



Diagnóstico de ectima contagioso em pequenos ruminantes através da Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real. Diagnosis of contagious ecthyma in small ruminants through the Real Time 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 vírus do ectima contagioso (ECV), também conhecido como orf vírus (ORFV), é o agente etiológico do ectima contagioso (EC) dos ovinos e caprinos, e pertence ao gênero Parapoxvírus, da família Poxviridae. Em certos casos, o EC pode ser confundido com enfermidades vesiculares, havendo assim, a necessidade de sua diferenciação, sobretudo porque, segundo as normas do Programa Nacional de Erradicação da Febre Aftosa (PNEFA), os caprinos e ovinos não são vacinados contra a Febre Aftosa (FA), atuando como animais sentinelas. Embora estudos iniciais tenham demonstrado a utilidade da reação em cadeia de polimerase (PCR) como teste diagnóstico, ainda não há estudos sobre sua utilização envolvendo amostras de campo brasileiras, que podem ser geneticamente diferentes das já estudadas. Este trabalho foi conduzido com o objetivo de padronizar uma PCR em tempo real (qPCR) utilizando o corante SYBR Green I para diagnóstico molecular de EC diretamente a partir de DNA extraído de lesões do animal afetado ou de cultivo celular inoculado com amostras de campo. Os produtos da qPCR foram detectados com a análise da curva de dissociação que mostrou um pico a 88 °C, indicativo de que as amostras positivas têm apenas um produto de amplificação específico. Todas as amostras de DNA testadas (crostas de 29 animais e seus respectivos cultivos celulares) foram positivas na qPCR. A qPCR foi capaz de detectar o DNA até, no mínimo, a diluição de 10.000 vezes, correspondendo a 0,056 ng do DNA. Acredita-se que com as adicionais validações a qPCR relatada neste trabalho poderá ser empregada para o diagnóstico diferencial nas ações de vigilância sanitária do PNEFA.

Palavras-chave: Parapoxvírus. qPCR. Vírus ORF.

Abstract

The virus of contagious ecthyma (CEV), also known as orf virus (ORFV) is the etiological agent of contagious ecthyma (CE) in sheep and goat and belongs to the Parapoxvirus genus, family Poxviridae. In some cases, CE can be confused with vesicular diseases so there is need for differentiation especially because, according to the standards of the National Program for the Eradication of FMD (PNEFA), goats and sheep are not vaccinated against Foot and Mouth Disease (FMD), acting as sentinel animals. Although initial studies have demonstrated the usefulness of the polymerase chain reaction (PCR) as a diagnostic test, there are no studies involving its use on Brazilian field samples, which may be genetically distinct from previously studied samples, as described in a study of restriction sites analysis of Brazilian CE samples. This work was conducted with the goal of standardizing a PCR (qPCR) test using SYBR Green I dye for molecular diagnosis of EC in DNA extracted from lesions of affected animal or cell culture inoculated in field samples. The products were detected with qPCR dissociation curve analysis which showed a peak at 88 °C indicating that positive samples have only one specific amplification product. All DNA samples tested (29 animals crusts and their cell cultures) were positive in the qPCR. The qPCR was able to detect the DNA of at least 10,000 times dilution corresponding to 0.056 ng of DNA. It is believed that with the additional qPCR validations reported in this study, it can be used for differential diagnosis in the health surveillance of PNEFA.

Keywords: Parapoxvírus. qPCR. Orf virus.

Introdução

Ectima contagioso (EC), também conhecido como ORF, é uma virose aguda que acomete caprinos e ovinos, amplamente disseminada em todo mundo, inclusive no Brasil, onde foi descrito pela primeira vez em São Paulo (GUIMARÃES, 1939) e, posteriormente, em Pernambuco (TORRES, 1943) e Rio Grande do Sul (GUERREIRO, 1954). Tem sido descrito no Ceará (ARITA et al., 1986), Minas Gerais, Rio de Janeiro (MAZUR e MACHADO, 1990), Rio Grande do Sul (SALLES et al., 1992), São Paulo (LANGONI et al., 1995; CARTROXO et al., 2002), Pernambuco (OLIVEIRA et al., 1998) e Mato Grosso (ABRAHÃO et al., 2009). A doença pode ainda afetar o homem, sendo considerada uma doença de interesse à saúde pública (BARRAVIEIRA et al., 2005; NANDI et al., 2011).

O vírus do ectima contagioso (ECV) pertence à família Poxviridae, gênero Parapoxvírus, estreitamente relacionado aos vírus da estomatite papular bovina, pseudocowpox vírus e parapoxvírus da corça vermelha na Nova Zelândia (PVNZ) (NANDI et al., 2011). O vírus é epiteliotrópico e altamente resistente às condições ambientais, geralmente adversas para a maioria dos vírus, como o ressecamento (PASTORET e BROCHIER, 1990). A mutação do vírus e como isso poderia afetar a saúde pública não é conhecida (CÁRDENAS, 2020).

A cepa mais estudada sob o ponto de vista molecular é a NZ2, isolada na Nova Zelândia. O genoma apresenta de 139 a 160 quilo pares de base (kpb) e é estreitamente relacionado ao genoma de outros poxvírus (DELHON et al., 2004). A organização do genoma do ECV exibe o padrão geral de outros poxvírus, consistindo em uma região central, que contém genes essenciais e conservados, e terminais, que contém genes geralmente relacionados à virulência e à patogênese (NANDI et al., 2011). O gene B2L é conservado, compreende cerca de 1.206 pb, codifica uma proteína do envelope viral de 42 kDa e está situado na região central do genoma, sendo o mais usado para detecção de ECV pela reação em cadeia da polimerase (PCR) em amostras clínicas, devido sua alta conservação entre as espécies (INOSHIMA et al., 2000).

A PCR é reconhecida como um método de diagnóstico molecular estável, rápido e sensível para a detecção de ácidos nucleicos e pode ser utilizada mesmo quando a disponibilidade de amostra é pequena. A PCR identifica animais verdadeiramente infectados e não apenas soropositivos (NITSCHKE et al., 2006). Ensaios de diluição seriada e de placa já foram bastante utilizadas para quantificar o vírus. Porém são demorados e trabalhosos e, geralmente, não podem ser usados para amostras de campo de ECV que não se adaptaram ao crescimento *in vitro*. Portanto, a PCR convencional baseada na amplificação de parte do gene B2L (SULLIVAN et al., 1994) foi desenvolvida para detectar as espécies de parapoxvírus conhecidas e, em conjunto com o sequenciamento de DNA, podem ser utilizadas para diferenciação das espécies (INOSHIMA et al., 2000). Diferentes protocolos de PCR convencional foram desenvolvidos para diagnóstico rápido de infecções por ECV (TORFASON et al., 2002; ABRAHÃO et al., 2009, INOSHIMA et al., 2000). Atualmente, além dos usos da PCR convencional, a PCR em tempo real (qPCR) tem-se revelado precisa e eficiente para quantificação de DNA, permitindo estabelecer sua correlação com o título viral, inclusive do ECV, mesmo de amostras de campo que não se repliquem *in vitro* (GALLINA et al., 2006). As qPCRs desenvolvidas para detecção do DNA do ECV usam sondas específica para região mais interna do gene B2L (NITSCHKE et al., 2006; GALLINA et al., 2006; BANKOWSKI et al., 2004). Embora estudos iniciais tenham demonstrado sua utilidade como teste de diagnóstico, ainda não há estudos sobre sua utilização envolvendo amostras

brasileiras, que podem ser geneticamente diferentes das já estudadas, conforme previamente descrito em um estudo com análise de restrição.

O controle da enfermidade se fundamenta, principalmente, na vacinação dos animais em áreas endêmicas (HONORATO et al., 2018); porém, dentre os entraves tecnológicos para a produção de vacinas, destaca-se a dificuldade de replicação do vírus em cultivo celular (SANTANA, 2019) e estudos *in vitro* utilizando amostras de ECV têm sido realizados, entre elas, células de córnea fetal caprina (SANTANA, 2021).

Baseado no exposto, este trabalho foi conduzido com o objetivo de padronizar uma qPCR utilizando o corante SYBR Green I para diagnóstico molecular de EC em amostras clínicas e isoladas em culturas de células.

Material e métodos

Amostras

Foram utilizadas amostras de DNA extraídas de crostas de 22 ovinos e de sete caprinos com sintomatologia clínica de EC, originários dos Estados de Pernambuco, Paraíba, Bahia e Sergipe, bem como de cultivos de células CorFC inoculadas com essas amostras. A quantidade de DNA nas amostras foi determinada por espectrofotometria, de acordo com as instruções do fabricante (Qubit Fluorometer; Life Technologies, USA).

Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR)

Para a realização da qPCR foram utilizados os primers PPP-3 (5'-gcg agt cc gaga aga ata cg-3') e PPP-4 (5'-tac gtg gga agc gcc tcg ct-3'), denominados pan-parapoxvírus, descritos por Inoshima et al. (2000), que amplificam um fragmento de 235 pb do gene B2L do ECV.

A reação qPCR foi realizada no termociclador em tempo real - Line-Gene K-software (Hangzhou Bioer Technology Co., Ltd-China) utilizando o corante SYBR Green I, inespecífico que se liga a qualquer DNA dupla fita (e ROX como referência passiva). Os produtos da qPCR foram detectados com a análise da curva de dissociação, realizada posteriormente à corrida da PCR, aumentando a temperatura lentamente 60-95 °C (0,5C/s) e através da medição da fluorescência de forma contínua. A Line-Gene K-software FQD-48 foi utilizada para a análise e interpretação dos resultados. A reação incluiu 2 L do DNA extraído, primers PPP3 –PPP4 (10 pmols de cada), 12,5 L Quantifast SYBR Green Master Mix (Qiagen, Alemanha), água adicionada para um volume final de 25 L.

Foram testadas algumas condições de ciclagem, onde diferentes temperaturas de anelamento, número de ciclos e tempo de extensão foram modificados. Após experimentação, os melhores resultados foram obtidos com a PCR realizada nas seguintes condições de ciclagem: uma etapa de desnaturação inicial a 95 °C por 5 min, seguido por 35 ciclos de amplificação (95 °C por 10 s e 60 °C por 30 s). Controles sem o DNA alvo (no template control - NTC) foram incluídos em cada PCR, para detectar resultados falso-positivos devido à contaminação. Todos os ensaios foram realizados em duplicatas.

Sensibilidade e especificidade analíticas da qPCR

A sensibilidade analítica da qPCR foi determinada com base em uma curva de detecção, onde foram realizadas diluições seriadas (1:10, 1:100, 1:1.000, e 1:10.000) em duplicata, a partir de uma concentração inicial do DNA de 560 ng a partir da amostra BrSE1.01 considerada como controle positivo. A especificidade analítica foi avaliada com base no sequenciamento do fragmento de DNA de 235 pb correspondente ao gene B2L do ECV de 26 amostras utilizando ABI 3100 (Applied Biosystems, EUA).

Resultados e discussão

Foi proposto aperfeiçoar uma qPCR para diagnosticar ECV diretamente a partir de DNA extraído de lesões do animal afetado ou de cultivo celular inoculado com amostras de campo. Os produtos da qPCR foram detectados com a análise da curva de dissociação. Uma vez que foi usado SYBR Green I como corante intercalante de DNA, a análise da curva de dissociação é essencial para determinar a especificidade dos resultados. A presença de pico a 88 °C no gráfico mostra que as amostras positivas tem apenas um produto de amplificação específico (figura 1), e controles negativos não tem nenhum produto.

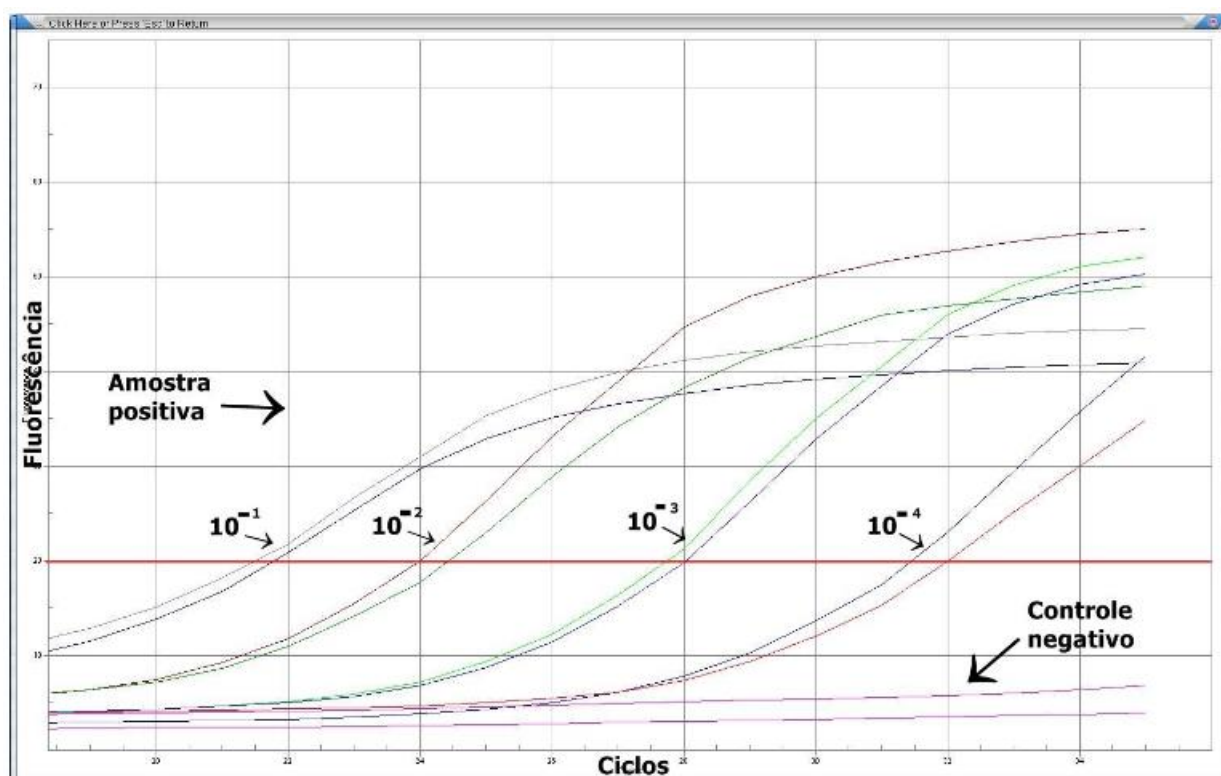


Figura 1. Curva de sensibilidade (ou detecção) utilizando diluições seriadas (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10.000) com concentração inicial do ECV de 560 ng da amostra BrSE1.0, em duplicata.

Todas as amostras de DNA testadas (crostas de 29 animais e seus respectivos cultivos celulares) foram positivas na qPCR, com base na curva de dissociação. Na Figura 2A observa-se o resultado obtido para a curva de dissociação das amostras dos Estados de Sergipe, Bahia e Paraíba; Estado de Pernambuco (Figura 2B e 2C), onde observa-se o pico gerado entre as temperaturas de 88 °C resultado da amplificação de produto específico para ECV e controle

negativo (NTC) sem amplificação de produtos. Essas amostras foram testadas previamente utilizando-se uma PCR convencional adaptada de Inoshima et al. (2000) e apresentaram resultado positivo.

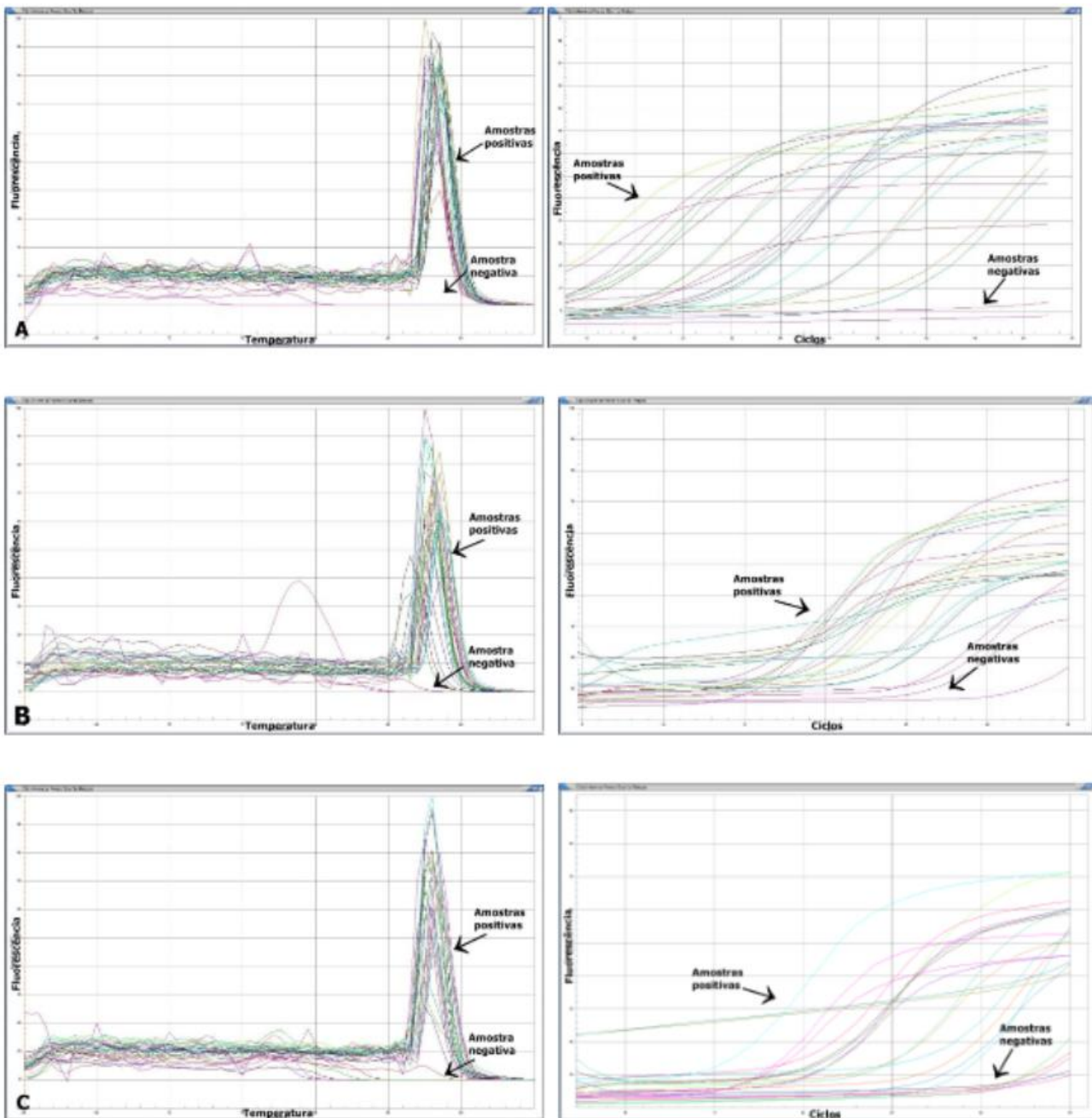


Figura 2. Curva de dissociação. (A) Amostras positivas com produto de amplificação específico para ECV dos Estados de Sergipe (BrSE1.01, BrSE1.02, BrSE1.03, BrSE2.01, BrSE2.02); Paraíba (BrPB 1.01, BrPB1.02, BrPB 1.03, BrPB 1.04) e Bahia (BrBA 1.01, BrBA 1.02) e controle negativo. (B) Amostras positivas com produtos de amplificação específico para ECV do Estado de Pernambuco (BrPE1.01, BrPE3.01, BrPE3.02, BrPE4, BrPE2.01, BrPE2.02, BrPE2.03, BrPE2.04, BrPE2.05, BrPE2.06) e controle negativo. (C) Amostras positivas com produtos de amplificação específico para ECV do Estado de Pernambuco (BrPE2.12, BrPE2.13, BrPE2.14, BrPE1.02, BrPE2.10, BrPE2.11, BrPE2.07, BrPE2.08, BrPE2.09, BrPE5) e controle negativo.

Existem alguns estudos utilizando a qPCR para a detecção de ECV e Parapoxvírus (GALLINA et al., 2006; NITSCHKE et al., 2006) utilizando sondas específicas para o vírus. Nossos resultados são os primeiros a utilizar o corante SYBR Green I ao invés de sondas. O

SYBR Green I é a alternativa mais viável para o diagnóstico de amostras de campo em larga escala, sendo por isso, o produto selecionado para realização do presente estudo, o que torna o diagnóstico por qPCR economicamente viável. Adicionalmente, a qPCR oferece várias vantagens em relação à PCR tradicional, por se tratar de um sistema fechado, no qual a amplificação de DNA é realizada e detectada em um único tubo que permanece fechados durante a execução de todo o processo, evitando processamento pós-amplificação, como a eletroforese em gel, diminuindo o risco de contaminação (GOMES et al., 2006).

A figura 1 apresenta a curva de sensibilidade analítica da qPCR, onde foram realizadas diluições seriadas do DNA de uma amostra. A qPCR foi capaz de detectar o DNA até, no mínimo, a diluição de 10.000 vezes, correspondendo a 0,056 ng do DNA. A análise das sequências demonstrou similaridade de 93% com a sequência de referência AY386263.1 e de 99% entre si, o que confirma a alta especificidade analítica da qPCR. Para se validar um teste diagnóstico, além da sensibilidade e da especificidade analíticas, deve-se determinar a sensibilidade e a especificidade diagnósticas, com base em testes de um número significativo de animais da população onde o teste será aplicado (OIE Terrestrial Manual, 2021). A qPCR apresentou resultado positivo em todas as amostras processadas a partir das crostas de animais clinicamente afetados, o que sugere ser um teste altamente sensível. Para definitiva validação da qPCR é necessário testar maior número de amostras de animais afetados e de animais de rebanhos livres de EC.

Para o diagnóstico de parapoxvírus exames sorológicos ou moleculares podem ser utilizados. Existem limitações nos testes sorológicos, pois se trata de uma doença geralmente de evolução aguda e devido ao fato de que membros do gênero parapoxvírus são intimamente relacionados antigenicamente e, muitas vezes, estes ensaios sorológicos não são eficazes para detecção de qual agente etiológico está causando a dermatite nos animais (NANDI et al., 2011).

Segundo as normas do PNEFA (2017) caprinos e ovinos não devem ser vacinados contra a Febre Aftosa, permanecendo como animais sentinela. Essa condição é essencial para a realização dos inquéritos sorológicos durante os processos de certificação pela OIE, bem como para detecção de circulação viral nos casos de introdução do vírus da Febre Aftosa em uma determinada região. Nesses casos deve-se dispor de um teste rápido e direto de diagnóstico, que possa ser empregado em certa escala, como a qPCR. EC é uma doença que pode ser confundida com as enfermidades vesiculares, como a Febre Aftosa. Acredita-se que com as adicionais validações a qPCR relatada neste trabalho poderá ser empregada para o diagnóstico diferencial nas ações de vigilância sanitária do PNEFA.

Conclusões

O aperfeiçoamento da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real para fins de diagnóstico de campo indicou ser um método eficiente para confirmação de infecção por ECV em amostras clínicas, demonstrando a presença de cepas de ECV circulando nos Estados de PE, SE, BA e PB. E que nossos atuais resultados são pioneiros em utilizar o corante SYBR Green I ao invés de sondas específicas, proporcionando teste diagnóstico menos oneroso para os laboratórios veterinários, uma vez que o corante SYBR Green I apresenta um custo cerca de três vezes menor que o das sondas específicas, viabilizando assim o uso desta técnica para fins diagnósticos.

Referências bibliográficas

- ABRAHAO, J. S.; CAMPOS, R. K.; TRINDADE, G. S.; GUEDES, M. I. M.; LOBATO, Z. I. P.; MAZUR, C.; FERREIRA, P. C. P.; BONJARDIM, C. A.; KROON, E. G. Detection and phylogenetic analysis of Orf virus from sheep in Brazil: a case report. **Virology Journal**, v. 6, n. 47, 2009. <https://virologyj.biomedcentral.com/articles/10.1186/1743-422X-6-47>
- ARITA, G. M. M.; CAPELLARO, C. E. M. P. M.; DEAK, J. G. Isolamento e identificação de poxvírus causando doença em ovinos no Estado do Ceará. **Biológico**, v. 52, n. 1-3, p. 23-26, 1986.
- BANKOWSKI, M. J.; ANDERSON, S. M. Real-time nucleic acid amplification in clinical microbiology. **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 26, n. 2, p. 9-15, 2004. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0196439904900037>
- 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/PXCjeyd9pFTdsrrKVTMz8f/?lang=en>
- CÁRDENAS, S. M. **Ectima Contagioso Ovino: estudio bibliográfico y análisis de la enfermedad**. 37p. Trabajo Fin de Grado em Veterinaria. Facultad de Veterinaria. Universidad Zaragoza, 2020. <https://zaguan.unizar.es/record/96435/files/TAZ-TFG-2020-3780.pdf>
- CARTROXO, M. H. B.; CURTI, N. A.; PITUCO, E. M.; GARCIA, M.; OKUDA, L. H.; PORTO, A. C. R.; STEFANO, E. Ocorrência de ectima contagioso em ovinos criados em Itatiba, estado de São Paulo, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 69, supl. 37, 2002.
- DELHON, G.; TULMAN, E. R.; AFONSO, C. L.; LU, Z.; DE LA CONCHA-BERMEJILLO, A.; LEHMKUHL, H. D.; PICCONE, M. E.; KUTISH, G. F.; ROCK, D. L. Genomes of the parapoxviruses ORF virus and bovine papular stomatitis virus. **Journal of Virology**, v. 78, n. 1, p. 168-177, 2004. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14671098/>
- GALLINA, L.; DAL POZZO, F.; McINNES, 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. **Journal of Virological Methods**, v. 134, n. 1-2, p. 140-145, 2006. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16430972/>
- GOMES, A. L. V.; MELO, F. L.; WERKHAUSER, R. P.; ABATH, F. G. C. Development of a real time polymerase chain reaction for quantitation of *Schistosoma mansoni* DNA. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 133-136, 2006. <https://www.scielo.br/j/mioc/a/98q8XktyWccNzx3wW5jrysr/?lang=en>
- GUERREIRO, M. G. Ectima contagioso dos ovinos no estado do Rio Grande do Sul. **Arquivos do Instituto de Pesquisa Veterinária Desiderio Finamor**, v. 1, n. 1, p. 51-53, 1954.
- GUIMARÃES, L. M. Sobre um caso de ectima contagioso em cabras observado em São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, n. 23, p. 232-234, 1939.
- 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>
- INOSHIMA, Y.; MOROOKA, A.; SENTSUI, H. Detection and diagnosis of Papoxvirus by the polymerase chain reaction. **Journal of Virology Methods**, v. 84, n. 2, p. 201-208, 2000. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10680970/>
- LANGONI, H.; COELHO, K. I. R.; PIMENTEL, M. P.; SIQUEIRA, E. R.; SPAGO, E. N. Ectima contagioso em ovinos na região de Botucatu. **A Hora Veterinária**, v. 14, p. 60-62, 1995.
- MAZUR, C.; MACHADO, R. D. The isolation and identification of the contagious ecthyma virus of caprines in all cultures. **Revista de Microbiologia**, v. 21, n. 1, p. 127-130, 1990.

- NANDI, S.; UJJWAL, K. de; 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>
- NITSCHKE, A.; BUTTNER, M.; WILHELM, S.; PAULI, G. e MEYER, H. Real-Time PCR detection of Parapoxvirus DNA. **Clinical Chemistry**, v. 52, n. 2, p. 316-319, 2006. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16449215/>
- OIE. **Terrestrial Manual 2021**. <https://www.oie.int/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/terrestrial-manual-online-access/>
- OLIVEIRA, D. S. C. 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://pesquisa.bvsalud.org/bvs-vet/resource/pt/vti-479497>
- PASTORET, P. P.; BROCHIER, B. Le virus de la vaccine et ses proches parents. **Annales de Medicine Veterinaire**, v. 134, p. 207-220, 1990.
- PNEFA. **Plano Estratégico do Programa Nacional de Vigilância para a Febre Aftosa**. 2017. <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/febre-aftosa/plano-estrategico-pnefa-2017-2026>
- SALLES, M. W. S.; BARROS, C. S. L.; LEMOS, R. A. A.; WEIBLEN, R. Ectima contagioso (dermatite pustular) dos ovinos. **Ciência Rural**, v. 22, n. 3, p. 319-324, 1992. <https://www.scielo.br/j/cr/a/hQjtXM55QvrfSSxLQ3hQgks/?lang=pt>
- SULLIVAN, J. T.; MERCER, A. A.; FLEMING, S. B.; ROBINSON, A. J. Identification and characterization of an orf virus homologue of the vaccinia virus gene encoding the major envelope antigen p37k. **Virology**, v. 202, n. 2, p. 968-973, 1994. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8030257/>
- SANTANA, R. L. Isolamento e avaliação do comportamento do vírus ORF em células de córnea fetal caprina e identificação pela Reação em Cadeia da Polimerase. **Revista Agrária Acadêmica**, v. 4, n. 4, p. 107-115, 2021. <https://agrariacad.com/2021/08/20/isolamento-e-avaliacao-do-comportamento-do-virus-orf-em-celulas-de-cornea-fetal-caprina-e-identificacao-pela-reacao-em-cadeia-da-polimerase/>
- 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>
- TORFASON, E. G.; GUONADOTTIR, S. Polymerase chain reaction for laboratory diagnosis of orf virus infection. **Journal of Clinical Virology**, v. 24, n. 1-2, p. 79-84, 2002. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11744431/>
- 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.

Recebido em 28 de março de 2021

Retornado para ajustes em 30 de maio de 2021

Recebido com ajustes em 2 de agosto de 2021

Aceito em 31 de agosto de 2021