



Isolamento e avaliação do comportamento do vírus ORF em células de córnea fetal caprina e identificação pela Reação em Cadeia da Polimerase. Isolation and evaluation of ORF virus in fetal caprine cornea cell and viral identification by the Polymerase Chain Reaction.

Rosana Léo de Santana¹

1- Médica Veterinária, Doutora em Ciência Veterinária pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, UFRPE, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n – Dois Irmãos CEP.: 52.171.900 – Recife-PE. E-mail: rosanaleosantana@gmail.com

Resumo

O controle da infecção em regiões endêmicas é realizado através de vacinação, no entanto ocorrem limitações na produção de vacinas devido à dificuldade de replicação do vírus em cultura celular. Este trabalho foi conduzido com o objetivo de isolar e avaliar o comportamento de amostras de ECV em uma linhagem de células de córnea fetal caprina (CorFC) naturalmente imortalizada. Amostras de crostas de vinte e dois ovinos e de sete caprinos que apresentavam sinais clínicos de EC, originários dos Estados de Pernambuco, Bahia, Sergipe e Paraíba, foram isoladas em monocamadas de células CorFC e identificadas pela reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando primers para amplificação de um fragmento de 235 pb do gene B2L do envelope do ECV. Onze amostras foram submetidas a sete passagens consecutivas, a intervalos semanais. Observou-se em todas as passagens, a partir de 24 horas pós-infecção, efeito citopático (ECP) caracterizado por arredondamento celular, fusão com formação sincicial, inclusão citoplasmática e vacuolização. Deste modo, concluiu-se que as culturas de células CorFC mostraram-se altamente permissíveis à replicação do ECV, com pequena variação entre as amostras virais. A PCR indicou ser um método eficiente para confirmação da infecção por ECV em amostras clínicas.

Palavras-chave: Parapoxvírus. Efeito citopático. PCR. Ectima contagioso.

Abstract

The control of the infection in endemic regions is performed with vaccines, however there are limitations in the vaccine production due to the difficulties in replicating the virus in cell cultures. This work was conducted so as to isolate and evaluate the behavior of ECV samples in fetal goat cell line cornea (CorFC) naturally immortalized. Crust samples from 22 sheep and seven goats presenting the clinical symptoms of EC from the states of Pernambuco, Bahia, Sergipe and Paraíba, were inoculated in CorFC monolayers and identified by polymerase chain reaction (PCR) using primers for amplification of a fragment of 235 bp of gene B2L envelope ECV. Eleven samples were submitted to seven consecutive passes, at weekly intervals. Cytopathic effect (CPE) was observed in all passages, after 24 hours post-infection, characterized by cell rounding, syncytial fusion with training, inclusion and cytoplasmic vacuolization. Thus, CorFC cell cultures proved highly permissible to ECV replication with small variation among viral samples. The PCR technique can be an efficient method used for confirmation of ECV infection in clinical samples.

Keywords: Parapoxvirus. Cytopathic effect. PCR. Contagious ecthyma.

Introdução

O Ectima contagioso (EC) foi descrito pela primeira vez em ovinos por Steeb, em 1787, e em caprinos em 1879 (BARRAVIEIRA, 2005). É causado por um vírus da família Poxviridae, gênero Parapoxvirus, caracterizado pelo tropismo por células epiteliais e pela alta resistência às condições ambientais, geralmente adversas para a maioria dos vírus, como o ressecamento (PASTORET e BROCHIER, 1990).

A penetração do vírus ocorre por meio de lesões cutâneas. O primeiro sintoma observado em animais acometidos pelo vírus é o aumento da espessura da pele na área de invasão do vírus, com a formação posterior de pápulas, vesículas, pústulas e crostas. Lesões características são observadas na face, principalmente nos lábios, porém em casos mais severos podem ser vistos no úbere, tetos, membros, orelhas, mucosas, cauda e coroa do casco. O período de incubação em ovinos e caprinos é de dois a três dias. Cursando a enfermidade em três a quatro semanas, com desaparecimento das crostas e regeneração do tecido epitelial (ROBINSON e BALASSU, 1981; NANDI et al., 2011).

O Ectima contagioso é considerado uma enfermidade benigna. Entretanto, pode tornar-se grave, quando ocorre envolvimento de outros órgãos, além da pele, determinando grandes perdas ao rebanho. A morbidade em animais jovens ou de rebanhos indenes pode ser alta, chegando a 100%, com mortalidade geralmente baixa, podendo elevar-se em animais jovens, devido a infecções secundárias e manejo deficiente, associados à infecção por cepas de alta virulência (ROBINSON e BALASSU, 1981; NANDI et al., 2011).

Apesar do desenvolvimento da ovinocaprino cultura brasileira, do caráter endêmico da enfermidade e da sua importância, poucos trabalhos de pesquisa têm sido realizados com relação ao vírus EC, que possam subsidiar o controle da enfermidade, que se fundamenta, principalmente, na vacinação dos animais em áreas endêmicas (TORRES, 1943; ROBINSON e BALASSU, 1981; PINTO JÚNIOR, 2007; NANDI et al., 2011; HONORATO et al., 2018; SANTANA, 2019). Como não existem vacinas inativadas contra EC que sejam eficientes, a vacinação deve ser feita com vírus vivo. Por isto, só é recomendada em criações endêmicas, pois o uso da vacina implica obrigatoriamente na introdução do vírus no rebanho (PINTO JÚNIOR, 2007, HONORATO et al., 2018; ; SANTANA, 2019).

Dentre os entraves tecnológicos para a produção de vacinas, destaca-se a dificuldade de replicação do vírus em cultivo celular. Estudos *in vitro* utilizando amostras de ECV têm sido realizados utilizando-se células de cultivo primário de testículo caprino (MAZUR e MACHADO, 1990; HOSAMANI et al., 2007), de rim caprino (OLIVEIRA et al., 1998), queratinócitos de tecido do prepúcio de cordeiros (SCAGLIARINI et al., 2005), células de linhagem contínua MDBK (OLIVEIRA et al., 1998), fibroblasto de embrião de pinto (MERCANTE et al., 2008) e células Vero (VIKOREN et al., 2008). Nesses estudos tem sido relatada a dificuldade de replicação do vírus, pois nenhum dos modelos aplicados mostrou-se permissível à replicação contínua de ECV.

Baseado no exposto, este trabalho foi conduzido com o objetivo de isolar e avaliar o comportamento de amostras de ECV em uma linhagem de células de córnea fetal caprina (CorFC) naturalmente imortalizada, bem como identificar o agente etiológico pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

Material e métodos

Origem das Amostras

Foram utilizadas crostas coletadas de vinte e dois ovinos e sete caprinos com sintomatologia clínica sugestiva de EC, originários dos Estados de Pernambuco, Bahia, Sergipe e Paraíba. Os animais apresentavam lesões distribuídas principalmente nas áreas desprovidas de pêlos, como face, lábios, cavidade bucal, narinas e orelhas, com intensidade variada, chegando a quadros graves (Tabela 1). As crostas foram acondicionadas em tubos de 1,5 mL estéreis e enviadas resfriadas, em caixas isotérmicas, ao laboratório de viroses (LAVIAN-UFRPE), onde foram conservadas a -20°C até o início do processo para isolamento viral.

Tabela 1 - Amostras de crostas colhidas para isolamento do vírus ectima contagioso (ECV) de acordo com a origem, espécie e localização das lesões

Estado	Municípios	Amostras	Espécie	Localização das lesões
Paraíba	Soledade	BrPB 1.01	Ovina	Face
		BrPB 1.02	Ovina	Face
		BrPB 1.03	Ovina	Face
		BrPB 1.04	Ovina	Face
Sergipe	Poço Verde	BrSE 1.01	Ovina	Boca
		BrSE 1.02	Ovina	Boca
		BrSE 1.03	Ovina	Boca
	Itaporanga	BrSE 2.01	Ovina	Boca
		BrSE 2.02	Ovina	Boca
Bahia	Heliópolis	BrBA 1.01	Caprina	Boca
		BrBA 1.02	Caprina	Boca
Pernambuco	Floresta	BrPE 1.01	Caprina	Boca
		BrPE 1.02	Caprina	Boca/orelha
		BrPE 1.03	Ovina	Boca/orelha
		BrPE 1.04	Ovina	Boca
		BrPE 1.05	Ovina	Boca/orelha/olhos
	Recife	BrPE 2.01	Ovina	Boca/orelha/olhos
		BrPE 2.02	Ovina	Boca
		BrPE 2.03	Caprina	Focinho/orelha
		BrPE 2.04	Caprina	Boca/orelha/olhos
		BrPE 2.05	Caprina	Boca/orelha/dorso
		BrPE 2.06	Ovina	Boca/orelha
		BrPE 2.07	Ovina	Boca/orelha/olhos
		BrPE 2.08	Ovina	Focinho
	Sertânia	BrPE 2.09	Ovina	Focinho/orelha
		BrPE 3.01	Ovina	Focinho/orelha
	Petrolina	BrPE 3.02	Ovina	Canfro/orelha
		BrPE 4	Ovina	Focinho
	Ilha de Itamaracá	BrPE 5	Ovina	Focinho

Cultivo celular

As monocamadas de células de córnea fetal caprina (CorFC) (NASCIMENTO, 2012) foram cultivadas em garrafas plásticas de 25 cm², em meio essencial mínimo de Eagle (MEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), antibióticos (penicilina e estreptomicina) e antifúngico (anfotericina B), incubados a 37°C sob atmosfera de 5% de CO₂ até total confluência da monocamada celular, quando eram feitas novas passagens por tripsinização.

Isolamento e Passagens em Monocamada Celular

As crostas foram maceradas com areia estéril, utilizando-se graal e pistilo, re-suspensas em solução tampão salina (PBS) pH 7,6, estéril, formando uma suspensão, que foi clarificada por centrifugação 3.000g, por 20 minutos, em temperatura de 25° a 27°C. O sobrenadante coletado foi tratado com 200UI/mL de penicilina G potássica, 2mg/mL de sulfato de estreptomicina e 2 mg/mL de anfotericina B3 e mantido em tubos de 15 mL (Corning) a 4°C por 24 horas. Monocamadas semi-confluentes de CorFC, cultivadas em garrafas de cultivo celular de 25cm² de área, foram inoculadas com 1mL dessa suspensão e incubadas durante 1 hora. Após esse período, o inóculo foi removido e a camada celular lavada duas vezes com MEM. Em seguida, procedeu-se com a adição de 5 mL de MEM suplementado com 2% de SFB e incubação a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂. Paralelamente, foi inoculado apenas MEM suplementado com 2% SFB, seguindo o mesmo procedimento, sendo estas garrafas consideradas controle.

A cada 24 horas, as garrafas foram avaliadas para observação detalhada da monocamada celular, em microscópio de luz invertida e verificação da formação de efeito citopático (ECP), cuja intensidade foi avaliada em relação às monocamadas controles, e registrada de acordo com a seguinte classificação: + (até 25% de ECP); ++ (entre 25% e 50% de ECP); +++ (entre 50% e 75% de ECP); ++++ (75% a 100% de ECP) (OLIVEIRA et al., 1998). Todas as garrafas, que apresentaram ou não ECP, foram congeladas a -20°C, no oitavo dia pós-inoculação (p.i.). Para avaliar o comportamento dos isolados do ECV em cultivo de CorFC, onze amostras foram submetidas a sete passagens, cujo inóculo consistiu da suspensão viral obtida por três ciclos de congelamento e descongelamento das garrafas de cultivo, realizadas com intervalo de oito dias, conforme protocolo descrito por Oliveira et al. (1998).

Identificação do ECV por PCR

Extração de DNA

Cerca de 25 mg das crostas dos animais afetados foram trituradas e re-suspensas em solução tampão salina (PBS) pH 7,6 na presença de antibióticos (penicilina 200U/ml, estreptomicina 2mg/ml), as culturas de células CorFC inoculadas com as amostras de campo, na primeira passagem, foram congeladas, descongeladas e usadas diretamente para extração do DNA. Os DNAs das amostras de crostas e das passadas em cultivo celular foram extraídos e purificados usando o Kit QIAamp MinElute Virus Spin (Qiagen®, Alemanha), conforme instruções do fabricante. Após as extrações os DNAs foram armazenados a -20°C para utilização nas PCRs.

Oligonucleotídeos iniciadores (Primers)

O par de primers, PPP-3 e PPP-4 denominados pan-parapoxvirus, descritos por Inoshima et al. (2000), foi utilizado neste estudo para amplificação de um fragmento de 235pb do gene do envelope B2L, da cepa NZ2. As sequências dos primers PPP-3 e PPP-4 são: 5'-gcg agt cc gaga aga ata cg-3' e 5'-tac gtg gga agc gcc tcg ct-3', respectivamente.

PCR convencional

Para a reação de PCR convencional foram utilizados 112ng do DNA extraído, 10pmol de cada primer (PPP-3 e PPP-4) e o Top Taq Master Mix Kit (Qiagen®, Alemanha), segundo recomendações do fabricante. As condições de ciclagem consistiram em incubação inicial de 94°C por 3 min, seguida de 30 ciclos: desnaturação 94°C por 30 segundos, anelamento 60°C por 30 segundos, extensão 72°C por 1 min, 72°C por 10 min, com etapa final de 4°C. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% (LGC Biotecnologia, SP, BR), corados com Blue Green loading dye I (LGC Biotecnologia, SP, BR) em tampão TAE 1x, sob voltagem constante (80V) durante 50 min. Foi utilizado marcador molecular de 100pb DNA ladder (LGC Biotecnologia, SP, BR). O gel foi visualizado sob luz ultravioleta (UV) através do Sistema de Captura de Imagem/L-PIX-HE (Loccus-biotecnologia, Brasil).

Resultados e discussão

As células CorFC inoculadas com as 29 amostras de crostas obtidas de animais clinicamente afetados apresentaram ECP caracterizado pelo arredondamento celular, fusão com formação de pequenos sincícios, vacuolização e corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos (Figura 1). Além das amostras serem originadas de casos clínicos sugestivos de EC, tais alterações celulares são compatíveis com as descrições de ECP causado pelos vírus da família Poxviridae (ROBINSON e BALASSU, 1981). Além disso, todas as amostras foram positivas à PCR realizadas para amplificação do gene B2L do ECV, o que confirma que os isolados são o ECV.

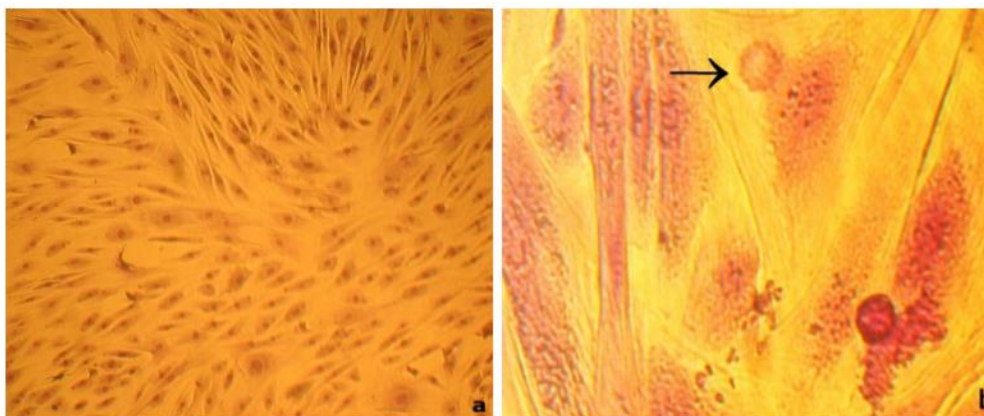


Figura 1. Cultivo primário de células de córnea fetal caprina (CorFC) observadas em microscópio óptico de luz invertida: a) monocamada não infectada corada pelo método de Giemsa no aumento de 40, e em b) inclusão intracitoplasmática causada pela replicação do ECV no citoplasma celular, aumento de 600X.

Dentre os entraves tecnológicos para a produção de vacinas, destaca-se a dificuldade de replicação do vírus em cultivo celular. Estudos *in vitro* utilizando amostras de ECV têm sido realizados, utilizando-se células de cultivo primário de testículo caprino (MAZUR e MACHADO, 1990, HOSAMANI et al., 2007), de rim caprino (OLIVEIRA et al., 1998), queratinócitos de prepúcio de cordeiros (SCAGLIARINI et al., 2005), bem como células de linhagem contínua MDBK (OLIVEIRA et al., 1998) e Vero (VIKOREN et al., 2008). Nesses estudos tem sido relatada a dificuldade de replicação do vírus, pois nenhum dos modelos aplicados mostrou-se permissível à replicação contínua de ECV. A ausência de cultivo celular permissível à replicação continuada de EC tem levado a comercialização no Brasil de vacina obtida a partir de suspensão de crostas de animais infectados, que apresenta sério risco de disseminação de outras doenças, principalmente virais, já que não é inativada (PINTO JÚNIOR, 2007; HONORATO et al., 2018; ; SANTANA, 2019). O sucesso na replicação do ECV nas células CorFC poderá resolver este problema.

As 11 amostras passadas seriadamente induziram o ECP, com 25% a 100% de desprendimento da camada celular, que variou, de acordo com a amostra viral. As amostras BrPB1.02, BrBA1.01 e BrBA1.02 apresentaram ECP mais intenso que as demais em todas as passagens realizadas (Tabela 2). A amostra BrPB1.02 foi obtida de um ovino do estado da Paraíba, que apresentava sinais clínicos severos de EC, e as amostras BrBA1.01 e BrBA1.02 de caprinos do estado da Bahia (Tabela 1). As demais, todas de ovinos de distintos rebanhos apresentaram ECP com intensidades variáveis entre as passagens (Tabela 2). Esses achados sugerem variação entre as amostras, porém deve-se destacar que as passagens foram executadas com volumes fixos dos inóculos. Assim, diferenças de comportamento entre as amostras podem ocorrer devido a diferentes títulos iniciais dos inóculos. Por outro lado, não é possível estabelecer relação entre intensidade de ECP e virulência, o que só poderá ser elucidada após inoculação de animais susceptíveis. De acordo com Oliveira et al. (1998), as alterações celulares de menor intensidade foram observadas em amostras de ovinos e não de caprinos, o que não foi confirmado neste estudo, pois a maioria das amostras foi oriunda de ovinos, exceto BrSE1.01 e BrSE1.02, e apresentaram ECP máximo às 192 horas p.i. na primeira passagem, semelhantes às amostras caprinas.

O comportamento das amostras de ECV foi diferente dos achados de Oliveira et al. (1998) que, utilizando amostras de caprinos de Pernambuco e células de linhagem MDBK e de cultivo primário de rim fetal caprino, conseguiram a replicação viral apenas na primeira e segunda passagens. A intensidade da replicação viral em todas as passagens no presente estudo pode ser um indicativo de adaptação das amostras virais às células CorFC, sistema de cultivo ainda não testado para replicação de ECV. A escolha deste sistema ocorreu por serem as células de córnea de fácil cultivo, pelos bons resultados na replicação de outros vírus, como o da artrite-encefalite caprina (CAEV) (OLIVEIRA et al., 2007) e por ser o ECV epiteliotrópico (ROBINSON e BALASSU, 1981). Adicionalmente, é conhecido que o epitélio da córnea não é irrigado diretamente pela corrente sanguínea (BURKITT et al., 1994), o que o torna menos acessível aos agentes virais. Com isto, mesmo sendo de natureza epitelial como outras células susceptíveis à infecção pelo ECV, essas células poderiam conter receptores menos favoráveis à infecção viral por não terem sido submetidas à forte pressão de seleção na interação vírus-hospedeiro. Do ponto de vista evolutivo, o contrário também é verdadeiro. Nesse caso, as células de córnea seriam mais permissíveis à infecção por ECV, o que poderia explicar, em parte, a melhor

replicabilidade em culturas de células de córnea, quando em comparação com os resultados obtidos em outros estudos, que relataram o insucesso ou sucesso parcial na replicação *in vitro* de ECV em outras células (MAZUR e MACHADO, 1990; OLIVEIRA et al., 1998; SCAGLIARINI et al., 2005; HOSAMANI et al., 2007; VIKOREN et al., 2008).

Tabela 2 - Intensidade do efeito citopático (ECP) causado pelas amostras do vírus ectima contagioso (ECV), de acordo com a passagem em linhagem de células de córnea fetal caprina (CorFC) naturalmente imortalizada, no oitavo dia pós-inoculação (p.i.)

Amostra	Passagem (semana)						
	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	5 ^a	6 ^a	7 ^a
BrPB1.02	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
BrPB 1.03	++++	++++	++	++	+++	++++	+++
BrPB 1.01	++++	++++	+++	++	+++	++++	++++
BrPB 1.04	+++	++++	+++	++++	++++	+++	+++
BrSE 2.01	++++	++++	+++	++++	++++	++++	+++
BrSE 2.02	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++
BrSE 1.01	++	++++	+++	++	++++	++++	+++
BrSE 1.02	+	++++	++++	++++	+	+++	++++
BrSE 1.03	++++	+++	+++	++++	++++	++++	+++
BrBA 1.01	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
BrBA 1.02	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++

ECP até 25% (+); entre 25% e 50% (++); entre 50% e 75% (+++); e entre 75% e 100% (++++).

Em algumas amostras foi observada que na terceira, quarta e quinta passagens, ocorreram formações de ECP de menor intensidade. Segundo Webster (1958) e Pyer (1990), isto pode ocorrer após adaptação do ECV às culturas celulares chegando, às vezes, a não ser mais observado formação de ECP, temporariamente, e que volta a ser observado com passagens sucessivas, provavelmente para seleção de amostras virais de maior poder infeccioso para a população celular exposta. Por outro lado, as variações observadas entre as amostras de ECV em cultivo celular, dependem também do nível de adaptação do vírus ao soro utilizado na suplementação do meio de cultura. É possível que as diferenças entre amostras tendam a desaparecer com passagens sucessivas (HUSSAIN e BURGER, 1988; MAZUR e MACHADO, 1990).

Conclusão

As culturas de células CorFC mostraram-se altamente permissíveis à replicação do ECV, com pequena variação entre as amostras virais. A PCR indicou ser um método eficiente para confirmação da infecção por ECV em amostras clínicas.

Referências bibliográficas

- BARRAVIEIRA, S. R. C. S. Diseases caused by poxvirus – ORF and milker's nodules – a review. **Journal of Venomous Animal and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 11, n.2, p. 102-108, 2005. <https://www.scielo.br/j/jvatitd/a/PXCjcyd9pFTtdsrrKVTMz8f/?lang=en>
- BURKITT, H. G.; YOUNG, B.; HEATH, J. W. Wheater Histologia Funcional. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994, 409p.
- HONORATO, J.; SOUSA, R. V.; CASTRO, R. S. Ectima Contagioso dos Ovinos e Caprinos: a doença e sua vacina. *Revista Agrária Acadêmica*, v. 1, n. 1, p. 58-83, 2018. <https://agrariacad.com/wp-content/uploads/2018/07/rev-agr-acad-v1-n1-2018-p58-83.pdf>
- HOSAMANI, M.; YADAV, S.; KALLESH, D. J.; MONDAL, B.; BHANUPRAKASH, V.; SINGH, R. K. Isolation and characterization of an Indian orf virus from goats. **Zoonoses and Public Health**, n. 54, n. 5, p. 204-208, 2007. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1863-2378.2007.01046.x>
- HUSSAIN, K. A.; BURGUER, D. *In vivo* and *in vitro* characteristics of contagious ecthyma virus isolates: host response mechanism. **Veterinary Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 37-51, 1988. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2466365/>
- INOSHIMA, Y.; MOROOKA, A.; SENTSUI, H. Detection and diagnosis of Parapoxvirus by the polymerase chain reaction. **Journal of Virological Methods**, v. 84, n. 2, p. 201-208, 2000. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10680970/>
- MAZUR, C.; MACHADO, R. D. The isolation and identification of the contagious ecthyma virus of caprines in cell cultures. **Veterinary Microbiology**, v. 21, n. 1, p. 127-130, 1990.
- MERCANTE, M. T.; LELLI, R.; RONCHI, G. F.; PINI, A. Production and efficacy of an attenuated live vaccine against contagious ovine ecthyma. **Veterinaria Italiana**, v. 44, n. 3, p. 537-542, 2008. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20405450/>
- NANDI, S.; UJJWAL, K.; CHOWDHURY, S. Current status of contagious ecthyma or Orf disease in goat and sheep – a global perspective. **Small Ruminant Research**, v. 96, n. 2-3, p. 73-82, 2011. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0921448810003196>
- NASCIMENO, S. A. **Descrição de uma linhagem de células de córnea fetal caprina (CorFC) naturalmente imortalizada: cultivo em meios com baixo teor de soro fetal bovino e uso para produção de antígenos do vírus da artrite encefalite caprina (CAEV)**. 62p. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária). Universidade Federal Rural de Pernambuco, PE, 2012.
- OLIVEIRA, D. S. C.; CASTRO, R. S.; NASCIMENTO, S. A.; MELO, W. T. Isolamento e caracterização preliminar de amostras do vírus Ectima Contagioso em caprino e ovino no estado de Pernambuco. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v. 1, n. 1, p. 33-40, 1998. [https://www.bvs-vet.org.br/vetindex/periodicos/ciencia-veterinaria-nos-tropicos/1-\(1998\)-1/isolamento-e-caracterizacao-preliminar-de-amostras-do-virus-ectima-con/](https://www.bvs-vet.org.br/vetindex/periodicos/ciencia-veterinaria-nos-tropicos/1-(1998)-1/isolamento-e-caracterizacao-preliminar-de-amostras-do-virus-ectima-con/)
- OLIVEIRA, M. M. O. et al. Western blot para diagnóstico de lentivírus de pequenos ruminantes (LVPR), usando protocolo simples para obtenção de antígeno. **Arquivos do Instituto Biológico**, 2007.
- PASTORET, P. P.; BROCHIER, B. Le virus de la vaccine et ses proches parents. **Annales de Medicine Veterinaire**, v. 134, p. 207-220, 1990.
- PINTO JÚNIOR, J. H. **Ectima contagioso dos ovinos e caprinos: a doença e sua vacina**. 50p. Monografia (Especialização em Farmacologia) – Universidade Federal de Lavras, MG, 2007.

- PYE, D. Vaccination of sheep with cell culture grown orf vírus. **Australian Veterinary Journal**, v. 67, n. 5, p. 182-186, 1990. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1751-0813.1990.tb07751.x>
- ROBINSON, A. J.; BALASSU, T. C. Contagious Pustular Dermatitis (Orf). **Veterinary Bulletin**, v. 51, n. 10, p.771-781, 1981.
- SANTANA, R. L. O vírus ORF (Ectima Contagioso). *Revista Agrária Acadêmica*, v. 2, n. 1, p. 124-143, 2019. <https://agrariacad.com/wp-content/uploads/2019/01/revagracadv2n12019p124143.pdf>
- SCAGLIARINI, A.; DAL POZZO, F.; GALLINA, L. Ovine skin organotypic culture applied to the *ex vivo* study of orf vírus infection. **Veterinary Research Communications**, v. 29, n. 2, p. 245-247, 2005. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16244966/>
- TORRES, S. Sugestões para a organização de um plano de profilaxia das moléstias dos caprinos e ovinos no Nordeste. *In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIA, 2. Anais...* Belo Horizonte: editora [s.n.], p. 447-452, 1943.
- VIKOREN, T.; LILLEHAUG, A.; AKERSTEDT, J.; BRETTEEN, T.; HAUGUM, M.; TRYLAND, M. A severe outbreak of contagious ecthyma (orf) in a free-ranging musk ox (*Ovibos moschatus*) population in Norway. **Veterinary Microbiology**, v. 127, n. 1-2, p. 10-20, 2008. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17768017/>
- WEBSTER, R. G. The immunological relations of the contagious pustular dermatitis virus to the mammalian pox group. **Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science**, v. 36, p. 267-274, 1958. <https://www.semanticscholar.org/paper/The-immunological-relations-of-the-contagious-virus-Webster/27c2f9b6b24d69a52cf58bc46da839bd5838dbd5>

Recebido em 29 de janeiro de 2021
Retornado para ajustes em 28 de abril de 2021
Recebido com ajustes em 30 de julho de 2021
Aceito em 19 de agosto de 2021