

VARIOLA SUÍNA: ESTUDO SOBRE A OCORRÊNCIA DE SURTOS NOS ESTADOS DE SÃO PAULO E TOCANTINS, BRASIL

**J.G. Bersano, M.H.B. Catroxo, E.M.C. Villalobos, M.C.M. Leme, A.M.C.R.P.F. Martins,
Z.M.P. Peixoto, M.A.S.C. Portugal, R.M. Monteiro, R.A. Ogata, N.A. Curi**

Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal, Instituto Biológico, Av. Cons. Rodrigues Alves, 1252, CEP 04014-002, São Paulo, SP, Brasil.

RESUMO

O presente estudo objetivou registrar a presença de surtos de varíola suína, nos Estados de São Paulo e Tocantins, Brasil, ocorridos durante o período de 1976 a 2001. Todos os animais atingidos pela doença apresentavam lesões, na maioria das vezes localizadas nas regiões abdominal e inguinal e na cabeça (orelhas e focinho), que se iniciavam por áreas eritematosas que evoluíam para pápulas e pústulas que se transformavam em crostas. A doença foi reproduzida experimentalmente, apresentando os suínos inoculados um quadro clínico semelhante ao dos surtos. A microscopia eletrônica de transmissão detectou partículas de ortopoxvírus em todas as amostras examinadas. Não houve crescimento do vírus na membrana corioalantóide de ovos embrionados e nem nos cultivos de células de rim de bovino, enquanto que se observou acentuada infecção do cultivo primário de células de rim de suíno recém-nascido, causando nítido efeito citopático. Este fato aliado às lesões histopatológicas características observadas e a presença constante de partículas do poxvírus, permitiu concluir tratar-se de varíola suína.

PALAVRAS-CHAVE: Varíola, suínos, poxvírus, ultraestrutura.

ABSTRACT

SWINE VARIOLA: STUDY ON THE OCCURRENCE OF THE OUTBREAKS IN SÃO PAULO AND TOCANTINS STATES, BRAZIL. The present study was aimed at the evaluation of the outbreaks of swine smallpox, in the states of São Paulo and Tocantins, Brazil, that occurred during the period 1976 to 2001. All the animals affected by the disease presented lesions, in most cases, localized in the abdominal and inguinal regions and in the head (ears and muzzle), which first appeared as erythematous areas, evolving into papules and pustules, which transformed into crusts. The disease was experimentally reproduced, the inoculated swines presenting clinical aspects similar to the ones of the outbreaks. Transmission electron microscopy detected particles of orthopoxvirus in all the examined samples. There was no virus growth in the chorion allantoic membrane of embryoned eggs nor in the cells of bovine kidney, while accentuated infection was observed in the primary cultivation of kidney cells from newborn pig, resulting in a clear cytopathic effect. This fact, in conjunction with the characteristic histopathologic lesions and the constant presence of particles of poxvirus, leads to the conclusion that this is a case of swine smallpox virus.

KEY WORDS: Swine pox, poxvirus, ultrastructure.

INTRODUÇÃO

A varíola é uma enfermidade comum ao homem e aos animais, sendo praticamente de distribuição universal. No caso humano, a doença foi considerada extinta pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em 1977, após campanha mundial de vacinação. Em 1980, depois de 3 anos sem ocorrência de novos casos da enfermidade e a recomendação que paratodos os países deixassem de vacinar, a OMS declarou a erradicação mundial (BOLETÍN EPIDEMIOLÓGICO, 2002).

O agente causador da doença é um poxvírus que pertence à família *Poxviridae* e à subfamília *Chordopoxvirinae*, nas quais estão incluídos oito gêneros: ortopox, parapox, capripox, leporipox, suipox, avipox, moluscipox e yatopox. Entre os ortopoxvírus incluem-se o cawpox, monkeypox, o vírus da varíola humana e o da vaccínia (Moss, 1996), sendo que estes vírus causam alterações citoesqueléticas, como destruição dos filamentos intermediários de vimentina e alterações organizacionais nos microtúbulos.

Alguns vírus pertencentes a estes gêneros podem infectar várias espécies animais (MOSS, 1996), podendo ocasionalmente causar lesões cutâneas em humanos, constituindo-se em importantes zoonoses (DIVEN, 2001).

Embora a varíola suína não seja considerada uma zoonose, cabe ressaltar que existe uma grande similaridade entre a proteína P42 do envelope do SWPV com a P37 do vírus da vaccínia implicada no processo de transmissão da doença (BARCENA *et al.*, 2000).

A doença nos suínos pode ser provocada por dois vírus distintos: o vírus vaccínia que pode afetar outras espécies animais, como bovinos e animais de laboratório e o vírus da varíola suína ou suipoxvírus.

O suipox (SWPV), membro exclusivo do gênero suipoxvírus, é o responsável pela varíola dos suínos, doença que ocorre mundialmente e está associada com condições sanitárias precárias (HOUSE & HOUSE, 1994).

A doença foi descrita pela primeira vez na literatura em 1842, na Europa, e o isolamento do vírus em cultura de célula foi relatado por KASZA *et al.* (1960) (MOHANTY & DUTTA, 1981).

Edward Jenner, entretanto, que acreditava haver relação entre as variolas humana, bovina e suína (BARON, 1838), em sua primeira tentativa de descobrimento da vacina da varíola humana, em 1791, inoculou seu filho com o vírus da varíola dos suínos, o qual desenvolveu a doença, recuperou-se e não mais contraiu a doença (HARRIS, 1998).

A varíola suína pode afetar suínos de todas as idades, porém, é mais grave em animais jovens (0 a 4 meses de idade) onde a morbidade pode chegar à 100% (HOUSE & HOUSE, 1994; MUNZ & DUMBELL, 1994; BARLOW & GRIST, 2000).

Após um período de incubação de 3 a 7 dias, a doença apresenta manifestações clínicas de febre ligeira, abatimento, perda de apetite, prostração e ericamento nos pelos (BEER, 1999). Na pele, principalmente nas regiões abdominal e inguinal podendo espalhar-se pela cabeça (orelhas e focinho), aparecem inicialmente áreas puntiformes avermelhadas que se transformam em pápulas, convertendo-se em pústulas amareladas que secam e originam crostas crateriformes que se desprendem deixando uma zona cicatricial (FENNER *et al.*, 1992; BEER, 1999; BARLOW & GRIST, 2000; RADOSTITIS *et al.*, 2002).

Freqüentemente, a transmissão faz-se por contato direto e o mecanismo parece ocorrer através da picada do piolho do porco *Hematopinus suis* (Linnaeus, 1758) (Phthiraptera, Haematopinidae) que ocorre na maioria das granjas. Moscas e outros insetos voadores também podem atuar como disseminadores (FENNER *et al.*, 1992; JUBB *et al.*, 1992; HOUSE & HOUSE, 1994; BEER, 1999; BARLOW & GRIST, 2000).

A varíola suína congênita caracteriza-se por lesões já presentes nos leitões ao nascimento (BORST *et al.*, 1990; PATON *et al.*, 1990). Os leitões acometidos nascem de porcas

sadias, podendo ser natimortos ou morrerem dentro de alguns dias após o nascimento (BARLOW, 1999; BARLOW & GRIST, 2000; RADOSTITIS *et al.*, 2002).

Suínos portadores podem transmitir o vírus para novos animais introduzidos no rebanho (RADOSTITIS, *et al.*, 2002). A taxa de mortalidade é de 3%; nos recém-nascidos pode variar entre 14 a 50% e, devido a longa duração da doença, os animais têm seu desenvolvimento retardado, gerando consideráveis perdas econômicas nas granjas produtoras de leitões (BEER, 1999; BARLOW & GRIST, 2000). Abscessos cutâneos, devidos a estreptococos, foram descritos por MILLER & OLSON (1980), como uma forma de seqüela do suipoxvírus.

O efeito tóxico causado pelo vírus às células é evidenciado ao exame histopatológico pela presença de erosões superficiais focais, hiperplasia epidérmica acentuada com acantose, degeneração baloniforme das células epidérmicas, além da presença de corpos de inclusões intracelulares eosinofílicos e vacúolos intranucleares ou intracitoplasmáticos (KIM & LUONG, 1975; BOER, 1975; TEPEMA & BOER, 1975; MORIGUCHI, 1977; OLUFEMI *et al.*, 1981; BORST *et al.*, 1990; PATON *et al.*, 1990; JUBB *et al.*, 1992; DIVEN, 2001; RADOSTITIS *et al.*, 2002). Estas características também são descritas ultraestruturalmente por outros autores (KIM & LUONG, 1975; TEPEMA & BOER, 1975; BÜLLER & PALUMBO, 1991; BARLOW & GRIST, 2000).

Devido ao seu grande tamanho e estrutura própria, os poxvírus podem facilmente ser caracterizados por microscopia eletrônica, método de eleição para realizar o diagnóstico laboratorial (FENNER *et al.*, 1992; 1996; BEER, 1999; DIVEN, 2001), tanto em líquido vesicular, quanto em pústulas ou crostas (BOLETÍN EPIDEMIOLOGICO, 2002). As partículas de poxvírus de suíno já foram visualizadas em sobrenadante de cultivos celulares (PATON *et al.*, 1990; JUBB *et al.*, 1992), em amostra de soro (OLUFEMI *et al.*, 1981) e em macerado de pele (BORST *et al.*, 1990; JUBB *et al.*, 1992; BARLOW & GRIST, 2000).

Os poxvírus são vírus DNA de fita dupla de 190 kb, sendo considerados os maiores vírus causadores de problemas em animais, medindo cerca de 300 x 240 x 100 nm. As partículas virais de todos os gêneros dos Chordopoxvírus são similares, exceto os que pertencem ao gênero parapox. Não possuem nucleocápside, portanto, não apresentam nenhum tipo de simetria comum à maioria dos vírus, o que eles a confere a denominação de vírus complexos. A membrana externa envolve uma zona central com forma de "halteres" e dois corpos laterais, de natureza desconhecida. A disposição irregular dos túbulos sobre a bicamada lipoproteica externa confere a ele uma aparência característica texturizada. Sua replicação é citoplasmática e as partículas liberadas por ruptura da célula apresentam um envelope (DOANE & ANDERSON, 1987; FENNER *et al.*, 1992; FENNER, 1996, 2000; DIVEN, 2001).

O genoma do SWPV, de 146 kbp, consta de uma região central codificadora que contém 150 genes; 146 genes conservados codificam proteínas envolvidas em funções replicativas, virulência viral hospedeiro-específico e evasão imune (AFONSO *et al.*, 2002). A proteína P42 do envelope do SWPV tem 54% de identidade com a P37, proteína abundante no envelope do vírus vaccínia, implicada no processo que leva à aquisição do envelope, saída do vírus e transmissão (BÁRCENA *et al.*, 2000).

O presente relato visa registrar quatro diferentes surtos de varíola suína ocorridos nos Estados de São Paulo e Tocantins, no período compreendido entre 1976 e 2001.

MATERIAL E MÉTODOS

Descrição dos Surtos

O primeiro surto foi observado em 1976, na região de Campinas, SP, atingindo um total de 17 animais de uma propriedade onde eram criados alguns animais exclusivamente para uso próprio. As lesões localizavam-se preponderantemente na cabeça, preferencialmente nos bordos das orelhas e focinho constendo pápulas que seqüencialmente transformavam-se em pústulas recobertas de crostas escuras (Figs. 1 e 2). Não se registrou óbitos e o processo regrediu com a adoção de medicação tópica e medidas gerais de higiene. Os animais recuperaram-se após um período de 40 dias.

O segundo surto ocorreu em 1980, em uma propriedade igualmente na região de Campinas, e o terceiro em 1985, na região do Vale do Paraíba, SP. Nestes dois surtos, as lesões localizavam-se particularmente na região abdominal e na cabeça, comprometendo focinho e orelhas, iniciando-se por áreas eritematosas que evoluíam para pápulas arredondadas, originando posteriormente pústulas amareladas que se transformavam em pústulas com crostas de coloração escura (Figs. 3 e 4).

Os animais afetados não revelaram alterações significativas em seu estado geral, recuperando-se em média um mês após o início dos sintomas. A morbidade alcançou 100% na primeira granja e 17% na outra. Nesta última restringiu-se aos leitões com até 60 dias de vida mas também não se registraram óbitos. Aparentemente não houve qualquer relação entre estes dois surtos, pelo fato de ter decorrido um período de 5 anos e ainda pela distância que separa os dois municípios envolvidos (FARINHA *et al.*, 1985).

As lesões, em ambos os surtos, localizavam-se particularmente nas regiões abdominal e inguinal e na cabeça (orelhas e focinhos), iniciando-se por áreas eritematosas que evoluíam para pápulas arredonda-

das originando pústulas amareladas que, secando, formavam crostas de coloração escura (Figs. 3 e 4).

O quarto surto ocorreu durante o ano de 2001, em cinco propriedades próximas entre si, localizadas no Estado de Tocantins. Em uma das propriedades os animais permaneciam soltos e percorriam as propriedades vizinhas, convivendo dessa forma com outros suínos, o que propiciou a disseminação da doença entre eles, visto não haver separação adequada entre as propriedades.

Em algumas destas propriedades os animais não apresentavam sintomas clínicos gerais; em outras os sinais mais comuns eram febre, prostração, perda de apetite e emagrecimento. Todos os animais apresentavam lesões disseminadas pelo corpo, atingindo principalmente as regiões da cabeça (orelhas) e abdômen (Figs. 5 e 6). A evolução da doença foi similar a dos outros surtos, aqui citados.

A presença do piolho dos suínos (*H. suis*) foi uma constante em todas as propriedades envolvidas no presente trabalho.

A taxa de morbidade entre as propriedades variou de 4,4 a 100%, sendo que os animais jovens (0 a 4 meses) foram os mais atingidos. Duas fêmeas reprodutoras também foram afetadas e houve óbito de um animal com menos de 2 meses de idade.

Materiais provenientes dos suínos doentes (crostas e pele) foram mantidos sob refrigeração em caixas isotérmicas bem como em solução de formol a 20% destinados a exame histopatológico e enviados ao Instituto Biológico, em São Paulo, para pesquisa do agente viral e caracterização das lesões.

Inoculação Experimental

As amostras obtidas das lesões (crostas) dos animais que adoeceram foram trituradas e centrifugadas, prepararam-se suspensões a 20% peso/volume em solução salina de Hanks, adicionada de 1 mL de mistura de glutamina, estreptomicina, gentamicina e fungizon (concentrada 100 vezes). Após centrifugação a 1.500 xg, a 4 ° C durante 15 minutos, recolheram-se os sobrenadantes que foram inoculados por via subcutânea e por escarificação da pele, nas regiões ventral e abdominal, na dose de 3 mL em 2 leitões com 40 dias de idade.

Isolamento e identificação do agente viral

Foram inoculados também 0,2 mL na membrana cório-alantóide de 10 ovos embrionados de 12 dias. Inoculou-se ainda, quatro frascos de plástico para cultivo celular para 25 cm³, contendo monocamada de células de cultivo primário de rim de bovino e de suíno, visando o diagnóstico diferencial do vírus implicado no processo.



Fig. 1 - Fase eritematosa e surgimento de pápulas na região ventral.



Fig. 2 - Crostas localizadas no bordo interno do pavilhão auricular.



Fig. 3 - Fase eritematosa comprometendo todo o abdômen.



Fig. 4 - Lesões crostosas atingindo a cabeça e abdômen.



Fig. 5 - Animal exibindo lesões crostosas na fase externa no pavilhão auricular.



Fig. 6 - Lesões crostosas em grande número na face interna da orelha e abdômen.

Exames de microscopia eletrônica de transmissão

Foram realizados com as amostras originárias dos animais doentes em todas as ocorrências, pelas técnicas de:

Coloração negativa

Fragmentos de pele e crostas foram suspensos em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0; gotas deste material assim obtido foram colocadas sobre telas de cobre previamente preparadas com filme de colódio e carbono que, a seguir, foram contrastadas negativamente com molibdato de amônio a 2% e pH 5,0 (BRENNER & HORNE, 1959) observadas e fotografadas nos microscópios eletrônicos Philips EM 208 e EM 300, sob tensão de 80 kV.

Inclusão em resina

Coloração positiva: fragmentos de pele e crostas foram fixados em glutaraldeído a 2% em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0, pós fixados em tetróxido de ósmio a 1% no mesmo tampão, desidratados em série cetônica e incluídos em resina Spurr (GONZÁLES-SANTANDER, 1969). As seções ultrafinas foram contrastadas com acetato de uranila a 2% (WATSON, 1958) e citrato de chumbo a 0,5% (REINOLDS, 1963). Os materiais foram examinados e fotografados nos microscópios eletrônicos de transmissão Philips EM 208 e EM 300, sob tensão de 80 kV.

Imunomicroscopia eletrônica

Utilizou-se a técnica de imunomicroscopia eletrônica (IME), sendo as telas de cobre inicialmente incubadas a 37° C com proteína A (10 mg/mL). A seguir, foram elas sensibilizadas com antisoro específico diluído na proporção de 1:10 e lavadas com tampão PBS. Foram então incubadas com o antígeno e novamente lavadas com o tampão. Seqüencialmente, foram contrastadas com molibdato de amônio a 2%, pH 5,0, consoante os trabalhos de ALMEIDA & WATERSON (1969), ALMEIDA (1980), BERTHIAUME *et al.* (1981), KATZ & KOHN (1984), DOANE & ANDERSON (1987) e CARRASCOSA (1988).

Imunocitoquímica

As telas de cobre foram incubadas a 37° C com gotas de antígeno e a seguir foram sensibilizadas com anti-soro específico diluído a 1:80. Após a lavagem com tampão PBS, elas foram incubadas com partículas de ouro coloidal de 6 nm de diâmetro e diluídas a 1:20. A seguir, realizou-se a contrastação com o molibdato de amônio a 2%, pH 5,0, conforme os trabalhos de ROTH *et al.* (1978), BENDAYAN (1984), HOPLEY & DOANE (1985) e HYATT & EATON (1993).

Histopatologia

Os fragmentos de pele obtidos dos animais infectados no último surto foram fixados em

formalina a 10% e a seguir incluídos em parafina, obtendo-se deles, pelas técnicas habituais de histopatologia, cortes com 5 µm de espessura e a seguir corados pelo método de hematoxilina-eosina.

RESULTADOS

Inoculação Experimental

A reprodução experimental da doença permitiu observar, nos suínos inoculados, um quadro clínico-patológico a partir do 16° dia após a inoculação, semelhante ao descrito nos surtos a campo (Figs. 7 e 8).

Inoculação em ovos embrionados

Não houve crescimento do vírus na membrana corioalantóide de embriões de 12 dias.

Cultivos primários de células renais de bovino e de suíno

Não ocorreu crescimento do vírus em células de rim de bovino, entretanto, o foi observado crescimento e efeito citopático em cultivo de células de rim de suíno.

Microscopia eletrônica de transmissão

Coloração negativa

Partículas com morfologia semelhante a poxvírus, do gênero ortopox, algumas envelopadas (Fig. 9), foram visualizadas em grande número (Fig. 10), em todas as amostras de crostas e de fragmentos de pele, contrastadas negativamente com molibdato de amônio a 2%, pH 5,0. As partículas apresentavam formato de "ladrilho" e disposição irregular dos túbulos sobre a membrana externa (Fig. 11), característica peculiar do gênero ortopox, medindo aproximadamente 300 x 200 nm.

Coloração positiva

Nos cortes ultrafinos de fragmentos de pele e de crostas, corados positivamente, foram observadas partículas ovaladas, medindo cerca de 270 x 130 nm, revelando um núcleo bicôncavo ou core interno com formato de alteres.

Partículas imaturas, circundadas por membrana, destituídas de núcleo (partículas vazias) foram também observadas (Fig. 12). As alterações citopatológicas mais comumente observadas foram: presença de núcleos ovalados mostrando marginalização da cromatina e membrana com aspecto denteado, observando-se brotamento de partículas virais (Figs. 13, 14). Corpos de inclusões intranucleares

eletrondensos, do tipo "homogênea" e conteúdo amorfo (Fig. 15) e do tipo "cristalina" contendo unidades estruturais em forma de arranjos cristalinos também foram identificados (Fig. 16).

Observou-se ainda inclusões intracitoplasmáticas fibrilares localizadas entre os vírions, constituídas de grupos de fibrilas que mostraram estriações cruzadas e dispostas em grupos que variavam de 2 a 7 fibrilas. O diâmetro dessas fibrilas média entre 10-25 nm (Fig. 12). Vacúolos intracitoplasmáticos circundados por membrana também foram visualizados (Fig. 15). As mitocôndrias estavam alteradas e mostravam ausência de cristas mitocôndriais.

Na técnica de imunomicroscopia eletrônica, as partículas do poxvírus foram aglutinadas pelo anticorpo, formando um imuno-complexo, indicando reação fortemente positiva (Fig. 17).

Na técnica de imunocitoquímica, a reação antígeno-anticorpo revelou-se nitidamente

marcada por inúmeras inclusões de ouro coloidal, realçando fortemente as partículas virais (Fig. 18).

Histopatologia

Microscopia óptica

Os cortes de pele apresentavam vesículas e uma acentuada infiltração dermal de células mononucleares e polimorfonucleares, predominante perivasculares (Fig. 20). Notou-se também áreas de proliferação dos queratinócitos e ainda outras áreas em degeneração formando vesículas onde se observou células em lise e células baloniformes com corpúsculos de inclusão eosinófilos (Fig. 19). Alguns corpúsculos encontravam-se entre os restos celulares. Apresentou, além disso, áreas maiores com intenso infiltrado inflamatório, com a presença de pústulas rompidas na superfície da epiderme e áreas em início de reparo (Fig. 21).



Fig. 7 - Escarificação da pele para inoculação do vírus.



Fig. 8 - Lesões crostosas resultantes de inoculação experimental.

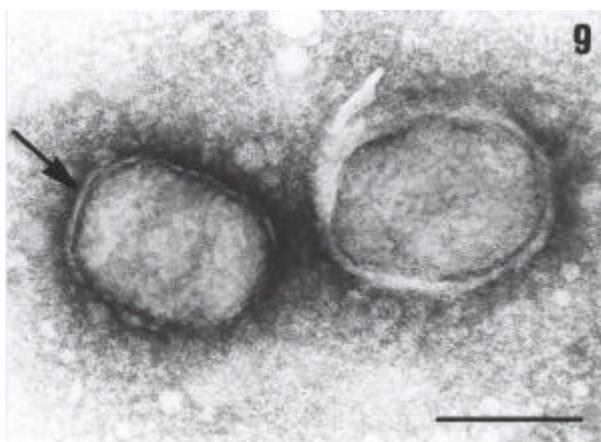


Fig. 9 - Micrografia eletrônica de partículas de poxvírus, do gênero ortopox, contrastadas negativamente pelo molibdato de amônio, mostrando formato característico de ladrilho e envelope externo (seta). Barra corresponde a 190 nm.

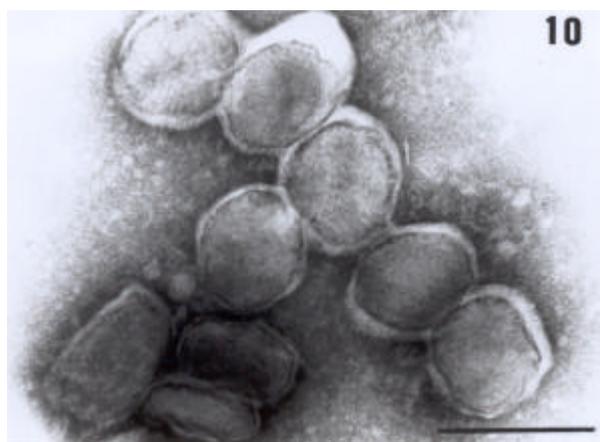


Fig. 10 - Micrografia eletrônica observando-se agrupamento de partículas de ortopoxvírus, em suspensão de crostas. Barra corresponde a 300 nm.

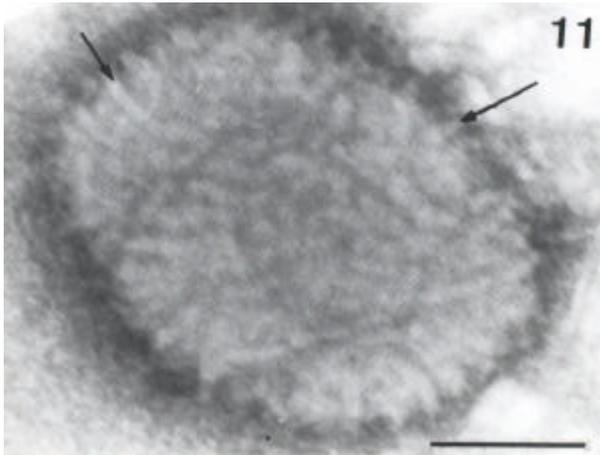


Fig. 11 - Micrografia eletrônica de partícula de ortopoxvírus, mostrando disposição irregular dos túbulos sobre a membrana externa (seta). Barra corresponde a 80 nm.

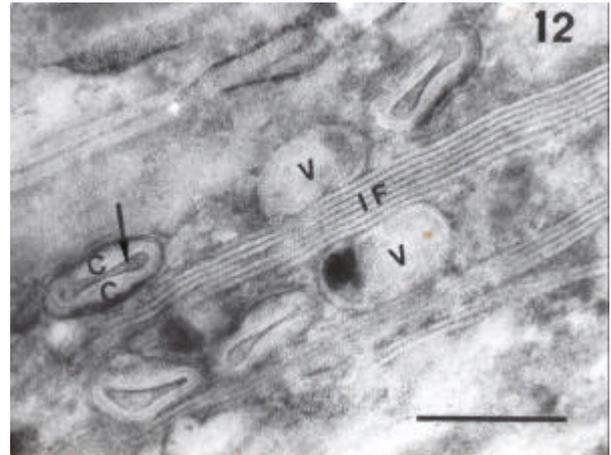


Fig. 12 - Micrografia eletrônica de secção ultrafina de pele de suíno onde observa-se: a) partículas ovaladas, contendo um núcleo bicôncavo ou core interno com formato de caracteres (seta); b) partículas imaturas ou vazias (V); c) inclusões citoplasmáticas fibrilares (IF), que podem estar associadas com o estágio inicial de formação do vírion. Barra corresponde a 280 nm.

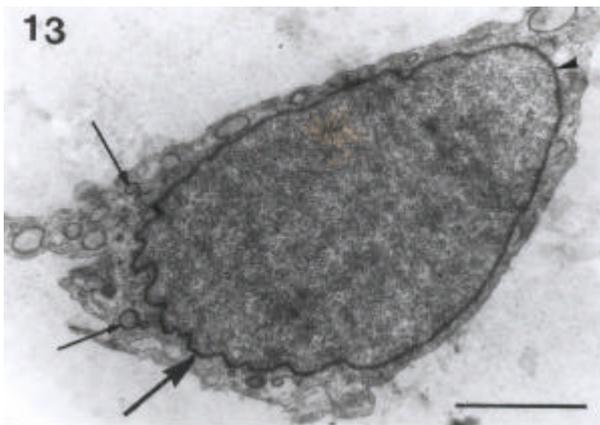


Fig. 13 - Núcleo alongado mostrando aspecto "denteado" da membrana (seta maior) e cromatina marginalizada (cabeça de seta). Notar partículas virais em diversas fases de formação (seta menor). Barra corresponde a 1700 nm.

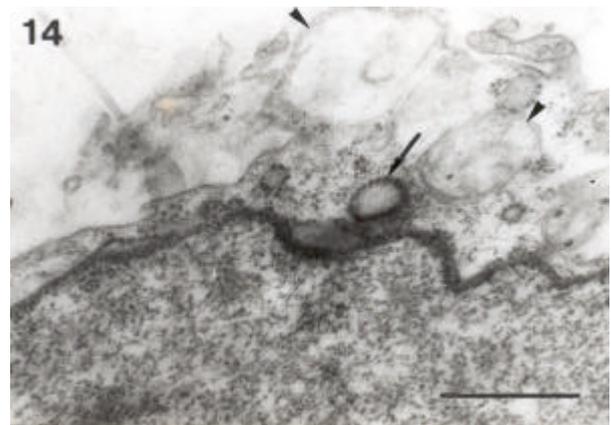


Fig. 14 - Aspecto "denteado" da membrana nuclear onde observa-se partícula viral em formação mostrando espículas na superfície externa (seta). Notar organelas celulares alteradas (cabeça de seta). Barra corresponde a 530 nm.

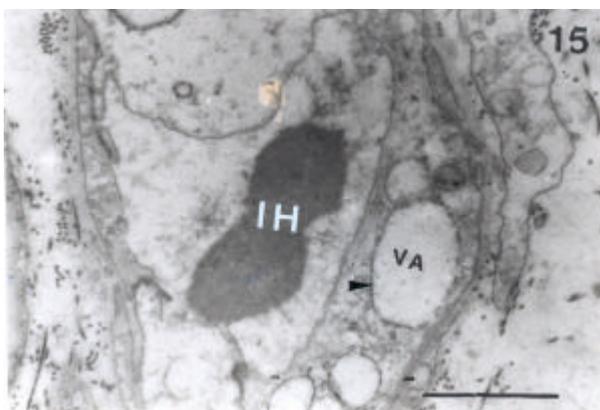


Fig. 15 - Inclusão intranuclear do tipo "homogênea" (IH). Observar vacúolos (VA) circundados por membrana (cabeça de seta). Barra corresponde a 1500 nm.

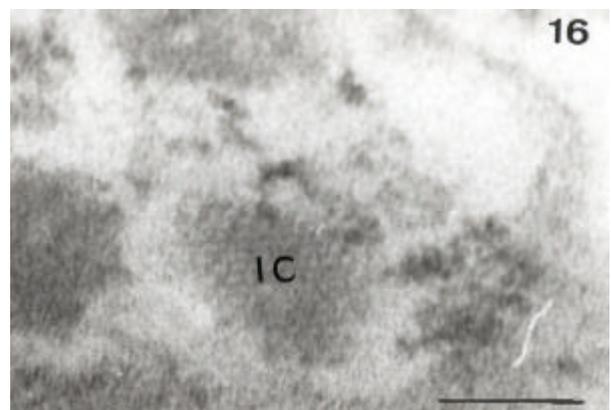


Fig. 16 - Inclusão intranuclear do tipo "cristalina". Barra corresponde a 280 nm.

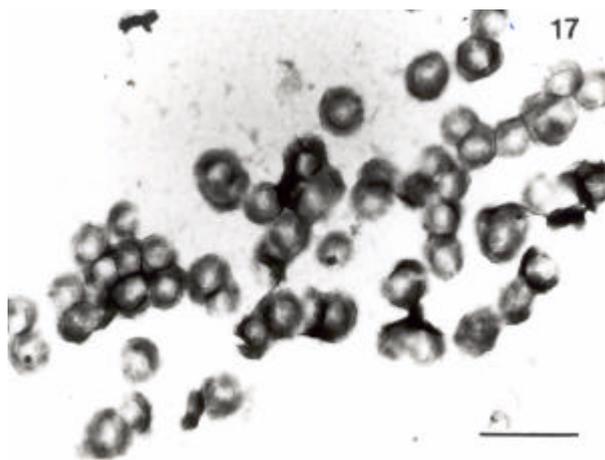


Fig. 17 - Resultado da reação de imunomicroscopia com aglutinação das partículas virais. Barra corresponde a 800 nm.

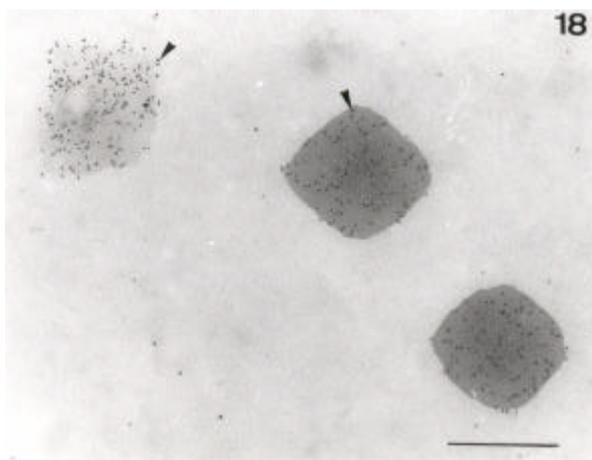


Fig. 18 - Partículas do poxvírus realçadas pelas inclusões de ouro coloidal. Barra corresponde a 250 nm.

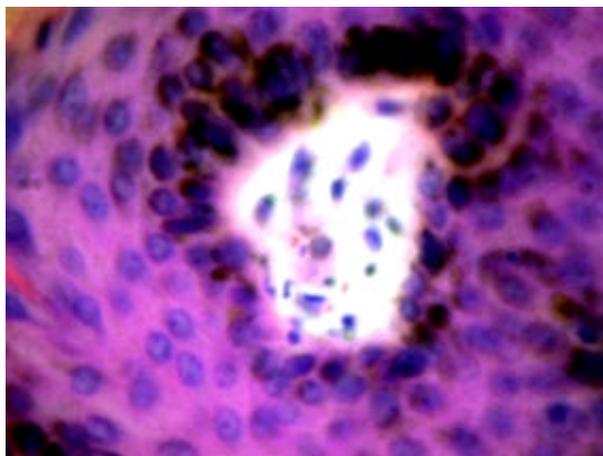


Fig. 19 - Corte histológico de pele onde se observa célula baloniforme com corpúsculos citoplasmáticos e entre debris celulares Aumento 60X

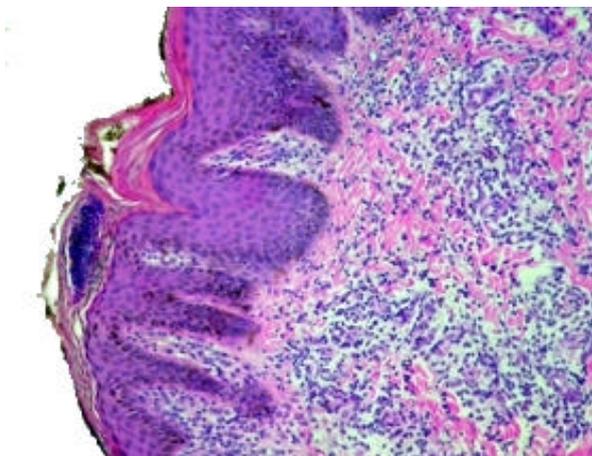


Fig. 20 - Corte histológico de pele, em que se vê a formação de uma pústula à superfície da epiderme, sua proliferação e infiltração de mononucleares. Aumento 20X

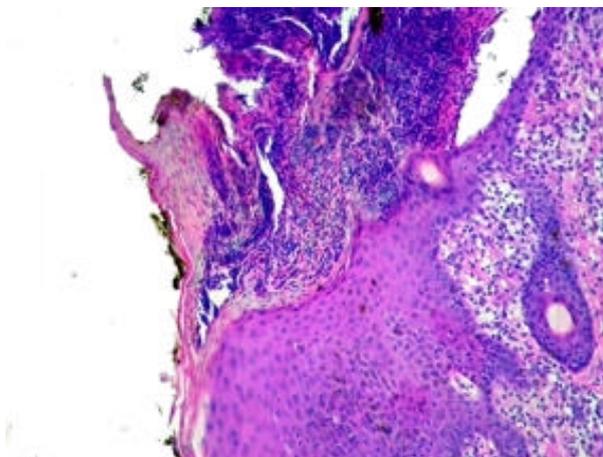


Fig. 21 - Corte de pele mostrando pústula rompida na superfície da epiderme com intensa proliferação de mononucleares. Aumento 200X

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

De acordo com a literatura, as lesões causadas pelo suipoxvírus são observadas nas regiões abdominal e inguinal (JUBB *et al.*, 1992; BEER, 1999; BARLOW & GRIST, 2000; RODOSTITIS *et al.*, 2002), onde o piolho de porco é encontrado mais freqüentemente (KASZA & GRIESEMER, 1962). Em leitões de 6 a 12 meses de idade, entretanto, as lesões podem ser observadas principalmente nas orelhas (BOER, 1975); nos recém-nascidos ocorrem nos lábios e língua (OLUFEMI *et al.*, 1981), podendo espalhar-se pelo corpo inteiro, conforme descrito por BORST *et al.* (1990) e PATON *et al.* (1990) durante surtos fulminantes e fatais de varíola congênita, ocorridos na Holanda e Inglaterra, respectivamente.

OLUFEMI *et al.* (1981) afirmaram que, apesar dos suínos recém-nascidos receberem imunidade mater-

na de mães imunes, a alta prevalência de mortalidade neonatal pode estar relacionada com a gravidade da infecção e com a inabilidade dos neonatos em mamar.

Em algumas das propriedades foi constatada a presença do *H. suis* (piolho do porco), entretanto, insetos voadores também podem atuar como disseminadores. Além disso, alguns animais permaneciam soltos e percorriam as fazendas vizinhas, mantendo contato com animais de outras criações, as quais poderiam ou não ser portadoras e originando surtos.

As lesões iniciavam-se por pápulas e pústulas que secavam e formavam crostas (KIM & LUONG, 1975; OLUFEMI *et al.*, 1981; JUBB *et al.*, 1992; BARLOW, 1999; BARLOW & GRIST, 2000). Em alguns casos, porém, a formação de vesículas não é observada (BOER, 1975; BORST *et al.*, 1990).

Os sinais clínicos observados em alguns animais, entre os quais: febre, abatimento, perda do apetite e prostração, também foram relatados por outros autores (OLUFEMI *et al.*, 1981; FENNER *et al.*, 1992; RODOSTITIS *et al.*, 2002). A degeneração balonosa das células epidérmicas e a presença de corpos de inclusões e vacúolos intracitoplasmáticos e intranucleares, são alterações características da infecção por poxvírus, também observadas por outros pesquisadores (KIM & LUONG, 1975; BOER, 1975; TEPPEMA & BOER, 1975; OLUFEMI *et al.*, 1981; BORST *et al.*, 1990; PATON *et al.*, 1990; JUBB *et al.*, 1992; BARLOW & GRIST, 2000).

A microscopia eletrônica de transmissão detectou em todas as amostras examinadas um grande número de partículas de poxvírus, do gênero ortopox, tanto por meio da técnica de contrastação negativa, medindo cerca de 300 x 200 nm, quanto na de contrastação positiva, em cortes ultrafinos, medindo, em média, 270 x 130 nm. As características morfológicas observadas nessas partículas correspondem às descritas por outros autores em seus estudos sobre a variola suína (TEPPEMA & BOER, 1975; OLUFEMI *et al.*, 1981; BORST *et al.*, 1990; PATON *et al.*, 1990; JUBB *et al.*, 1992; BARLOW & GRIST, 2000).

De acordo com TEPPEMA & BOER (1975), a formação de vacúolos intranucleares nos queratinócitos somente é observada na infecção por suipoxvírus, e que tal fato sugere fortemente a presença do vírus. Estes autores também fazem menção quanto à presença de inclusões intracitoplasmáticas fibrilares localizadas entre os vírions, dispostas em grupos de número variável, medindo entre 10 a 25 nm de diâmetro.

De acordo com MOSS (1996), o estágio inicial de formação do vírion ocorre em áreas granulares e eletrondensas do citoplasma, separadas da membrana celular.

A reprodução experimental da doença foi possível pela inoculação de leitões com 40 dias de idade, que apresentaram, a partir do décimo sexto dia de

inoculação, quadro clínico-patológico semelhante ao descrito nos surtos anteriores. Estes achados foram compatíveis com os estudos de BOER (1975) e de PATON *et al.* (1990).

A ausência de efeito citopático em cultivos de células de rim de bovino e de não haver crescimento do vírus na membrana corioalantóide de ovos embrionados, mas com infecção do cultivo primário de células de rim de leitão recém-nascido, são situações também relatadas por KASZA *et al.* (1960) e PATON *et al.* (1990) ao discorrerem sobre aplicações das técnicas de cultivos celulares para o estudo da variola suína.

Os resultados obtidos nas técnicas de imunomicroscopia eletrônica e imunocitoquímica, permitem reforçar a conclusão de que os surtos registrados no presente trabalho foram de variola suína.

De acordo com a literatura consultada, a variola suína ocorre esporadicamente no mundo, fato também observado em nosso meio, sendo que estas são as primeiras ocorrências relatadas no Brasil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFONSO, C.L.; TULMAN, E.R.; LU, Z.; ZSAK, L.; OSÓRIO, F.A.; BALINSKY, C.; KUTISH, G.F.; ROCK, D.L. The genome of swinepox virus. *J. Virol.*, v.76, n.2, p.783-790, 2002.
- ALMEIDA, J.D. & WATERSON, A.P. The morphology on virus-antibody interaction. *Adv. Virus Res.*, v.15, p.304-338, 1969.
- ALMEIDA, J.D. Practical aspects of diagnostic electron microscopy. *Yale J. Biol. Med.*, v.53, p.5-18, 1980.
- BÁRCENA, J.; LORENZO, M.M.; SÁNCHEZ-PUIG, J.M.; BLASCO, R. Sequence and analysis of a swinepox virus homologue of the vaccinia virus major envelope protein P37 (F13L). *J. Gen. Virol.*, v.81, p.1073-1085, 2000.
- BARLOW, A.M. Overview from VLA pig group. *Pig J.*, v.44, p.139-143, 1999.
- BARLOW, A.M. & GRIST, C. An outbreak of congenital pig pox. *Pig J. Proceed. Sec.*, v.46, p.118-121, 2000.
- BARON, J. 1786-1822 - *The life of Edward Jenner*. FRS London: Henry Colburn, 1838.
- BEER, J. *Doenças infecciosas dos animais domésticos*. São Paulo: Roca, 1999. 394p.
- BENDAYAN, M. Enzyme-gold electron microscopic cytochemistry: A new affinity approach for the ultrastructural localization of macromolecules. *J. Electron. Microsc. Tech.*, v.1, p.349-372, 1984.
- BERTHIAUME, L.; ALAIN, R.; Mc LAUGHLIN, B.; PAYMENT, P.; TREPANIER, P. Rapid detection of human viruses in feces by a simple and routine immune electron microscopy technique. *J. Gen. Virol.*, v.55, p.223-227, 1981.
- BOER, G.F. Swinepox. Virus isolation, experimental infections and the differentiation from vaccinia virus infections. *Arch. Virol.*, v.49, p.141-150, 1975.
- BOLETÍN EPIDEMIOLOGICO Recomendaciones de actuación y respuesta ante la aparición de un caso o de un brote de viruela (I). Centro Nacional de Epidemiología, Minis-

- tério de Sanidade y Consumo, Instituto de Salud Carlos III, Espanha, v.10, n.13, p.129-136, 2002.
- BORST, G.H.A.; KIMMAN, T.G.; GIELKENS, A.L.J.; VAN DER KAMP, J.S. Four sporadic cases of congenital swinepox. *Vet. Rec.*, v.21, p.61-63., 1990.
- BRENNER, S. & HORNE, R.W. A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. *Biochem. Biophys. Acta*, v.34, p.103, 1959.
- BÜLLER, R.M.L. & PALUMBO, G.J. Poxvirus pathogenesis. *Microbiol. Rev.*, v.55, p.80-122, 1991.
- CARRASCOSA, J.L. Imunolectron microscopical studies on viruses. *Electron Microsc. Rev.*, v.1, p.1-16, 1988.
- DIVEN, D.G. An overview of poxviruses. *J. Am. Acad. Dermatol.*, v.44, p.1-14, 2001.
- DOANE, F.W. & ANDERSON, M. *Electron microscopy in diagnostic virology - A practical guide and atlas*. Cambridge: Cambridge University Press, 1987, 178p.
- FARINHA, F.B.N.; BERSANO, J.G.; PINHEIRO, S.R.; MOULIN, A.P.; CAPELLARO, C.E.M.P.D.M. Variola Suína: relato de dois surtos. In: CONGRESSO LATINO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 1. & CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 2., 1985, Rio de Janeiro, RJ. *Resumos*. Rio de Janeiro: 1985. p.132.
- FENNER, F. Poxviruses. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (Eds.). *Fields virology*. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996. v.2, p.2673-2702.
- FENNER, F. Adventures with poxviruses of vertebrates. *FEMS Microbiol. Rev.*, v.24, p.123-133, 2000.
- FENNER, F.; BACHMANN, P.A.; GIBBS, E.P.J.; MURPHY, F.A.; STUDDERT, M.J.; WHITE, D.O. *Virologia veterinária*. Zaragoza: Ed. Acribia, 1992. 691p.
- GONZÁLES-SANTANDER, R. *Técnicas de microscopia electrónica en biología*. Madrid: Aguilar, 1969. 666p.
- HARRIS, F. *Vaccination*. Washington: The World Wide School, Seattle, 1998. Chapter 1: Edward Jenner and vaccination.
- HYATT, A.D. & EATON, B.T. *Immuno-gold electron microscopy in virus diagnosis and research*. London: CRC Press, 1993. 448p.
- HOPLEY, J.F.A. & DOANE, F.W. Development of a sensitive protein A-Gold imunolectron microscopy method for detectin viral antigens in fluid specimens. *J. Virol. Meth.* v.12, p.135-147, 1985.
- HOUSE, J.A. & HOUSE, C.A. Swine pox. In: LEMAN, A.D.; STRAW, B.E.; MENGELING, W.L.; D'ALLAIRE, S.; TAYLOR, D.J. (Eds.). *Diseases of swine*. 7.ed. Ames: Iowa State University Press, 1994. p.358-361.
- JUBB, T.M.; ELLIS, T.M.; PEET, R.L.; PARKINSON, J. Swinepox in pigs in northern Western Australia. *Aust. Vet. J.*, v.69, p.99, 1992.
- KASZA, L.; BOHL, E.H.; JONES, D.O. Isolation and cultivation of swine poxvirus in primary cell of swine origin. *Am. J. Vet. Res.*, v.21, p.269-273, 1960
- KASZA, L. & GRIESEMER, R.A. Experimental swine pox. *Am. J. Vet. Res.*, v.23, p.443-450, 1962.
- KATZ, D. & KOHN, A. Immunosorvent electron microscopy for detection of viruses. *Adv. Virus. Res.* v.29, p. 169-194, 1984.
- KIM, J.C.S. & LUONG, L.C. Ultrastructure of swine pox. *Vet. Med. Small Clin.*, v.70, n.9, p.1043-1045, 1975.
- MILLER, R.B. & OLSON, L.D. Experimental induction of cutaneous streptococcal abscesses in swine as a sequela to swinepox. *Am. J. Vet. Res.*, v.41, n.3, p.341-347, 1980.
- MOHANTY, S.B.; DUTTA, S.K. *Veterinary Virology*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1981. 372p.
- MORIGUCHI, R. Cytoplasmic and nuclear inclusions in epidermal cells of pigs inoculated with vaccinia viruses. *Arch. Virol.*, v.54, p.353-365, 1977.
- MOSS, B. Poxviridade: the viruses and their replication. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (Eds.). *Fields virology*. v.2, Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996. v.2, p.2637-2671.
- MUNZ, E.; DUMBELL, K. Swinepox. In: COETZER, J.A.W.; THOMSON, G.R.; TUSTIN, R.C. (Eds.). *Infectious diseases of livestock*. New York: Oxford University Press, 1994. v.1.p. 627-629.
- OLUFEMI, B.E.; AYOADE, G.O.; IKEDE, B.O.; AKPAVIE, S.O.; NWUFOH, K.J. Swine pox in Nigeria. *Vet. Rec.*, v.109, p.278-180, 1981.
- PATON, D.J.; BROWN, I.H.; FITTON, J.; WRATHALL, A.E. Congenital pig pox: a case report. *Vet. Rec.*, v.25, p.204, 1990.
- RADOSTITIS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C.; HINCHCLIFF, K.W. *Clínica Veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos*. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p.1127
- REINOLDS, E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell. Biol.*, v.17, p.208-212, 1963.
- ROTH, J.; BENDAYAN, M.; ORTL, L. Ultrastructural localization of intracellular antigen by the use of proteina-gold complex. *J. Histochem Cytochem.* v.26, p.1074-1081, 1978.
- TEPPEMA, J.S. & BOER, G.F. Ultrastructural aspects of experimental swinepox with special reference to inclusion bodies. *Arch. Virol.*, v.49, p.151-163, 1975.
- WATSON, M.L. Staining of tissue for electron microscopy with heavy metals. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, v.4, p.475-478, 1958.

Recebido em 28/4/03

Aceito em 8/12/03