ser que o risco de contrair varíola seja significativo (Moss, 2002).

2.6.1.1 - Cowpox virus

Cowpox virus (CPXV) foi denominado como resultado da associação com lesões pustulares em tetas de vacas e nas mãos de ordenhadores, entretanto, repetidos estudos demonstram que a infecção por CPXV não é uma doença comum (Buller e Palumbo, 1991). Esta zoonose está restrita ao Reino Unido, continente europeu e partes adjacentes a extinta URSS. Embora originalmente descrita como uma infecção adquirida por ordenhadores é raramente encontrada no gado bovino e muitos casos resultam do contato com felinos infectados. Atualmente tem sido encontrada em uma gama de hospedeiros, como ratos, gerbos e em diferentes animais de zoológicos (leões, tamanduás e elefantes) (Lewis-Jones, 2004; Vorou *et*

al., 2008). Além disso, estudos sorológicos corroboram a hipótese de pequenos roedores como reservatórios (Vorou *et al.*, 2008).

O período de incubação da infecção por CPXV é de aproximadamente sete dias, surgindo então sinais abruptos de febre, dor de cabeça, dor muscular, e algumas vezes náusea e vômito. As lesões cutâneas localizam-se, na maioria das vezes, nas mãos e face, iniciando como pápulas vermelhas, inicialmente solitárias, mas com rápida disseminação, seguida do surgimento de pústulas. O edema e eritema são muito mais pronunciados do que os vistos em infecções com *Orf virus* (Vorou *et al.*, 2008).

A infecção prévia por CPXV confere alguma imunidade contra a infecção por VARV, fato explorado por Edward Jenner para suas primeiras tentativas de vacinação (Lewis-Jones, 2004).

2.6.1.3 - Monkeypox virus

A infecção é adquirida tanto pela inoculação cutânea quanto pela inalação. O período de incubação dura de 10-14 dias e o período infeccioso ocorre durante a primeira semana de desenvolvimento de eczema. Sintomas característicos do início da infecção são febre e mal estar, ocorrendo na maioria dos pacientes antes do eczema (Di Giulio e Eckburg, 2004).

Linfadenopatia severa pode ocorrer em muitos pacientes. A linfadenopatia não é característica da Varíola, entretanto, seu diagnóstico clínico é a chave para distinguir entre a Varíola e Monkeypox humana (Di Giulio e Eckburg, 2004). Cerca de 90% dos pacientes infectados com MPXV desenvolvem linfadenopatia, que pode ser unidirecional ou bidirecional, nos linfonodos submandibulares, cervicais, pós-auriculares, axilares ou inguinais, ou uma combinação deles (Di Giulio e Eckburg, 2004).

O primeiro caso relatado de MPXV em humanos foi descrito em uma criança na República Democrática do Congo na década de 1970, 9 meses após a erradicação da Varíola naquele país (Fenner *et al.*, 1988).

A infecção por MPXV em humanos foi reconhecida pela primeira vez fora da África em 2003 nos EUA, sendo que os sintomas foram similares aos descritos na África. Nesta ocorrência, foram hospitalizadas 18 pessoas sendo que duas crianças

desenvolveram um quadro clínico severo (CDC, 2003).

2.6.1.4 - *Variola virus*

Variola virus é o único membro do gênero *Orthopoxvirus* que infecta somente humanos. Análises genômicas apontam uma relação filogenética desta espécie com TATV e CMPV (Gubser e Smith, 2002; Esposito *et al.*, 2006). Esta é uma das mais antigas infecções humanas conhecidas, sendo que as primeiras descrições de varíola datam de 10.000 a.C. na Ásia e Índia. Posteriormente, a infecção se espalhou pela Europa e África, sendo introduzida nas Américas no século 17 (Whitley, 2003; Li *et al.*, 2007).

O vírus pode permanecer viável por muitos meses no meio ambiente. Seu efeito patogênico é atenuado pelo tempo, exposição à luz natural e UV, e, rapidamente, pelo calor, perdendo seu poder infectante em 30 a 60 minutos à temperatura de 56 °C (Levi e Kallás, 2002).

O contágio ocorre, na grande maioria das vezes, pela inalação de gotículas contendo o vírus em suspensão, eliminadas pela mucosa oral, nasal ou faríngea dos pacientes com a doença. Embora o vírus esteja presente em grandes quantidades em crostas infectadas, este mecanismo de transmissão é menos frequente. Pode haver também infecção aérea à distância ou pelo manuseio de roupas, lençóis e cobertores contaminados, embora essas duas modalidades sejam pouco comuns (Levi e Kallás, 2002; Warren, 2002).

O vírus replica-se em linfonodos, tecido esplênico e na medula óssea. Eventualmente, o vírus pode deslocar-se para os vasos sanguíneos da pele e membranas mucosas da boca, nariz e garganta. O contágio é maior durante a primeira semana da doença porque a grande maioria dos vírus está presente na saliva nesse período. Como a virulência do VARV é muito alta, uma única partícula viral é capaz de causar a patologia (Warren, 2002).

O período de incubação médio da infecção por VARV é de 12 dias, variando de 7 a 14 dias. O início dos sintomas é abrupto, com febre muito alta, cefaléia, dores nas costas, com duração de dois a quatro dias, surgindo a seguir a erupção. Esta se inicia com máculas na face, que evoluem rapidamente para pápulas e, em alguns dias, para vesículas, que contêm líquido límpido e são cercadas por halo

eritematoso regular. Ao redor do sexto dia, as vesículas evoluem para pústulas, sendo ambos, tipos de lesões geralmente umbilicadas e de centro mais escuro (Levi e Kallás, 2002).

As lesões são uniformes e de mesmo estágio evolutivo. São profundas, endurecidas e de distribuição centrífuga. Ao redor do nono ao décimo dia, elas evoluem para crostas; a febre regride e o estado geral melhora bastante. No entanto, são necessários mais sete a dez dias para a queda das crostas. Áreas hipopigmentadas podem persistir por um longo tempo, havendo frequentemente cicatrizes profundas na face e, mais raramente, em outras partes do corpo. Existem também formas hipertóxicas, em que a morte pode ocorrer ainda no período prodômico ou logo após (Fenner *et al.*, 1988; Levi e Kallás, 2002).

Formas mais leves, com erupção abortiva, podem ser observadas em indivíduos com imunidade parcial obtida por vacinação. Já as formas hemorrágicas são de extrema gravidade e frequente letalidade (Warren, 2002).

2.6.2 - Gênero *Parapoxvirus*

2.6.2.1 - *Pseudocowpox virus*

Também conhecida como Paravaccinia ou Nódulo do ordenhador, a infecção por *Pseudocowpox virus* é ocupacional em ordenhadores e veterinários, e também afeta as pessoas que manipulam o leite fresco. A infecção humana é, portanto, acidental e ocorre somente quando o homem entra em contato com animais infectados ou manipula carne contaminada com o vírus. (Barravieira, 2005). A infecção é endêmica para o gado, causando lesões no úbere, tronco, pernas e cavidade oral, levando a formação de pústulas e crostas. (Barravieira, 2005; Mercer *et al.*, 2007).

O período de incubação varia entre 5 e 15 dias. Clinicamente, as lesões manifestam-se como pápulas eritematosas achatadas, que, após alguns dias, mudam para nódulos eritematosos violáceos. A pele se torna opaca e acinzentada com pequenas crostas, e com uma depressão central. Na maioria dos casos os nódulos ocorrem em pequenas quantidades nas mãos, particularmente nos dedos e ocasionalmente na face (Barravieira, 2005).

Os sinais clínicos desaparecem espontaneamente após 6-8 semanas, sem deixar cicatrizes. A prevenção consiste no uso de luvas e desinfetantes antes e depois da ordenha ou manipulação destes animais (Barravieira, 2005).

2.6.2.2 - Orf virus

A infecção por *Orf virus* deflagra as doenças dermatite pustular contagiosa e dermatite labial infecciosa, comuns em áreas com criação de ovelhas. A infecção pelo Orf vírus em ovelhas foi descrita primeiramente em 1787 e em cabras em 1879. O primeiro caso em humanos foi relatado em 1934 (Barravieira, 2005).

O Orf vírus é transmitido pelo contato com os animais infectados ou com fômites. A transmissão para humanos ocorre via contato com zonas da pele ferida de animais infectados. É muito frequente entre ordenhadores, veterinários, açougueiros, sendo considerada uma doença vinculada à profissão. Contaminação prévia não provê imunidade permanente, sendo que em casos de re-infecção se observa uma menor severidade da doença (Barravieira, 2005).

O período de incubação é de aproximadamente uma semana, as lesões manifestam-se sob a forma de ulcerações com formação de crostas localizadas mais comumente nas comissuras labiais, mas ocorre também nas faces extremas dos lábios. Nos casos mais graves, a infecção se estende até as gengivas, olhos, língua, narinas, úbere, vulva, região perianal, espaços interdigitais e coroas dos cascos. As lesões da língua, do esôfago e do rúmen são normalmente devidas a uma infecção secundária. Os cordeiros em idade de amamentação são severamente afetados e suas mães podem apresentar proliferações verrugosas nas tetas e partes vizinhas ao úbere (Moss, 2002).

Logo após o rompimento das vesículas existe a formação das crostas. A recuperação pode ser rápida, caso não ocorram infecções secundárias. As lesões no interior da boca podem dificultar ou impedir o animal de se alimentar. Os animais que são infectados apresentam perda de peso intensamente, devido à dificuldade de se alimentar, ao ingerir saliva com o vírus pode ocorrer à disseminação das lesões para os compartimentos estomacais, intestinos e até aos pulmões; nesses casos, pode levar o animal ao óbito (Barravieira, 2005; Mercer *et al.*, 2007).

2.7 – POXVIROSES NO BRASIL

As primeiras doenças causadas por poxvírus que se tem relato no Brasil ocorreram pela infecção pelo VARV. Durante vários séculos a varíola foi a principal causa de mortalidade nas vilas e cidades brasileiras, de onde se disseminava pelos sertões, provocando a morte de grande número de escravos e de índios que trabalhavam nos engenhos de açúcar do Nordeste e na extração de ouro em Minas Gerais (Levi e Kallás, 2002).

Devido ao nível mínimo de conhecimento sobre a patologia, a única opção era o afastamento dos enfermos dos ambientes frequentados pelos sadios, levando-os muitas vezes a morrerem sozinhos e desassistidos nas matas próximas a vilas e povoados.

O Brasil foi o país com o maior número de casos de varíola das Américas, chegando a vários milhares de casos reportados por anos durante os anos de 1960 a 1970. Com o início do programa de erradicação desta doença promovido pela OMS, a situação brasileira começou a mudar. O Brasil desenvolveu uma campanha de vacinação nacional, sendo o último país das Américas a erradicar a Varíola. Em 1971 foram notificados 19 casos, sendo que em 1972 ocorreu o último caso da doença, que a partir de então foi considerada erradicada do continente americano (Fenner *et al.*, 1988).

Porém, a partir das primeiras décadas do século XX houve os primeiros registros de outras poxviroses no Brasil e, desde então, iniciou-se um estudo mais detalhado de identificação visando o diagnóstico da doença e a classificação do agente viral (Levi e Kallás, 2002).

Nos últimos anos, vários relatos de casos de doença pústulo-vesicular ocorreram em diversas fazendas nos Estados do Rio de Janeiro, São Paulo, Espírito Santo e Minas Gerais acometendo o gado bovino leiteiro e pessoas, principalmente ordenhadores e seus familiares. As características clínicas sugeriram a possibilidade de um agente etiológico da família *Poxviridae*, posteriormente comprovada por diagnóstico laboratorial como sendo um *Orthopoxvirus* (Damaso *et al.*, 2000; Trindade *et al.*, 2003; Leite *et al.*, 2005; Donatele *et al.*, 2007).

Dentre os vírus isolados de surtos com características de poxviroses destacam-se: *Cantagalo virus* (Damaso *et al.*, 2000), *Araçatuba virus* (Trindade *et*

al., 2003) e *Passatempo virus* (Leite *et al.*, 2005), derivados de OPV, provavelmente VACV. Porém, em alguns casos o agente etiológico pode ser um *Parapoxvirus* (Damaso *et al.*, 2000; Schatzmayr *et al.*, 2000), por apresentar sintomatologia semelhante.

O número crescente de surtos de poxviroses que vêm ocorrendo com maior agressividade do vírus, preocupa, no que diz respeito ao prejuízo comercial das fazendas de gado leiteiro, levando tanto à baixa na produção de leite, quanto ao frequente desenvolvimento de mastite.

Considerando que, a transmissão viral ocorre principalmente pelo contato durante a ordenha manual dos animais, a doença é quase exclusivamente limitada às pequenas propriedades. Claramente, infecções em humanos a partir de fonte animal representam um perigo para aqueles profissionais que comumente entram em contato com os animais infectados (Silva-Fernandes *et al.*, 2009).

2.8 – RISCOS BIOLÓGICOS NA ERA PÓS-GENÔMICA

A varíola foi utilizada pela primeira vez como arma biológica pelas Forças Armadas Britânicas na América do Norte no século XVIII. Aparentemente, cobertores contaminados com o vírus da varíola (obtidos de pacientes infectados) foram distribuídos entre os índios americanos. O resultado foi uma epidemia com mortalidade superior a 50% nas tribos infectadas (Whitley, 2003).

Nos últimos anos, a preparação de contramedidas devido ao risco de ataques terroristas com agentes biológicos tem aumentado, principalmente na esfera militar. Os eventos ocorridos nos Estados Unidos da América em 11 de setembro de 2001 tornaram evidente a possibilidade de várias formas de terrorismo e o potencial de destruição das vidas de milhões de pessoas.

Quando se considera a maioria dos agentes que podem ser utilizados como armas biológicas, certos critérios devem ser ressaltados: potencial infeccioso e facilidade de disseminação, alto potencial de impacto na saúde e mortalidade. Pela sua fácil transmissão e seu perverso efeito devastador nas populações o vírus da Varíola é considerado uma arma biológica de potencial uso em bioterrorismo (Warren, 2002). Como arma biológica, a varíola possui um potencial maior do que o antraz (Whitley, 2003).

Além do VARV, existem 8 poxvírus que são capazes de causar doenças em humanos. Infecções com MPXV resultam em doenças sistêmicas severas e que necessitam de atenção especial. O MPXV tem estado confinado na África central e ocidental, porém, em 2003, alguns casos envolvendo este vírus foram relatados nos EUA, sendo transmitidos de roedores para cães e depois para humanos (CDC, 2003).

Desde a erradicação da Varíola em 1980 estoques laboratoriais do vírus permaneceram em dois laboratórios com alta segurança nos EUA e Rússia. Entretanto, durante a década de 1980, a União Soviética conduziu um programa biológico clandestino em que cepas virulentas do vírus foram produzidas para utilização como armas (Hull *et al.*, 2003).

Atualmente, com a possibilidade de síntese química de genomas, novas perspectivas de obtenção de genomas virais têm surgido (Smith *et al.*, 2003). Mesmo o DNA de uma partícula de poxvírus sozinho não seja infeccioso, através de recombinação com espécies relacionadas como CMPV ou TATV, uma cepa altamente virulenta pode ser obtida e utilizada como arma biológica. Desta forma, torna-se necessário o desenvolvimento de novas formas de detecção e tratamento destes vírus, pois os estoques de vacinas distribuídos pelo mundo não seriam suficientes para imunizar rápida e eficazmente a população humana (Whitley, 2003; Hull *et al.*, 2003; Parrino e Graham, 2006).

2.9 – DIAGNÓSTICO DE POXVÍRUS

O diagnóstico das poxviroses é realizado clínico e laboratorialmente. O diagnóstico clínico geralmente não é suficiente, tornando-se necessário estabelecer um diagnóstico laboratorial específico.

Nos últimos anos, novas formas de diagnóstico foram desenvolvidos, buscando maior rapidez e confiabilidade nos resultados além de tentar resolver eventuais dúvidas quanto ao agente etiológico de uma série de casos relatados em diferentes partes do mundo.

Uma forma de diagnóstico rápido da partícula viral consiste no exame direto do espécime clínico ao microscópio eletrônico de transmissão, possibilitando a diferenciação de uma infecção por poxvírus de outras infecções. Entretanto, todos

OPV são semelhantes em tamanho e morfologia e desta forma não podem se diferenciados por esta técnica; contudo, a microscopia eletrônica permite discriminar OPV de PPV e herpesvirus (Schatzmayr *et al.*, 2000, Gelderblom e Hazelton, 2003, Kurth e Nitsche, 2007).

A propagação viral em membrana corioalantóica de embriões de galinha provê uma clara evidência para alguns poxvirus ao produzir alterações caracterizadas por focos necróticos denominados “pocks”. Porém, este método demora no mínimo 2 dias, quando os embriões de 11-13 dias estão prontos (Mercer *et al.*, 2007).

Uma outra alternativa é a cultura celular para isolamento do vírus, o que foi por anos o padrão ouro de diagnóstico (Mercer *et al.*, 2007). Dependendo do poxvirus, o efeito citopático característico pode ser visualizado após 12 horas e se recomenda que somente pessoal com experiência conduza a diferenciação do vírus após cultivo celular ou em membrana corioalantóide (Kurth e Nitsche, 2007).

A introdução de anticorpos monoclonais melhorou a sensibilidade e especificidade dos métodos serológicos, entretanto, mais de 3 horas são necessárias para obter o resultado final. Além disso, os membros do gênero OPV compartilham características antigênicas, sendo difícil a diferenciação intra-específica (Fedorko *et al.*, 2005; Kurth e Nitsche, 2007).

A detecção indireta de poxvirus também é possível, porém pacientes infectados só desenvolverão anticorpos poxvirus-específicos de 2 a 3 semanas após a infecção permitindo o diagnóstico positivo, sendo este método utilizado em estudos retrospectivos e não como diagnóstico primário de infecções agudas (Kurth e Nitsche, 2007).

A amplificação do DNA por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica bem aceita assim como a mais sensível para detecção de vírus. Mesmo que a detecção do material genético do vírus não prove a infecção, em espécimes clínicas ela é um marcador diagnóstico de infecção por poxvirus.

As metodologias originais centradas na PCR para a tipagem rápida de poxvirus se baseavam na digestão dos produtos da amplificação do DNA alvo por enzimas de restrição. Diversos genes têm sido utilizados como *locus* alvo de amplificação: hemaglutinina (Ropp *et al.*, 1995), a proteína de inclusão do tipo A

(Meyer *et al.*, 1997) e o homólogo do receptor do fator de necrose tumoral (Loparev *et al.*, 2001).

Atualmente, o PCR em tempo real (RT-PCR) tem recebido atenção especial por combinar uma série de benefícios como velocidade (40-90 min), nenhuma manipulação posterior à PCR e a possibilidade de quantificar e genotipar em um mesmo tubo. Porém, a eficácia do RT-PCR depende dos iniciadores desenhados e da sequência alvo (Kurth e Nitsche, 2007).

A técnica de RT-PCR é a mais amplamente utilizada nos laboratórios de referência distribuídos mundialmente (Niedrig *et al.*, 2006). Diversas abordagens e genes já foram utilizados com esta técnica para identificar uma determinada espécie de *Orthopoxvirus* através do ponto característico de desanelamento obtido numa análise de curva de desanelamento por fluorescência (em inglês *Fluorescent Melting Curve Analysis* - FMCA) após o passo da amplificação (Kurth e Nitsche, 2007).

FMCA é um método versátil para identificar qualquer polimorfismo conhecido pela temperatura característica de desanelamento na hibridização da sonda. Esta técnica foi utilizada para detectar VACV (Nitsche *et al.*, 2005; Cohen *et al.*, 2007; Nitsche *et al.*, 2006b), VARV (Aitichou *et al.*, 2008; Fedele *et al.*, 2006; Putkuri *et al.*, 2009), MPXV (Saijo *et al.*, 2007), CAPXV (Balamurugan *et al.*, 2009) e FWPV (Tadese *et al.*, 2008).

Com relação à detecção de *Parapoxvirus* pela PCR, poucos trabalhos existem na literatura, o que denota a importância de expandir as formas de detecção destes vírus (Inoshima *et al.*, 2000; Nitsche *et al.*, 2006a). Recentemente, mediante a amplificação de um gene altamente conservado entre 59 sequências disponíveis que codifica uma proteína do envelope viral (B2L) foi possível a discriminação de DNA de *Parapoxvirus*, mas não a diferenciação de espécies (Nitsche *et al.*, 2006a).

O presente trabalho explora a PCR quantitativa fluorescente (QF-PCR) em uma reação multiplex seguida da separação por eletroforese capilar para detecção e diferenciação de Poxvírus. Esta variação da técnica da PCR é muito sensível e de simples execução, sendo amplamente explorada na tipagem humana com fins forenses e médicos (Butler, 2005).

A QF-PCR consiste em marcar os iniciadores com fluorocromos pré-determinados, para que, após a amplificação de uma região do DNA, os produtos sejam identificados e quantificados por excitação luminosa por um laser de argônio.

A partir da luminosidade liberada, pode-se realizar a associação ao fluorocromo correspondente e assim se concluir qual iniciador foi amplificado.

Apesar do grande número de aplicações desta técnica na área de genética humana, pouco está estabelecido para fins de diagnóstico de doenças bacterianas ou virais, sendo que nos últimos anos têm surgido “kits” de diagnóstico do vírus do papiloma humano (HPV) (MolGentix, 2007).

III – OBJETIVO GERAL

Desenvolvimento de ensaio quantitativo multiplex fluorescente da reação em cadeia da polimerase (QF-PCR) para detecção e diferenciação de membros da família *Poxviridae* (*Orthopoxvirus* e *Parapoxvirus*)

3.1 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- 3.1.1 – Identificar novos marcadores de DNA gênero/específicos, visando a sua inclusão em teste genético para identificação e discriminação viral
- 3.1.2 – Análise filogenética de minissatélites da região polimórfica do ortólogos do gene *F1L* de *Vaccinia virus*.
- 3.1.3 – Estabelecer ensaio de PCR quantitativo fluorescente capaz de diferenciar os membros da família *Poxviridae* (*Orthopoxvirus* e *Parapoxvirus*).

IV – JUSTIFICATIVA

Apesar da variedade de técnicas de detecção de vírus da família *Poxviridae* descrita na literatura científica, poucas visam à detecção e diferenciação dos principais gêneros em um único ensaio. Na maioria dos testes genéticos baseados na PCR os produtos de amplificação devem ser submetidos à digestão com enzimas de restrição e os fragmentos derivados analisados para atingir o poder de discriminação desejado.

O diagnóstico molecular etiológico em uma única reação por PCR a partir de amostras relevantes de origens humana, bovina e de outros animais permitirá um mapeamento epidemiológico regional mais efetivo destas doenças. Estas informações serão de fundamental importância para as autoridades de Defesa Sanitária Animal e Saúde Pública dos estados envolvidos, visando ao estabelecimento de medidas apropriadas para prevenção e contenção de novos surtos de poxvirose humana e animal. Além de fornecer subsídios para a elaboração de programas de atendimento, informação e tratamento adequado a pessoas acometidas pela doença e programas de gestão e qualidade de produtos de origem animal aos pequenos produtores regionais.

V – MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 - AMOSTRAS CLÍNICAS

Os espécimes para análise foram disponibilizados pelo Prof. Dr. Carlos Eurico Pires Ferreira Travassos e o Dr. André Tavares Silva Fernandes do Setor de Epidemiologia e Medicina Veterinária Preventiva, Laboratório de Sanidade Animal (LSA) do Centro de Ciência e Tecnologia Agropecuária (CCTA) da Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF). Estes consistiram de 26 (vinte e seis) crostas coletadas de lesões úlcero-crostosas (amostras C1 a C26); quatro amostras de líquido vesicular (L1 a L4), coletado de lesões vesículo-pustulares, ambas do úbere de gado bovino leiteiro, além de 10 (dez) amostras de soro (S1 a S10), resultado de coletas de sangue através de punção venosa na jugular ou mamária, nos animais acometidos, totalizando 40 amostras. O material biológico foi coletado de animais oriundos de propriedades rurais localizadas em diferentes regiões do Estado do Rio de Janeiro, Brasil, nas quais ocorreram surtos entre os anos de 2000 a 2006 (Fernandes, 2008). A metodologia utilizada para a coleta dos espécimes clínicos (crostas, líquido vesicular e plasma) estão descritas em Fernandes, 2008.

5.2 - DNA GENÔMICO REFERÊNCIA

O DNA de referência isolado de *Vaccinia virus* Western Reserve, cedido pelo Laboratório de Vírus da UFMG, foi extraído de vírus cultivado em monocamadas de células Vero, após passar por uma centrifugação para sedimentação das células, gentilmente preparadas e cedidas pelo mestrando Inareí José Paulini Júnior (Laboratório de Biologia do Reconhecer, UENF).

5.4 - EXTRAÇÃO DO DNA

Para a extração de DNA a partir de amostras biológicas de origens animal ou de vírus isolados de amostras biológicas sob cultivo foram testadas três metodologias.

5.4.1 – Protocolo 1

Baseado na metodologia descrita por Shchelkunov *et al.*, 2005. O material biológico foi homogeneizado em solução contendo 200 µL de tampão de lise (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM EDTA, 100 mM NaCl e 1% SDS) e 20 µL de solução de proteinase K (10 mg/mL), com incubação a 56 °C por 10 min. A mistura foi centrifugada (Micro centrífuga Eppendorf, modelo 5415C) por 7 min a 18.000g para remover a fração insolúvel. Ao sobrenadante foram adicionados 400 µL de uma mistura de fenol-clorofórmio (1:1), e submetida agitação em vórtex por 1 min. As fases aquosa e orgânica foram separadas por centrifugação a 5.000g por 1 min. A fase aquosa foi transferida para tubos limpos para extração do fenol residual com álcool isoamílico, como no passo anterior. O DNA foi precipitado da fase aquosa adicionando 1:10 v/v de solução de acetato de sódio 3M pH 5.5 e dois volumes de etanol 100%. A mistura foi centrifugada e seguida pela remoção da fase aquosa, secagem do sedimento e sua dissolução em 30µL de água.

5.4.2 – Protocolo 2

Baseado na metodologia descrita por Fernandes, 2008. As amostras de espécimes clínicos: líquido vesicular, secreções, crostas maceradas e monocamada de Vero infectada processadas foram aquecidas a 99°C por 15 minutos, em seguida, submetidas às extrações com PCI (fenol/clorofórmio/álcool isoamílico, 25:24:1). Os espécimes clínicos foram adicionados com o mesmo volume de PCI. Posteriormente, a amostra foi vertida quatro vezes e deixada em repouso por 20 minutos. A suspensão obtida, em seguida, foi centrifugada a 17.000g (Micro centrífuga Eppendorf, modelo 5415C) por 15 minutos e o sobrenadante foi coletado. Ao sobrenadante obtido após as extrações foi adicionado 10% do volume de acetato de sódio, pH 5,5, a 3 M e em seguida 2,5x volumes de etanol absoluto resfriado. O sobrenadante foi desprezado, etanol 75% foi adicionado sobre o sedimento e em seguida foi centrifugado a 17.000g (Micro centrífuga Eppendorf, modelo 5415C) por 5 minutos. O etanol foi então desprezado e o tubo vertido para secar a temperatura ambiente. O sedimento obtido foi ressuspendido em 30 µL de água ultra pura.

5.4.3 – Protocolo 3

O DNA viral foi extraído das amostras biológicas utilizando o kit *Illustra Blood Genomic Prep* (GE HealthCare) de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante, modificando-se apenas o volume de amostra biológica adicionado para 100 µL independentemente de sua origem.

5.5 - QUANTIFICAÇÃO DO DNA

Após a extração, foi determinada a concentração de DNA por fluorimetria através do kit Quant-iT™ dsDNA HS Assay® (Invitrogen), de acordo com as especificações do fabricante e utilizando o fluorímetro Qubit® (Invitrogen).

5.6 - PROCURA *IN SILICO* DE SEQUÊNCIAS DE DNA REPETIDAS EM TANDEM (ELEMENTOS STR, MICROSSATÉLITES) EM GENOMAS DA FAMÍLIA *POXVIRIDAE*

Para revelar várias facetas da distribuição de microssatélites, a procura ocorreu nas sequências dos genomas referência em formato FASTA obtidas em bancos de dados disponíveis no NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) com os seguintes números de acesso: *Vaccinia virus* (NC_006998), *Cowpox virus* (NC_003663), *Variola virus* (NC_001611), *Orf virus* (NC_005336) e sequências disponíveis para *Pseudocowpox virus* (atualizados em 22 de abril de 2008). A procura por elementos STR foi realizada com o programa *Tandem Repeat Finder* (TRF) (Benson, 1999) calibrado com o tamanho de período de nucleotídeos e com os parâmetros de estringência de alinhamento de {2,7,7} para *match*, *mismatch* e *indels*, respectivamente. O programa gera valores de escores de alinhamento para cada elemento de repetição diretamente proporcional ao número de cópias e a porcentagem de similaridade com a sequência consenso.

5.7 - VALIDAÇÃO *IN SILICO* DOS POLIMORFISMOS

A natureza polimórfica dos loci STR foi avaliada usando uma metodologia de comparação genômica centrada nos intervalos de interesse. As sequências STR dos

bancos de dados foram alinhadas usando recurso on-line *Multiple Sequence Alignment* por CLUSTALW (<http://align.genome.jp/>) para identificar variações alélicas (Machado e Medina-Acosta, 2009).

5.8 - SEQUÊNCIAS AMPLIPRIMER

Cada *locus* STR selecionado, mascarado e flanqueado, foi analisado utilizando o programa on-line *OligoPerfect™ Designer from Invitrogen™* (<http://tools.invitrogen.com/content.cfm?pageid=9716>), com os seguintes parâmetros para o ensaio multiplex: aplicação (*PCR detection*), tamanho (18-22nt), temperatura de anelamento (59-62°C) conteúdo GC (50%), tamanho do produto de amplificação (100-350 pb), concentração do iniciador (5 pM), concentração de sal (50 mM).

A ausência de estruturas restritivas a reação (potencial de formação de grampo, complementaridade 3', potencial de formação de sítios de auto-anelamento) foi confirmada usando o programa on-line *OligoCalc Oligonucleotide Properties Calculator* (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>).

As identidades das sequências amplificadas foram validadas utilizando a ferramenta on-line *Genome Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST, *blastn*) (Cummings *et al.*, 2002). As sequências dos iniciadores foram testadas quanto à presença de homologia ou complementaridade entre si ou entre outras sequências de poxvírus disponíveis no *GenBank* (Benson *et al.*, 2005). A ausência de homologia com outras espécies de poxvírus foi um dos critérios para a escolha dos oligonucleotídeos apropriados. Por meio de testes experimentais, o par de iniciadores altamente conservado, incapaz de formar *amplicons* indesejados foi selecionado para a espécie em questão.

5.9 - INICIADORES

Os iniciadores foram desenhados a partir das sequências flanqueadoras dos loci polimórficos identificados e selecionados para o gênero OPV e para o *locus* específico para o gênero PPV descrito em outros trabalhos (Tabela 2).

Desta forma, os iniciadores PPV-específicos, descritos por Nollens e colaboradores (2006) localizados no gene B2L foram reavaliados, buscando adequá-

los a um experimento de PCR multiplex com relação ao tamanho do *amplicon*, temperatura de anelamento e concentração de sais para a reação. Após o desenho dos iniciadores, uma guanina foi adicionada na região 5' para promover a adenilação (Hill *et al.*, 2008).

Tabela 2 - Iniciadores desenhados para detecção viral

Iniciador	Deteção	Locus	Gene	5'	3'	Fluorocromo	Amplicon
P2	Cowpox [TTTCA] _n	POX002	BR006	CCCGCTCTCCAATCATT	GCGCAGCATCATATCCAAGTT	PET (Vermelho)	127-188
P8	Cowpox/ Vaccinia [GATACA] _n	POX008	CVA24	CCCGCTATAAAGGCATTATCAA	GTTCTACATCGTGACAGATACATTC	6-FAM (Azul)	320-387
P5	Pan- Orthopox	POX005	F1L	ATACCATATTTTCTGGAAGTGGAT	GAGTATGTTGCCGATGTTTATGTG	VIC (Verde)	117-369
P9	Pan- Parapox	-	B2L	CGAGTCCGAGAAGAATACGC	GAGAACCTCGGGCTCTACTCC	NED (Amarelo)	188

5.10 – AMPLIFICAÇÃO DAS REGIÕES ALVO NOS ESPÉCIMES CLÍNICOS

As reações foram realizadas utilizando o DNA extraído de cada um dos espécimes clínicos, diluindo-as em água ultra-pura quando necessário. A reação de PCR consistiu na adição de 5 pM dos pares de iniciadores juntamente com 2,0 mM de MgCl₂, 1,25U da enzima Taq Polimerase (Applied Biosystems), 5μL de tampão 10X e 5μL de amostra, totalizando 12μL de reação. A programação da amplificação consistiu de 1 ciclo de 95°C/10 minutos, 35 ciclos de 94°C/1 minuto, 60°C/1 minuto e 72°C/1 minutos e 1 ciclo de 60°C/60 minutos, sendo realizado no termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems).

5.11 – ANÁLISE DOS AMPLICONS

Ao produto da PCR foram adicionados formamida (Hi-Di™ Formamide, Applied Biosystems) e o marcador de peso molecular (*GeneScan*™ – 500 LIZ® *Size Standard*, Applied Biosystems) conforme especificação do fabricante. A mistura foi aquecida a 95°C/3min e rapidamente resfriada a 4°C/3min para desnaturar. Após esta etapa, os produtos da QF-PCR foram submetidos à separação eletroforética em capilar utilizando o analisador automático ABI PRISM 310 GENETIC ANALYZER (Applied Biosystems, USA).

5.12 – IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS PERFIS ALÉLICOS

Os perfis eletroforéticos foram analisados utilizando os programas *Genescan*® e *Genotyper*® (versão 3.7, Applied Biosystems) que geram eletroferogramas baseados na quantidade relativa de fluorescência e no tempo de corrida do fragmento em relação aos padrões de peso molecular.

5.13 – ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS GÊNICAS DOS ORTÓLOGOS DO GENE F1L

As sequências de nucleotídeos e aminoácidos dos ortólogos do gene F1L de *Vaccinia virus* das diferentes espécies de OPV foram obtidos do sítio do *Poxvirus Bioinformatics Resource Center* (PBR) (<http://www.poxvirus.org>; Lefkowitz *et al.*, 2005). As sequências foram baixadas no formato FASTA e analisadas novamente para busca de elementos de repetição com o programa TRF (Benson, 1999), e uma vez identificados foram agrupados para as análises posteriores. Cada grupo de STRs foi alinhado, utilizando-se o programa CLUSTALW disponível no pacote MEGA versão 4 (Tamura *et al.*, 2007) e eventuais disparidades do processo de alinhamento foram corrigidas manualmente com auxílio do programa BioEdit (Hall, 1999), como também a obtenção dos índices de entropia das sequências.

As análises filogenéticas posteriores foram conduzidas no programa MEGA versão 4 (Tamura *et al.*, 2007). As distâncias genéticas foram geradas através do método *neighbor-joining* e o suporte das genealogias construídas foram aferidas por 2000 re-amostragens dos dados por *bootstrap* (Salemi e Vandamme, 2009).

Para a obtenção dos índices de hidrofobicidade de proteínas foi utilizado o programa on-line *Protein Hydrophobicity Plots* (<http://www.vivo.colostate.edu/molkit/hydropathy/>), que gera um gráfico baseado nos índices de hidrofobicidade da sequência de aminoácidos da proteína fornecida.

VI – RESULTADOS

6.1 – PROCURA DE SEQUÊNCIAS POLIMÓRFICAS NOS GENOMAS DE POXVIRUS

A procura por STRs presentes nos genomas de poxvírus ocorreu inicialmente nos genomas dos isolados protótipo de cada espécie. Após a identificação de cada região repetida, estas foram comparadas com os demais genomas de cada espécie disponíveis no sítio do *Poxvirus Bioinformatics Resource Center* (PBR) (<http://www.poxvirus.org>; Lefkowitz et al., 2005).

A seleção das regiões repetidas obedeceu a critérios qualitativos com respeito ao resultado obtido pelo programa TRF. Após a análise realizada pelo programa, o próprio gerou uma lista com os resultados de cada repetição encontrada. Cada uma possui uma pontuação associada que se baseia na qualidade da repetição, levando em consideração a perfeição como esta se apresenta (Benson, 1999).

Somente repetições com pontuação acima de 100 e apresentando homologia entre as repetições mais próximo possível a 100% foram selecionados para o desenho de iniciadores específicos. Após a seleção, três regiões polimórficas com características desejáveis foram encontradas entre os *Orthopoxvirus*: uma região única para CPXV, que apresenta um STR pentanucleotídeo [TTTCA]; uma região única compartilhada entre VACV e CPXV, que contém uma repetição hexanucleotídica [GATACA], com polimorfismos presentes somente em alguns isolados destas duas espécies (Tabela 3); e uma região altamente polimórfica, presente em diferentes espécies do gênero *Orthopoxvirus*, que apresentou sequências de STRs distintas. Devido a enorme variabilidade apresentada por esta última repetição, uma análise mais detalhada, utilizando todas as sequências disponíveis foi realizada para visualizar a distribuição dos polimorfismos encontrados.

Tabela 3 - Número de repetições encontradas nos genomas de *Cowpox virus* e *Vaccinia virus*.

Repetição	Número de acesso	Isolado viral	Nº de cópias
[GATACA] _n POX008	X94355.2	<i>Cowpox virus</i> GRI-90	10,5
	DQ437593.1	<i>Cowpox virus</i> Germany 91-3	0
	NC_003663.2	<i>Cowpox virus</i> Brighton Red	5,0
	NC_006998.1	<i>Vaccinia virus</i> WR	0
	DQ983236.1	<i>Vaccinia virus</i> MVA-I721	0
	DQ121394.1	<i>Vaccinia virus</i> Lister clone VACV107	0
	AY678276.1	<i>Vaccinia virus</i> Lister	0
	AY678277.1	<i>Vaccinia virus</i> LC16mO	0
	AY678275.1	<i>Vaccinia virus</i> LC16m8	0
	DQ439815.1	<i>Vaccinia virus</i> DUKE	12,5
	U94848.1	<i>Vaccinia virus</i> Ankara	0
	AY313847.1	<i>Vaccinia virus</i> Acambis clone 2000	0
	AY313848.1	<i>Vaccinia virus</i> Acambis clone 3	11,5
	AM501482.1	<i>Vaccinia virus</i> Ankara (CVA)	8,5
	DQ377945.1	<i>Vaccinia virus</i> 3737	8,5
	M35027.1	<i>Vaccinia virus</i> Copenhagen	9,5
[TTTCA] _n POX002	X94355.2	<i>Cowpox virus</i> GRI-90	0
	DQ437593.1	<i>Cowpox virus</i> Germany 91-3	0
	NC_003663.2	<i>Cowpox virus</i> Brighton Red	13,8

Foram desenhados iniciadores para estas regiões polimórficas, que poderiam ser utilizados como marcadores específicos para os genomas nas quais foram encontradas. Devido à variabilidade genômica do gênero *Parapoxvirus*, nenhum STR com as características desejáveis, quantidade de *indels* e pontuação, se mostrou conservado entre os diferentes genomas (Figura 7).

DQ184476.1 - Orf vírus NZ2	GCGCGTTAACTCGC--ACTGGTTC-CCTCTCTAACTCGGAGT---GGGCG
AX754989.1 - Sealpox	GCGCGTTAACTCGC--ACTGGTTC-CCTCTCTAACTCGGAGT---GGGCG
AY386263.1 - Orf vírus OV-IA82	GCGGGTTAACTCGCTCACTGGTTCTCCTCTCTAACTCGGAG---GGGCG
NC_005336.1 - Orf virus OV-SA00	GCTCGTCGACTCGT-CACTCGTTCTCTCCTCTAAGACCGAGTGAGGAGTG
	** ** * * * * * * * * * * * * * * *
DQ184476.1 - Orf vírus NZ2	AGCGAGTGGTTGACTCG-----TCCTCCGCT
AX754989.1 - Sealpox	AGCGAGTGGTTGACTCG-----TCCTCCGCT
AY386263.1 - Orf vírus OV-IA82	AGCGAGTGGTTGACTCG-----CCCTCC--T
NC_005336.1 - Orf virus OV-SA00	CGCGAGTGGTTAACTCGCTAACTCGTTAACTTATTATCTGTCTCTGCACT
	***** * * * * * * * * * * *
DQ184476.1 - Orf vírus NZ2	CTCA-----CTCTGAGTG-GTGATAACTGTTAACCA
AX754989.1 - Sealpox	CTCA-----CTCTGAGTG-GTGATAACTGTTAACCA
AY386263.1 - Orf vírus OV-IA82	CTCA-----CTCTGAGTGAGTGATAAC---TAACCG
NC_005336.1 - Orf virus OV-SA00	CTCTTACTCTCTTACTCTCTACTCTCTACTCTCTACTCTCTACTCTCTA
	** * * * * * * * * * * * * * *
DQ184476.1 - Orf vírus NZ2	TAACTCGTC-----CTCCACTCTCT-----CACTCTCTCACTCTGAG
AX754989.1 - Sealpox	TAACTCGTC-----CTCCACTCTCT-----CACTCTCTCACTCTGAG
AY386263.1 - Orf vírus OV-IA82	TAACTATTA-----ACTCGTCCTC-----CACTCTCTCGCTCTGAG
NC_005336.1 - Orf virus OV-SA00	CTCTCTACTCTCTACTCTCTACTCTCTACTCTCTACTCTCTACTCTCTGAG
	* ** * * * * * * * * * * * * *
DQ184476.1 - Orf vírus NZ2	TGAG-----GATTGACTTGTTAACTCGT-----CCTCCA
AX754989.1 - Sealpox	TGAG-----GATTGACTTGTTAACTCGT-----CCTCCA
AY386263.1 - Orf vírus OV-IA82	TGAG-----GATTGACTTGTTAACTCGT-----CCTC-A
NC_005336.1 - Orf virus OV-SA00	TGAGCGAGTGGTTAACTCGCTAACTCGTTAACTTATTATCTTGTCTCTGCA

Figura 7 – Alinhamento do *locus* polimórfico encontrado em Orf vírus próximo às RTI. O alinhamento demonstra ausência de conservação entre os diferentes genomas devido aos “gaps” encontrados.

O motivo da escolha do genoma de *Orf virus* como representante do gênero PPV foi porque somente duas espécies deste gênero foram sequenciadas até o momento e esta espécie é a única dentre as sequenciadas que afeta animais e humanos.

Porém, as repetições encontradas apresentaram um alto grau de polimorfismo nas regiões que as flanqueavam, impedindo o desenho de iniciadores com sequência conservada em todos os isolados. Trabalhos anteriores sobre a espécie *Orf virus* descrevem esta grande variabilidade genômica (Mazur *et al.*, 2000; Mercer *et al.*, 2006). Isso levou a busca de alvos já descritos na literatura como representativos com comprovada capacidade de reconhecimento.

Um gene presente na literatura para detecção de *Parapoxvirus* em uma diversidade de hospedeiros é o gene B2L (número de acesso Gb U06671.1), utilizando diferentes técnicas, como *nested-PCR* (Inoshima *et al.*, 2000, Abrahão *et al.*, 2009), hibridização *in situ* (Muller *et al.*, 2003) e RT-PCR (Nitsche *et al.*, 2006a, Gallina *et al.*, 2006). Este gene é homólogo ao antígeno principal do envelope de

Vaccinia virus (gene p37K) e mostra 42% de homologia de aminoácidos (Sullivan *et al.*, 1994). Devido a quantidade disponível de sequências deste gene para diferentes espécies do gênero PPV, este foi a escolha para o desenho de iniciadores PPV pan-específicos (Pan-PPV), que foram utilizados no desenho do teste genético para a detecção viral.

6.1.2 – Iniciadores preditos para VACV e CPXV

Foram desenhados iniciadores para cada região variável encontrada. Estes iniciadores amplificam a região POX008 e por meio da análise *in silico* localizam-se em loci específicos para VACV e CPXV. O STR hexanucleotídio [GATACA]*n* encontrado em VACV e CPXV, localiza-se no interior dos genes VV-WR 199 (número de acesso: YP_23308) em VACV e CPXV211 (número de acesso: NP_619992.1) em CPXV. Estes genes são ortólogos e codificam uma proteína que possui repetições do tipo ankirina. Este tipo de repetição é um dos mais comuns em interações proteína-proteína na natureza, participando em uma ampla variedade de funções na célula, como iniciadores de transcrição, reguladores do ciclo celular, e transdução de sinal (Andrade *et al.*, 2001).

Os amplicons esperados através da análise *in silico* do *locus* POX008 estão descritos na tabela 4.

Tabela 4 – Tamanho predito dos amplicons minerados *in silico* para o *locus* POX008 em VACV e CPXV.

Número de acesso	Isolado de vírus	Amplicon (pb)
X94355.2	<i>Cowpox virus</i> GRI-90	376
DQ437593.1	<i>Cowpox virus</i> Germany 91-3	335
NC_003663.2	<i>Cowpox virus</i> Brighton Red	379
NC_006998.1	<i>Vaccinia virus</i> WR	321
DQ983236.1	<i>Vaccinia virus</i> MVA-I721	327
DQ121394.1	<i>Vaccinia virus</i> Lister clone VACV107	320
AY678276.1	<i>Vaccinia virus</i> Lister	321
AY678277.1	<i>Vaccinia virus</i> LC16mO	321
AY678275.1	<i>Vaccinia virus</i> LC16m8	321
DQ439815.1	<i>Vaccinia virus</i> DUKE	387
U94848.1	<i>Vaccinia virus</i> Ankara	327
AY313847.1	<i>Vaccinia virus</i> Acambis clone 2000	321
AY313848.1	<i>Vaccinia virus</i> Acambis clone 3	381
AM501482.1	<i>Vaccinia virus</i> Ankara (CVA)	363
DQ377945.1	<i>Vaccinia virus</i> 3737	363
M35027.1	<i>Vaccinia virus</i> Copenhagen	369

A repetição pentanucleotídeo encontrada em CPXV foi alvo do desenho de iniciadores. Esta repetição esta presente somente nos genomas desta espécie.

Os iniciadores P2 (F e R), foram desenhados para serem específicos para a espécie *Cowpox virus*, anelando-se na repetição encontrada no interior do gene CPXV-BR-006 (número de acesso: AF482758.2) para amplificar o *locus* POX002, não demonstrando anelamento inespecífico através da ferramenta BLAST (Benson *et al.*, 2005). O alinhamento da região de anelamento dos iniciadores nos genomas de VACV e CPXV é mostrado na figura 8, evidenciando a especificidade para a espécie CPXV. Porém, na ausência de amostras clínicas relevantes ou DNA controle, estes iniciadores não puderam ser testados.

```

CPX BR   CCGTTGGATGGTTCATGCGGTGTTATATCGCTGTTTATTATGATTATACATGAAAGCAGC
VACV WR   CCATCGGATGGTGCATGCGGTGCTATATCTCTCCGTTTATTATTATACATGAGAGAAAC
          ** * ***** ***** **          **** ***** ** *

CPX BR   AATAGCAATATATAT-----GACTTCATGATTTAATAATGTAGTAGTAATTATCACCTC
VACV WR   AATATATACGAGTATAATACGGACTTCATGATTTAATAATGTAGTA--ATCGTCGTCTT
          **** *      **** ***** ** ** **

CPX BR   GT TCCCGCTCTCCAATCATTATAGATA TTTTAAATATTTTCATTTCAATTCATTTTCAT
VACV WR   GTTCCTGTTTCCTACTTCTCCA----ATCATATAGATATTTTC-----
          ***** * * * * * ** * * *****

CPX BR   TTCATTTCAATTCATTTCAATTCATTTCAATTCATTTCAATTCATTTCTAGTATGGATAA
VACV WR   -----TTTCTATCATGGATAA
                                   *****

CPX BR   TGT TTGTAATGGTTCTTTCCGTACAACATACTTTT TAGATGATA GTCGCTTAACTTGGAT
VACV WR   TATTTGTAATGGTTCTTTCCGTACAACATACTGTTTAGATGATA-----
          * *****

CPX BR   ATGATGCTGCGTATAATTTCTGGAGGCAAATAATATAGTCTAGATTGACCATCGATGGTA
VACV WR   -----TTGCGCATAATTTCCGGAGGCAAATACGATAGTCTAGATTGACC---GATGGTA
          **** *****

```

Figura 8 - Alinhamento da região de anelamento do iniciadores P2F (vermelho) e P2R (rosa) entre os genomas referência de CPXV-BR (NC_003663.2) e VACV-WR (NC_006998.1).

Os amplicons preditos *in silico* para os genomas disponíveis no GenBank (Benson *et al.*, 2005) para o par de iniciadores P2F e P2R no *locus* POX002 estão discriminados na tabela 5.

Tabela 5 - Tamanho predito dos amplicons minerados *in silico* para o locus POX002 em CPXV.

Número de acesso	Isolado viral	Amplicon (pb)
X94355.2	Cowpox virus GRI-90	128
DQ437593.1	Cowpox virus Germany 91-3	127
NC_003663.2	Cowpox virus Brighton Red	188

A terceira repetição encontrada possui características únicas, apresentando diferentes sequências repetidas em diferentes espécies, porém no mesmo loco. Desta forma, uma análise mais aprofundada foi conduzida. A repetição localiza-se em ortólogos do gene F1L de VACV, um gene presente em todas as espécies do gênero *Orthopoxvirus*.

6.2 – ANÁLISE DOS ORTÓLOGOS DO GENE F1L (*Vaccinia virus*)

Ao procurar repetições presentes nos genomas dos *Orthopoxvirus* identificou-se uma região altamente polimórfica no interior do gene C5L de *Variola virus*. Estendendo a procura nos outros representantes do gênero, percebeu-se que diversas repetições estavam presentes nesta região.

O gene C5L pertence ao grupo de genes ortólogos de F1L de VACV presente em todos os integrantes do gênero. Desta forma, todas as sequências de nucleotídeos e de aminoácidos disponíveis deste grupo no *GenBank* (Benson *et al.*, 2005) foram analisadas (Tabela 6).

Tabela 6 – Características dos ortólogos de F1L de VACV analisados.

Vírus	Gene	Início	Fim	Nº de aminoácidos	Peso Molecular	Ponto Isoelétrico
CMLV-CMS	39	32102	31353	249	28,984	4,1144
CMLV-M96	36	33891	33037	284	32,968	3,8444
CPXV-BR	48	47694	46939	251	29,010	4,1588
CPXV-GER91	45	46964	46248	238	27,764	4,4203
CPXV-GRI	44	47228	46512	238	27,847	4,4357
ECTV-Mos	26	39789	38419	456	50,995	3,6974
ECTV-Nav	27	37577	36300	425	47,775	3,7384
HSPV-MNR76	57	42262	41498	254	29,517	4,2579
MPXV-COG_2003_358	33	31422	30763	219	25,805	4,786
MPXV-COP58	27	31435	30776	219	25,760	4,7723
MPXV-LBR_1970_184	30	31678	31019	219	25,760	4,7723
MPXV-SLE	27	31206	30547	219	25,760	4,7723
MPXV-USA_2003_039	30	31190	30531	219	25,760	4,7723
MPXV-USA_2003_044	30	31190	30531	219	25,760	4,7723
MPXV-WR267	27	31192	30533	219	25,760	4,7723
MPXV-ZAR	33	31278	30619	219	25,705	4,7057
MPXV-ZAR_1979_005	33	31408	30749	219	25,805	4,786
RPXV-Utr	29	35678	34995	227	26,527	4,61
TATV-DAH68	41	30395	29466	309	36,004	3,6136
VACV-3737	41	36474	35794	226	26,375	4,9415
VACV-Acam2000	48	33917	33237	226	26,375	4,9415
VACV-Acam3	50	33972	33292	226	26,367	4,7006
VACV-Acam3000	31	20256	19588	222	25,910	4,8475
VACV-Cop	45	34097	33417	226	26,367	4,7006
VACV-CVA	45	31268	30588	226	26,367	4,7006
VACV-DUKE	48	36211	35531	226	26,366	4,8458
VACV-LC16m8	56	33624	32944	226	26,366	4,8458
VACV-LC16mO	56	33624	32944	226	26,366	4,8458
VACV-Lister	56	33528	32848	226	26,367	4,7006
VACV-Lister_VACV107	40	33698	33018	226	26,367	4,7006
VACV-MVA	14	26046	25378	222	25,910	4,8475
VACV-MVA_I721	55	19607	18939	222	25,910	4,8475
VACV-WR	40	31026	30346	226	26,428	4,5844
VARV-AFG70	28	22264	21596	222	26,014	4,6237
VARV-BEN68	30	23249	22464	261	30,511	3,9469
VARV-BGD74_nur	28	22491	21769	240	28,060	4,181
VARV-BGD74_shz	28	22491	21769	240	28,060	4,181
VARV-BGD74_sol	28	22491	21769	240	28,060	4,181
VARV-BGD75_Banu	28	22413	21700	237	27,717	4,2306

Tabela 6 - continuação

Vírus	Gene	Início	Fim	Nº de aminoácidos	Peso Molecular	Ponto Isoelétrico
VARV-BGD75maj	28	22498	21785	237	27,717	4,2306
VARV-BRA66	32	23197	22358	279	32,571	3,8033
VARV-BWA72	28	22378	21629	249	29,089	4,0768
VARV-BWA73	28	22368	21628	246	28,746	4,1144
VARV-CHN48	28	22600	21770	276	32,195	3,8409
VARV-COG70_227	28	22482	21787	231	27,029	4,3844
VARV-COG70_46	28	22654	21959	231	27,029	4,3844
VARV-DEU58	28	22294	21509	261	30,463	3,9332
VARV-ETH72_16	29	22735	22058	225	26,343	4,5074
VARV-ETH72_17	29	22735	22058	225	26,343	4,5074
VARV-Gar_1966	31	22872	21934	312	36,347	3,6495
VARV-GBR44_harv	28	22300	21551	249	29,104	4,0648
VARV-GBR46_hind	28	22318	21578	246	28,761	4,1041
VARV-GBR47_hig	28	22395	21601	264	30,807	3,9059
VARV-GBR52_but	32	23324	22359	321	37,378	3,5829
VARV-GIN69	30	23171	22395	258	30,168	3,976
VARV-IND3_1967	25	21874	21119	251	29,302	4,0477
VARV-IND53_mad	28	22338	21598	246	28,761	4,1041
VARV-IND53_ndel	27	22350	21592	252	29,424	3,9965
VARV-IND64_vel4	29	22478	21810	222	26,014	4,6237
VARV-IND64_vel5	28	22339	21671	222	26,014	4,6237
VARV-IRN72	28	22257	21589	222	26,014	4,6237
VARV-JPN46_yam	27	22350	21592	252	29,424	3,9965
VARV-JPN51_hrpr	27	22334	21576	252	29,424	3,9965
VARV-JPN51_stwl	27	22342	21575	255	29,768	3,964
VARV-KOR47	28	22457	21735	240	28,060	4,181
VARV-KWT67	28	22265	21597	222	26,014	4,6237
VARV-NER69	30	23237	22326	303	35,270	3,6564
VARV-NPL73	28	22252	21584	222	26,014	4,6237
VARV-PAK_1969	28	22270	21602	222	26,014	4,6237
VARV-SDN47_jub	28	22566	21808	252	29,432	4,0392
VARV-SDN47_rum	28	22627	21878	249	29,089	4,0768
VARV-SLE68	30	23342	22395	315	36,691	3,6085
VARV-SOM77_1252	28	21554	20829	241	28,176	4,1366
VARV-SOM77_1605	28	21545	20829	238	27,833	4,181
VARV-SOM77_ali	28	22540	21815	241	28,176	4,1366
VARV-SUM70_222	28	22380	21559	273	31,851	3,8392
VARV-SUM70_228	28	22345	21560	261	30,477	3,9384

6.2.1 – Variabilidade das repetições

As sequências de aminoácidos obtidas foram alinhadas utilizando a matriz de substituição BLOSUM (Salemi e Vandamme, 2009). O alinhamento foi utilizado como base para a construção de um gráfico de entropia. O gráfico de entropia fornece uma idéia da quantidade de variabilidade ao longo das colunas em um alinhamento, utilizando o programa BioEdit (versão 7, Hall, 1999).

Valores baixos de entropia representam uma menor variabilidade ou ausência de informação. De acordo com esta análise, a porção C-terminal desta proteína é bastante conservada, apresentando pouca variabilidade. A maior parte da variabilidade se concentra na porção N-terminal, onde se localizam as repetições.

A região com repetições localiza-se entre os aminoácidos na posição 20 e 120, na qual o volume de informação é reduzido devido aos espaçamentos inseridos na matriz de alinhamento.

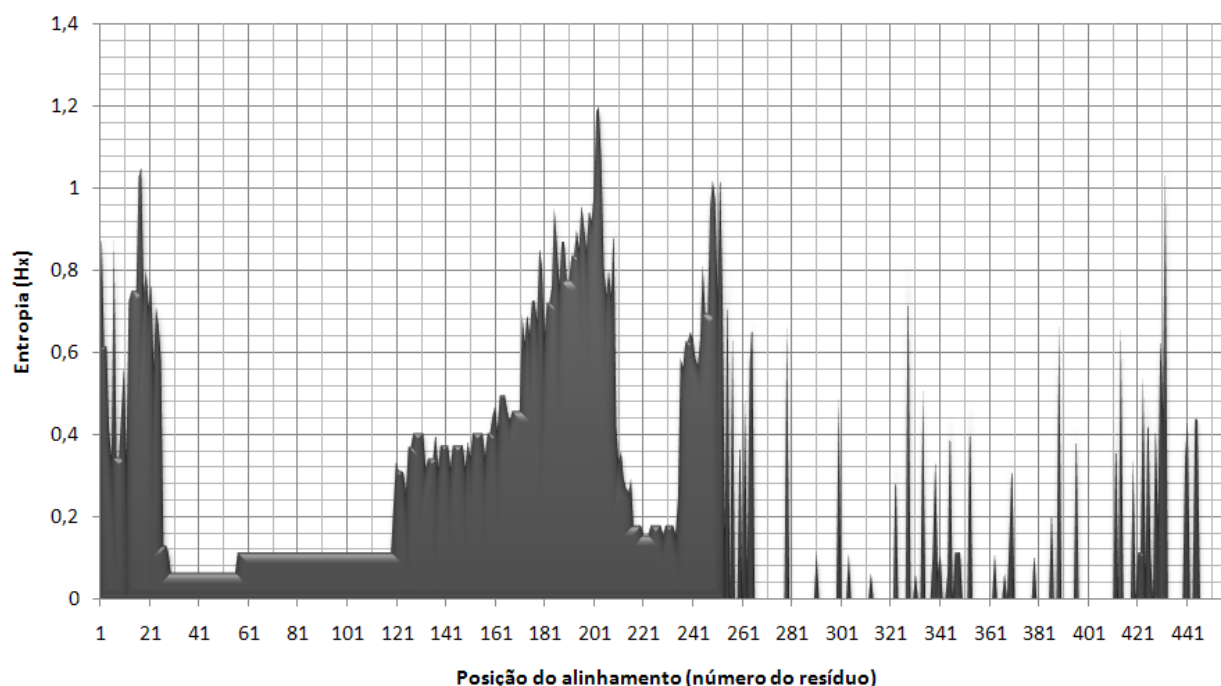


Figura 9 – Gráfico de entropia dos diferentes ortólogos de F1L de VACV. Análise realizada no programa BioEdit após o alinhamento das sequências de aminoácidos.

Através da busca por repetições em tandem utilizando o programa TRF (Benson, 1999) nas diferentes sequências gênicas foram encontradas repetições localizadas no mesmo *locus* F1L em quatro espécies virais (Tabela 7).

Tabela 7 – Diferentes repetições encontradas entre os ortólogos de F1L de VACV

Espécies	Período	Sequência repetitiva	Aminoácidos codificados	Nº de cópias
<i>Variola virus</i>	9	[TATCATCTA] _n	[DDI]	3-36
<i>Camelpox virus</i>	9	[ATCTATATC] _n	[DDI]	6,6-15,6
<i>Taterapox virus</i>	9	[ATCTATATC] _n	[DDI]	27,3
<i>Ectromelia virus</i>	24	[TCTATATCCTGTACTATACCATTA] _n	[NGIVQDID]	30,2

As repetições encontradas nos genomas de VARV, CMPV e TATV mostraram-se semelhantes. Como estas se localizam no interior de um gene, esta sequência repetitiva com 9 nucleotídeos codifica 3 aminoácidos que faz com que a porção N-terminal da proteína codificada seja hipervariável. Desta forma, nestes três genomas de vírus, 3 aminoácidos se repetem na proteína, enquanto em ECTV 8 aminoácidos se repetem (Figura 10).

Através do alinhamento das sequências de aminoácidos dos representantes protótipos de cada espécie percebe-se que a proteína possui uma inserção de três aminoácidos [DDI] em VARV, TATV e CMPV, enquanto em ECTV oito aminoácidos estão repetidos [NGIVQDID]. Portanto, dois padrões estão presentes, um comum a VARV, TATV e CMPV, que pode ter uma origem comum, e um presente somente em ECTV, ambos no mesmo local da proteína.

C5L-Variola	MYNSMLPMFCMN
DAH68-Taterapox	MDNSMLPMFCNNIVDYVD
CMPX036-Camelpox	MDNSMLPMFICNNIVDYV
F1L-Vaccinia	-----MLSMFCNNIVDYV-DDI-----
EVM025-Ectromelia	MDNSILSMFYNIYDNGIVQDIDNGIVQDIDNGIVQDIDNGIVQDIDNGI
C5L-Variola	-----DDIDDIDDIDDIDDIDDIDDIDDIDDIDDIDDIDDIDDIDDIDD---
DAH68-Taterapox	DIDDIDDIDDIDDIDDIDDIDDIDDIDDIDDIDDIDDIDDIDDIDDIDD
CMPX036-Camelpox	DIDDIDDIDDIDDIDDIDDIDDIDDIDDIDDIDDIDDIDDIDDIDDIDD
F1L-Vaccinia	-----
EVM025-Ectromelia	VQDIDNGIVQDIDNGIVQDIDNGIVQDIDNGIVQDIDNGIVQDIDNGIVQ
C5L-Variola	N-----
DAH68-Taterapox	DND-----
CMPX036-Camelpox	-----
F1L-Vaccinia	-----
EVM025-Ectromelia	DIDNGIVQDIDNGIVQDIDNGIVQDIDNGIVQDIDNGIVQDIDNGIVQDI
C5L-Variola	-----
DAH68-Taterapox	-----
CMPX036-Camelpox	-----
F1L-Vaccinia	-----
EVM025-Ectromelia	DNGIVQDIDNGIVQDIDNGIVQDIDNGIVQDIDNGIVQDIDNGIVQDIDN
C5L-Variola	-----
DAH68-Taterapox	-----I
CMPX036-Camelpox	-----DNGIVQDIVHDDNSI
F1L-Vaccinia	-----DNGI
EVM025-Ectromelia	GIVQDIDNGIVQDIDNGIVQDIDNGIVQDIDNGIVQDIDNGIVQDIDNGI
C5L-Variola	----EDKASN--DHNVVYPLPENMVYRFNKSTNILDYLSTERDHVMMAVQ
DAH68-Taterapox	VQDIEDEASNNDDHNHYVYPLPENMVYRFDKSTNILDYLSTERDHVMMAVQ
CMPX036-Camelpox	VQDIEDEASNNDDHNHYVYPLPENMVYRFDKSTNILDYLSTERDHVMMAVQ
F1L-Vaccinia	VQDIEDEASNNVDHDYVYPLPENMVYRFDKSTNILDYLSTERDHVMMAVR
EVM025-Ectromelia	VQDIEDKASNDNDHNHYVYPLPENMVYRFDKSTNILDYLSTERDHVMMAVQ
C5L-Variola	YYMSKQRLLDLRYQLPTKTRSYIDIINTYCDKVNNNDYNRDMNIMYD--MA
DAH68-Taterapox	YYMSKQRLLDLRYQLPTKTRSYIDINMYCDKVNNNDYNREMNIMYD--MA
CMPX036-Camelpox	YYMSKQRLLDLRYQLPTKTRSYIDINMYCDKVNNNDYNRDMNIMYD--MA
F1L-Vaccinia	YYMSKQRLLDLRYQLPTKTRSYIDINIYCDKVSNDYNRDMNIMYD--MA
EVM025-Ectromelia	YYMGQRLLDLRYQLPTKTRSYIDINMYCDKVNNDSYSDINIMCDDIAA
C5L-Variola	STESFTVYDINNENVNTILMDNKGGLVRLATISFITELGKRRCMNPVETIKM
DAH68-Taterapox	STESFTVYDINNENVNTILMDNKGGLVRLATISFITELGKRRCMNPVETIKM
CMPX036-Camelpox	STESFTVYDINNENVNTILMDNKGGLVRLATISFITELGKRRCMNPVETIKM
F1L-Vaccinia	STKSFTVYDINNENVNTILMDNKGGLVRLATISFITELGKRRCMNPVKTIKM
EVM025-Ectromelia	STESFTVYDINNKNVTILMDNKGGLVRLITISFITKLGRRCMNPVETIKM
C5L-Variola	FTLLSHTICDDCFIDYITDISPPDNTIPNISTREYLKLGITAIMFATYK
DAH68-Taterapox	FTLLSHTICDDCFVDYITDISPQDNTIPTNSTREYLKLGITAIMFATYK
CMPX036-Camelpox	FTLLSHTICDDCFVDYITDISPNNTISNTSTREYLKLGITAIMFATYK
F1L-Vaccinia	FTLLSHTICDDCFIDYITDISPPDNTIPTNSTREYLKLGITAIMFATYK
EVM025-Ectromelia	FTLLSHTICDDYVDYITDIFSTPRDNATTSTREYLKLMGIIVMFATYK
C5L-Variola	TLKYMIG
DAH68-Taterapox	TLKYMIG
CMPX036-Camelpox	TLKYMIG
F1L-Vaccinia	TLKYMIG
EVM025-Ectromelia	TLKYMIG

6.2.3 – Índices de Hidrofobicidade

O gráfico de hidrofobicidade foi realizado para mostrar a distribuição dos resíduos polares e apolares ao longo da sequência protéica, que serve para identificar possíveis estruturas ou domínios de uma proteína, Figura 11. A abscissa do gráfico corresponde à sequência de aminoácidos da proteína, e a ordenada corresponde ao grau de hidrofobicidade ou hidrofiliidade da mesma. A escala utilizada para esta análise foi a de Kyte-Doolittle. Esta escala é largamente aplicada para delinear o caráter hidrofóbico de uma proteína. Por esta escala, regiões com valores maiores que 0 possuem caráter hidrofóbico. Ao se analisar os índices de hidrofobicidade obtidos das sequências de aminoácidos das proteínas codificadas pelos genes homólogos ao F1L, percebe-se uma diferença entre as proteínas sem e com a repetição, nas últimas a repetição da sequência de aminoácidos parece formar um domínio hidrofílico na região N-terminal da proteína.

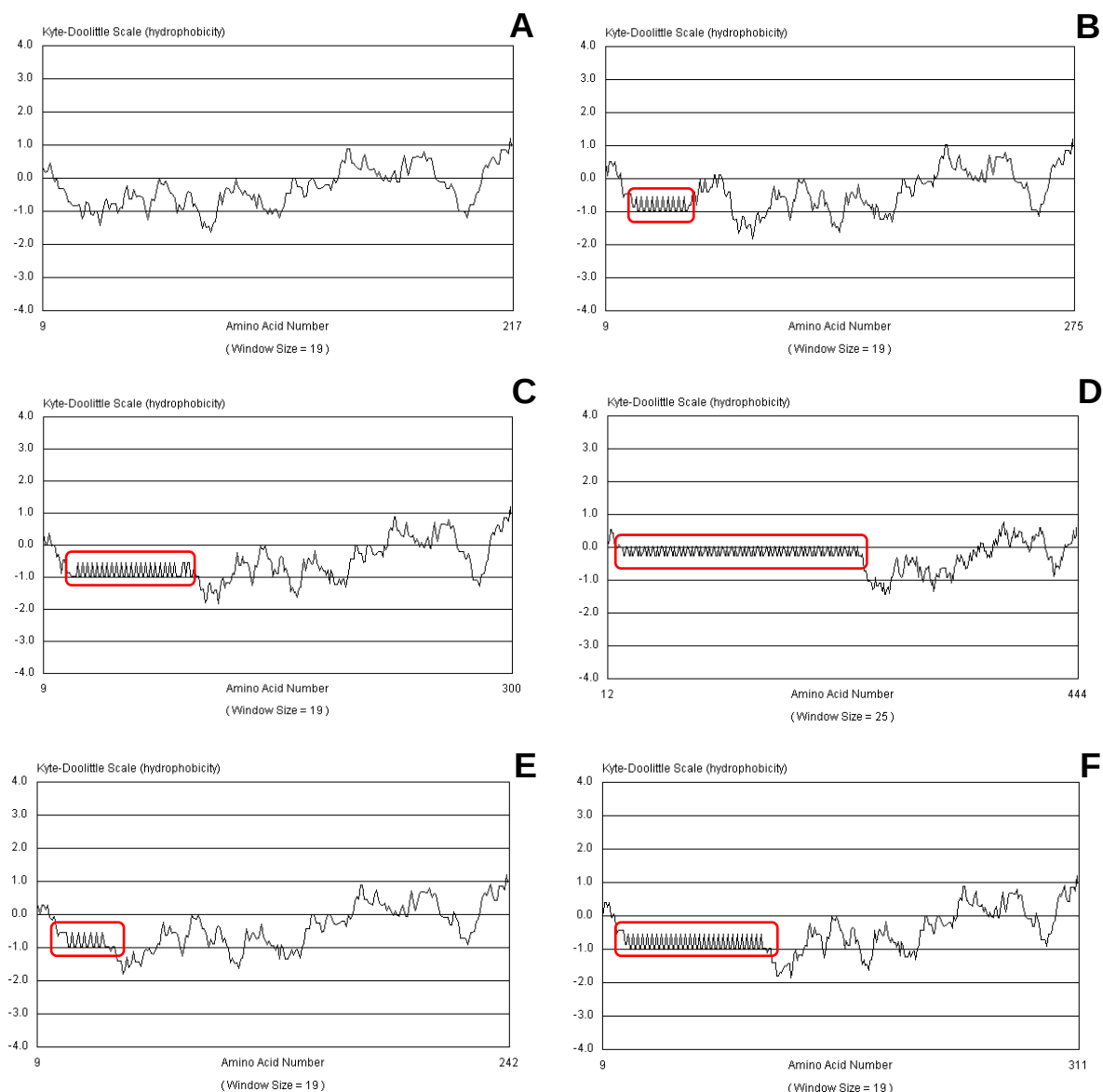


Figura 11 – Índices de hidrofobicidade de diferentes ortólogos do gene F1L. A – *Vaccinia virus* Copenhagen; B – *Camelpox virus* CMS; C – *Taterapox virus*; D – *Ectromelia virus*; E – *Variola virus* India 3 Major 1967; F – *Variola virus* United Kingdom 1952 Butler. A região marcada corresponde às posições dos aminoácidos correspondentes às repetições.

6.2.4 – Polimorfismos encontrados no ortólogo de *Variola virus* (C5L)

As repetições se mostraram polimórficas por meio de análises *in silico*, quando mais de um genoma viral está disponível. O exemplo mais notável foi o polimorfismo presente em VARV.

Separando as repetições em grupos, de acordo com número de cópias e espécie, percebe-se a grande quantidade de polimorfismos presentes nos ortólogos do gene F1L.

Na espécie VARV, 22 alelos estavam presentes nos 48 genomas disponíveis. A distribuição destes alelos pelos diferentes isolados parece obedecer ao relacionamento filogenético realizado por Esposito e colaboradores em 2006. Isolados relacionados apresentam um número de repetições semelhante (Figura 12).

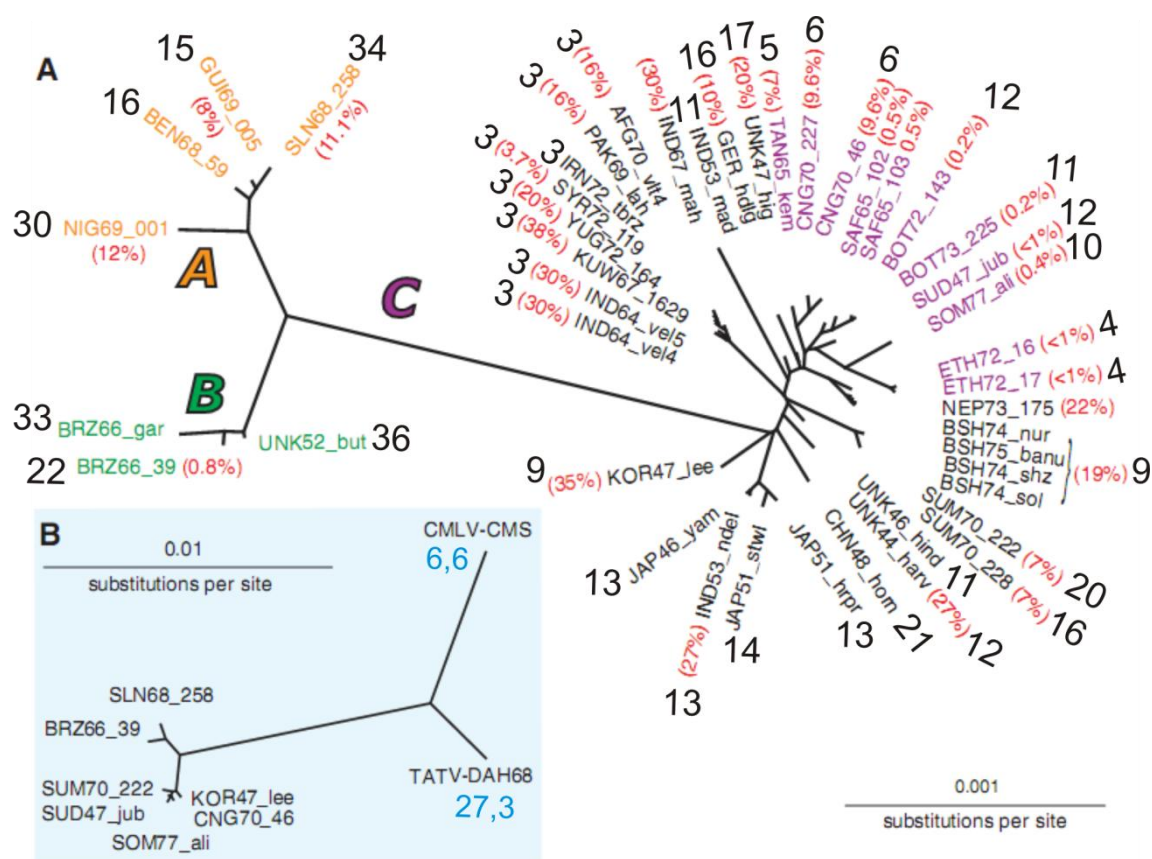


Figura 12 – Distribuição do número de repetições sobre o relacionamento filogenético dos isolados de VARV. Juntamente ao nome do isolado encontram o coeficiente de mortalidade (%) e o número de repetições. A – Filograma dos diferentes isolados de VARV apresentando 3 clados principais. B – Filograma enraizado com CMLV-CMS e TATV-DAH68, com seus respectivos número de repetições (Adaptado de Esposito *et al.*, 2006).

O número de repetições encontradas em todos os genomas analisados de VARV, CMPV e TATV está discriminada na Tabela 8.

Tabela 8 - Grupos formados por isolados de VARV, CMPV, ECTV e TATV com mesmo número de repetições nos ortólogos de F1L

Grupo	Nº de acesso	Isolado	Nº de STR
V1	DQ437580	Afghanistan 1970 Variolator 4	3
	DQ437585	India 1964 7124 Vellore	
	DQ437586	India 1964 7125 Vellore	
	DQ437587	Iran 1972 2602 Tabriz	
	DQ441433	Kuwait 1967 (K1629)	
	DQ437588	Nepal 1973	
	DQ437592	Syria 1972 V72-199	
	DQ441448	Yugoslavia 1972 V72-164	
	DQ437589.1	Pakistan 1969 (Rafiq Lahore)	
V2	DQ441424	Ethiopia 1972 (Eth16 R14-1X-72 Addis)	4
	DQ441425	Ethiopia 1972 (Eth17 R14-1X-72 Addis)	
V3	DQ441443	Tanzania 1965 kembula	5
V4	DQ441423	Congo 9 1970 (v74-227 Gispén)	6
	DQ437583	Congo 1970	
V5	L22579	Bangladesh 1975 v75-550 Banu	8
	DQ441421	Bangladesh 1974 (Shahzaman	
	DQ441420	Bangladesh 1974 (nur islam)	
V6	DQ441422	Bangladesh 1974 (Solaiman)	9
	DQ441432	Korea 1947 (Lee, Masterseed)	
	DQ441439	Somalia 1977 (V77-1605)	
V7	DQ441438	Somalia 1977 (V77-1252)	10
	DQ437590	Somalia 1977	
	DQ441418	Botswana 1973 (v73-225)	
V8	DQ441427	India 1953 (Kali-Muthu-M50 Madras)	11
	DQ441445	United Kingdom 1946 Hinden (Middlesex)	
	DQ441417	Botswana 1972 (v72-143)	
V9	DQ441441	Sudan 1947 (Rumbec)	12
	DQ441444	United Kingdom 1944 Harvey	
V10	NC_001611	Variola virus India 3 Major 1967	13
	DQ441428	India 1953 (New Delhi)	
V11	DQ441429	Japan 1946 (Yamada MS-2(A) Tokyo)	13
	DQ441430	Japan 1951 (Harper, Masterseed)	
	DQ441440	Sudan 1947 (Juba)	
V12	DQ441431	Japan 1951 (Stillwell, Masterseed)	14
V13	DQ441426	Guinea 1969 (005)	15
	DQ441436	South Africa 1965 (103T'vaal, Nelspruit)	
	DQ441416	Benin, Dahomey 1968 (v68-59)	
V14	DQ437584	Germany 1958 Heidelberg	16
	DQ441442	Sumatra 1970 V70-228	
V15	DQ441446	United Kingdom 1947 Higgins (Staffordshire)	17
V16	DQ437591	Sumatra 1970 V70-222	20

Tabela 8 - Continuação

Grupo	Nº de acesso	Isolado	Nº STR
V17	DQ437582	China Horn 1948	21
V18	DQ441419	Brazil 1966 (v66-39 Sao Paulo)	22
V19	DQ441434	Niger1969(001, importation from Nigeria)	30
V20	Y16780	Variola minor virus Garcia 1966	33
	DQ441435	South Africa 1965 (102 Natal, Ingwavuma)	
V21	DQ441437	Sierra Leone 1969 (V68-258)	34
V22	DQ441447	United Kingdom 1952 Butler	36
C1	NC_003391.1	Camelpox virus	15,6
C2	AY009089.1	Camelpox virus CMS	6,6
E1	NC_004105.1	Ectromelia virus	30,2
E2	*	Ectromelia vírus Naval	25,3
T1	NC_008291.1	Taterapox virus	27,3

* Disponível em <www.poxvirus.org>

Estes grupos ao serem dispostos em um mapa mundial, de acordo com os países em que foram isolados, apresentaram uma distribuição que segue a ordem geográfica (Figura 13). O grupo V1, que apresenta o menor número de repetições (3), se distribuiu do Oriente Médio ao sul da Ásia, local onde se propõe que tenham ocorridos os primeiros casos de infecção variólica (Li *et al.*, 2007).



Figura 13 - Distribuição geográfica dos isolados de VARV agrupados segundo o número de elementos STR no gene F1L. Cada número corresponde ao grupo formado pelos representantes de VARV dispostos na tabela 8.

6.2.5 – Análise filogenética dos ortólogos do gene F1L

As sequências de aminoácidos dos ortólogos do gene F1L foram alinhadas, utilizando a matriz para proteínas BLOSUM a através da ferramenta CLUSTAL W 1.4, disponível no programa MEGA versão 4 (Tamura *et al.*, 2007), com valores padrão. A reconstrução filogenética foi realizada utilizando o método *Neighbor-Joining*, com *bootstrap* com 2000 réplicas e valor de corte de 80% de similaridade (Figura 14).

De acordo com a árvore gerada, as sequências ortólogas de TATV, CMPV e VARV formam um clado que compartilha um ancestral comum, um dado consistente com o fato de estas três espécies possuírem a repetição [DDI] em comum. O ECMV, outra espécie que também apresenta repetições em seu gene ortólogo a F1L constitui um grupo separado, mais relacionado ao gene presente em MPXV, não apresentando um ancestral direto comum com o clado formado por TATV, CMPV e VARV.

A explicação mais parcimoniosa para topologia apresentada pela árvore é que as repetições surgiram por dois eventos independentes (representados pelos quadrados na figura 14). Um evento ocorreu no ancestral compartilhado por TATV, CMPV e VARV, enquanto o outro ocorreu no ancestral de ECMV.

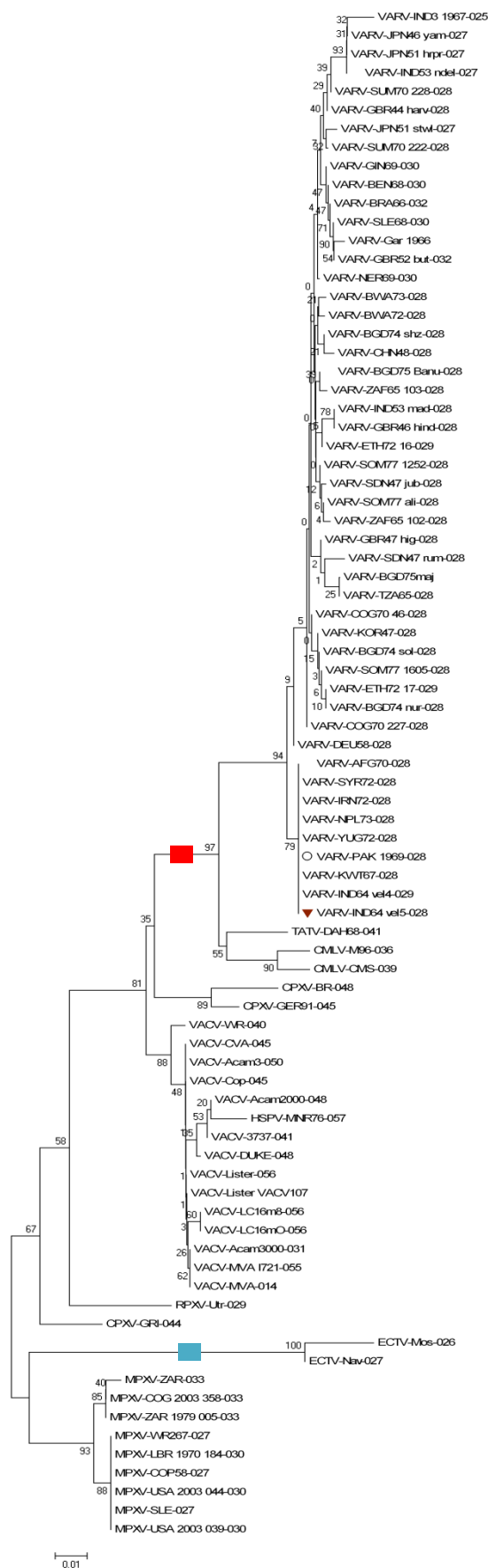


Figura 14 - Relações filogenéticas dos 82 ortólogos de F1L. A história evolutiva foi inferida pelo método Neighbor-Joining. A árvore consenso por *bootstrap* inferida por 2000 réplicas foi feita para representar a história evolucionária dos taxa analisados. Os ramos correspondentes às partições reproduzidas em menos de 80% das repetições *bootstrap* estão colapsadas. Os eventos de surgimento das repetições estão representados pelos quadrados coloridos.

6.2.6 – Desenho dos iniciadores

Devido ao potencial do *locus* POX005 para a tipagem molecular de indivíduos do gênero OPV, este foi escolhido para a construção de um teste molecular para diagnóstico rápido de infecções por poxvírus. Para isso, foram desenhados iniciadores específicos para este gênero que amplificam a região variável encontrada em F1L.

Para o gênero PPV, como nenhuma região variável se mostrou adequada para desenho de iniciadores, o alvo foi o *locus* POX009, localizado no gene B2L, presente em outros testes da literatura.

O tamanho dos amplicons preditos por meio da análise dos genomas disponíveis no GenBank (Benson *et al.*, 2005) para cada espécie viral estão presentes na tabela 9.

Tabela 9 – Tamanho do amplicon gerado pelos iniciadores gêneros-específicos em diferentes genomas preditos da família *Poxviridae*

Espécie	Genomas (n)	Alelos (n)	Amplicon (pb)
<i>Orthopoxvirus</i> (POX005)			
<i>Variola virus</i>	47	22	117-415
<i>Camelpox virus</i>	02	02	199-304
<i>Cowpox virus</i>	03	03	163-205
<i>Vaccinia virus</i>	13	01	142
<i>Ectromelia virus</i>	01	01	817
<i>Taterapox virus</i>	01	01	379
<i>Parapoxvirus</i> (POX009)			
<i>Pseudocowpox virus</i>	-	01	188
<i>Orf virus</i>	03	01	188

6.3 – DIAGNÓSTICO VIRAL POR QF-PCR

6.3.1 – Desenho do ensaio de QF-PCR

A diferenciação entre gêneros foi feita pela análise do tamanho do amplicon e pela fluorescência emitida pelo iniciador marcado.

Para o gênero OPV, os iniciadores P5F e P5R (Pan-Orthopox) marcados com o fluorocromo VIC[®], foram desenhados próximos ao *locus* polimórfico, o que gera amplicons de tamanho variável dependendo da espécie. Para a espécie VACV, o amplicon esperado é de 142nt e com coloração verde.

Com relação ao gênero PPV, os iniciadores P9F e P9R (Pan-Parapox) foram marcados com o fluorocromo NED[®], com emissão de coloração amarela. O amplicon esperado para este gênero não é variável, com tamanho de 188nt.

Em um ensaio uniplex, somente uma fluorescência seria visível (ou verde ou amarela), e somente um gênero poderia ser diagnosticado. Já em um ensaio biplex, a diferença no fluorocromo do marcador permite que os dois gêneros sejam diagnosticados e diferenciados sem ambigüidades.

O resultado esperado ao se utilizar os iniciadores Pan-Parapox (NED[®]) e Pan-Orthopox (VIC[®]) está representado na figura 15. Cada pico com coloração diferente representa o amplicon gerado após o PCR, analisado pelo sequenciador automático, pela escala é possível saber qual o tamanho do amplicon.

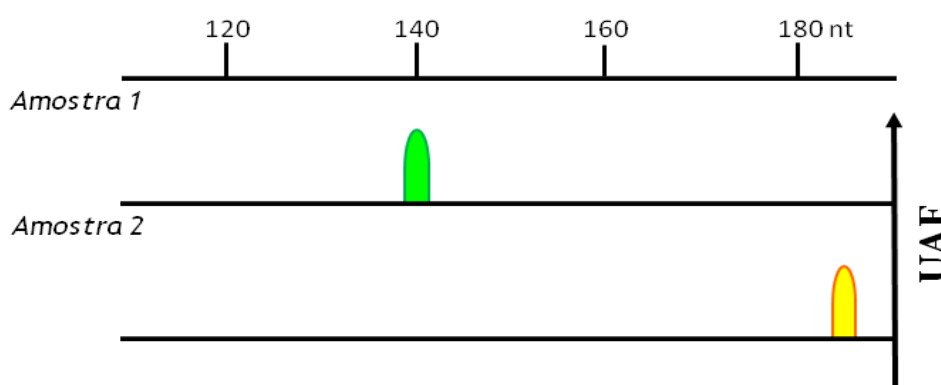


Figura 15 – Representação esquemática do eletroferograma esperado em ensaio QF-PCR biplex. O pico verde representa o amplicon gerado pelo par de iniciadores P5 (Pan-Orthopox) e o pico amarelo pelos iniciadores P9 (Pan-Parapox).

6.3.2 – Otimização da PCR

A etapa mais problemática para a reação da PCR é a extração de DNA, principalmente quando se lida com amostras de origem animal já processadas, pois nesta etapa uma série de fatores podem atrapalhar o resultado final da amplificação, tais como: quantidade de DNA, presença de inibidores da reação, contaminantes etc. (Butler, 2005). Por isso, a escolha do método adequado de extração de DNA é um passo importante para o estabelecimento de um diagnóstico molecular, pois este pode comprometer sua eficácia.

Os protocolos 1 e 2, que são variações de protocolos comumente utilizados na literatura para extração de DNA, permitiram extrair o DNA de vírus cultivado em monocamada celular. Porém, ao se analisar o PCR proveniente destas amostras, percebe-se uma grande quantidade de picos inespecíficos presentes no início da corrida, o que compromete a confiabilidade no eletroferograma gerado (Figura 16).

Porém o eletroferograma obtido com o DNA proveniente da extração utilizando o kit *Illustra Blood GenomicPrep* (GE Healthcare), apresentou uma linha base mais limpa (Figura 16). Este kit se destina a extração de DNA de amostras de sangue, através da ligação preferencial do DNA a uma coluna de sílica, o que resulta em uma amostra mais purificada.

O protocolo 3 se mostrou eficaz para a extração do DNA viral e foi a escolha para a condução de todas as extrações de DNA subsequentes.

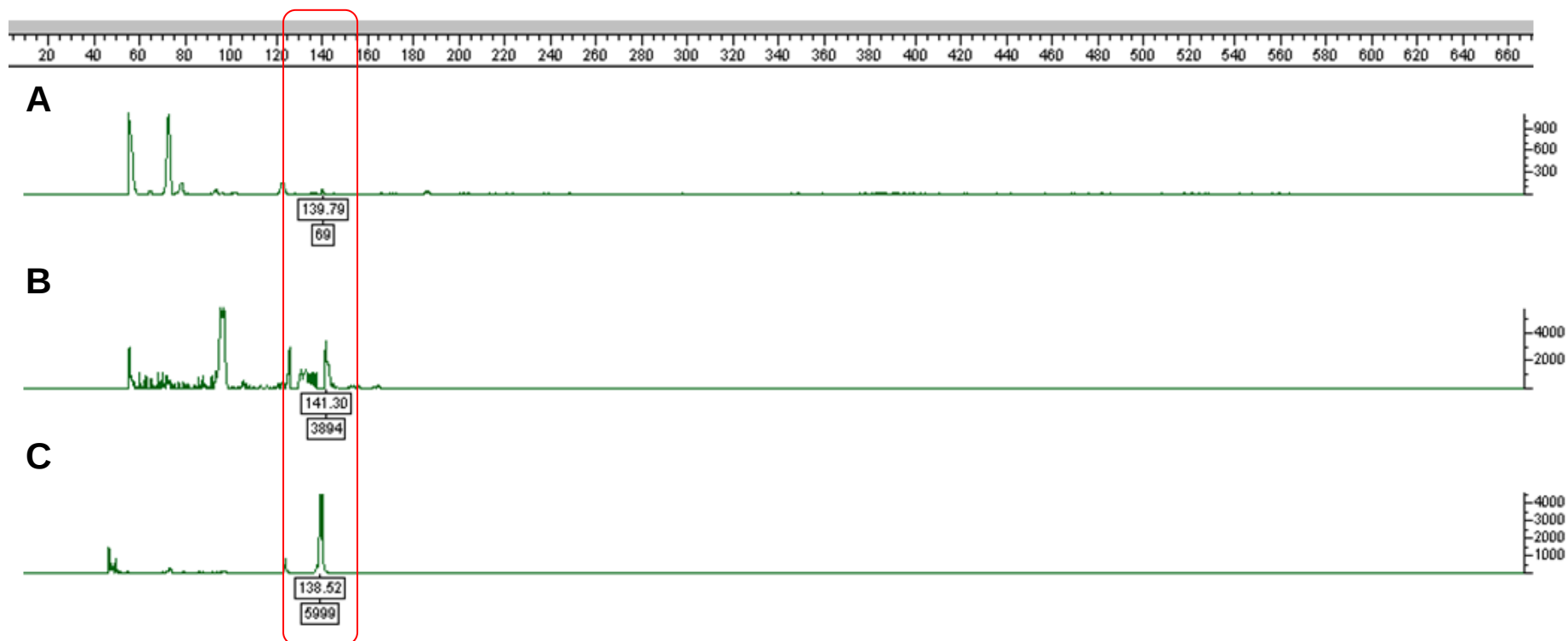


Figura 16 - Comparação entre eletroferogramas obtidos com a utilização dos diferentes protocolos de extração de DNA, a região alvo de OPV (amplicon com aproximadamente 142 pb localizado no *locus* POX005) está assinalada. A, protocolo 1, baseado em Schelkunov *et al.*, 2005; B, protocolo 2, baseado em Fernandes, 2008 e C, protocolo 3, Kit *Illustra Blood GenomicPrep* (GE HealthCare).

6.3.3 – Amplificação do DNA viral

As amostras provenientes de crostas (26), líquidos vesiculares (quatro) e soros (10) provenientes de surtos ocorridos no estado do Rio de Janeiro durante os anos de 2000-2006 foram analisados para testar a eficácia do ensaio QF-PCR.

Os iniciadores desenhados para detectar o genoma do gênero *Orthopoxvirus* (P5F e P5R) amplificaram com sucesso a região polimórfica do gene F1L nos diferentes espécimes clínicos analisados, assim como os iniciadores desenhados para detectar *Parapoxvirus* (P9F e P9R), amplificando a região do gene B2L (Figura 17).

Os iniciadores funcionaram em reação bplex, não ocorrendo interferência entre si ou com DNA não viral existente na amostra biológica, demonstrando a capacidade do teste em reconhecer DNA de poxvirus em uma amostra complexa.

A amplificação da região F1L demonstrou que esta não se apresenta polimórfica na espécie VACV, como esperado pela análise *in silico*, com amplicon de 142 pb, correspondente ao controle positivo VACV-WR. Os amplicons gerados pelo par de iniciadores P9, foram iguais ao tamanho esperado pela predição *in silico*, porém nenhum controle positivo pode ser utilizado para confirmar seu resultado.

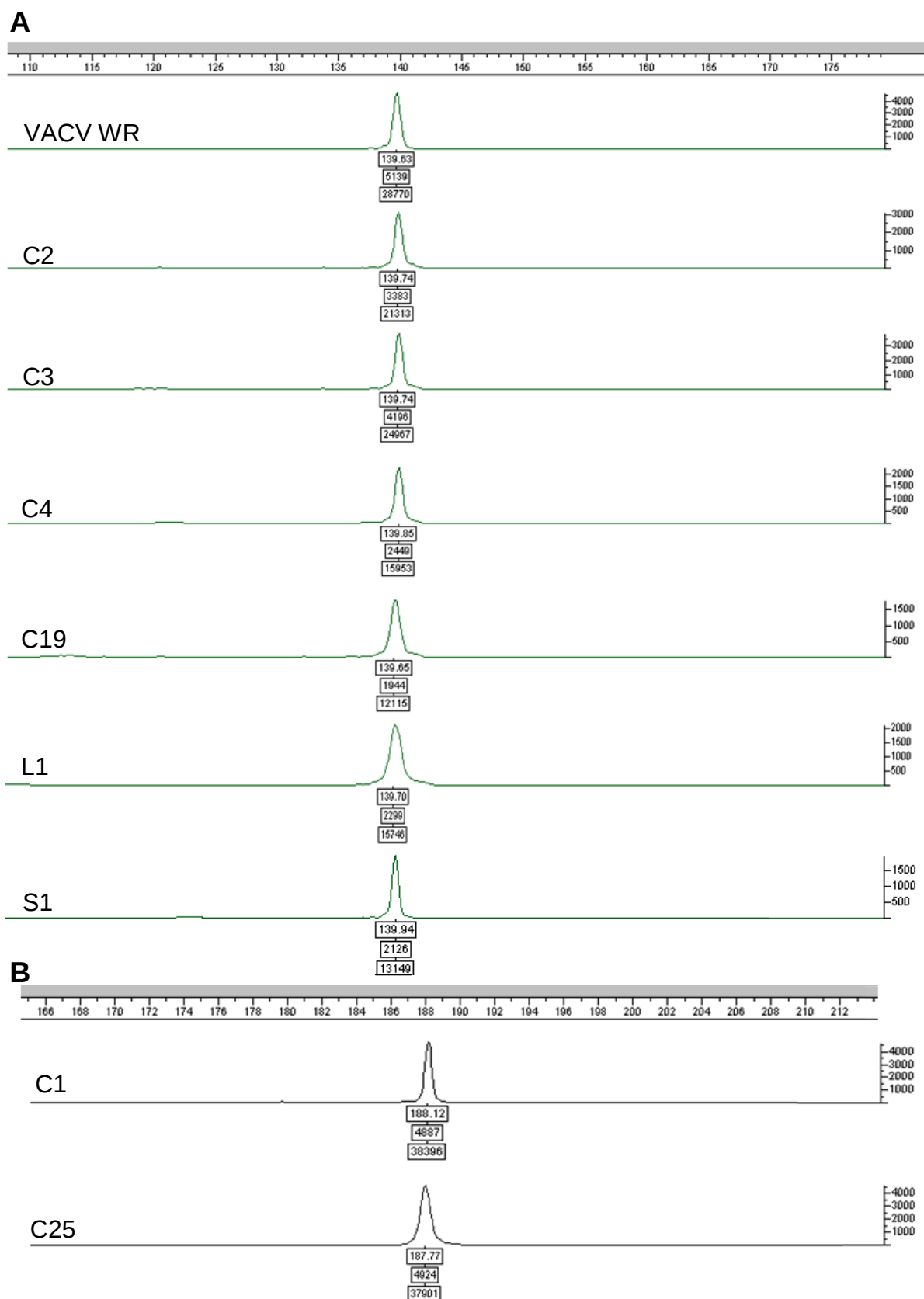


Figura 17 - Eletroferogramas gerados utilizando a combinação de iniciadores em ensaios multiplex. A – Amostras diagnosticadas como *Orthopoxvirus*, B – Amostras diagnosticadas como *Parapoxvirus*.

6.3.4 – Sensibilidade do teste molecular

Algumas amostras tiveram a concentração de DNA medida utilizando o kit Quant-iT™ dsDNA HS (Invitrogen).

A quantidade de DNA presente nas amostras provenientes de crostas, foi similar (média 12,2 ng/mL), menos para a amostra C1. Não foi possível detectar DNA na amostra L1, indicando que menos de 2ng/mL de DNA estavam presentes (Tabela 10).

Tabela 10 – Conteúdo de DNA das amostras quantificadas por fluorimetria.

Amostra	Espécime	Concentração (ng/mL)
C1	Crosta	274
C4	Crosta	15,2
C7	Crosta	11,6
C19	Crosta	9,8
L1	Líquido vesicular	-
VACV WR	Cultivo celular	77,4

Diluições seriadas da amostra C1, positiva somente para *Parapoxvirus*, e do vírus controle, proveniente do sobrenadante do cultivo celular centrifugado, foram realizadas para avaliar a sensibilidade do teste (Figura 18 e Figura 19).

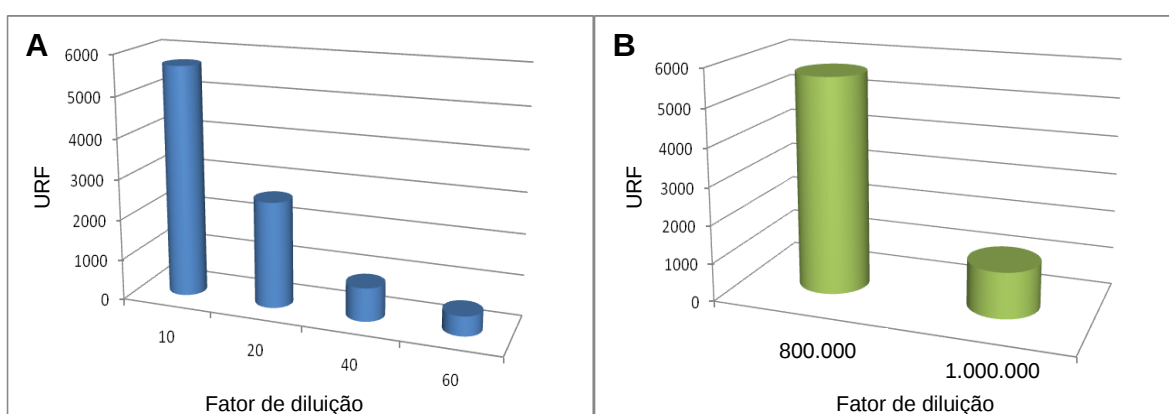


Figura 18 – Relação entre a quantidade de amplicon produzido e a concentração de DNA alvo. (A) Curva de diluição serial da amostra C1; (B) Curva de diluição serial da amostra controle VACV WR cultivado. Eixo x corresponde à intensidade de fluorescência relativa ao amplicon produzido; eixo y corresponde ao fator de diluição do DNA alvo.

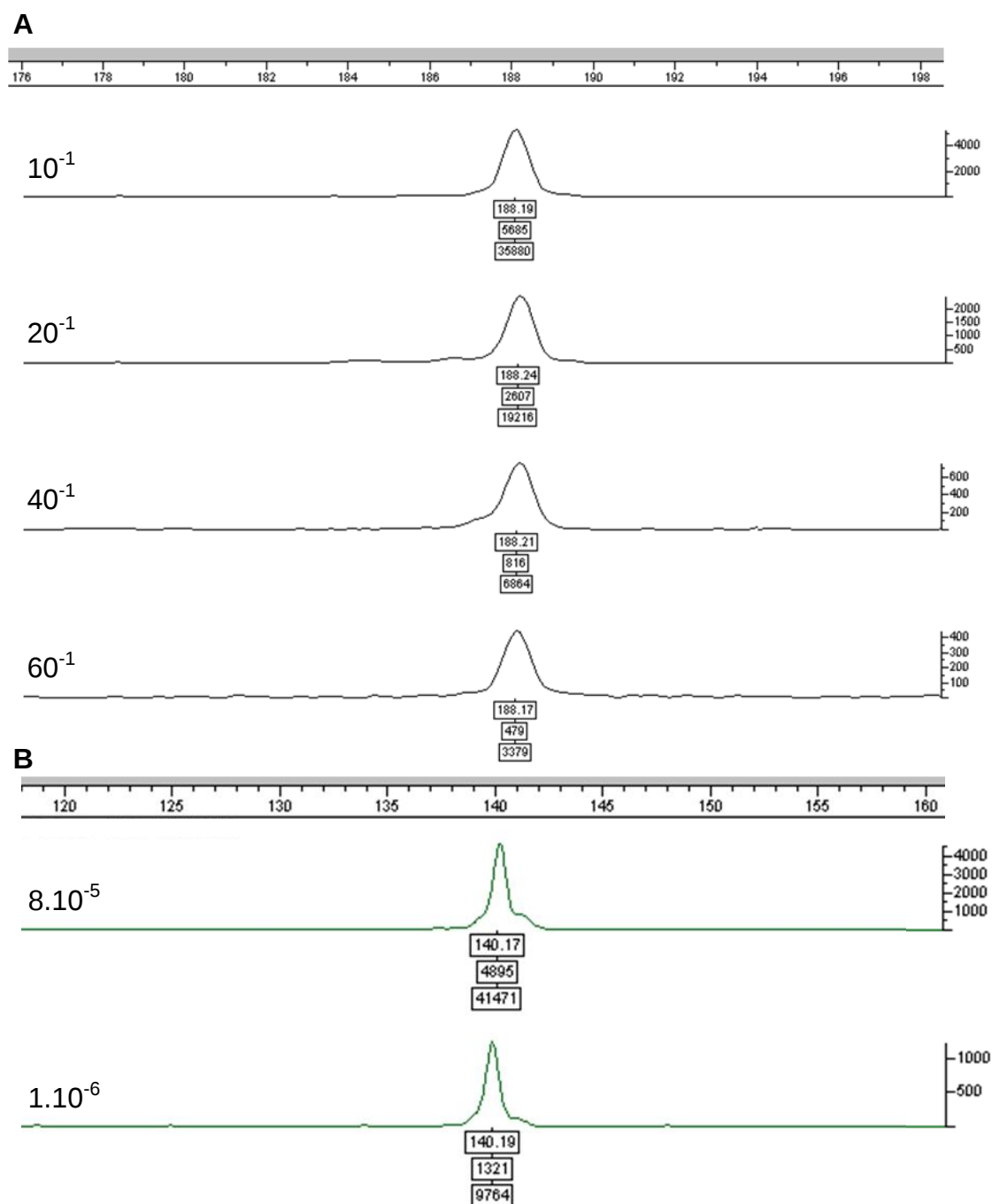


Figura 19 – Eletroferogramas das diluições seriadas da amostra C1 (A) e do vírus cultivado VACV WR (B). A escala à direita representa a fluorescência relativa de cada amostra.

Uma das vantagens dos testes moleculares rápidos para o diagnóstico diferencial é a possibilidade de eliminação de etapas de processamento de amostras biológicas para análise. Para avaliar a possibilidade de amplificação de DNA viral diretamente de espécimes, suspensões de crostas maceradas e conservadas em tampão PBS (Fernandes, 2008) foram aquecidas a 100°C por 3 min, centrifugadas a 4000g por 3 min (microcentrífuga Eppendorf, modelo 5415C) e testadas positivas em ensaios da QF-PCR (Figura 20).

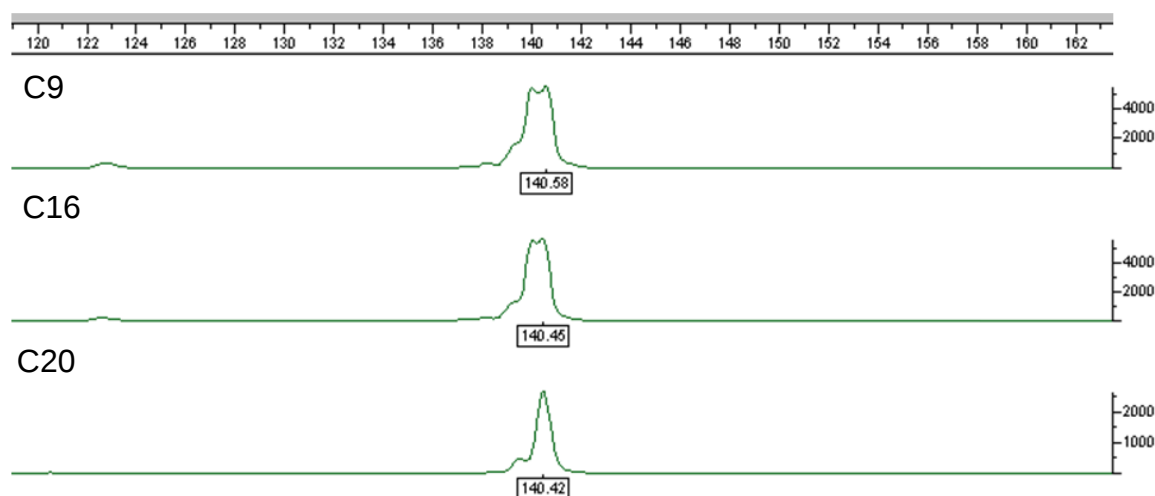


Figura 20 - Eletoferograma do QF-PCR realizado em amostras sem extração de DNA.

6.3.5 – Aplicabilidade do teste em espécimes clínicos

O diagnóstico molecular mostrou-se viável em todos os tipos de espécimes clínicos analisados, ou seja, crostas, líquido vesicular e soro. Porém a taxa de sucesso na detecção se mostrou variável, sendo mais expressiva em crostas.

Em crostas, 19 das amostras (73%) foram positivas para *Orthopoxvirus* e 5 (19,2%) para *Parapoxvirus*. Quatro amostras (15,4%) apresentaram co-infecção pelas duas espécies, porém com concentração viral diferente (Figura 18).

Com relação ao líquido vesicular (quatro amostras), somente uma amostra (25%) demonstrou conter DNA de *Orthopoxvirus*. Da mesma forma, somente uma amostra (10%) do total de soro analisado (10 amostras) foi positivo pelo teste, com detecção do DNA de *Orthopoxvirus* (Tabela 11).

Tabela 11 - Amostras clínicas analisadas para avaliar a performance do QF-PCR multiplex

Espécime	Quantidade	Positivos OPV	Positivos PPV	Co-infecção OPV/PPV
Crosta	26	19	5	4
Líquido vesicular	04	1	0	0
Soro	10	1	0	0
Total	40	21	5	4

Quatro amostras apresentaram co-infecção, com detecção dos lócus POX009 e POX005 nas amostras, indicando que estavam presentes material genético das duas famílias virais, OPV e PPV.

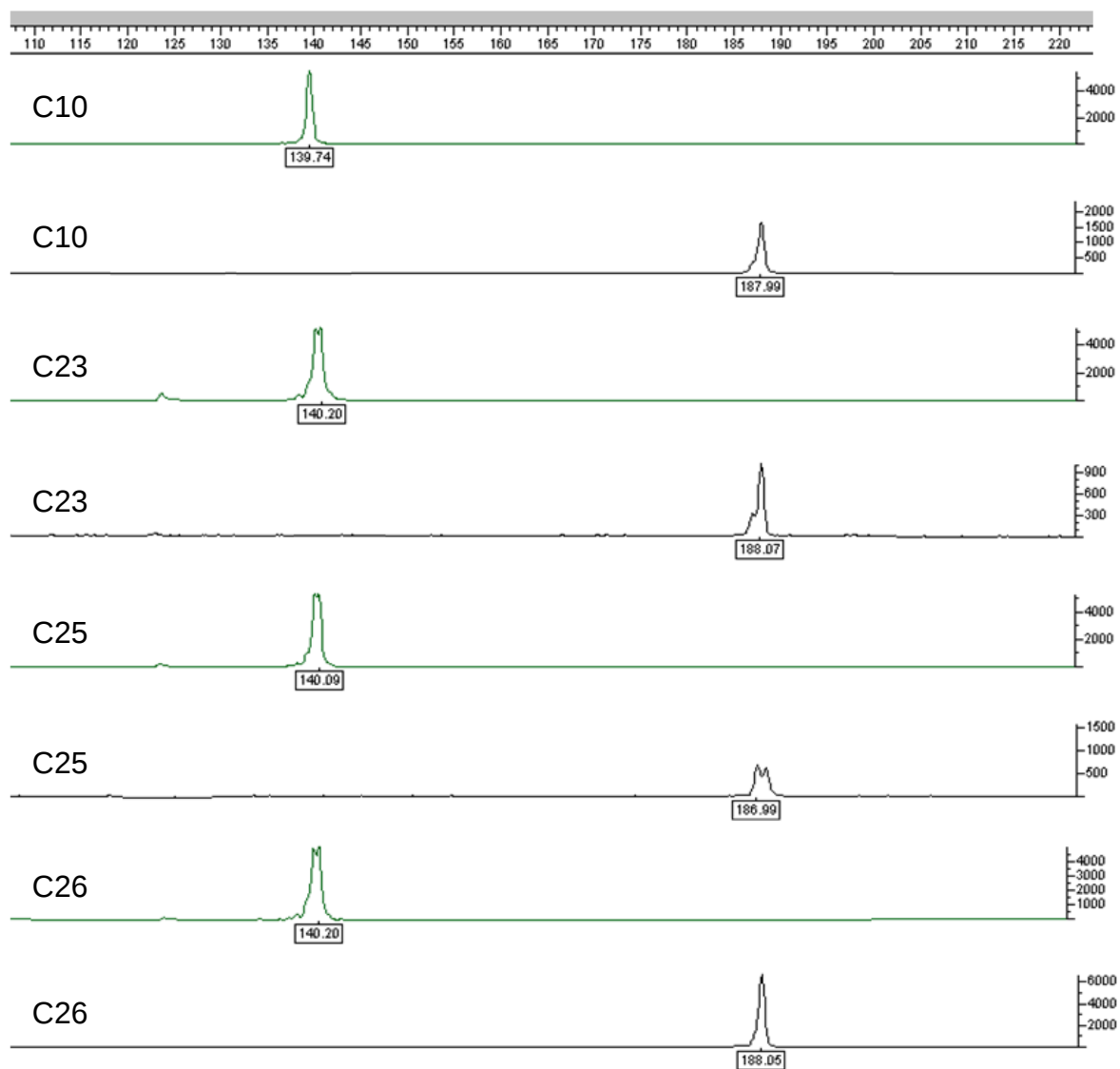


Figura 21 – Eletoferogramas das amostras que apresentaram co-infecção por PPV e OPV. A amplificação dos iniciadores PanOrthopox (P5-VIC®) e em preto os PanParapox (P9-NED®).

VII - DISCUSSÃO

7.1 – MINERAÇÃO DE REPETIÇÕES NO GENOMA DE *POXVIRUS*

Por meio da metodologia empregada neste trabalho foi possível encontrar repetições em tandem polimórficas nos genomas de *Poxvirus*. Existem poucos trabalhos na literatura abordando este tema, e nenhum foi encontrado sobre busca de regiões polimórficas em OPV ou PPV.

Três sequências polimórficas conservadas em diferentes genomas de OPV foram selecionadas por possuírem as características desejadas para serem utilizados como marcadores específicos.

Repetições em tandem são utilizados como marcadores moleculares com valor epidemiológico para tipagem de microrganismos devido a sua alta variabilidade, diferenciando com sucesso cepas de diferentes patógenos (Arnold *et al.*, 2006; McAuliffe *et al.*, 2008; Young *et al.*, 2008).

Como demonstrado na tabela 3, dois loci polimórficos foram encontrados em CPXV e um locus em VACV. Utilizando os iniciadores desenhados por nós que amplificam estes dois loci para a tipagem molecular, seria possível diferenciar estas duas espécies.

Devido à ausência de amostras relevantes, estes dois marcadores não foram testados, porém através de análise *in silico*, foi possível estimar a variabilidade dos loci.

Devido à grande variabilidade do locus POX005, presente em todos os OPV, estudos mais aprofundados sobre a natureza da variação foram realizados.

7.2 – HISTÓRIA DA REPETIÇÃO NOS DIFERENTES ORTÓLOGOS DE F1L

Ao se buscar repetições no interior do gene F1L foram encontradas quatro repetições distribuídas entre os genomas de VARV, CMPV, TATV e ECTV, sendo as três primeiras relacionadas entre si, com uma sequência repetida semelhante, com inserção dos mesmos aminoácidos na proteína, nesta ordem: [D, D, I]. A repetição encontrada em ECMV insere os aminoácidos [N,G,I,V,Q,D,I,D].

O gene *F1L* é expresso nas primeiras horas pós-infecção (Assarsson *et al.*, 2008). A proteína F1L localiza-se na mitocôndria e se insere em sua membrana externa com a porção N-terminal exposta para o citoplasma (Stewart *et al.*, 2005).

A explicação mais simples para o modo de ação de F1L é a sua interação direta com Bak, uma proteína da família Bcl-2 que é responsável pela regulação fina dos sinais apoptóticos (Galluzzi *et al.*, 2008), prevenindo sua ativação. Os domínios responsáveis por esta interação já foram descritos, e localizam-se entre os aminoácidos da porção C-terminal (Kvansakul *et al.*, 2008).

Aminoácidos carregados na porção C-terminal são responsáveis pelo direcionamento desta proteína para a mitocôndria. Uma vez na mitocôndria ela interage com a proteína Bak. O heterodímero F1L-Bak impede a perda do potencial da membrana interna da mitocôndria, o que evita a consequente liberação do citocromo c (Taylor e Barry, 2006, Kvansakul, *et al.*, 2008).

As repetições encontradas não se encontram na porção funcional da proteína, o que pode explicar porque não houve seleção negativa contra estas mutações. A inserção destas repetições no gene altera a estrutura tridimensional da proteína, porém não o suficiente para fazer com que ela perca sua função, pois a mesma se mostrou funcional em ECMV e CPXV (Stewart *et al.*, 2005).

A análise do relacionamento filogenético das sequências de aminoácidos desta proteína reproduz com sucesso a história evolutiva da família *Poxviridae*, determinado anteriormente (Xing *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2007), agrupando espécies relacionadas em um mesmo clado. As espécies VARV, CMPX e TATV formam um grupo monofilético que se originou de um ancestral que não possuía as repetições em tandem.

Desta forma, a explicação mais parcimoniosa para o surgimento e ampliação do número de repetições, levando em consideração o modelo de mutação passo a passo proposto por Kimura e Ohta (1973 *apud* Goldstein e Pollock, 1997), seria que em determinado momento, o ancestral comum a VARV, TATV e CMPV teve um evento de duplicação de uma unidade de repetição. De acordo com este modelo, o número de unidades de repetição modificou-se em uma unidade por mutação, expandindo-se a taxas semelhantes, possivelmente através de um mecanismo conhecido como derrapagem da DNA polimerase (Benson e Dong, 1999; Whittaker *et al.*, 2003).

A derrapagem da DNA polimerase consiste na dissociação transiente do DNA replicado, seguido de uma reassociação errônea, que se ocorrer antes do local correto, acaba por acrescentar um novo fragmento em uma das fitas do DNA, caracterizando a expansão da repetição (Ellegren, 2004).

Com a separação deste grupo ancestral para infectar diferentes hospedeiros, diferentes pressões de seleção atuaram, levando ao surgimento de diferentes números de repetições. Graças ao grande número de genomas de VARV estudados, um perfil altamente polimórfico foi identificado. Mas, de acordo com nossas previsões, se novas sequências forem obtidas de TATV e CMPV, estas se mostrarão polimórficas.

No caso de ECTV, as repetições não estão relacionadas aos encontrados em TATV, CMPV e VARV, tendo ocorrido *de novo*. Desta forma, a sequência repetida é diferente da encontrada anteriormente, porém todas as repetições se encontram na mesma posição na proteína.

A razão pela qual esta grande quantidade de polimorfismos está presente nestes vírus permanece um mistério, entretanto, a presença de STR no interior de genes pode prover uma vantagem para uma rápida adaptação em novos ambientes (Li *et al.*, 2004).

O padrão de distribuição geográfica das repetições encontradas nos genomas de VARV, assemelha-se às hipóteses de origem deste vírus propostas por Li e colaboradores (2007). Através da correlação de arquivos históricos das infecções de Varíola com uma análise filogenética robusta, este grupo propôs que este vírus surgiu na Ásia Oriental, disseminando-se do Oriente Médio e Índia, e então para a África.

Em nossa análise, considera-se a ausência de repetição um caráter ancestral e que o aumento do número de cópias da unidade de repetição um caráter derivado. O grupo com menor número de repetições (V1), e conseqüentemente, o mais ancestral corresponde a isolados de países correspondentes da região geográfica proposta para a origem do VARV. E os grupos com número crescente de repetições disseminam-se pela África, onde ocorre uma diversificação do número de repetições e com posterior distribuição mundial, o que é consistente com a proposta de Li e colaboradores (2007).

Desta forma, a repetição encontrada em F1L é um marcador consistente com a história evolutiva e da disseminação do VARV.

7.3 – DETECÇÃO MOLECULAR POR QF-PCR MULTIPLEX

Diversos métodos de diagnóstico de poxvirus baseados em PCR foram descritos nos últimos anos (Ropp *et al.*, 1995; Loparev *et al.*, 2001; Nitsche *et al.*, 2006a; Nitsche *et al.*, 2006b; Abrahão *et al.*, 2009). Os trabalhos iniciais baseavam-se na amplificação de um alvo viral com posterior digestão com endonucleases de restrição (Kurth e Nitsche, 2007). Esta metodologia depende da análise do tamanho dos amplicons por eletroforese em gel após a digestão, o que, além de ser laborioso, consumia um tempo precioso para o diagnóstico. Este fato tornou evidente que novas metodologias, mais rápidas e confiáveis, deveriam ser criadas para o diagnóstico viral.

Neste trabalho, propõe-se o diagnóstico de poxvirus e sua diferenciação entre os gêneros *Orthopoxvirus* e *Parapoxvirus* por meio PCR quantitativo fluorescente. Nesta técnica são utilizados iniciadores marcados com diferentes fluorocromos amplificam uma região genômica alvo, e posteriormente, são analisadas por eletroforese capilar, o que confere a técnica a capacidade de analisar pequenas quantidades de DNA molde. Além disso, o teste utiliza uma combinação de iniciadores em uma reação multiplex, tornando-o mais rápido e menos laborioso.

Nenhum trabalho foi encontrado na literatura utilizando o QF-PCR para diagnóstico molecular de poxvírus, mesmo que esta técnica já tenha sido utilizada para diagnosticar outros vírus que infectam humanos, como o HPV (MolGentix, 2007).

Com os iniciadores criados, foi possível diagnosticar o gênero viral presente em espécimes clínicos provenientes de surtos de doenças exantemáticas em gado bovino leiteiro do estado do Rio de Janeiro durante o período de 2000 a 2006.

O ensaio bplex para os loci POX005 e POX009, exclusivos para *Orthopoxvirus* e *Parapoxvirus*, respectivamente, foi capaz de amplificar o DNA viral em amostras provenientes de crostas, vesículas e plasma sanguíneo, em altas dosagens. Além disso, através do ensaio foi possível detectar co-infecções com os

dois gêneros virais em um mesmo espécime clínico. Quatro amostras apresentaram co-infecção, com dosagem viral diferente para cada gênero. Nestas amostras, o DNA de *Orthopoxvirus* estava presente em uma quantidade maior do que o de *Parapoxvirus*.

Diluições seriadas do DNA extraído dos vírus possibilitam inferir que a fluorescência presente no eletroferograma é proporcional à quantidade de DNA presente na amostra. Assim, analisando os eletroferogramas com co-infecção, pode-se sugerir que a quantidade de DNA de *Orthopoxvirus* presente na amostras era maior que a de *Parapoxvirus*.

Desta forma, nas amostras com co-infecção, somente após diluições do DNA viral foi possível obter o perfil de picos claro de OPV (*locus* POX005); porém, neste caso, não foi possível amplificar o DNA de PPV (*locus* POX009) após a diluição.

Também através da amplificação de diluições seriadas do DNA extraído da amostra controle VACV WR, cujo conteúdo de DNA foi determinado como 77,4 ng/mL, foi possível definir o limite de detecção do teste. Amostras com diluição de $1:10^6$, com aproximadamente, 77,4 fg de DNA, foram amplificadas com sucesso, valores estes próximos aos demonstrados utilizando PCR em tempo real por outros autores (Aitichou *et al.*, 2008; Putkuri *et al.*, 2009).

Um teste multiplex para detecção de *Orthopoxvirus* e *Parapoxvirus* foi descrito recentemente na literatura (Abrahão *et al.*, 2009). Este utiliza iniciadores já descritos na literatura para amplificar o DNA viral em uma reação multiplex de *nested*-PCR.

Uma variação importante da PCR é a técnica de *nested*-PCR, que consiste na amplificação de um alvo com um par de iniciadores, seguida da amplificação com um segundo par de iniciadores internos ao primeiro produto de amplificação. Embora ela melhore a especificidade e a eficiência da reação, envolve múltiplos manuseios dos produtos de amplificação, o que aumenta as chances de contaminação cruzada, o que pode aumentar o número de falso positivos. Além disso, ao se realizar duas reações de amplificação há um gasto maior de material de laboratório, como DNA polimerase, iniciadores e um aumento no tempo de execução da análise, já que os amplicons são analisados por eletroforese em gel.

O teste biplex da QF-PCR aqui apresentado requer somente uma etapa de amplificação, que posteriormente é analisada em sequenciador automático, por

eletroforese capilar. Desta forma, o tempo gasto para a obtenção do resultado após a coleta de campo é de aproximadamente 5 horas.

VIII – CONCLUSÃO

Os iniciadores inéditos utilizados neste trabalho foram capazes de detectar *Orthopoxvirus* e *Parapoxvirus* em uma única reação. Os resultados obtidos sugerem que o ensaio bplex fluorescente da PCR é um método sensível e robusto para a detecção de *Orthopoxvirus* e *Parapoxvirus* em uma mesma reação.

O ensaio foi capaz de detectar os vírus em co-infecção, indicando a dosagem viral presente, o que é importante para o monitoramento de áreas onde os dois gêneros virais co-circulam.

A região polimórfica do gene F1L parece ter surgido em dois eventos separados de mutação, formando dois grupos não relacionados: um englobando VARV, TATV e CMPX e outro com ECTV, porém nos dois grupos as repetições codificam para um domínio hidrofílico.

A distribuição dos alelos encontrados para o ortólogo de gene F1L presente de VARV remonta a história da origem e disseminação deste vírus na população humana mundial, constituindo um marcador de ancestralidade informativo.

IX – BIBLIOGRAFIA

Abrahão, J. S., Lima, L. S., Assis, F. L., Alves, P. A., Silva-Fernandes, A. T., Cota, M. M. G., Ferreira, V. M., Campos, R. K., Mazur, C., Lobato, Z. I. P., Trindade, G. T., Kroon, E. G. **Nested-multiplex PCR detection of *Orthopoxvirus* and *Parapoxvirus* directly from exanthematic clinical samples.** Virol. J. v.6, n.140, DOI: 10.1186/1743-422X-6-140, 2009.

Aitichou, M., Saleh, S., Kyusung, P., Hugins, J., O'Guinn, M., Jahling, P., Ibrahim, S. **Dual-probe real-time PCR assay for detection of variola or other orthopoxviruses with dried reagents.** J. Virol. Method. v.153, p.190-195, 2008.

Andrade, M. A., Perez-Iratxeta, C., Ponting, C. P. **Protein Repeats: Structures, Functions, and Evolution.** J. Struct. Biol. v.134, p.117-131, 2001.

Arnold, C. Thorne, N., Underwood, A., Baster, K., Gharbia, S. **Evolution of short sequence repeats in *Mycobacterium tuberculosis*.** FEMS Microbiol. Lett. v.256, p.340-346, 2006.

Assarsson, E., Greenbaum, J. A., Sundstro, M., Schaffer, L., Hammond, J. A., Pasquetto, V., Oseroff, C., Hendrickson, R. C., Lefkowitz, E. J., Tscharke, D. C., Sidney, J., Grey, H. M., Head, S. R., Peters, B., Sette, A. **Kinetic analysis of a complete poxvirus transcriptome reveals an immediate-early class of genes.** Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. v.105, n.6, p.2140–2145, 2008.

Balamurugan, V., Jayappa, K. D., Hosamani, M., Bhanuprakash, V., Venkatesan, G., Singh, R. K. **Comparative efficacy of convencional and TaqMan polymerase chain reaction assays in the detection of capripoxviruses from clinical samples.** J. Vet. Diagn. Invest. v.21, p.225-231, 2009.

Barravieira, S.R.C.S. **Diseases caused by Poxvirus – Orf and Milker's nodules – A review.** J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis. v.11, n.2, p.102–108, 2005.

Benson, D. A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., Wheeler, D. J. **GenBank**. Nucleic Acids Research, v.33, Database issue, D34–D38, 2005.

Benson, G., Dong, L. **Reconstructing the Duplication History of a Tandem Repeat**. Proc. Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol. p.44-53, 1999.

Benson, G. **Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences**. Nucl. Acids Res., v.27, n.2, p.573-580, 1999.

Bratke, K. A., McLysaght, A. **Identification of multiple independent horizontal gene transfers into poxviruses using a comparative genomics approach**. BMC Evol Biol. v.8, p.67-80, 2008.

Bugert, J. J., Darai, G. **Poxvirus Homologues of Cellular Genes**. Virus Genes. v.21, p.111-133, 2000.

Buller, R. M. L., Palumbo, G. J. **Poxvirus Pathogenesis**. Microbiol Reviews. v.55, n.1, p.80-122, 1991.

Butler, J. M. **Forensic DNA typing**. Burlington: Elsevier Academic Press, 2005.

Carletti, F., Di Caro, A., Calcaterra, S., Grolla, A., Czub, M., Ippolito, G., Capobianchi, M. R., Horejsh, D. **Rapid, differential diagnosis of orthopox- and herpesviruses based upon real-time PCR product melting temperature and restriction enzyme analysis of amplicons**. J. Virol. Methods. v.129, p.97–100, 2005.

Carroll, M. W., Moss, B. **Poxviruses as expression vectors**. Curr. Opin. Biotech. v.8, p.573-577, 1997.

CDC – *Center of Disease Control*. **Update: multistate outbreak of monkeypox—Illinois, Indiana, Kansas, Missouri, Ohio, and Wisconsin**. MMWR. v. 52, p.642–646, 2003.

Cohen, J. I., Hohman, P., Preuss, J. C., Li, L., Fischer, S. H., Fedorko, D. P. **Detection of vaccinia virus DNA, but not infectious virus, in the blood of smallpox vaccinia recipients.** Vaccine. v.25, p.4571-4574, 2007.

Cummings, L., Riley, L., Black, L., Souvorov, A., Resenchuk, S., Dondoshansky, I., Tatusova, T. **Genomic BLAST: custom-defined virtual databases for complete and unfinished genomes.** FEMS Microbiol. Lett. v. 216, n.2, p.133-38, 2002.

Cyrklaff, M., Risco, C., Fernández, J. J., Jiménez, M. V., Estéban, M., Baumeister, W., Carrascosa, J. L. **Cryo-electron tomography of vaccinia virus.** Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. v.102, n.8, p.2772-2777, 2005.

Da Silva, M., Upton, C. **Host-derived pathogenicity islands in poxviruses.** Virol J. v.2, p.30-41, 2005.

Damaso, C. R. A., Esposito, J. J., Condit, R. C., Moussatché, N. **An emergent poxvirus from humans and cattle in Rio de Janeiro State: Cantagalo Virus may derive from Brazilian smallpox vaccine.** Virology. V.277, p.439-449, 2000.

Damaso, C. R. A., Reis, S. A., Jesus, D. M., Lima, P. S. F., Moussatché, N. **A PCR-based assay for detection of emerging vaccinia-like viruses isolated in Brazil.** Diagn. Microbi. Infec. Dis. v.57, p.39-46, 2007.

Di Giulio, D. B., Eckburg, P. B. **Human monkeypox: an emerging zoonosis.** Infect. Dis. v.4, p15-26, 2004.

Donatele, D. M. **Estudo epidemiológico do surto da poxvirose bovina e humana no Estado do Espírito Santo.** Tese de Doutorado, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias – UENF, 2005.

Donatele, D.M., Travassos, C.E.P.F., Leite, J.A., Kroon, E.G. **Epidemiologia da poxvirose bovina no estado do Espírito Santo, Brasil.** Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci. v.44, n.44, p.275-282, 2007.

Ellegren, H. **Microsatellites: simple sequences with complex evolution**. Nature Reviews Genetics. v.5, p.435-444, 2004.

Esposito, J. J., Sammons, S. A., Frace, A. M., Osborne, J. D., Olsen-Rasmussen, M., Zhang, M., Govil, D., Damon, I. K., Kline, R., Laker, M., Li, Y., Smith, G. L., Meyer, H., Leduc, J. W., Wohlhueter, R. M. **Genome Sequence Diversity and Clues to the Evolution of Variola (Smallpox) virus**. Science. v.313, p.807-812, 2006.

Espy, M. J., Cockerill III, F. R., Meyer, R. F., Bowen, M. D., Poland, G. A., Hadfield, T. L., Smith, T. F. **Detection of Smallpox Virus DNA by LightCycler PCR**. J. Clin. Microbiol. v.40, n.6, p.1985-1988, 2002.

Fedele, C. G., Negredo, A., Molero, F., Sánchez-Seco, M. P., Tenorio, A. **Use of Internally Controlled Real-Time Genome Amplification for Detection of Variola Virus and Other Orthopoxviruses Infections in Humans**. J.Clin. Microbiol. v.44, n.12, p.4464-4470, 2006.

Fedorko, D. P., Preuss, J. C., Fahle, G. A., Li, L., Fischer, S. H., Hohman, P., Cohen, J. I. **Comparison of Methods for Detection of Vaccinia Virus in Patient Specimens**. J.Clin. Microbiol. v.43, n.9, p.4602-4606, 2005.

Fenner, F., Henderson, I. A., Jezek, Z., Ladnyi, I. D. **Smallpox and its Eradication**. World Health Organization, Switzerland, 1988.

Fernandes, A. T. S. **Vaccínia bovina em mesorregiões no estado do Rio de Janeiro: epidemiologia e caracterização de amostras de Vaccinia vírus**. Tese de Doutorado, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias – UENF, 2008.

Gallina, L., Dal Pozzo, F., Mc Innes, C. J., Cardeti, G., Guercio, A., Battilani, M. Ciulli, S., Scagliarini, A. **A real time PCR assay for the detection and quantification of Orf virus**. J. Virol. Methods. v.134, p.140-145, 2006.

Galluzzi, L., Brenner, C., Morselli, E., Touat, Z., Kroemer, G. **Viral control of Mitochondrial Apoptosis.** PLoS Pathog. v.4, n.5. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000018, 2008.

Goldstein, D. B., Pollock, D. D. **Launching Microsatellites: A Review of Mutation Processes and Methods of Phylogenetic Inference.** J. Hered. v.88, p.335-342, 1997.

Gubser, C., Smith, G. L. **The sequence of camelpox virus shows it is most closely related to variola virus, the cause of smallpox.** J. Gen. Virol. v.83, p.855-872, 2002.

Gubser, C., Hué, S., Kellam, P., Smith, G. L. **Poxvirus genomes: a phylogenetic analysis.** J Gen Virol. v.85, p.105-177, 2004.

Hall, T.A. **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT.** Nucl. Acids. Symp. Ser. v.41, p.95-98, 1999.

Hazelton, P. R., Gelderblom, H. R. **Electron Microscopy for Rapid Diagnosis of Emerging Infectious Agents.** Emerging Infect. Dis. v.9, n.3, p. 294-303, 2003.

Hill, C.R, Kline, M. C, Coble, M. D., Butler, J, M. **Characterization of 26 miniSTR loci for improved analysis of degraded DNA samples.** J. Forensic. Sci. v.53, p.73-80, 2008.

Hughes, A. L., Friedman, R. **Poxvirus genome evolution by gene gain and loss.** Mol. Phylogenet. Evo. v.35, p.186-195, 2005.

Hull, H. F., Danila, R., Ehresmann, K. **Smallpox and bioterrorism: Public-health responses.** J. Lab. Clin. Med. v.142, p.221-228, 2003.

Inoshima, Y., Morooka, A., Sentsui, H. **Detection and diagnosis of parapoxvirus by the polymerase chain reaction.** J. Virol. Methods. v.84, p.201–208, 2000.

Inoshima, Y., Murakami, K., Wu, D., Sentsui, H. **Characterization of parapoxviruses circulating among wild Japanese serows (*Capricornis crispus*).** Microbiol. Immunol. v.46, n. 8, p.583-587, 2002.

Iyer, L. M., Balaji, S., Koonin, E. V., Aravind, L. **Evolutionary genomics of nucleocytoplasmic large DNA viruses.** Virus Res. v.117, p.156-184, 2006.

Kurth A., Nitsche, A. **Fast and reliable diagnostic methods for the detection of human poxvirus infections.** Future Medicine. V.2, n.5, p.467-479, 2007.

Kvansakul, M., Yang, H., Fairlie, W. D., Czabotar, P. E., Fischer, S. F., Perugii, M. A., Huang, D.C.S., Colman, P. M. **Vaccinia virus anti-apoptotic F1L is a novel Bcl-2-like domain-swapped dimer that binds a highly selective subset of BH3-containing death ligands.** Cell Death Differ. 2008 DOI: 10.1038/cdd.2008.83.

Lefkowitz, E. J., Upton, C., Changayil, S.S., Buck, C., Traktman, P., Buller, R. M. L. **Poxvirus Bioinformatics Resource Center a comprehensive *Poxviridae* informational and analytical resource.** Nuc. Ac. Res. v.33, p.311-316, 2005.

Leite, J. A., Drumond, B. P., Trindade, G. S., Lobato, Z. I. P., da Fonseca, F. G., dos Santos, J. R., Madureira, M. C., Guedes, M. I. M. C., Ferreira, J. M. S., Bonjardim, C. A., Ferreira, P. C. P., Kroon, E. G. **Passatempo Virus, a Vaccinia Virus Strain, Brazil.** Emerging Infect. Dis. v.11, n.12, p1935-1939, 2005.

Levi, G. C., Kallás, E. G. **Varíola, sua prevenção vacinal e ameaça como agente de bioterrorismo.** Rev. Assoc. Med. Bras. v.48, n.4, p.357-362, 2002.

Lewis-Jones, S. **Zoonotic poxvirus infections in humans.** Curr Opin Infect Dis. v17, p.81-99, 2004.

Li, Y., Carroll, D. S., Gardner, S. N., Walsh, M. C., Vitalis, E. A., Damon, I. K. **On the origin of smallpox: Correlating variola phylogenics with historical smallpox records**. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. v.104, n.40, p.15787-15792, 2007.

Li, Y., Korol, A. B., Fahima, T., Nevo, E. **Microsatellites within genes: structure, function, and evolution**. Mol. Biol. Evo. v.21, n.6, p.991–1007, 2004.

Loparev, V. N., Massung, R. F., Esposito, J. J., Meyer, H. **Detection and Differentiation of Old World *Orthopoxviruses*: Restriction Fragment Length Polymorphism of the *crmB* Gene Region**. J.Clin. Microbiol. v.39, n.1, p.94–100, 2001.

Machado, F. B., Medina-Acosta E. **High-resolution combined linkage physical map of short tandem repeat loci on human chromosome band Xq28 for indirect haemophilia A carrier detection**. Haemophilia v.15, p. 297-308, 2009.

Martina, B. E. E., van Doornum, G., Dorrestein, G. M., Niesters, H. G. M., Stittelaar, K. J., Wolters, M. A. B. I., van Bolhuis, H. G. H., Osterhaus, A. D. M. E. **Cowpox Virus Transmission from Rats to Monkeys, the Netherlands**. Emerging Infect. Dis. v.12, n.6, p.1005–1007, 2006.

Mazur, C., Ferreira. I. I., Rangel Filho, F. B., Galler, R. **Molecular characterization of Brazilian isolates of orf virus**. Veterinary microbiology. v. 73, p.253-259, 2000.

McAuliffe, L., Churchward, C. P., Lawes, J. R., Loria, G., Ayling, R. D., Nicholas, R. A. J. **VNTR analysis reveals unexpected genetic diversity within *Mycoplasma agalactiae*, the main causative agent of contagious agalactia**. BMC Microbiol. v.8, DOI: 10.1186/1471-2180-9-183, 2008.

McFadden, G. **Poxvirus tropism**. Nat. Rev. Microbiol. v.3, p.201-213, 2005.

McLysaght, A., Baldi, P. F., Gaut, B. S. **Extensive gene gain associated with adaptative evolution of poxviruses.** Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. v.100, n.26, p.15655-15660, 2003.

Mercer, A. A., Schmidt, A., Weber, O. (ed.). **Poxviruses.** Basel: Birkhäuser Verlag, 2007.

Mercer, A.A., Ueda, N., Friederichs, S., Hofmann, K., Fraser, K. M., Bateman, T., Fleming, S. B. **Comparative analysis of genome sequences of three isolates of Orf virus reveals unexpected sequence variation.** Virus Res. v.116, p.146-158, 2006.

Meyer, H., Ropp, S. L., Esposito J. J. **Gene for A-type inclusion body protein is useful for a polymerase chain reaction assay to differentiate Orthopoxviruses.** J. Virol. Methods. v.64, p.217–221, 1997.

Molgentix. **F-HPV typing™ Multiplex Fluorescent-PCR Kit For Human Papilloma Virus (HPV) Genotyping.** Barcelona, 2007.

Moss, B. **Poxviridae: the viruses and their replication.** p.2906-2943. *In.* Fields, B. N., Knipe, D. M. e Howley, P. M. (ed.), Fields Virology, 5.a ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 2002.

Moss, B. **Poxvirus entry and membrane fusion.** Virology. v.344, p.48-54, 2006.

Müller, G., Gröters, S., Siebert, U., Rosenberger, T., Driver, J., König, M., Becher, P., Hetzel, U., Baumgärtner, W. **Parapoxvirus Infection in Harbor Seals (*Phoca vitulina*) from the German North Sea.** Vet. Pathol. v.40, p445-454, 2003.

Niedrig, M., Meyer, H., Panning, M., Drosten, C. **Follow-Up on Diagnostic Proficiency of Laboratories Equipped To Perform Orthopoxvirus Detection and Quantification by PCR: the Second International External Quality Assurance Study.** J. Clin. Microbiol. v.44, n.4, p.1283-1287, 2006.

Nitsche, A., Büttner, M., Wilhelm, S., Pauli, G., Meyer, H. **Real-Time PCR Detection of Parapoxvirus DNA**. Clin. Chem. v.52, p.316-319, 2006a.

Nitsche, A., Steger, B., Ellerbrok, H., Pauli, G. **Detection of vaccinia virus DNA on the LightCycler by fluorescence melting curve analysis**. J. Virol. Methods. v.126, p.187-195, 2005.

Nitsche, A., Stern, D., Ellerbrok, H., Pauli, G. **Detection of Infectious Poxvirus Particles**. Emerg. Infect. Dis. v.7, n.7, p.1139-1141, 2006b.

Nollens, H. H.; Gulland, F. M. D.; Jacobson, E. R.; Hernandez, J. A.; Klein, P. A.; Walsh, M. T., Condit, R. C. **Parapoxviruses of seals and sea lions make up a distinct subclade within the genus Parapoxvirus**. Virology. v.349, n.2, p.316–324, 2006.

Parrino, J., Graham, B. S. **Smallpox vaccines: Past, present, and future**. J. Allergy Clin. Immunol. v.118, n.6, p.1320-1326, 2006.

Piskurek, O., Okada, N. **Poxviruses as possible vectors for horizontal transfer of retroposons from reptiles to mammals**. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. v.104, n.29, p.12046-12051, 2007.

Putkuri, N., Piiparinen, H., Vaheri, A., Vapalahti, O. **Detection of Human Orthopoxvirus Infections and Differentiation of Smallpox Virus with Real-Time PCR**. J. Med. Virol. v.81, p.146-152, 2009.

Ropp, S. L., Jin, Q, Knight, J. C., Massung, R. F., Esposito, J. J. **PCR Strategy for Identification and Differentiation of Smallpox and Other Orthopoxviruses**. J.Clin. Microbiol. v.33, n.8, p.2069-2076, 1995.

Saijo, M., Ami, Y., Suzaki, Y., Nagata, N., Iwata, N., Hasegawa, H., Ogata, M., Fukushi, S., Mizutani, T., Iizuka, I., Sakai, K., Sata, T., Kurata, T., Kurane, I.,

Morikawa, S. **Diagnosis and Assessment of Monkeypox Virus (MPXV) Infection by Quantitative PCR assay: Differentiation of Congo Basin and West African MPXV Strains.** Jpn. J. Infect. Dis. v.61, p.140-142, 2008.

Salemi, M., Vandamme, A. M. (ed). **The phylogenetic Handbook: A Practical Approach to DNA and Protein Phylogeny.** 2 ed. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 2009.

Schatzmayr, H.G., Lemos, E.R.S., Mazur, C., Schubach, A., Majerowicz, S., Rozental, T., Schubach, T.M.P., Bustamante, M.C., Barth, O.M. **Detection of poxvirus in cattle associated with human cases in the State of Rio de Janeiro: Preliminary Report.** Mem. do Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v.95, n.5, p.625-627, 2000.

Shchelkunov, S.N., Gavrilova, E.V., Babkin, I.V. **Multiplex PCR detection and species differentiation of *Orthopoxviruses* pathogenic to humans.** Mol. Cell. Probes. v.19, p.1–8, 2005.

Silva-Fernandes, A. T., Travassos, C. E. P. F., Ferreira, J. M. S., Abrahão, J. S., Rocha, E. S. O., Viana-Ferreira, F., Santos, J. R., Bonjardim, C. A., Ferreira, P. C. P., Kroon, E. G. **Natural human infections with *Vaccinia virus* during bovine vaccinia outbreaks.** J. Clin. Virol. v.44, p.308-313, 2009.

Singh, R. K., Hosamani, M., Balamurugan, V., Bhanuprakash, V., Rasool, T. J., Yadav, M. P. **Buffalopox: an emerging and re-emerging zoonosis.** Anim. Health Res. Rev. v.8, p.105-114, 2007.

Singh, R. K., Hosamani, M., Balamurugan, V., Satheesh, C. C., Rasool, T. J., Yadav, M. P. **Comparative sequence analysis of envelope protein genes of Indian buffalopox virus isolates.** Arch. Virol. v.151, n.10, p.1995-2005, 2006.

Smith, G. L., G. McFadden. **Smallpox: anything to declare?** Nat. Rev. Immunol. v.2, p.521-527, 2002.

Smith, H. O., Hutchison III, C. A., Pfannkoch, C, Venter, J. C. **Generating a synthetic genome by whole genome assembly: Φ X174 bacteriophage from synthetic oligonucleotides.** Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. v.100, n.26, p.15440-15445, 2003.

Stewart, T. L., Wasilenko, S. T., Barry, M. ***Vaccinia virus* F1L is a tail-anchored protein that functions at the mitochondria to inhibit Apoptosis.** J. Virol. v.79, p.1084-1098, 2005.

Sullivan, J. T., Mercer, A. A., Fleming, S. B. e Robinson, A. J. **Identification and characterization of na Orf virus homologue of the Vaccinia virus gene encoding the major envelope antigen p37K.** Virology. v.202, p.968-973, 1994.

Tadese, T., Fitzgerald, S., Reed, W. M. **Detection and differentiation of re-emerging fowlpox virus (FWPV) strains carrying integrated reticuloendotheliosis virus (FWPV-REV) by real-time PCR.** Vet. Microbiol. v.127, p.39.49, 2008.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S. **MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0.** Mol. Biol.and Evo. v.24, p.1596–1599, 2007.

Taylor, J. M., Barry, M. **Near death experiences: Poxvirus regulation of apoptotic death.** Virology. v.344, p.139-150, 2006.

Totmenin, A. V., Kolosova, I. V., Shchelkunov, S. N. ***Orthopoxvirus* Genes for Kelch-like proteins: Analysis of species-specific structural features.** Mol. Biol. v.36, n.4, p.476-481, 2002.

Trindade,G. S., Fonseca, F. G., Marques, J. T., Nogueira, M. L., Mendes, L. C. N., Borges, A. S., Peiró, J. R., Pituco, E. M., Bonjardim, C. A., Ferreira, P. C. P., Kroon,

E. G. **Araçatuba virus: a vaccinia-like virus associated with infection in humans and cattle.** Emerging Infect. Dis. v9, p.155-160, 2003.

Turner, P. C., Moyer, R. W. **Control of Apoptosis by Poxviruses.** Semin. Virol. v.8, p.453-469, 1998.

Vorou, R. M., Papavassiliou, V. G., Pierroutsakos, I. N. **Cowpox virus infection: an emerging health threat.** Curr. Opin. Infect. Dis. v. 21, p.153-156, 2008.

Warren, J. E. **Smallpox.** Prim. Care Update Ob. Gyns.v.9, n.4, p.122-124, 2002.

Whitley, R. J. **Smallpox: a potential agent of bioterrorism.** Antiviral Res. v. 57, p.7-12, 2003.

Whittaker, J. C., Harbord, R. M., Boxall, N., Mackay, I., Dawson, G., Sibly, R. M. **Likelihood-based estimation of microsatellite mutation rates.** Genetics. v.164, p.781-787, 2003.

Xing, K., Deng, R., Wang J., Feng J., Huang, M., Wang, X. **Genome-Based phylogeny of Poxvirus.** Intervirology. v.49, p. 207-214, 2006.

Young, S. K., Ponnighaus, J. M., Jain, S., Lucas, S., Suneetha, S., Lockwood, D. N. J., Young, D. B., Fine, P. E. M. **Use of Short Tandem Repeat Sequences to Study Mycobacterium leprae in Leprosy Patients in Malawi and India.** PLoS Negl. Trop. Dis. v.2, n.4, 2008.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)