

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

DETECÇÃO DO VÍRUS VACCINIA NA REGIÃO
CENTRO OESTE DO ESTADO DE SÃO PAULO

MARINA GEA PERES

Botucatu – SP
2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

DETECÇÃO DO VÍRUS VACCINIA NA REGIÃO
CENTRO OESTE DO ESTADO DE SÃO PAULO

MARINA GEA PERES

Tese apresentada junto ao
Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária para
obtenção do título de Doutora

Orientador: Profa. Dra. Jane Megid

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Peres, Marina Gea.

Detecção do vírus Vaccinia na região centro oeste do estado de São Paulo / Marina Gea Peres. - Botucatu, 2016

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Jane Megid

Capes: 50502000

1. Vírus Vaccinia. 2. Epidemiologia. 3. DNA Viral.
4. Relação hospedeiro-vírus. 5. São Paulo (Estado).

Palavras-chave: Epidemiologia; Reservatório silvestre; Vaccinia virus.

Nome do Autor: Marina Gea Peres

Título: DETECÇÃO DO VÍRUS VACCINIA NA REGIÃO CENTRO OESTE DO
ESTADO DE SÃO PAULO

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^aDr^a Jane Megid

Orientadora

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof.Dr. Hélio Langoni

Membro

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof.Dr. Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza

Membro

Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem
FMB – UNESP – Botucatu

Prof^a.Dr^a. Ediviges Maristela Pituco

Membro

Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento em Sanidade Animal
LBV – Instituto Biológico – São Paulo

Prof^a.Dr^a. Zélia Ines Portela Lobato

Membro

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva
Escola de Veterinária – UFMG – Belo Horizonte

Data: 01 de Agosto de 2016

Nome do Autor: Marina Gea Peres

Título: DETECÇÃO DO VÍRUS VACCINIA NA REGIÃO CENTRO OESTE DO
ESTADO DE SÃO PAULO

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcio Garcia Ribeiro

Suplente

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

FMVZ – UNESP – Botucatu

Profa. Dra. Giliane de Souza Trindade

Suplente

Departamento de Microbiologia

IB – UFMG – Belo Horizonte

Dra. Liria Hiromi Okuda

Suplente

Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal

LVB – Instituto Biológico – São Paulo

Data: 01 de Agosto de 2016

Dedicatória

Ao único digno de receber, toda honra, toda glória, todo louvor e adoração para sempre: ao Pai, ao Filho Jesus Cristo e ao Espírito Santo.

Agradecimentos

Ao amado da minha alma, meu Senhor e salvador Jesus Cristo, por teu amor, por tuas misericórdias, por tua fidelidade, pelos milagres, livramentos, ensinamentos.

À minha melhor amiga, minha mãe querida, obrigada por todo amor e apoio. À minha pequena Sofia, pelo amor e alegria que acrescentou em minha vida. Ao meu parceiro de jornada, pelo amor e paciência.

À Professora e Orientadora Jane, por todos os ensinamentos, pela confiança, pela oportunidade, pela compreensão.

Aos amigos do laboratório, que nestes setes anos tornaram-se amigos para a vida, Camila, Susan, João Marcelo, Acácia, Mateus, Bruna, Clóvis por serem ombro e ouvidos, por serem torcida, por serem fonte de conhecimento e inspiração, por serem ajuda sempre presente, por serem quem eles são, especiais e inesquecíveis.

A todos os professores que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização desse trabalho: Professor José Carlos de Figueireido Pantoja (UNESP-Botucatu), Professor Fernando Ferreira (FMVZ-USP), Professor Luiz Eloy Pereira (Instituto Adolfo Lutz – São Paulo), Professora Edviges Maristela Pituco (LVB - Instituto Biológico de São Paulo), Professora Ana Paula Carmignoto (UFSCAR – Sorocaba), Professora Erna Kroon (UFMG-Belo Horizonte) e Professor Jonathas Santo Abrahão (UFMG – Belo Horizonte).

A todos os profissionais que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho: Líria Hiromi Okuda e toda a equipe do Laboratório de Vírus de Bovídeos (LVB – Instituto Biológico de São Paulo), e a Grazielle Pereira Oliveira, bióloga e aluna de doutorado da UFMG.

A todos os produtores rurais que autorizaram a realização da pesquisa em suas propriedades, e aos “mateiros” que trabalharam arduamente, mesmo debaixo de chuva, com tamanho empenho.

A todos os animais amostrados, por nos cederem amostras de sangue, fezes e urina, e aqueles que nos cederam suas vidas, nossa gratidão e respeito.

À FAPESP pela bolsa de Doutorado.

“Não te mandei eu? Esforça-te, e tem bom ânimo; não te atemorize, nem te espantes; porque o Senhor teu Deus está contigo, por onde quer que andares.”

(Josué 1:9)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estrutura dos vírions.....	4
Figura 2 -	Esquema do genoma do vírus Vaccinia.....	5
Figura 3 -	Lesões em teto e úbere.....	6
Figura 4 -	Lesões em muflo e mucosa nasal de bezerro.....	7
Figura 5 -	Lesões em mão de ordenhador.....	7
Figura 6 -	Lesões em antebraço de ordenhador.....	8
Figura 7 -	Cronologia dos surtos no país.....	16
Figura 8 -	Cronologia dos surtos no país (cont.).....	17
Figura 9 -	Modelo de transmissão.....	21

SUMÁRIO

	Página
CAPITULO 1	
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Vírus Vaccinia.....	3
2.1.1 Taxonomia.....	3
2.1.2 Estrutura viral.....	4
2.1.3 Manifestações clínicas e transmissão.....	5
2.1.4 Diagnóstico e Tratamento.....	8
2.2 VACV no Brasil.....	9
2.2.1 Amostras vacinais.....	9
2.2.2 Primeiros isolamentos.....	11
2.2.3 Disseminação pelo país.....	11
2.3 Dicotomia genética e fenotípica.....	18
2.4 Origem dos vírus isolados.....	19
2.5 Modelo de Transmissão.....	20
CAPITULO 2 – Trabalho Científico.....	24
CAPITULO 3 – Trabalho Científico.....	41
CAPITULO IV	
DISCUSSÃO GERAL.....	65
CONCLUSÕES GERAIS.....	69
BIBLIOGRAFIA.....	70

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

O vírus *Vaccinia*, um membro do gênero *Orthopoxvirus* da família *Poxviridae*, é o agente etiológico de uma doença exantemática, caracterizada pelo aparecimento de lesões cutâneas nos tetos e úberes das vacas, e no muflo e mucosa oral dos bezerros (MEDEIROS-SILVA et al., 2010; KROON et al., 2011). Além dos animais, afeta também os humanos, que adquirem a infecção pelo contato direto com as lesões no momento da ordenha, desenvolvendo alterações semelhantes à dos animais nas mãos, braços e antebraços (MOUSSATCHÉ et al., 2008; MEDEIROS-SILVA et al., 2010; FONSECA et al., 2011; KROON et al., 2011).

Ao gênero *Orthopoxvirus* pertencem o extinto Vírus da Varíola Humana ou *Varíola vírus* (VARV), e outros três importantes patógenos zoonóticos: o Vírus da “varíola bovina” ou *Cowpox vírus* (CPXV), o Vírus da Varíola dos Macacos ou *Monkeypox vírus* (MPXV), e o *Vaccinia vírus* (VACV) (LOBATO et al., 2005; MOUSSATCHÉ et al., 2008; ESSBAUER et al., 2010; MEDEIROS-SILVA et al., 2010; KROON et al., 2011; FLORES, 2012). Os membros deste gênero apresentam reação imunológica cruzada, ou seja, após infecção e/ou imunização com qualquer vírus desse gênero observa-se uma resposta sorológica protetora frente aos demais (MOUSSATCHÉ et al., 2008; JACOBS et al., 2009; ESSBAUER et al., 2010; KROON et al., 2011; FLORES, 2012). Essa característica, permitiu a utilização do VACV como antígeno vacinal contra o VARV no programa de vacinação mundial maciça da Organização Mundial de Saúde (WHO) (TRINDADE et al., 2007a; DRUMOND et al., 2008; JACOBS et al., 2009).

No Brasil, aproximadamente 10 anos após a WHO, em 1980, anunciar a erradicação do VARV, surtos por VACV afetando rebanhos bovinos e seres humanos começaram a ser descritos (DAMASO et al., 2000; TRINDADE et al., 2003; TRINDADE et al., 2007b; MEGID et al., 2008, MEGID et al., 2012; ABRAHÃO et al., 2015). Acreditava-se que tal ocorrência estivesse relacionada a uma adaptação do VACV vacinal a algum hospedeiro selvagem ainda não

identificado, re-emergindo esporadicamente em surtos afetando rebanhos bovinos e humanos (MOUSSATCHÉ et al., 2008). Entretanto, estudos sugerem que a origem e a história natural do VACV é distinta dos vírus vacinais usados no Brasil (TRINDADE et al., 2007a; DRUMOND et al., 2008).

A origem dos surtos no país continua desconhecida. No entanto a hipótese mais aceita supõe que existe uma população de VACV com diversidade genética e fenotípica que circula em reservatórios naturais ainda desconhecidos e que, dependendo das condições biológicas e geográficas, são transmitidos para vacas e humanos (TRINDADE et al., 2007a; DRUMOND et al., 2008; FERREIRA et al., 2008a).

Existem poucas informações sobre os reservatórios naturais do VACV, mas sabe-se que o CPXV, tem os roedores como reservatórios naturais, estando envolvidas diversas espécies silvestres como *Apodemus sylvaticus*, *Clethrionomys glareolus* e *Microtus agrestis*, e urbanas como *Mus musculus*, *Rattus rattus* e *Rattus norvegicus* (CHANTREY et al., 1999; NINOVE et al., 2009; ESSBAUER et al., 2010; FLORES, 2012). No Brasil o VACV foi uma vez isolado de um roedor peridoméstico da espécie *Mus musculus* durante surto afetando rebanho bovino e humanos (ABRAHÃO et al., 2009a). Entretanto, durante surto zoonótico, DNA viral foi também detectado, em amostras de sangue de cães e gambas (*Didelphis albiventris*) sem sinais clínicos, sugerindo o possível envolvimento de outras espécies na disseminação viral (PERES et al., 2016).

Considerando o caráter re-emergente do VACV e o não esclarecimento sobre a origem dos surtos no país, o presente estudo teve por objetivo verificar positividade ao VACV em amostras de animais domésticos, selvagens e humanos provenientes de áreas com e sem histórico de surto, na região centro oeste do estado de São Paulo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Vírus Vaccínia

2.1.1 Taxonomia

O vírus *Vaccínia* (VACV) pertencente à família *Poxviridae*, que é subdividida em duas subfamílias, *Entomopoxvirinae* e *Chordopoxvirinae*. Os membros da subfamília *Entomopoxvirinae* infectam diversas ordens da classe *Insecta* (SMITH, 1993; FENNER, 2000; BECKER et al., 2008; ESSBAUER et al., 2010; FLORES, 2012); a subfamília *Chordopoxvirinae* infecta os vertebrados e agrupa oito gêneros: *Orthopoxvirus*, *Capripoxvirus*, *Suipoxvirus*, *Leporipoxvirus*, *Avipoxvirus*, *Molluscipoxvirus*, *Yatapoxvirus* e *Parapoxvirus* (ESSBAUER et al., 2010; FLORES, 2012).

O gênero *Orthopoxvirus* (OPV) abriga sete espécies de vírus antigenicamente relacionadas: *Variola vírus* (VARV), *Vaccinia vírus* (VACV), *Cowpox vírus* (CPXV), *Monkeypox vírus* (MPXV), *Camelpox vírus* (CMLV), *Ectromelia vírus* (ECTV), *Uasin Gishu vírus* (UGDV) (FLORES, 2012). Desses, quatro espécies infectam seres humanos: VARV, VACV, CPXV, e MPXV, sendo os três últimos de importante caráter zoonótico, infectando inicialmente os animais (ESSBAUER et al., 2010; FLORES, 2012). O *Vaccinia vírus* (VACV), tem distribuição mundial e infecta humanos, bovinos, equinos, suínos, roedores, coelhos, e outros mamíferos (TRINDADE et al., 2004; MEGID et al., 2008; BRUM et al., 2010; ESSBAUER et al., 2010; MEDEIROS-SILVA et al., 2010; FLORES, 2012; PERES et al., 2016). O *Cowpox vírus* (CPXV) ou vírus da “varíola bovina” propriamente dita, tem sua ocorrência restrita aos continentes europeu e asiático, e infecta humanos, bovinos, felídeos e roedores, esses últimos atuam como reservatórios naturais e estão envolvidas diversas espécies silvestres como *Apodemus sylvaticus*, *Clethrionomys glareolus* e *Microtus agrestis*, e urbanas como *Mus musculus*, *Rattus rattus* e *Rattus norvergicus* (CHANTREY et al., 1999; KURTH et al., 2008; CARLETTI et al., 2009; CAMPE et al., 2009; NINOVE et al., 2009; ESSBAUER et al., 2010; FLORES, 2012). O Vírus da Varíola dos Macacos ou *Monkeypox vírus* (MPXV), de distribuição restrita a

oeste e centro do continente africano, infecta humanos, primatas e roedores (ESSBAUER et al., 2010; FLORES, 2012).

2.1.2 Estrutura viral

Os virions são grandes e complexos, e podem apresentar formato, ovóide, retangular arredondado ou pleomórfico, com dimensões que variam entre 170-260nm de diâmetro por 270-360nm de comprimento (FENNER, 2000; ESSBAUER et al., 2010; BHANUPRAKASH et al., 2012; FLORES, 2012). A partícula viral contém quatro estruturas distintas: cerne, corpúsculos laterais (corpos laterais), membrana e envelope (Figura 1). O cerne tem configuração bicôncava, unilateralmente côncava ou cilíndrica e envolve o material genético. Uma membrana lipídica contendo proteínas de superfície tubulares ou globulares arranjadas em forma helicoidal ou irregular envolve o cerne e os corpos laterais (SMITH, 1993; BHANUPRAKASH et al., 2012; FLORES, 2012). Apresentam uma forma extracelular denominada EEV (*extracellular enveloped virions*), provida de envelope duplo, adquirido por brotamento da membrana plasmática, e uma forma intracelular desprovida de envelope adicional, denominada IMV (*intracellular mature virions*), que são menos infecciosas e liberadas por lise celular (ESSBAUER et al., 2010; FLORES, 2012).

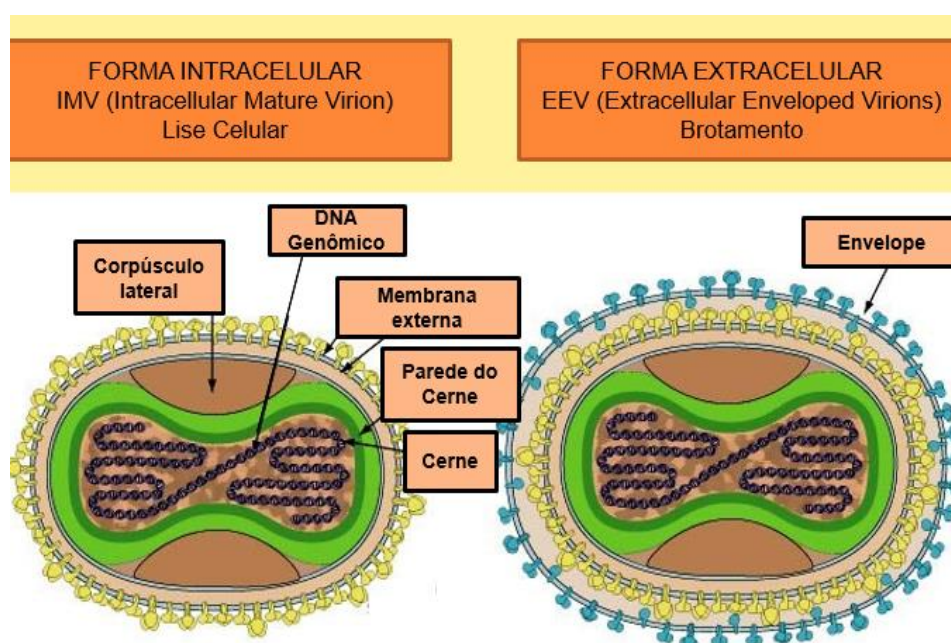


Figura 1. Estrutura dos vírions (fonte: adaptado de viralzone, www.viralzone.expasy.org)

O genoma é uma molécula de DNA linear de fita dupla, contendo sequências repetidas invertidas (ITRs) nas extremidades e uma única região longa que ocupa a região central (Figura 2). As duas cadeias de DNA são unidas entre si nas extremidades por curvas (*loops*), sendo as regiões que formam as curvas ricas em adenina (A) e timina (T) não complementares, não sendo possível o pareamento entre elas (SMITH, 1993; BECKER et al., 2008; BHANUPRAKASH et al., 2012; FLORES, 2012). A região central é altamente conservada, e codifica proteínas requeridas para estrutura e morfogênese, bem como enzimas envolvidas na replicação do DNA e transcrição do RNAm, enquanto as regiões terminais invertidas são variáveis, e codificam produtos envolvidos na patogenia (determinação do espectro de hospedeiros, modulação da resposta imune e antiapoptótica) e virulência (FLORES, 2012; SMITHSON et al., 2014). As regiões que forma as curvas ricas em A-T não complementares, são altamente conservadas, contendo sequencias necessárias para a formação de concatâmeros durante a replicação do DNA (FLORES, 2012).

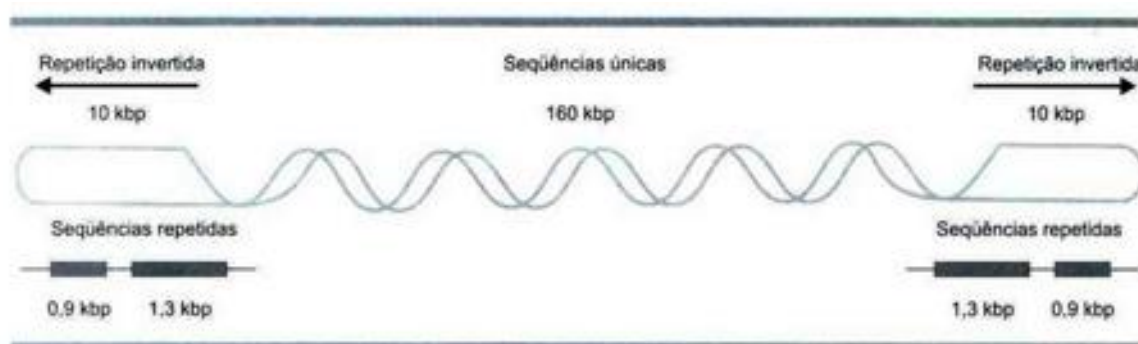


Figura 2. Representação do genoma dos poxvírus (fonte: Flores, 2012)

2.1.3 Manifestações clínicas e transmissão

As lesões causadas pelo VACV são proliferativas, ulcerativas ou crostosas, e facilmente visíveis nos tetos e úbere das vacas (Figura 3). Caracterizam-se inicialmente por eritema róseo e edema localizado que evolui para vesículas e, posteriormente, para pápulas e pústulas que se rompem e supuram, formando então crostas escuras que podem ulcerar (MEDEIROS-SILVA et al., 2010; KROON et al., 2011, RIVETTI JR et al., 2012, SANT'ANA et al., 2013). Bezerros podem desenvolver lesões no focinho ou muflo e mucosa oral (Figura 4). O curso da doença varia entre três a quatro semanas (MEGID et

al., 2008, TRINDADE et al., 2009; MEDEIROS-SILVA et al., 2010; KROON et al., 2011, FLORES, 2012; SANT'ANA et al., 2013).

A transmissão entre os animais ocorre pelas mãos dos ordenhadores e/ou equipamentos utilizados na ordenha manual, como cordas, e igualmente por equipamentos de ordenha mecânica e fômites em geral. A penetração viral ocorre por soluções de continuidade na pele e em lesões pré-existentes nos tetos das vacas. Os humanos podem se infectar pelo contato direto com as lesões existentes nos tetos e úberes das vacas, desenvolvendo além de lesões nas mãos e antebraços semelhantes às dos animais (Figura 5 e Figura 6), um quadro febril com reação linfonodal axilar, por vezes dolorosa, prostração, anorexia, desidratação, cefaleia, sudorese, artralgia e mialgia. Nos casos de lesões afetando pescoço e face se observa reação linfonodal cervical anterior (NEGASSE-GAHARA et al., 2004; LOBATO et al., 2005; FLORES, 2012; MEGID et al., 2008, SILVA-FERNANDES et al., 2009; SCHATZMAYR et al., 2009; MEDEIROS-SILVA et al., 2010; FONSECA et al., 2011; KROON et al., 2011, MEGID et al., 2012; SANT'ANA et al., 2013).



Figura 3. Lesões em teto e úbere (fonte: arquivo pessoal)



Figura 4. Lesões em muflo e mucosa nasal de bezerro (fonte: arquivo pessoal)



Figura 5. Lesões em mão de ordenhador (fonte: arquivo pessoal)



Figura 6. Lesões em antebraço de ordenhador (fonte: arquivo pessoal)

Recentemente foi descrito em humanos diagnosticados com VACV, além dos sinais clássicos, convulsões, vômitos, diarreia e confusão mental. No entanto os fatores envolvidos na gravidade dos quadros humanos durante esse surto ainda não estão elucidados (ABRAHÃO et al., 2015).

2.1.4 Diagnóstico e Tratamento

O material clínico utilizado para o diagnóstico laboratorial consiste em crostas, *swab* das lesões, líquido vesicular, sangue total, soro, leite e fezes (ABRAHÃO et al., 2009b; FLORES, 2012; RIVETTI JR et al., 2012; ASSIS et al., 2013a; KROON et al., 2016; PERES et al., 2016). O diagnóstico da infecção é realizado pelo isolamento viral em membrana corioalantóide de ovos embrionados e/ou em cultivo celular (células Vero ou BSC-40), detecção da partícula viral por microscopia eletrônica, métodos sorológicos (soroneutralização, ELISA, imuoperoxidase em monocamada celular – IPMC) e técnicas moleculares, como a reação em cadeia pela polimerase (PCR), convencional e em tempo real (FLORES, 2012; KROON et al., 2016).

A técnica de PCR tem permitido diagnóstico, rápido, sensível e específico da enfermidade, e diversos genes tem sido utilizados como alvos no diagnostico

molecular, como o gene C11R, relacionado ao fator de crescimento viral (viral growth fator, *vgf*), que é exclusivo e altamente conservado entre os vírus do gênero OPV, sendo por este motivo, frequentemente utilizado em diversos estudos de diagnóstico e caracterização viral de VACV isolados em surtos no Brasil (ABRAHÃO et al., 2009c; ABRAHÃO et al., 2010a; RIVETTI JR et al., 2012; ASSIS et al., 2013b; KROON et al., 2016).

Outro gene importante e muito utilizado na caracterização de VACV brasileiros, é o gene *A56R*, que codifica uma glicoproteína de superfície presente em todos os OPV, a hemaglutinina viral (*ha*). De acordo com as análises das sequências desse gene, é possível classificar as amostras brasileiras de VACV em dois grupos filogenéticos distintos (DAMASO et al., 2000; TRINDADE et al., 2003; LEITE et al., 2005; ABRAHÃO et al., 2009a; KROON et al., 2016). Essa dicotomia genética encontra-se detalhadamente descrita no item 2.3.

Como diagnóstico diferencial considera-se picadas de insetos, traumatismos, infecções vesiculares (febre aftosa, estomatite vesicular), papilomas com traumatismos, infecções por *Parapoxvirus* (*Pseudocowpox virus*, agente da pseudovaríola bovina), infecções por *Herpesvirus* bovino tipo 2 (BHV-2, agente da mamelite herpética) e infecções bacterianas (KROON et al., 2016).

Uma vez que não existe tratamento específico para VACV, recomenda-se como tratamento de suporte, a utilização de iodo com glicerina e pomadas epitelizantes nas lesões, bem como antibióticos sistêmicos em casos de infecções bacterianas secundárias (KROON et al., 2016).

2.2 VACV no Brasil

2.2.1 Amostras vacinais

Foi em 1804, com a chegada de escravos vindos de Lisboa, que o VACV foi importado para o Brasil. Trazendo em seus braços a vacina contra a varíola humana, os escravos atracaram na Bahia e de lá foram enviados ao Rio de Janeiro, possivelmente transmitindo o vírus vacinal para a população local, sendo desta forma, através do contato direto com a lesão vacinal dos braços (braço a braço), que a população brasileira foi vacinada entre 1804 e 1887 (FERNANDES, 1999).

A primeira vacina produzida com as lesões pustulares de bovinos inoculados, foi importada em 1887 do Instituto Chambon de Paris, para o Instituto de Vacina no Rio de Janeiro (atual Instituto Oswaldo Cruz). A vacina foi distribuída para outros estados do Brasil e, entre 1887 e 1895, outros institutos produtores de vacina foram estabelecidos nos estados do Rio Grande do Sul, São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso, Espírito Santo e Pernambuco (FERNANDES, 1999).

A erradicação da varíola humana ocorreu em 1951, nas Américas do Norte e Central, e em 1953 na Europa. O Brasil começou a trabalhar com a Organização Pan-Americana de Saúde em 1962, instituindo a campanha nacional de vacinação contra a varíola e, em 1966, com a intensificação do programa de vacinação global da Organização Mundial de Saúde (OMS), um novo programa de vacinação nacional foi instituído. Quatro laboratórios produziam a vacina no Brasil, o Instituto Oswaldo Cruz no Rio de Janeiro, o Instituto Butantan em São Paulo, o Instituto para Pesquisas Biológicas em Porto Alegre e um instituto na cidade de Recife, Pernambuco. Os vírus usados por esses institutos eram as amostras PARIS, LISTER e a LEDERLE (LEWIS et al., 2005). A amostra PARIS, usada pelo Instituto Oswaldo Cruz, parece ser uma referência à vacina produzida com as lesões pustulares de bovinos inoculados, originalmente importada do Instituto Chambon de Paris, em 1887. A amostra LISTER, desenvolvida originalmente no Instituto Lister na Inglaterra, era usada pelo Instituto para Pesquisas Biológicas de Porto Alegre. A LEDERLE, usada pelo Instituto de Recife e pelo Instituto Butantan, foi obtida do Laboratório Lederle Wyeth nos Estados Unidos da América. Tem origem na amostra NYCBH e originou as amostras VACV-WR (amostra de pesquisa) e Dryvax (amostra viva mantida nos Estados Unidos desde os anos 70) (LEWIS et al., 2005; JACOBS et al., 2009). Portanto, PARIS, LISTER e NYCBH foram usadas no Brasil no período de 1968 a 1971.

Quando o suprimento de vacinas disponíveis diminuiu a níveis críticos em 1970, o Brasil importou vacina da Argentina que, naquele período, utilizava a amostra MALBRAN em seus programas de vacinação. Nesse mesmo ano, seguindo as recomendações da OMS, a Argentina adotou a amostra LISTER.

Da mesma forma, o Instituto Butantan seguiu as normas da OMS utilizando a LISTER e se tornou o distribuidor oficial do Brasil (FERNANDES, 1999; LEWIS et al., 2005; TRINDADE et al., 2007a). Com isso houve a distribuição das amostras virais PARIS, LISTER, NYCBH e MALBRAN pelo Brasil durante a campanha de erradicação da OMS.

2.2.2 Primeiros isolamentos

Durante uma fiscalização da atividade dos arbovírus em áreas de floresta ao redor da cidade de São Paulo, conduzida pelo governo brasileiro em parceria com o Instituto Adolfo Lutz, entre 1960 a 1970, um poxvírus foi isolado de camundongo-sentinela exposto a vetores aéreos em área de floresta no município de Cotia no Estado de São Paulo, sendo nomeado como Cotia Vírus (COTV SPAn232) (LOPESODE et al., 1965). Posteriormente, com base nas análises das sequências dos genes que codificam a Timidina Kinase (*TK*) e o Fator de Crescimento Viral (*VGF*) o COTV SPAn232 foi caracterizado como um VACV e foi renomeado, passando a chamar-se SAV (FONSECA et al., 2002). No entanto, o primeiro suposto isolamento de uma nova variante do VACV em roedor silvestre ocorreu em 1963, quando o vírus nomeado BeAn58058 (BAV), foi isolado em amostra de sangue de um *Oryzomys spp.* capturado na floresta Amazônica nos arredores de Belém do Pará. BAV foi antigenicamente relacionado ao SAV (FONSECA et al., 1998; MARQUES et al., 2001). Entretanto análises recentes do sequenciamento completo do genoma do SAV revelou 185 “Open Reading Frames” (ORFs) ausentes em outros poxvirus, sugerindo que o SAV seja membro de outro gênero da família *Poxviridae*, ainda não classificado (AFONSO et al., 2012).

2.2.3 Disseminação pelo país

Em 1993 um surto semelhante ao de ectromelia (*Mousepox*) afetou os camundongos do Instituto Biológico (Centro do Bioterismo) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) em Belo Horizonte. Os camundongos eram provenientes da Universidade de Campinas no estado de São Paulo e apresentavam bom estado geral de saúde ao chegarem. Após alguns dias alguns vieram a óbito e outros apresentaram pústulas generalizadas, sendo este

material coletado para análise. Posteriormente, em 1998, o vírus isolado nessas amostras congeladas foi denominado Belo Horizonte Vírus (BHV), e as caracterizações moleculares demonstraram alta homologia entre o BHV e os genes de VACV depositados no *GenBank*, evidenciando a circulação de diferentes linhagens do VACV no Brasil, a partir de outras fontes além das selvagens, demonstrando a necessidade de vigilância epidemiológica (TRINDADE et al., 2004).

A partir de 1999, após o surto que afetou pequenas propriedades rurais na cidade de Cantagalo no estado do Rio de Janeiro, resultando no isolamento de um VACV que foi nomeado Cantagalo Vírus (CTGV), e outro na cidade de Araçatuba no estado de São Paulo, resultando em isolamento de VACV nomeado Araçatuba Vírus (ARAV), (DAMASO et al., 2000; TRINDADE et al., 2003) diversos casos de doença exantemática afetando rebanhos bovinos e humanos começaram a ser descritos no Brasil. Alguns surtos merecem destaque pela importância genética ou epidemiológica (Figura 7 e Figura 8).

O estado de Minas Gerais, o maior produtor leiteiro do país, registra surtos desde 2000, com isolamento de VACV que receberam os nomes das cidades onde ocorreram os surtos, como Muriae Vírus (MURV), Mariana Vírus (MARV), dentre outros (LEITE et al., 2005; TRINDADE et al., 2006; TRINDADE et al., 2007b; ABRAHÃO et al., 2009a; TRINDADE et al., 2009; ABRAHÃO et al., 2015). Três surtos no estado mineiro chamam a nossa atenção. O surto que afetou o município de Guarani, onde duas variantes do VACV foram simultaneamente isoladas, o Guarani P1 Vírus (GP1V) e o Guarani P2 Vírus (GP2V) (TRINDADE et al., 2006). O surto que afetou o município de Mariana, por relatar o primeiro isolamento de VACV acometendo simultaneamente bovinos, humanos e um camundongo peridoméstico (*Mus musculus*) capturado no local do surto (ABRAHÃO et al., 2009a) e o surto que afetou o município de Resplendor, por relatar o primeiro caso de co-infecção por *Vaccinia vírus* e *Pseudocowpox*, onde um jovem ordenhador e suas vacas foram diagnosticados por meio de testes imunológicos e moleculares, e apresentaram resultados positivos para ambos os agentes (ABRAHÃO et al., 2010b).

O primeiro caso confirmado de transmissão de VACV humano a humano foi registrado na cidade de São Francisco de Itabapoana – RJ em 2002 (OLIVEIRA et al., 2014). Casos assim são comuns nos Estados Unidos da América (EUA), envolvendo soldados recém vacinados e seus parentes próximos (VORA et al., 2008). Mas nessa situação, um ordenhador adquiriu a infecção dos animais no ambiente de trabalho, e a transmitiu ao seu filho em sua residência 20km distante do mesmo, sendo o vírus isolado e caracterizado filogeneticamente (OLIVEIRA et al., 2014). Ainda relacionado à transmissão intrafamiliar, em Setembro de 2012, na cidade de Serro – MG, um ordenhador com lesões em suas mãos foi diagnosticado molecular e sorologicamente positivo ao VACV, entretanto duas filhas que não manejavam ou mantinham qualquer contato com os animais, tampouco apresentavam sinais clínicos, apresentaram DNA viral em suas amostras de sangue, sugerindo outras vias de infecção, como fômites por exemplo (COSTA et al., 2015). Esses achados corroboram os resultados de um surto que afetou o município de Carangola – MG em 2011, onde um ordenhador com lesões em suas mãos supostamente se auto-inoculou em seu nariz, e houve positividade ao VACV em provas moleculares e de isolamento viral, não apenas de suas lesões, mas também de swab coletado de seu travesseiro, sugerindo que a alta carga viral de suas lesões contaminaram o ambiente, sendo esse uma possível fonte de infecção para pessoas que não desenvolvem atividades ocupacionais como ordenha ou manejo de rebanhos (ASSIS et al., 2013a).

Outro destaque merece o surto que afetou cavalos da raça crioulo no município de Pelotas no estado do Rio Grande do Sul, em fevereiro de 2008, onde 14 animais (nove éguas, quatro potros e um macho adulto castrado) apresentaram lesões nodulares que evoluíram para pústulas e estas para crostas, na região de focinho, narinas, e áreas internas e externas dos lábios (BRUM et al., 2010). Posteriormente, em 2009, amostras de biopsia da lesão de um desses animais foram enviadas ao laboratório de Vírus no Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, em Belo Horizonte, onde o isolamento viral e a caracterização molecular foram realizadas. Os resultados obtidos no isolamento viral demonstraram dois vírus distintos, nomeados como *Pelotas 1 vírus* (P1V) e *Pelotas 2 vírus* (P2V). A análise das

sequências de nucleotídeos dos genes *Ha*, B5R, B18R e E3L do P1V e P2V revelou diferenças que os coloca em grupos diferentes e reflete diferentes vias de evolução (CAMPOS et al., 2011).

O ano de 2008 foi marcado, ainda, pela propagação do CTGV para a região norte do país. Em setembro desse ano, no município de Muricilândia no estado do Tocantins, 15 bovinos de um rebanho de 356 cabeças, apresentaram quadro febril e lesões características de VACV nos tetos e úbere das vacas adultas e no muflo dos bezerros. Ordenhadores também reportaram quadro febril e lesões semelhantes à dos animais, nas mãos e pescoço. O isolamento viral e PCR demonstrou tratar-se de um surto causado pelo *Cantagalo virus* (CTGV). Dois meses depois, um novo surto afetando nove animais de uma propriedade no município de Santa Fé do Araguaia, 12km distante de Muricilândia, também revelou infecção pelo CTGV. Os autores atribuíram tal propagação à movimentação de pessoas e animais, que ocorre com maior frequência na região sul do estado, próximo à fronteira com o estado de Goiás, onde há relatos de ocorrência da doença. Entretanto, não há dados epidemiológicos que confirmem a correlação entre os surtos nos dois estados (MEDAGLIA et al., 2009).

A propagação do CTGV foi também observada em surtos investigados nos estados do Mato Grosso e Rondônia, entre 2008 e 2010. Um total de 52 amostras de crostas foram coletadas de vacas apresentando manifestações clínicas típicas em 23 fazendas distribuídas ao longo dos dois estados. Trinta e cinco amostras resultaram positivas na PCR e alta homologia ao CTGV foi observada no sequenciamento. As propriedades afetadas estão distribuídas ao longo da BR-363 que liga Mato Grosso a Rondônia, sugerindo que a movimentação animal ao longo dessa rodovia, deve ser a provável causa da disseminação do CTGV na região (QUIXABEIRA-SANTOS et al., 2011).

Nesse sentido, alta homologia a VACV isolados anteriormente foi observada por Megid e colaboradores (2012) em surtos que afetaram as cidades de Itatinga e Torre de Pedra no interior do estado de São Paulo, 2009 e 2010 respectivamente. Nessa ocasião, a análise filogenética das amostras coletadas demonstrou alta identidade do VACV envolvido nesses surtos com o ARAV e o CTGV. Torre de Pedra já havia sido afetada anteriormente por surtos (MEGID et

al., 2008), e Itatinga voltou a registrar surto em 2012, ocasião em que, além da confirmação molecular da infecção no rebanho e ordenadores, o DNA viral foi detectado em amostras de sangue de cães das propriedades e de gambas capturados nas áreas de mata das propriedades, sugerindo hipóteses sobre a possível atuação de cães e gambas na disseminação viral (PERES et al., 2016).

Embora os aspectos envolvidos na disseminação do VACV pelo Brasil ainda não estejam completamente elucidados, um estudo conduzido de Janeiro a Dezembro de 2011 em 22 municípios no estado da Bahia, analisou 52 surtos zoonóticos de VACV e verificou, através de análise epidemiológica, que 40% dos produtores afetados relataram comprar animais advindos do estado de Minas Gerais, e considerando os frequentes surtos afetando o referido estado, sugeriu-se que a introdução de um único animal doente proveniente de Minas Gerais, poderia ter contribuído para a disseminação viral por todo o estado da Bahia (ASSIS et al., 2015).

Outro aspecto inédito registrado em surto foi a severidade das manifestações clínicas em seres humanos. Abrahão e seus colaboradores (2015) descrevem surto no município de Doresópolis, MG, em 2010, onde observou-se além das lesões e sinais característicos (pápulas, pústulas, vesículas, crostas, dor local e irradiada, reação linfonodal, febre), convulsões, vômitos, diarreia e confusão mental. Após isolamento do agente nomeado VACV-DOR2010, as análises genéticas e de virulência não apresentaram nenhuma característica especial que justificasse a severidade dos quadros apresentados pelos ordenhadores (ABRAHÃO et al., 2015).

ANO	1999	1999	2000	2001	2001 - 2003	2002	2003	2005	2005	2005
Vírus isolado	Cantagalo Vírus (CTGV)	Araçatuba Vírus (ARAV)	Muriae Vírus (MURV)	Guarani P1 Vírus (GP1V) e Guarani P2 Vírus (GP2V)	VACV	VACV-SFI	Passatempo Vírus (PSTV)	Mariana Vírus (MARV)	Serro Vírus (S2V)	Co-infecção VACV e Parapoxvirus
Espécies afetadas	Vacas e humanos	Vacas e humanos	Vacas e humanos	Vacas e humanos	Vacas e humanos	Vacas e humanos (humano - humano)	Vacas e humanos	Vacas e humanos Positividade em <i>Mus musculus</i>	Vacas e humanos	Vacas e humanos
Municípios e Estado	Cidades de Cantagalo, Miracema e Santo Antonio de Padua Estado do Rio de Janeiro	Cidade de Araçatuba Estado de São Paulo	Cidade de Muriaé Estado de Minas Gerais	Cidade de Guarani Estado de Minas Gerais	Vale do Paraíba Estado de São Paulo e Vale de São Patrício Estado de Goiás	Cidade de São Francisco de Itabapoana Estado do Rio de Janeiro	Cidade de Passatempo Estado de Minas Gerais	Cidade de Mariana Estado de Minas Gerais	Cidade de Serro Estado de Minas Gerais	Cidade de Resplendor Estado de Minas Gerais
Referencia	Damaso et al., 2000	Trindade et al., 2003	Trindade et al., 2007b	Trindade et al., 2006	Nagasse-Sugahara et al., 2004	Oliveira et al., 2014	Leite et al., 2005	Abrahão et al., 2009a	Trindade et al., 2009	Abrahão et al., 2010b

Figura 7. Cronologia dos surtos no país

ANO	2007	2008	2008	2008 - 2010	2009	2009 e 2010	2010	2010	2011	2010 - 2012	2012
Vírus isolado	VACV	Pelotas 1 Vírus (P1V) e Pelotas 2 Vírus (P2V)	Cantagalo Vírus (CTGV)	Alta homologia ao Cantagalo Vírus (CTGV)	Maranhão Vírus (MRV)	Homologia ao ARAV e CTGV	Pará Vírus (PARV)	VACV – DOR2010	Mundo Novo Vírus (MUNV)	VACV	VACV
Espécies afetadas	Vacas e humanos	Cavalos da raça Crioulo	Vacas e humanos	Vacas	Vacas e humanos	Vacas e humanos	Vacas e humanos	Vacas e humanos	Vacas e humanos	Vacas e humanos	Vacas e humanos Positividade em cães e gambás
Municípios e Estado	Cidade de Guareí, Torre de Pedra Estado de São Paulo	Cidade de Pelotas Estado de Rio Grande do Sul	Cidade de Muricilandia, Santa Fé do Araguaia Estado do Tocantins	Estado do Mato Grosso e Rondonia	Cidade de Açailandia Estado do Maranhão	Cidade de Itatinga e Torre de Pedra Estado de São Paulo	Cidade de Bom Jesus do Tocantins Estado do Pará	Cidade de Dorésópolis Estado de Minas Gerais	22 municípios do Estado da Bahia	Cidades de Varjão, Buriti Alegre, São João da Paraúna, Pontalina, Edéia, Mineiros Estado de Goiás	Cidade de Itatinga Estado de São Paulo
Referencia	Megid et al., 2008	Brum et al., 2010 Campos et al., 2011	Medaglia et al., 2009	Quixabeira-Santos et al., 2011	Oliveira et al., 2013	Megid et al., 2012	Assis et al., 2013b	Abrahão et al., 2015	Assis et al., 2015	Sant'Ana et al., 2013	Peres et al., 2016

Figura 8. Cronologia dos surtos no país (Cont.)

2.3 Dicotomia genética e fenotípica

O achado mais importante sobre a diversidade dos *Vaccinia virus* brasileiros é uma nítida dicotomia genética e fenotípica entre eles (TRINDADE et al., 2007a; DRUMOND et al., 2008; FERREIRA et al., 2008a). Essa hipótese vem sendo confirmada por estudos do sequenciamento parcial desses vírus e por estudo da virulência *in vivo*. Nos últimos anos, diversos genes vem sendo usados para caracterizar os vírus isolados, como é o caso dos genes relacionados ao fator de crescimento viral (*VGF*), a timidina quinase (*TK*), ao corpúsculo de inclusão tipo A (*ATI*) e, o mais usado, o gene que codifica a hemaglutinina viral (*A56R*) (DAMASO et al., 2000; TRINDADE et al., 2003; LEITE et al., 2005; ABRAHÃO et al., 2009a). Esse gene é o mais estudado pois muitas variantes do VACV apresentam uma deleção de 18 nucleotídeos na posição 251, como é o caso do ARAV, CTGV, PSTV, GP2V, MURV, S2V, MARV, P2V, PARV, MRV, VACV-DOR2010, MUNV, enquanto que GP1V, BHV, P1V, BAV, SAV e SH2V/2011 não apresentam essa deleção (DAMASO et al., 2000; FONSECA et al., 2002; TRINDADE et al., 2003; TRINDADE et al., 2004; LEITE et al., 2005; ABRAHÃO et al., 2009a; ASSIS et al., 2012; ASSIS et al., 2013b; OLIVEIRA et al., 2013; ABRAHÃO et al., 2015; ASSIS et al., 2015). As análises filogenéticas das sequências do gene A56R mostram os vírus brasileiros divididos em dois grupos de acordo com o padrão de deleção dos 18 nucleotídeos (TRINDADE et al., 2007a; DRUMOND et al., 2008).

Essa dicotomia encontrada na análise filogenética do gene A56R pode ser estendida em nível biológico. Em estudo realizado por Ferreira e colaboradores (2008a), demonstrou-se que camundongos BALB/c inoculados por GP1V, BHV, BAV, SAV pela via intranasal apresentaram doença respiratória aguda seguida de morte, enquanto os inoculados por ARAV, GP2V e PSTV não apresentam nenhum sinal clínico. No entanto, nenhuma diferença na gravidade das infecções nos humanos e nos bovinos foi observada ou relatada nos surtos em que as amostras destes vírus foram coletados. Outro ensaio biológico em que camundongos BALB/c foram inoculados por via intranasal com P1V e P2V, corrobora os achados descrito por Ferreira e colaboradores (2008a). Os animais inoculados com P1V desenvolveram manifestações clínicas como pêlos

arrepiados, costas arqueadas, balanopostite e taxa de letalidade de 50%, enquanto os animais inoculados com P2V apresentaram letalidade de 0% e nenhuma manifestação clínica, demonstrando que P1V e P2V encontram-se em grupos de distinta virulência (CAMPOS et al., 2011).

Entretanto, Abrahão e colaboradores (2015) sugerem que o modelo de ensaio biológico com camundongos para verificar a virulência das variantes dos VACV circulantes no país, pode não representar o potencial de virulência nas infecções humanas. Ao analisarem amostras de um surto que afetou 12 trabalhadores rurais de Dorésópolis, MG, dos quais três apresentaram, além das manifestações clínicas características, convulsões, confusão mental, vômitos e diarreia, verificou-se pela filogenia do VACV-DOR2010, que o mesmo não apresenta alterações de nucleotídeos, além da deleção de 18 nucleotídeos característica dos vírus menos virulentos nos ensaios biológicos com camundongos. Verificando a virulência então por ensaio biológico, os camundongos inoculados com VACV-DOR201 não apresentaram sinais clínicos nem mortalidade, permanecendo inconclusivos os motivos da variação de gravidade nas manifestações clínicas humanas.

2.4 Origem dos vírus isolados

Alguns pesquisadores têm estudado a semelhança entre os vírus isolados ao longo dos anos no Brasil e aqueles usados durante a erradicação da varíola. Foi demonstrado por Drumond e colaboradores (2008) pelas análises do gene *A56R* que a amostra LISTER do Butantan não está diretamente agrupada com os VACV brasileiros. Embora a amostra vacinal PARIS do Instituto Oswaldo Cruz (IOC) apresente a mesma deleção de 18 nucleotídeos no gene *A56R*, ela também apresenta substituições de nucleotídeos em todo o gene que não são partilhadas pelos vírus brasileiros, o que faz com que não se agrupe aos mesmos. Assim evidências suportam que a origem e a história natural do VACV é distinta dos vírus vacinais usados no Brasil (TRINDADE et al., 2007a; DRUMOND et al., 2008).

Como se observa grande diversidade genética e fenotípica entre os vírus isolados possibilitando a separação filogenética das cepas vacinais usadas no

Brasil; a hipótese mais aceita quanto a origem do VACV no Brasil, supõe que existe uma população de amostras do VACV com diversidade genética e fenotípica que circula em uma população de reservatórios naturais ainda desconhecidos e, dependendo das condições biológicas e geográficas, podem ser transmitidas para vacas e humanos (TRINDADE et al., 2007a; DRUMOND et al., 2008; FERREIRA et al., 2008a).

Em tese, cada um dos vírus isolados nos surtos é o resultado de uma nova introdução de vírus, a partir de um reservatório selvagem, para populações bovinas e humanas, o que provavelmente está relacionada com a intensificação das atividades antropogênicas (ABRAHÃO et al., 2009a). Distúrbios antropogênicos como desmatamento e fragmentação de habitats, aumentam o contato da vida selvagem com as populações rurais, alteram os padrões de diversidade e abundância de espécies, o que influencia na dinâmica natural de ciclos silvestres de agentes infecciosos (BRADLEY; ALTIZER, 2006). Mills (2006) destacou a relação entre a perda da biodiversidade e a emergência de doenças infecciosas, nas quais as alterações nos habitats favorecem poucas espécies, e caso essas sejam as mais competentes na transmissão de patógenos, haverá maior eficiência de transmissão, aumento das taxas de prevalência entre reservatórios, e maior risco de transmissão aos humanos. Como consequência, zoonoses epidêmicas, incluindo VACV, podem emergir (KROON et al., 2011).

2.5 Modelo de transmissão

A maioria dos surtos ocorre na época da seca quando há escassez da oferta de alimentos, o que leva alguns animais selvagens a procurarem alimentos nas áreas próximas a habitats humanos e currais (ASSIS et al., 2015). Ratos, camundongos, gambás, raposas, cachorros e gatos selvagens são frequentemente avistados no entorno das propriedades onde ocorrem os surtos (ABRAHÃO et al., 2009a). Sugere-se que, essas espécies, particularmente os roedores, possam ser os reservatórios (KROON et al., 2011).

Um modelo de transmissão hipotético vem sendo sugerido, desde o isolamento do MARV em camundongo da espécie *Mus musculus* (ABRAHÃO et

al., 2009a). Neste modelo, roedores peridomésticos atuam como uma conexão entre os animais selvagens e os animais domésticos na área rural (Figura 9). O roedor peridoméstico pode se infectar a partir de um animal selvagem nos arredores da propriedade, pelas disputas por território, aspiração ou ingestão de excrementos contendo partículas virais, consumo de carcaça contaminada ou consumo de comida contendo saliva de um animal infectado. Alguns desses roedores peridomésticos retornariam para a propriedade, introduzindo o VACV dentro da população de bovinos e humanos pelo contato direto ou excreções. Os roedores peridomésticos também podem se tornar infectados após contato com fragmento de crostas dos bovinos ou humanos, ou leite contaminado, excrementos ou fômites (ABRAHÃO et al., 2009a).

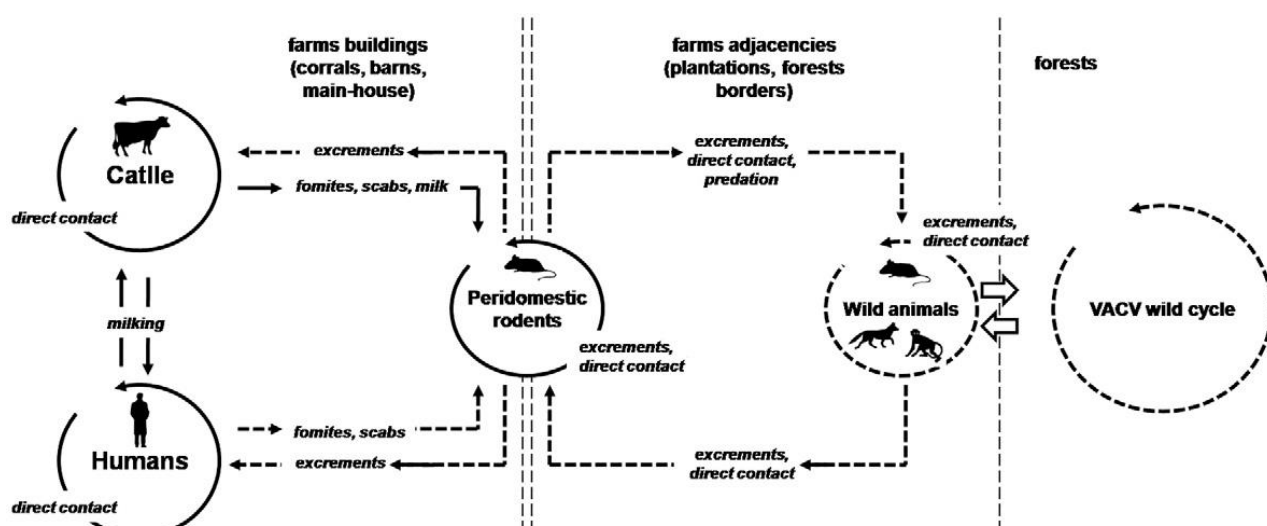


Figura 9. Modelo de transmissão (fonte: Abrahão et al., 2009a)

Essa hipótese foi corroborada por dois estudos recentes que demonstraram a transmissão de VACV respectivamente, para camundongos BALB/c expostos a fezes de vacas experimentalmente infectadas por GP2V, e para camundongos BALB/c inoculados pela via oral com leite experimentalmente contaminado com o mesmo vírus (D'ANUNCIAÇÃO et al., 2012; REHFELD et al., 2015). No primeiro estudo, partículas virais infecciosas foram detectadas nas fezes dos camundongos expostos, bem como DNA viral nas fezes e no sangue dos mesmos, porém sinais clínicos não foram observados, sendo tal fato relacionado a baixa virulência dos VACV classificados no grupo 2

(D'ANUNCIÇÃO et al., 2012). Igualmente, no segundo estudo, os camundongos inoculados adquiriram a infecção, sem manifestar nenhum sinal clínico, sendo possível a detecção de DNA viral em fezes, sangue, swab oral e órgãos, embora nenhuma partícula viral infecciosa tenha sido detectada no isolamento viral em BSC-40 das mesmas amostras (REHFELD et al., 2015).

Ainda, segundo o modelo de transmissão (Abrahão et al., 2009a), os roedores peridomésticos infectados podem disseminar VACV para os animais silvestres quando são predados, pela ingestão de suas fezes ou carcaças, ou durante brigas. Em um estudo realizado por Abrahão e colaboradores (2009d) foi observado que camundongos BALB/c inoculados pela via intranasal com VACV-WR, GP1V, GP2V e BAV, eliminaram partículas virais em suas fezes por até 20 dias após infecção, enquanto o DNA viral foi encontrado por até 60 dias, confirmando a longa duração de VACV nas fezes murinas expostas a condições ambientais. Ferreira e colaboradores (2008b) demonstraram que camundongos BALB/c não infectados (sentinelas) expostos a fezes e urina de camundongos BALB/c experimentalmente infectados pela via intranasal com VACV-WR e GP2V, não apresentam sinais clínicos, mas disseminam DNA viral e partículas virais viáveis em suas fezes, sugerindo infecção subclínica e suscitando importantes questões relacionadas a circulação e manutenção viral entre os roedores peridomésticos e silvestres. Embora menos provável, a hipótese de transmissão direta entre animais silvestres e animais domésticos/humanos não pode ser excluída (FERREIRA et al., 2008b; ABRAHÃO et al., 2009d; PERES et al., 2016).

Em estudo sorológico realizado entre fevereiro de 2001 a setembro de 2002, 269 macacos-prego (*Cebus apella*), 27 bugius (*Allouata caraya*), 12 quatis (*Nasua nasua*), 20 cotias (*Dasyprocta sp*), dois gambás-de-orelha-branca (*Didelphis albiventris*), cinco tatus-peba (*Euphractus sexcinctus*), cinco tamanduás-mirim (*Tamandua tetradactyla*) e quatro cachorros-do-mato (*Cerdocyon thous*) foram capturados em um programa de resgate de fauna durante a construção de uma hidrelétrica nas cidades de Lajeado e Ipueiras no estado do Tocantins. Nos ensaios de soroneutralização foram encontrados anticorpos para *Orthopoxvirus* (OPV) em 68 macacos-prego (*Cebus apella*), 13

bugius (*Alouatta caraya*), dois quatis (*Nasua nasua*) e uma cotia (*Dasyprocta sp.*). Das 344 amostras submetidas a PCR, 18 apresentaram resultados positivos, sendo 11 macacos-prego (*Cebus apella*) e sete bugius (*Alouatta caraya*) sabidamente positivos nos ensaios de soroneutralização (ABRAHÃO et al., 2010c).

Estudo epidemiológico conduzido por Peres e colaboradores (2013), demonstrou baixa prevalência de anticorpos para OPV em roedores silvestres da região centro oeste do Estado de São Paulo. Em contrapartida alta soroprevalência foi demonstrada em cães, questionando seu possível envolvimento na disseminação viral. Outro achado interessante foi descrito por Peres e colaboradores (2016) durante surto afetando rebanhos e ordenadores na cidade de Itatinga, SP, onde DNA viral foi detectado em amostras de sangue coletadas de 3 cães e 3 gambás (*Didelphis albiventris*) capturados nas áreas de mata das propriedades afetadas, porém 2 roedores silvestres (*Akodon montensis* e *Nectomys squamipes*) foram negativos.

Nesse sentido os mecanismos e espécies envolvidos na transmissão do VACV aos rebanhos bovinos continuam não totalmente esclarecidos, não podendo ser descartada a atuação de roedores e outras espécies de mamíferos, domésticos ou selvagens.

CAPÍTULO 2 – TRABALHO CIENTÍFICO

Trabalho submetido à revista Emerging Infectious Diseases. Normas disponíveis em: <http://wwwnc.cdc.gov/eid/page/manuscript-preparation>

Title: *Vaccinia virus* in feces of wild rodents from São Paulo State, Brazil

Authors: Marina G. Peres, Thais S. Bacchiega, Camila M. Appolinário, Acácia F.

Vicente, Mateus S. R. Mioni, Bruna L. D. Ribeiro, Clóvis R. S. Fonseca, Vanessa C.

Pelícia, Jônatas S. Abrahão, Fernando Ferreira, Jane Megid*

Affiliations:

UNESP - Univ. Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia¹, Botucatu, Brazil (M. Peres, T. Bacchiega, C. Appolinário, A. Vicente, M. Mioni, B. Ribeiro, C. Fonseca, V. Pelícia, J. Megid)

USP – Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo, Brazil (F. Ferreira)

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciencias Biológicas, Belo Horizonte, Brazil (J. Abrahão)

¹ Institution at which the work was performed:

***Corresponding author:** Jane Megid, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP – Univ. Estadual Paulista, Distrito de Rubião Júnior s/n, Botucatu-São Paulo, Brasil. Cep: 18618-970; email: jane@fmvz.unesp.br

Word counts:

Abstract: 138

Text: 2122

Article summary line: Detection of *Vaccinia virus* DNA in feces of wild rodents

Key words: VACV, epidemiology, transmission, public health, wild animals, PCR

Abstract

The origin of *Vaccinia virus* (VACV) outbreaks in Brazil remains unknown, but since the isolation of VACV in *Mus musculus* mice during a zoonotic outbreak that peridomestic rodents have been suggested to be a link between cows and wild animals. Considering that experimentally infected mice eliminate viral particles in their feces, we investigated the presence of VACV in the feces and urine of wild rodents that were captured in the forest areas surrounding milking farms in the central west region of São Paulo State. For the first time, this work reports the detection of VACV by PCR in the feces of naturally infected *Oligoryzomys flavescens*, *Oligoryzomys nigripes* and *Sooretamys angouya*, and in the urine of *Oligoryzomys flavescens*, which raises important questions about the spread of VACV by rodent feces and its potential to induce clinical infections in cows.

Introduction

Vaccinia virus (VACV) is a prototype of the *Orthopoxvirus* genus (OPV) that has been the causal agent of emergent exanthematous zoonotic outbreaks in Brazil over the past decade (1,2,3,4). The emergence of human cases of VACV infection may be related to the end of the intensive vaccination campaign promoted by the World Health Organization (WHO) in 1980, but the origin of the outbreak in cattle remains unknown (5, 6).

A hypothetical transmission model has been suggested following the isolation of VACV from *Mus musculus* mice during a zoonotic outbreak (7). In this model, peridomestic rodents act as a connection between wildlife and domestic animals in rural areas (7). In Europe, wild and peridomestic rodents are known to act as reservoirs of cowpox (4), but in Brazil, the role of these rodents as VACV reservoirs remains unclear. Although mice that are experimentally infected eliminate viable viral particles in their

feces (8, 9), transmission to cows through contact with rodent feces has not been established during any of the Brazilian outbreaks.

In the present study, we assessed the presence of VACV in fecal and urine samples from wild rodents captured in forest areas surrounding milking farms in areas with and without histories of VACV zoonotic outbreaks.

Materials and Methods

Animal Ethics Statements

This study was approved by Ethical Committee of Animals Uses in Veterinary Medicine and Animal Production UNESP, Botucatu, São Paulo (number 114/2015-CEUA), the Brazilian Institute of Renewable Environment and Natural Resources (IBAMA) of the Environment Ministry (MMA), the Chico Mendes Biodiversity Conservation Institute (ICMBio), and the Biodiversity Information and Authorization System (SISBIO) for wild rodent capture under the number 23918-1.

Site sampling

Samples were collected in three counties in the central west region of São Paulo State with and without histories of VACV zoonotic outbreaks, i.e., Torre de Pedra ($23^{\circ}14'58.76''\text{S}48^{\circ}11'39.49''\text{W}$) in which outbreaks were registered in 2007 and 2010 (10, 11) and Bofete ($23^{\circ}05'54.51''\text{S}48^{\circ}11'26.61''\text{W}$) and Anhembi ($23^{\circ}05'54.51''\text{S}48^{\circ}11'26.61''\text{W}$) in which histories of outbreaks are unknown (Figure 1).

The total number of farms included in the study was calculated based on the populations of the farms in the three counties, a 5% prevalence of positive farms (at least one positive sample), and a 5% margin of error using Epi Info 3.5.4. Forty-seven farms were randomly selected, including 10 in Torre de Pedra, 15 in Bofete, and 22 in Anhembi (Figure 1)

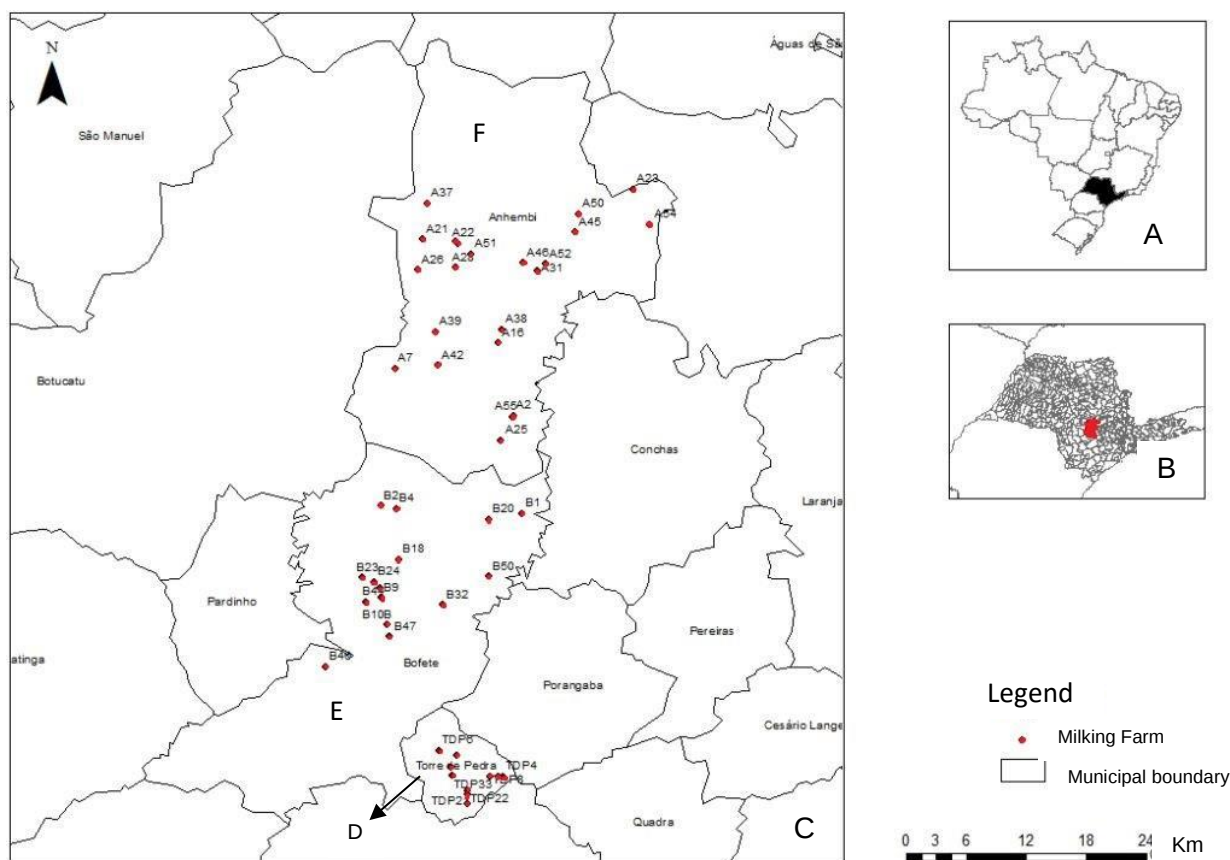


Figure 1. Map of the sampling sites in Brazil (A) with São Paulo State shown in black. São Paulo state map (B) with Torre de Pedra, Bofete and Anhembi in red. Map of São Paulo State (C) showing the sampling sites; the points in red correspond to the farms in Torre de Pedra (D), Bofete (E) and Anhembi (F). Source: Peres et al., 2013 (13).

Wild rodent capture

Wild rodents were captured from May to September of 2011 on 47 milking farms in the three counties (Figure 1). Pitfall and Sherman traps were used for wild rodent capture, and peanut cream, canned sardines, cornmeal and oatmeal were used as bait. Five trap nights were required to capture animals in each of the native forest areas (consisting of a transitional Atlantic Forest and Cerrado) surrounding each milking farm. Due to the risk of exposure to infectious diseases related to rodents, such as *Hantavirus*, all procedures were performed following safe procedures. Positive pressure masks with HEPA filters and triple glove layers were used during the procedures for

checking the Sherman and Pitfall traps. Rodents in the Pitfall traps were removed and placed in plastic boxes for transport to the site of sample collection, and the Sherman traps containing rodents were transported to the site of sample collection.

Wild rodent sample collection

The personal protective equipment (PPE) consisted of a waterproof polypropylene disposable apron, two pairs of procedure gloves, rubber boots and a motorized respiratory set containing a Tyvex-type cap, a trachea, a motor and a HEPA filter was used during the collection of the wild rodent samples. The rodents were anesthetized in plastic autoclavable bags containing gauze soaked in ethyl ether. Blood samples were collected by cardiac puncture, and if death did not occur after the puncture, they were euthanized through the deepening of the anesthetic plan. The organs, feces and urine were collected (feces directly from the final portion of the intestine, and urine by puncturing the urinary bladder with insulin needle), placed into microtubes and stored at -80° C until the polymerase chain reaction (PCR) assays.

Polymerase Chain Reaction (PCR), Sequencing and Phylogenetic Analysis

The PPE described for the wild rodent sample collection was also used during the viral DNA extraction from the feces and urine samples, and these steps were performed in a laminar flow hood.

Viral DNA was extracted using the RTP[®] DNA/RNA Virus Mini Kit (Strattec Molecular, Berlin, Germany). A nested PCR was used for the amplification of the vaccinia growth factor (*vgf*) gene (12), and positive samples were submitted to gene sequencing. A phylogenetic tree was constructed using the neighbor-joining method, the Tamura-3 model of nucleotide substitutions and a bootstrap of 1,000 replicates in MEGA 7.0.

Results

Wild rodent capture and sample collection

A total of 138 wild rodents of the following species were captured: *Akodon montensis*, *Calomys tener*, *Juliomys pictipes*, *Necomys lasiurus*, *Nectomys squamipes*, *Oligoryzomys flavescens*, *Oligoryzomys nigripes*, and *Sooretamys angouya* (Table 1). Fecal samples were collected from 115 animals, and urine samples were also collected from 55 animals (Table 1). For some animals, fecal and/or urine sample collection was not possible due to the absence of intestinal content and/or empty urinary bladders. The most sampled species was *Oligoryzomys nigripes* (54%) following by *Oligoryzomys flavescens* (22%) and *Sooretamys angouya* (10%) (Table 1). The numbers of analyzed fecal and urine samples were also highest for these species (Table 1).

Table 1. Wild rodent species captured and clinical samples analyzed to presence of VACV in Brazil.

Species	Captured		Analyzed samples			
			Feces		Urine	
	n	(%)*	n	(%)*	n	(%)*
<i>J. pictipes</i>	1	(0.7)	0	(0.0)	0	(0.0)
<i>N. lasiurus</i>	1	(0.7)	1	(0.9)	1	(1.8)
<i>C. tener</i>	4	(2.9)	4	(3.5)	1	(1.8)
<i>N. squamipes</i>	4	(2.9)	3	(2.6)	2	(3.6)
<i>A. montensis</i>	8	(5.8)	6	(5.2)	2	(3.6)
<i>S. agouya</i>	14	(10.1)	14	(12.2)	9	(16.4)
<i>O. flavescens</i>	31	(22.5)	24	(20.9)	11	(20.0)
<i>O. nigripes</i>	75	(54.3)	63	(54.8)	29	(52.7)
TOTAL	138	(100.0)	115	(83.3)	55	(39.8)

* Percentages calculated over the total numbers of samples

Polymerase Chain Reaction (PCR) and Sequencing

Among the 115 analyzed fecal samples, six (5.2%) were positive for vaccinia growth factor (*vgf*) gene amplification by nested PCR, including three samples from Anhembi (4%) and three from Bofete (8%); however, only one of the positive samples was sequenced due to the low DNA concentration of the other five were not sufficient for sequencing (Table 2). The percentages of positivity of the fecal samples from the different species were 14% for *Sooretamys anougaya*, 8% for *Oligoryzomys flavescens*, and 4% for *Oligoryzomys nigripes*. According to county, the highest rates of positivity were observed in *Oligoryzomys flavescens* from Bofete (22%) and *Sooretamys angouya* from Anhembi (15%) (Table 2).

Table 2. Distributions of wild rodent fecal samples according to municipality and VACV positivity in Brazil.

Species	Anhembi		Bofete		Torre de Pedra		TOTAL	
	n	Positive (%)	N	Positive (%)	n	Positive (%)	n	Positive (%)
<i>N. lasiurus</i>	0	0 (0.0)	1	0 (0.0)	0	0 (0.0)	1	0 (0.0)
<i>N. squamipes</i>	2	0 (0.0)	1	0 (0.0)	0	0 (0.0)	3	0 (0.0)
<i>C. tener</i>	2	0 (0.0)	2	0 (0.0)	0	0 (0.0)	4	0 (0.0)
<i>A. montensis</i>	0	0 (0.0)	6	0 (0.0)	0	0 (0.0)	6	0 (0.0)
<i>S. agouya</i>	13	2 (15.4)	1	0 (0.0)	0	0 (0.0)	14	2 (14.3)
<i>O. flavescens</i>	14	0 (0.0)	9	2 (22.2)	1	0 (0.0)	24	2 (8.3)
<i>O. nigripes</i>	42	1* (2.3)	18	1 (5.5)	3	0(0.0)	63	2 (3.7)
TOTAL	73	3 (4.1)	38	3 (7.9)	4	0 (0.0)	115	6 (5.2)

* Sequenced sample

Among the 55 analyzed urine samples, only one (1.8%) was positive and was not sequenced due to the low DNA concentration (Table 3). The only species with a positive urine sample was *Oligoryzomys flavescens* (9%) from Anhembi (14%). All wild rodents sampled in the present study were previous tested for detection of neutralizing antibodies against *Orthopoxvirus* (13). The simultaneous detection of

VACV DNA in the feces and neutralizing antibodies against *Orthopoxvirus* (OPV) were observed in two *Oligoryzomys flavescens* from Bofete (Table 3).

Table 3. Correlation between detection of VACV DNA in fecal samples and previous seropositivity (SN) in the same sampled wild rodents (13).

Species	Anhembi			Bofete			Torre de Pedra			TOTAL		
	n	Positive		n	Positive		n	Positive		n	Positive	
		DNA	SN ¹		DNA	SN ¹		DNA	SN ¹		DNA	SN ¹
<i>N. lasiurus</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
<i>N. squamipes</i>	2	0	0	1	0	0	0	0	0	3	0	0
<i>C. tener</i>	2	0	0	2	0	0	0	0	0	4	0	0
<i>A. montensis</i>	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0	0
<i>S. agouya</i>	13	2	2	1	0	0	0	0	0	14	2	2
<i>O. flavescens</i>	14	0	1	9	2*	2*	1	0	0	24	2	3
<i>O. nigripes</i>	42	1	2	18	1	2	3	0	0	63	2	4
TOTAL	73	3	5	38	3	4	4	0	0	115	6	9

DNA = positive fecal samples for detection of VACV DNA by PCR

SN = positive serum samples for detection of Neutralizing Antibodies by Plaque Reduction Neutralizing Test (PRNT) previous observed in the same sampled wild rodents (13)

¹ Data from previous serologic study (13)

* Wild rodents both positive, PCR and PRNT

Phylogenetic Analysis

The sequencing and phylogenetic tree based on the orthopoxvirus nucleotide sequence of the *vgf* gene revealed that our strain (Sample) clustered with the Brazilian VACVs (i.e., TOa, TOb, Passatempo, MURV, GP1V, GP2V, and DMTV2005) and vaccine VACVs (i.e., Lc16m2, WR, and Lister), which characterized it as a *Vaccinia virus*. (Figure 2); however, the *vgf* gene exhibited nucleotide polymorphisms that indicated it was not completely similarity to the clustered VACV (Figure 3).

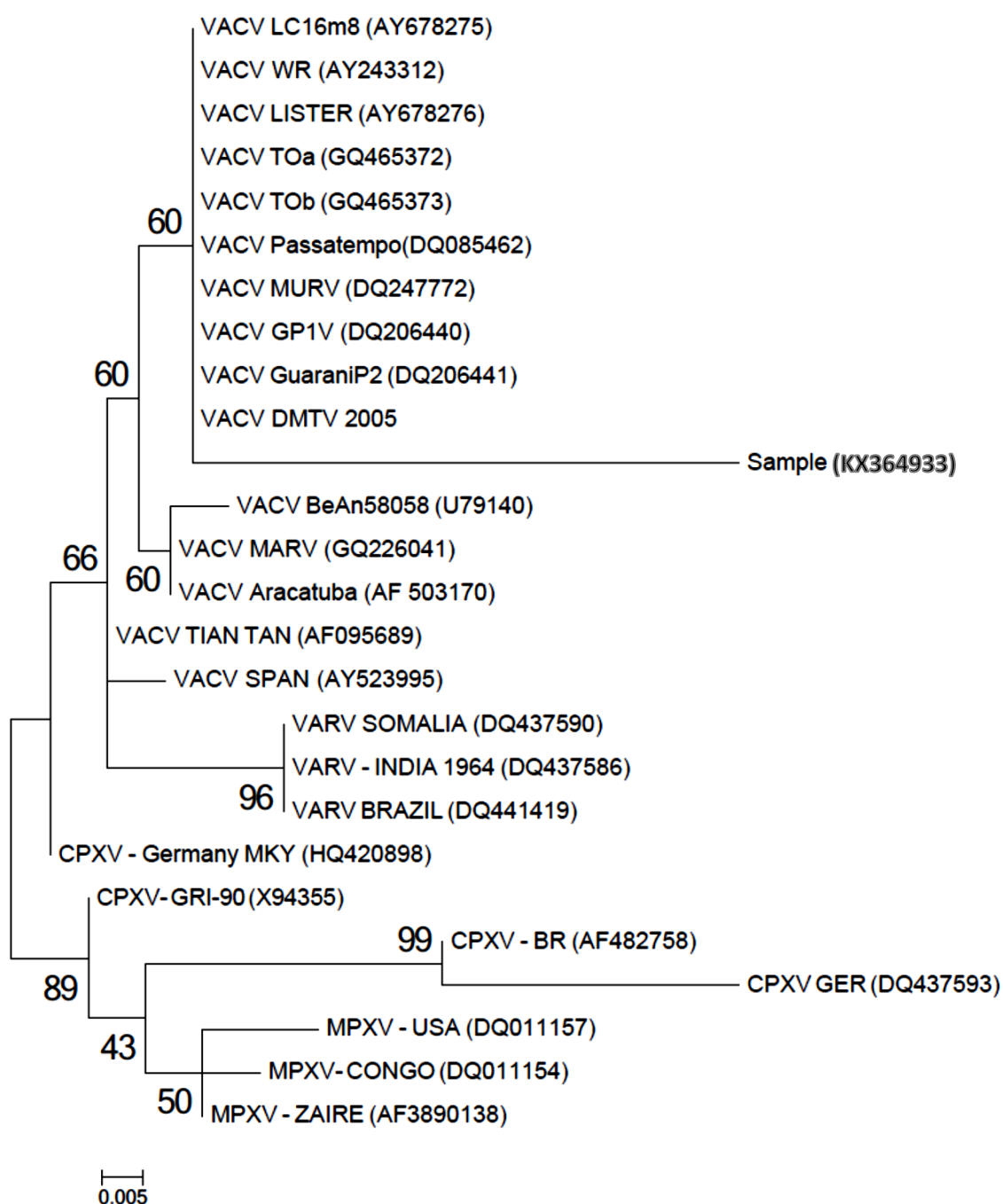


Figure 2. Phylogenetic tree based on the OPV nucleotide sequence of the *vgf* gene showing the rodent strain (Sample) cluster.

VACV_GuaraniP2_(DQ206441)	ACA	CGG	TGA	CTG	TAT	CCA	CGC	TAG	AGA	TAT	TGA	CGG	TAT	GTA	TTG	TAG	ATG	CTC	TCA	TGG	TTA	TAC	AGG	CAT	TAG	ATG
VACV_DMTV_2005	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
SAMPLE																										
VACV_MARV_(GQ226041)	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
VACV_GP1V_(DQ206440)	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
VACV_MURV_(DQ247772)	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
VACV_Aracatuba_(AF_503170)	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
VACV_Passatempo(DQ085462)	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
VACV_BeAn58058_(U79140)	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
VACV_Tob_(GQ465373)	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
VACV_Toa_(GQ465372)	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
VACV_SPAN_(AY523995)	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
VACV_LISTER_(AY678276)	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
VACV_TIAN_TAN_(AF095689)	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
VACV_LC16m8_(AY678275)	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
VACV_WR_(AY243312)	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
CPXV_-BR_(AF482758)	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	C..	...	...	...	...	...	...	..T	...	...	..T	T..	T..	T..	T..	T..
CPXV_-GRI-90_(X94355)	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	C..	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
CPXV_-Germany_MKY_(HQ420898)	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	C..	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
CPXV_GER_(DQ437593)	...	...	C..	...	...	...	...	...	...	...	C..	T..	...	...	...	...	...	T..A	...	...	..T	T..	T..	T..	T..	T..
MPXV_-CONGO_(DQ011154)	...	...	...	...	...	A..	...	...	...	...	C..	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
MPXV_-ZAIRE_(AF3890138)	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	C..	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
MPXV_-USA_(DQ011157)	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	C..	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	T..
VARV_SOMALIA_(DQ437590)	T..	...	..AT	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
VARV_-INDIA_1964_(DQ437586)	T..	...	..AT	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
VARV_BRAZIL_(DQ441419)	T..	...	..AT	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
VACV_GuaraniP2_(DQ206441)	TCA	GCA	TGT	AGT	ATT	AGT	AGA	CTA	TCA	ACG	TTC	AGA	AAA	CCC	AAA	CAC	TAC	AAC	GTC	ATA	TAT	CCC	ATC			
VACV_DMTV_2005	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
SAMPLE																										
VACV_MARV_(GQ226041)	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..-	...	...	...	...	..-	...	...	TCA	..G	ACC	...	..A	...	...	...
VACV_GP1V_(DQ206440)	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
VACV_MURV_(DQ247772)	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
VACV_Aracatuba_(AF_503170)	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
VACV_Passatempo(DQ085462)	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
VACV_BeAn58058_(U79140)	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
VACV_Tob_(GQ465373)	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
VACV_Toa_(GQ465372)	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
VACV_SPAN_(AY523995)	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..C-	...	...	G..	A..	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
VACV_LISTER_(AY678276)	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
VACV_TIAN_TAN_(AF095689)	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
VACV_LC16m8_(AY678275)	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
VACV_WR_(AY243312)	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
CPXV_-BR_(AF482758)	...	...	..A.	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..A.	..G.	...	...	...	..A.	...	...	...	...	...	...	...
CPXV_-GRI-90_(X94355)	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..A.	..G.	...	...	...	..A.	...	...	...	...	...	...	...
CPXV_-Germany_MKY_(HQ420898)	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..A.	...	...	...	...	..A.	...	...	...	...	...	...	...
CPXV_GER_(DQ437593)	...	...	..A.	...	...	...	..G	...	...	...	...	...	...	..A.	..G.	...	...	...	..A.	...	...	...	...	...	...	...
MPXV_-CONGO_(DQ011154)	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..G	...	...	..A.	..G.	...	...	...	..A.	...	...	...	...	...	...	...
MPXV_-ZAIRE_(AF3890138)	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..G	...	...	..A.	..G.	...	...	...	..A.	...	...	...	...	...	...	...
MPXV_-USA_(DQ011157)	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..G	...	...	..A.	..G.	T..	...	...	..A.	...	...	...	...	...	...	...
VARV_SOMALIA_(DQ437590)	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..A.	...	...	...	...	..A.	...	...	...	...	...	...	...
VARV_-INDIA_1964_(DQ437586)	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..A.	...	...	...	...	..A.	...	...	...	...	...	...	...
VARV_BRAZIL_(DQ441419)	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..A.	...	...	...	...	..A.	...	...	...	...	...	...	...

Figure 3. Alignment of the rodent strain (SAMPLE) sequences showing the polymorphism in red.

Discussion

To the best of our knowledge, we have reported for the first time the detection of *Vaccinia virus* by PCR in the feces of naturally infected *Oligoryzomys flavescens*, *Oligoryzomys nigripes* and *Sooretamys angouya* and in the urine of *Oligoryzomys flavescens*, captured in forest areas surrounding milk farms in the central west region of São Paulo State. These findings agree with the results of previous studies in which mice that were experimentally infected with VACV were able to eliminate viral particles in their feces and urine (8).

The presences of VACV in 5.2% of the fecal samples and 1,8% of the urine samples analyzed are low and corroborate previous serologic findings that demonstrated

8,7% seropositivity in the same animals studied (13). Only two positive wild rodents (*Oligoryzomys flavescens*) have previously exhibited the presence of antibodies against orthopoxviruses. The absence of positive wild rodents in Torre de Pedra, which is a county with a history of official reports of VACV zoonotic outbreaks (10, 11), is also in accordance with the absence of seropositivity in wild rodents from this region (13). In contrast, Anhembí and Bofete, both cities without histories of VACV zoonotic outbreak, presented positive PCR results, and these findings accord with previous seropositivities observed in wild rodents sampled from these counties (13).

These results allow us to question the epidemiological influence of viral shedding in the feces of wild rodents in terms of the transmission of VACV to cattle. Long-lasting stabilities of VACV strains in the feces of experimentally infected BALB/c mice have been demonstrated (9), and the transmission of VACV via the feces of experimentally infected cows to mice has previously been described (14). However, transmission from the feces of experimentally infected mice has been described only for exposed sentinel BALB/c mice (8). A peridomestic rodent (*Mus musculus*) was once found to be positive for VACV during a zoonotic outbreak (7), but no wild rodent species have been positively diagnosed during VACV outbreaks. *Mus musculus* is an Old World species that was introduced to Brazil (15). In Europe, among other peridomestic species, such as *Rattus rattus* and *Rattus norvegicus*, this species acts as a natural reservoir of Cowpox virus (CPXV) (4, 16). In recent years, cases of CPXV transmission from pet rats (*Rattus norvegicus*) to pet owners, from rats to other pet animals and from these pets to pet owners have been described. Nevertheless, in these cases, the involved animals all became sick and died, and transmission occurred via direct contact between humans and the animals' lesions (17, 18). Indeed, the, transmission of VACV via the feces of experimentally infected mice to cows has not yet

been described, and no cases of rodent-to-cow or rodent-to-human VACV transmission have been reported during the Brazilian outbreaks.

Another relevant finding from an investigation of the spread of VACV via murine feces is that sentinel BALB/c mice that are naturally infected by direct contact with the feces of experimentally infected mice do not exhibit any clinical signs independent of whether group I or group II VACVs are examined, which suggests that these mice experience subclinical infections (8). Similar observations have been made with BALB/c mice that have been exposed to the feces of experimentally infected cows (14). Taking these findings into account, along with the facts that both VACV and CPXV are transmitted by direct contact with lesions, questions are arisen concerning whether the low viral loads eliminated in the feces are able to infect and produce disease in cattle.

We use the amplification of *vgf* gene as to screen for positive wild rodents due to high sensitivity of this PCR reaction (12). Among the six positive samples, the DNA concentration of one was of sufficient quality for sequencing, whereas the DNA concentration of the other five were not. We ascribe the low DNA concentration to low viral loads in the feces. Therefore, it is quite likely that these animals were in a subclinical infection stage because they did not exhibit clinical signs, and the viral loads eliminated in their feces were low. Thus, these animals may not be capable of transmitting sufficient viral loads to induce clinical infection in cattle. Although not mentioned in the materials and methods, we attempted to classify the VACV in one of two groups of Brazilian VACVs according to the deletion of amino acids A56R in the gene that encodes the viral hemagglutinin (*ha* gene). Thus, all samples were also tested for the amplification of the *ha* gene according to the methods of Damaso et al (19), but these tests were not successful. This protocol is less sensitive and does not detect low

viral loads, which reinforces our hypothesis that the viral loads eliminated in the sampled feces were low.

Interestingly, during a zoonotic outbreak in São Paulo State, three dogs and three opossums (*Didelphis albiventris*) without characteristic clinical signs were found to be positive for VACV by PCR among all of the tested blood samples, but no positive wild rodent (*Akodon montensis* and *Nectomys squamipes*) samples were found (20). These findings are similar to those of a previous serologic study in which a high prevalence of antibodies against *Orthopoxvirus* (OPV) was detected in dogs without clinical signs, which suggest their involvement in the spread of VACV (13). Other wild species, such as capuchin monkeys (*Cebus paella*) and howler monkeys (*Alouata carya*), have been found to be positive in serological and molecular tests without presenting clinical signs (21). Thus, the involvement of rodents in the spread of VACV and the involvements of other mammalian species both domestic and wild require further study.

Our study detected VACV DNA in wild rodent feces and raises important questions about the spread of *Vaccinia virus* by rodent feces and its potential to induce clinical infections in cows. Additional studies are needed to further elucidate this epidemiologic situation.

Acknowledgment: We thank Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) for financial support. We specially thank Adriana Cortez and Marcos Brian Heinemann for technical support.

Biographical sketch: Ms. Peres is PhD student at the Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, São Paulo, Brazil. Her research interests are zoonotic and infectious diseases of wild and domestic animals.

References

1. Damaso CR, Esposito JJ, Condit RC, Moussatché N. An emergente poxvirus from Humans and Cattle in Rio de Janeiro State: Cantagalo virus may derive from Brazilian smallpox vaccine. *Virology*. 2000;277: 439-49.
2. Leite JA, Drumond BP, Trindade GS, Lobato ZIP, da Fonseca FG, dos Santos JR, Madureira MC, Guedes MIC. Passatempo Virus, a Vaccinia Virus Strain, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*. 2005;11(12).
3. Assis FL, Vinhote WM, Barbosa JD, Oliveira CHS, Oliveira CMG, Campos KF, Silva NS, Trindade GS, Abrahão JS, Kroon EG. Reemergence of Vaccinia virus during zoonotic outbreak, Pará State, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*. 2013;19: 2017-20.
4. Essbauer S, Pfeffer M, Meyer H. Zoonotic poxviruses. *Veterinary Microbiology*. 2010;140:229-236.
5. Oliveira DB, Assis FL, Feereira PCP, Bonjardim CA, Trindade GS, Kroon EG, Abrahão JS. Short Report: Group 1 Vaccinia virus zoonotic outbreak in Maranhão State, Brazil. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2013;89: 1142-45.
6. Abrahão JS, Campos RK, Trindade GS, Fonseca FG, Ferreira PCP, Kroon EG. Outbreak of severe zoonotic Vaccinia virus infection, Southeastern Brazil. *Emerging Infectious Diseases*. 2015;21: 695-98.
7. Abrahão JS, Guedes MIM, Trindade GS, Fonseca FG, Campor RK, Mota BF, Lobato ZIP, Silva-Fernandes AT, Rodrigues GOL, Lima LS, Ferreira PCP, Bonjardim CA, Kroon EG. One more piece in the VACV ecological puzzle: Could peridomestic rodents be the link between wildlife and bovine vaccinia outbreaks in Brazil? *Plos One*. 2009;4: e7428.

8. Ferreira JMS, Abrahão JS, Drumond BP, Oliveira FM, Alves PA, Pascoal-Xavier MA, Lobato ZIP, Bonjardim CA, Ferreira PCP, Kroon EG. Vaccinia vírus: shedding and horizontal transmission in a murine model. *Journal of General Virology*. 2008;8: 2986-91.
9. Abrahão JS, Trindde GS, Ferreira JMS, Campos RK, Bonjardim CA, Ferreira PCP, Kroon EG. Long-lasting stability of Vaccinia virus strains in murine feces: implications for virus circulation and environmental maintenance. *Archives of virology*. 2009;154: 1551-53.
10. Megid J, Appolinário CM, Langoni H, Pituco EM, Okuda LH. Short Report: Vaccinia virus in humans and cattle in southwest region of São Paulo State, Brazil. 2008;79: 647-51.
11. Megid J, Borges IA, Abrahão JS, Trindade GS, Appolinário CM, Ribeiro MG, Allendorf SD, Antunes JMAP, Silva-Fernandes AT, Kroon EG. Vaccinia Virus, Zoonotic Infection, São Paulo State, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*. 2012; 18: 189-91.
12. Abrahão JS, Lima LS, Assis FL, Alves PA, Silva-Fernandes AT, Cota MMG, Ferreira VM, Campos RK, Mazur C, Lobato ZIP, Trindade GS, Kroon EG. Nested-multiplex PCR detection of Orthopoxvirus and Parapoxvirus directly from exanthematic clinical samples. *Virology Journal*. 2009;6:140.
13. Peres MG, Bacchiega TS, Appolinário CM, Vicente AF, Allendorf SD, Antunes JMAP, Moreira SA, Legatti E, Fonseca CR, Pituco EM, Okuda LH, Pantoja JCF, Ferreira F, Megid J. Serological study of vaccinia virus reservoirs in areas with and without official reports of outbreaks in cattle and humans in São Paulo, Brazil. *Archives of Virology*. 2013;158 :2433-41.

14. D’Anunção L, Guedes MIM, Oliveira TL, Rehfeld I, Bonjardim CA, Ferreira PP, Trindade GS, Lobato ZP, Kroon EG, Abrahão JS. Filling one more gap: experimental evidence of horizontal transmission of Vaccinia virus between bovines and rodents. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 2012;12: 61-64.
15. Delariva RL, Agostinho AA. Introdução de espécies: uma síntese comentada. *Acta scientiarum*. 1999;21: 255-62.
16. Flores EF. *Virologia Veterinária*. Editora da Universidade Federal de Santa Maria. 2012;19: 571-603.
17. Ninove L, Domart Y, Vervel C, Voinot C, Salez N, Raoult D, Meyer H, Capek I, Zandotti C, Charrel RN. Cowpox virus transmission from pet rats to humans, France. *Emerging Infectious Diseases*. 2009;15: 781-84.
18. Campe H, Zimmermann P, Glos K, Bayer M, Bergemann H, Dreweck C, Graf P, Weber BK, Meyer H, Buttner M, Busch U, Sing A. Cowpox virus transmission from pet rats to humans, Germany. *Emerging Infectious Diseases*. 2009; 15: 777-780.
19. Damaso CRA, Reis SA, Jesus DM, Lima PSF, Moussatché N. A PCR-based assay for detection of emerging vaccinia-like viroses isolated in Brazil. *Diagnostic Microbiology and infectious Disease*. 2007;57: 39-46.
20. Peres MG, Barros CB, Appolinário CM, Antunes JMAP, Mioni MSR, Bacchiega TS, Allendorf SD, Vicente AF, Fonseca CR, Megid J. Dogs and opossums positive for vaccinia virus during outbreak affecting cattle and humans, São Paulo State, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*. 2016;22: 271-273.

21. Abrahão JS, Silva-Fernandes AT, Lima LS, Campos RK, Guedes MIMC, Cota MMG, Assis FL, Borges IA, Souza-Junior MF, Lobato ZIP, Bonjardim CA, Ferreira PCP, Trindade GS, Kroon EG. Vaccinia Virus Infection in Monkeys, Brazilian Amazon. *Emerging Infectious Diseases*. 2010;16: 976-79.

CAPÍTULO 3 – TRABALHO CIENTÍFICO

Trabalho submetido à revista Emerging Infectious Diseases. Normas disponíveis em: <http://wwwnc.cdc.gov/eid/page/manuscript-preparation>

Title: *Vaccinia Virus in blood samples from humans, domestic and wild mammals, Brazil*

Authors: Marina G. Peres, Thais S. Bacchiega, Camila M. Appolinário, Acácia F. Vicente, Mateus S. R. Mioni, Bruna L. D. Ribeiro, Clóvis R. S. Fonseca, Vanessa. C. Pelícia, Fernando Ferreira, Grazielle P. Oliveira, Jonatas S. Abrahão, Jane Megid*

Affiliations:

UNESP - Univ. Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia¹, Botucatu, Brazil (M. Peres, T. Bacchiega, C. Appolinário, A. Vicente, M. Mioni, B. Ribeiro, C. Fonseca, V. Pelícia, J. Megid)

USP – Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo, Brazil (F. Ferreira)

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Belo Horizonte, Minas Gearais, Brazil (G. Oliveira, J. Abrahão)

¹ Institution in which work was conducted

***Corresponding author:** Jane Megid, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP – Univ. Estadual Paulista, Distrito de Rubião Júnior s/n, Botucatu-São Paulo, Brasil. Cep: 18618-970; email: jane@fmvz.unesp.br

Word count:

Abstract: 118

Text: 3694

Article summary line: VACV positivity in blood of naturally infected animals, Brazil

Key words: *Vaccinia virus*, blood samples, humans, domestic mammals, wild mammals, public health, epidemiology, transmission

Abstract

Outbreaks of *Vaccinia virus* (VACV) affecting cattle and humans have been reported in Brazil in the last 15 years, but the origin of these outbreaks remains unknown. Although VACV DNA has been detected in mice (*Mus musculus*), opossums (*Didelphis albiventris*) and dogs during zoonotic VACV outbreaks, no transmission to cattle or humans from any of these species was reported during Brazilian outbreaks. In this work, we assessed the PCR-positivity for VACV in blood samples from cows and other domestic mammals, wild rodents and other wild mammals, and humans from areas with or without reports of VACV infection. Our results show detection of VACV DNA in blood samples from cows, horse and opossums, raising important questions about VACV transmission.

Introduction

The first official report of a *Vaccinia virus* (VACV) outbreak in cattle and humans in Brazil was recorded in 1999 at Cantagalo city, Rio de Janeiro State (1). Since then, outbreaks have been described in several regions of the country (2 - 9). It was believed that VACV re-emergence in zoonotic outbreaks was related to the VACV vaccine strain used by the World Health Organization (WHO) during campaigns against smallpox and its possible adaptation to wild hosts (10). The VACV isolated in Brazilian outbreaks is divergent from VACV vaccines strains, but the origin of these outbreaks remains unknown (11, 12).

A model of transmission has been proposed in which peridomestic rodents act as a link between domestic animals and wildlife (13). In fact, peridomestic rodents such as *Mus musculus*, *Rattus rattus* and *Rattus norvegicus* act as host reservoirs of the Cowpox virus in Europe (14). The order Rodentia members has been targeted for research regarding its possible role in the spread of VACV (15-18).

Although VACV was once isolated from the peritoneum and testicles of *Mus musculus* and VACV DNA was once detected in blood samples from opossums (*Didelphis albiventris*) and dogs during VACV outbreaks (13, 19), no transmission to cows or humans from any of those species during Brazilian VACV outbreaks was established.

In Brazil, during a zoonotic VACV outbreak, VACV DNA was detected in blood samples from a milker and in the blood of his two daughters that were not engaged in any exposure activity (20). VACV DNA has also been detected in blood samples from smallpox-vaccine recipients, as well as in blood samples from experimentally infected cows and mice (17; 21; 22). Accordingly, we accessed the PCR-positivity for VACV in blood samples from humans, cows and other domestic and wild mammals from areas with or without official reports of zoonotic VACV outbreaks in central west region of São Paulo State, Brazil.

Materials and Methods

All animal and human samples in the present study were tested previously for the presence of antibodies anti-*Orthopoxvirus* (OPV) (18).

Ethical Statements

This study was approved by the Ethical Committee of Animal Uses in Veterinary Medicine and Animal Production College of São Paulo State University “Júlio de Mesquita Filho”(number 114/2015-CEUA) and by the Ethical Committee in Research of Medicine College of that university (CEP3605-2010).

Site sampling

Samples were collected in three counties with and without reports of zoonotic VACV outbreaks: Torre de Pedra (23°14'58.76''S48°11'39.49''W), where outbreaks

were previously reported (3, 6), Bofete (23°05'54.51''S48°11'26.61''W) and Anhembi (23°05'54.51''S48°11'26.61''W), in which there is no history of outbreaks (Figure 1).

The total number of farms included in the study was calculated based on the populations of the farms in the three counties, aiming for a 5% prevalence of positive farms (at least one positive sample) with a 5% margin of error using Epi Info 3.5.4. We randomly selected 48 farms: 11 in Torre de Pedra, 15 in Bofete, and 22 in Anhembi (Figure 1).

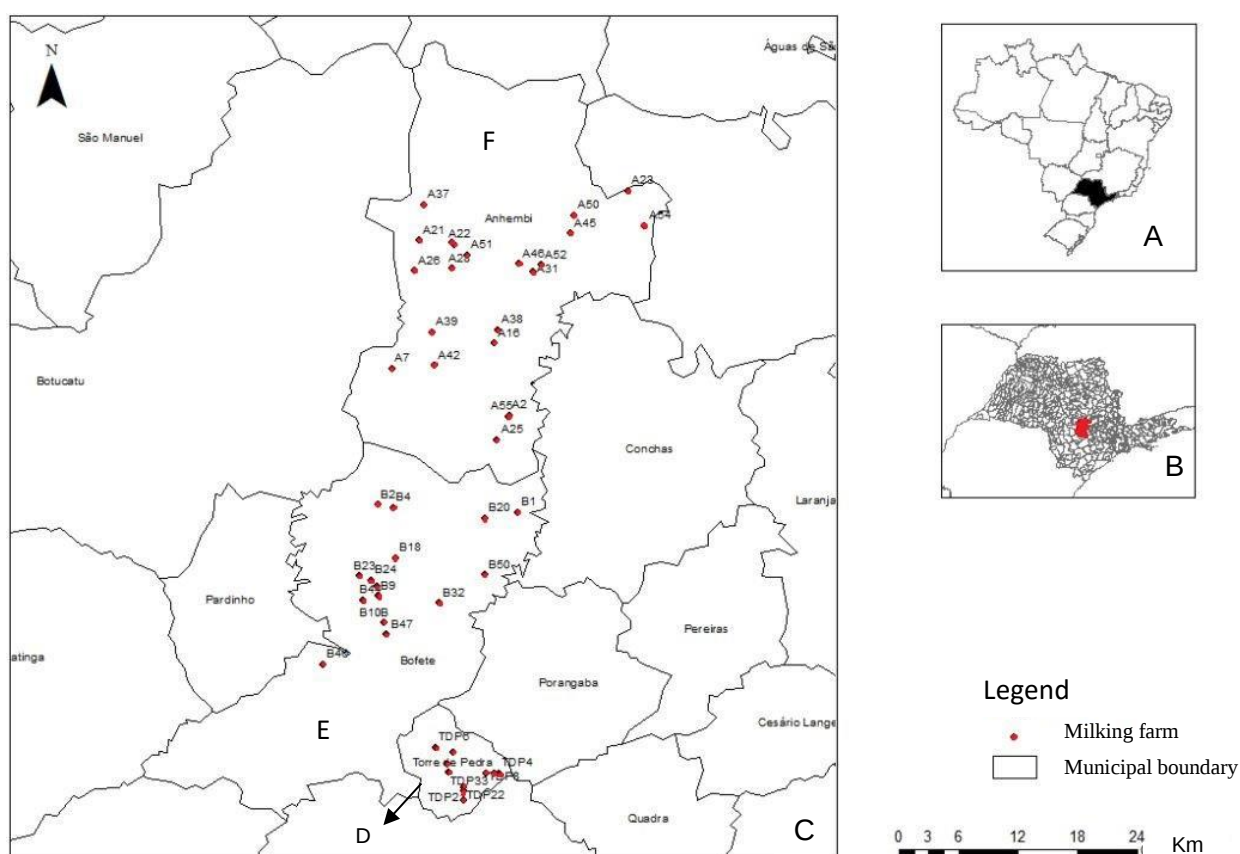


Figure 1. Map of sampled sites (A) with São Paulo State in black. São Paulo state map (B) with Torre de Pedra, Bofete and Anhembi in red. Map of São Paulo State (C) showing the sampled sites; the points in red correspond to farms in Torre de Pedra (D), Bofete (E) and Anhembi (F). Source: Peres et al., 2013 (18).

Blood-sample collection from domestic animals

The minimum number of sampled cows was determined using the program HERDACC3.0[®] for each farm, assuming a PCR sensitivity of 80%, a specificity of

99.9%, and a proportion of infected animals in a positive herd of 20%. The minimum number of lactating cows that needed to be sampled to ensure a minimum sensitivity and specificity of 95% was 20 animals. In a herd with more than 20 animals, only 20 lactating cows were selected for sampling at random, but in a herd with fewer than 20 animals, samples were collected from all animals. From other species (horse, sheep, swine, dogs and cats), one to five samples were collected.

Blood samples were collected from February to April 2011 by mammary-vein puncture or jugular puncture from lactating cows and by jugular puncture from other domestic species and stored at -20° C until testing by PCR. All animals were examined to determine the presence of characteristic clinical signs such as pustules and crusts.

Blood samples collection from wild animals

Capture of wild mammals was conducted from May to September 2011 and was authorized by the Brazilian Institute of Environment and Natural Resource Renewable (IBAMA), the Chico Mendes Biodiversity Conservation Institute (ICM-Bio) by Biodiversity Information and Authorization System (SISBIO) under authorization number 23918-1.

Tomahawk traps with chicken bait were used to capture of wild mammals, and Pitfall and Sherman traps with a bait consisting of a mixture of peanut cream, canned sardine, cornmeal and oatmeal were used for wild rodent capture. Five trap nights in each farm were required to capture animals in native forest areas surrounding them (consisting of a transitional Atlantic Forest and Cerrado).

Wild mammals were anesthetized with tiletamine and zolazepan (Zoletil®) using the recommended dose for each species (23), and blood samples were collected by jugular puncture. Due to infectious agents related to rodents, such as *Hantavirus spp*, the procedure for all wild rodents before, during and after blood sample collection was

performed with personal protective equipment (EPP), as previously described (18). All collected blood samples were stored at -20°C until testing by PCR. All animals were examined to determine the presence of characteristic clinical signs such as pustules and crusts.

Blood samples collection from humans

Blood samples from farmers, rural workers and their families were collected by nurses by cephalic vein puncture during October and November 2011 and stored at -20°C until testing by PCR.

PCR, Purification, Sequencing and Analysis of Sequences

Viral DNA was extracted using the Invisorb[®] Spin Blood Mini Kit (Stratec Molecular, Berlin, Germany). A nested PCR was used for amplification of vaccinia growth factor (*vgf*) gene in the same conditions previous described (24). The *vgf* gene is a conserved *Orthopoxvirus* (OPV) gene, widely used as a PCR target, in diagnostic and phylogenetic of Brazilian VACV outbreaks (22, 24, 25). The *vgf* PCR products were purified by uses of the Illustra[®] GFX PCR and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare Life Science, Freiburg, Germany) and then, were submitted to cloning using the pGEM[®]-T Easy Vector System I (Promega, Madison, WI, USA) at Virus Laboratory of Bioscience Institute of the Federal University of Minas Gerais - UFMG. Cloned samples were submitted to gene sequencing and obtained sequences aligned with previously published VACV sequences from GenBank using the Clustal W method, and the alignments were manually checked with MEGA version 7.0 software (Arizona State University, Phoenix, AZ, USA). A phylogenetic tree was constructed using the neighbor-joining method, the Tamura-3 model of nucleotide substitutions and a bootstrap of 1,000 replicates.

Results

Missing values

A total of 48 farms was randomly chosen for the study; however, one farm from Torre de Pedra didn't authorize the study, resulting in a total of 47 farms sampled. A total of 138 wild rodents was captured, but collection of blood samples were successfully performed in 103 animals; the results are shown only for these animals.

Samples collected and positivity

A total of 1331 blood samples, 148 from humans, 688 from cows, 44 from sheep, 22 from swine, 117 from horses, 114 from dogs, 7 from cats, 57 from white-eared opossums (*Didelphis albiventris*), 16 from black-eared opossums (*Didelphis aurita*), 6 from Brazilian gracile opossums (*Grcilinanus microtarsus*), 4 from crab-eating foxes (*Cerdocyon thous*), 4 from coatis (*Nasua nasua*), 1 from ocelot (*Leopardus pardalis*), and 103 from wild rodents (4 *Akodon montensis*, 4 *Nectomys squamipes*, 4 *Calomys tener*, 13 *Sooretamys angouya*, 17 *Oligoryzomys flavescens*, 61 *Oligoryzomys nigripes*) were collected (Table 1).

From collected samples, eight (0.6%) were positive for amplification of the *vgf* gene in the testing by PCR. Positivity was observed in four cows (0.6% of sampled cows), one horse (0.8% of sampled horse), two black-eared opossums (12.5% of sampled *D. aurita*) and one white-eared opossum (1.7% of sampled *D. albiventris*) (Table 1). The positive animals were from Anhembi (0.7%) and Bofete (0.7%), and no positivity was detected in blood samples from Torre de Pedra (Table 2), where zoonotic VACV outbreaks were previously reported (3, 6).

Table 1. Total of collected blood samples and PCR-positivity among species

Species	n	p	(%)
Human	148	0	(0.0)
Cow	688	4	(0.6)
Sheep	44	0	(0.0)
Swine	22	0	(0.0)
Horse	117	1	(0.8)
Dog	114	0	(0.0)
Cat	7	0	(0.0)
<i>Didelphis albiventris</i>	57	1	(1.7)
<i>Didelphis aurita</i>	16	2	(12.5)
<i>Gracilinanus microtarsus</i>	6	0	(0.0)
<i>Cerdocyon thous</i>	4	0	(0.0)
<i>Nasua nasua</i>	4	0	(0.0)
<i>Leopardus pardalis</i>	1	0	(0.0)
<i>Akodon montensis</i>	4	0	(0.0)
<i>Nectomys squamipes</i>	4	0	(0.0)
<i>Calomys tener</i>	4	0	(0.0)
<i>Sooretamys angouya</i>	13	0	(0.0)
<i>Oligoryzomys flavescens</i>	17	0	(0.0)
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	61	0	(0.0)
TOTAL	1331	8	(0.6)

n = collected samples

p = positive samples

(%) = percentage of positives

Table 2. Blood sample distribution among municipalities and proportion of PCR-positive between different species

Species	Anhembi		Bofete		Torre de Pedra	
	n	p (%)	n	p (%)	n	p (%)
Human	82	0 (0.0)	38	0 (0.0)	28	0 (0.0)
Cow	332	3 (0.9)	204	1 (0.5)	152	0 (0.0)
Sheep	33	0 (0.0)	9	0 (0.0)	2	0 (0.0)
Swine	9	0 (0.0)	12	0 (0.0)	1	0 (0.0)
Horse	71	1 (1.4)	23	0 (0.0)	23	0 (0.0)
Dog	56	0 (0.0)	35	0 (0.0)	23	0 (0.0)
Cat	3	0 (0.0)	2	0 (0.0)	2	0 (0.0)
<i>D. albiventris</i>	31	1 (3.2)	19	0 (0.0)	7	0 (0.0)
<i>D. aurita</i>	0	0 (0.0)	13	2 (15.4)	3	0 (0.0)
<i>G. microtarsus</i>	2	0 (0.0)	2	0 (0.0)	2	0 (0.0)
<i>C. thous</i>	3	0 (0.0)	1	0 (0.0)	0	0 (0.0)
<i>N. nasua</i>	3	0 (0.0)	1	0 (0.0)	0	0 (0.0)
<i>L. pardalis</i>	1	0 (0.0)	0	0 (0.0)	0	0 (0.0)
<i>A. montensis</i>	0	0 (0.0)	4	0 (0.0)	0	0 (0.0)
<i>N. squamipes</i>	3	0 (0.0)	1	0 (0.0)	0	0 (0.0)
<i>C. tener</i>	0	0 (0.0)	2	0 (0.0)	2	0 (0.0)
<i>S. angouya</i>	13	0 (0.0)	0	0 (0.0)	0	0 (0.0)
<i>O. flavescens</i>	11	0 (0.0)	3	0 (0.0)	3	0 (0.0)
<i>O. nigripes</i>	30	0 (0.0)	26	0 (0.0)	5	0 (0.0)
TOTAL	683	5 (0.7)	395	3 (0.7)	253	0 (0.0)

n = collected sampled

p = positive samples

(%) = percentage of positive samples

Of the total analyzed samples, one animal from Bofete was simultaneously positive for the detection of DNA in the blood and neutralizing antibodies (titer equal to 16) against OPV in the serum, while the other seven PCR-positive samples were from seronegative animals (Table 3).

Table 3. Correlation between VACV DNA detection in blood samples by PCR and detection of neutralizing antibodies in serum samples from the same sampled animals previously tested (18).

	PCR-positive (%)	PCR-negative (%)	Total (%)
Seropositive ¹	1* (0.5)	185 (99.5)	186 (100)
Seronegative ¹	7** (0.6)	1138 (99.4)	1145 (100)
Total	8 (0.6)	1323 (99.4)	1331 (100)

* Cow positive by PCR and serology (OPV neutralizing antibodies titer equal to 16)

** PCR-positive but seronegative animals (three cows, one horse, one *D. albiventris*, two *D. aurita*)

¹ Data from previous serologic study (18).

The PCR-positive animals were from six different milking farms, four located in Anhembi county and two in Bofete county, which have made no reports of VACV outbreaks. PCR-positivity in two animals (a cow and a horse) was observed on one milking farm from Anhembi and another milking farm from Bofete (two *D. aurita*). The farms with PCR-positive in blood presented seropositivity for OPV in animals and humans previously (Table 4).

Table 4. Farms on which blood samples from animals were PCR-positive for VACV and previous seropositivity of animals and humans from these farms

Milking farms		PCR-positive animals	Previous seropositive ¹		
			Species	p (%)	N
Anhembi	A16	Opossum (<i>D. albiventris</i>)	Human	1 (25)	4
			Domestic dog	1 (50)	2
	A2	Cow	Cow	1 (5)	20
	A23	Cow Horse	Cow	1 (6.6)	15
Bofete	A7	Cow	Human	1 (16.6)	6
			Cow	1 (5)	20
			Domestic dog	2 (33.3)	6
			Wild rodent (<i>O. nigripes</i>)	1 (5.5)	18
	B46	Cow*	Horse	1 (25)	4
			Domestic dog	1 (16.6)	6
			Cows	5 (25)	20
	B47	Opossums (two <i>D. aurita</i>)	Human	1 (50)	2
			Swine	2 (33.3)	6

* Cow positive in both tests, PCR and Serology; ¹ Data from previous serologic study (18)

p = number of previous seropositives

n = sampled individuals from each species

(%) = percentage of samples that were seropositive

Sequencing and Analysis of the sequences

The sequencing and phylogenetic tree based on the nucleotide sequence of the orthopoxvirus *vgf* gene revealed that our strains (Sample 694, Sample 211, Sample 693, Sample 263, Sample 270, Sample 706) clustered with the Brazilian VACVs (i.e., TOa, TOb, Passatempo, MURV, GP1V, GP2V) and vaccine VACVs (i.e., Lc16m2, WR, and Lister), marking it as a *Vaccinia virus* (Figure 2).

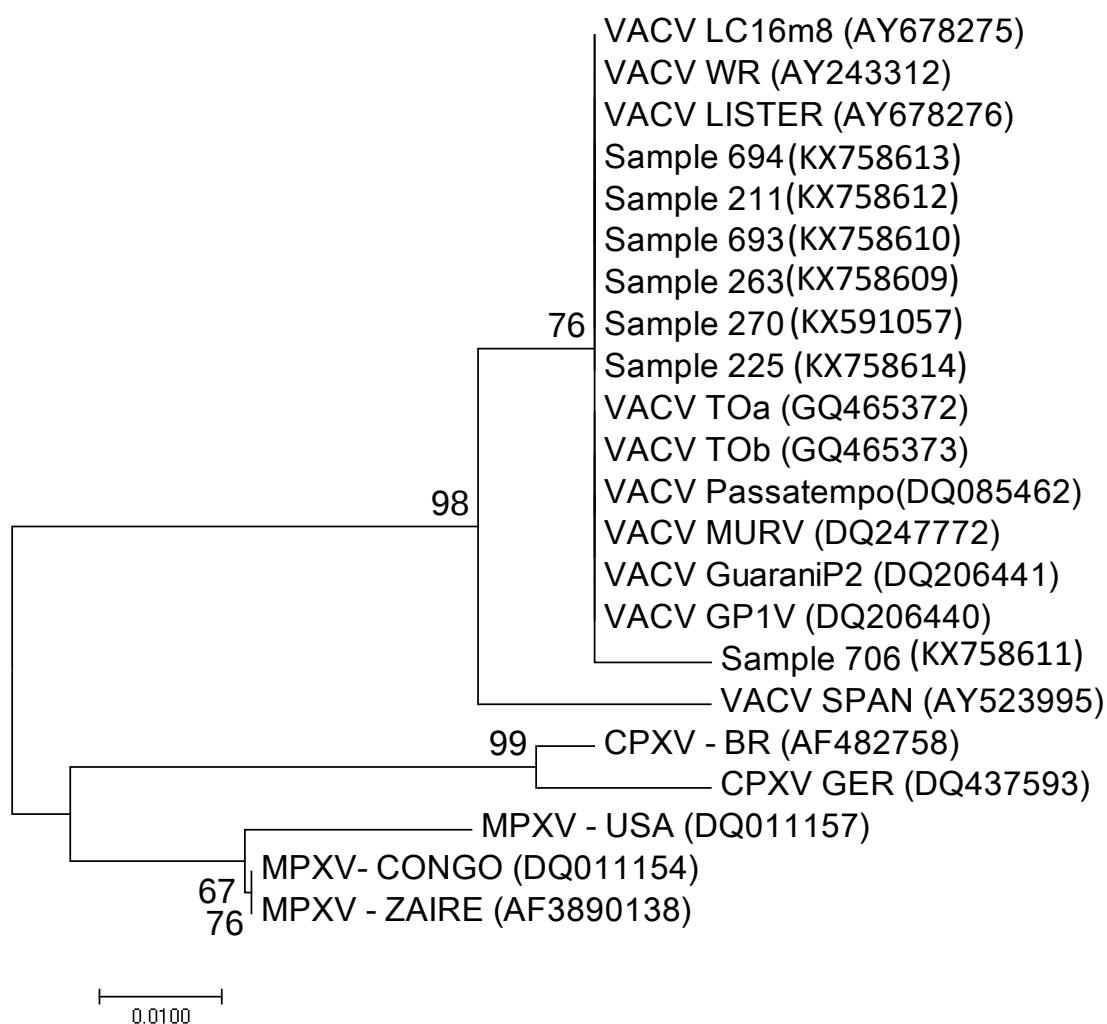


Figure 2. Phylogenetic tree based on the OPV nucleotide sequence of the *vgf* gene showing the blood samples clustering (Sample 694, Sample 211, Sample 693, Sample 263, Sample 270, Sample 225, Sample 706).

Sample 694 = blood sample from *Didelphis aurita*

Sample 211 = blood sample from a cow

Sample 693 = blood sample from *Didelphis aurita*

Sample 263 = blood sample from a cow

Sample 270 = blood sample from a horse

Sample 225 = blood sample from a cow

Sample 706 = blood sample from *Didelphis albiventris*

Discussion

Vaccinia virus, like other orthopoxviruses, exhibits a tropism for epithelial cells, so during outbreaks, diagnosis is preferably conducted through the analysis of scabs (1-7). In this study, we assessed the presence of VACV in bovine herds and in other domestic and wild mammals, as well as in humans, from milk farms located in areas with and without reports of zoonotic outbreaks. When none of the 47 milk farms were undergoing VACV outbreaks, as VACV DNA has been detected in blood samples from experimentally and naturally infected animals, as well as in blood samples from naturally infected humans (15, 17, 19, 20, 22), we investigated the presence of VACV DNA in blood samples collected from healthy animals and humans from these properties.

Viral DNA was detected in the blood samples from one horse, three opossums (one *Didelphis albiventris* and two *Didelphis aurita*) and four cows, all apparently healthy, from areas in São Paulo State where there had been no reports of VACV outbreaks (Anhembi and Bofete counties). To the best of our knowledge, this is the first detection of VACV DNA in blood samples from naturally infected cows, horses and *Didelphis aurita*.

All sampled animals and humans in this study were previously tested for the presence of OPV-neutralizing antibodies, and seropositivity was observed in humans, cows, horses, swine, dogs, cats, opossums (*D. aurita*; *D. albiventris*), coatis (*Nasua nasua*), and wild rodents (*Oligoryzomys nigripes*, *Oligoryzomys flavescens*, *Sooretamys angouya*) (18). In this study, only one cow was positive for both viral DNA and neutralizing antibodies in blood and serum, respectively. The other three cows and the horse were positive only for viral DNA and had no detectable neutralizing antibodies. A similar pattern was observed during a zoonotic VACV outbreak when serum samples

from unaffected humans were positive only for viral DNA or for both viral DNA and neutralizing antibodies (20). The absence of clinical signs associated with the presence of viral DNA in the blood with or without neutralizing antibodies suggests systemic and subclinical infection or an early stage of infection that could evolve into future clinical manifestations.

Humans appear to acquire clinical infection following contact with viral particles on bovine or human scabs (3, 4, 6, 8); however, subclinical human infections in which viral DNA was detected in the blood have been related to other routes of infection, such as fomites in the household or the consumption of raw milk and cheese (20). In our study, all human blood samples tested negative for the presence of viral DNA; however, neutralizing antibodies were previously detected in 17% of them. Seropositivity was directly correlated with age and was higher in older persons (18). Possible explanations include smallpox vaccine memory or lifelong exposure of farmers to the circulating virus in domestic animals, especially cows (18); however, we found seropositive results in people who had never been vaccinated for smallpox (18). The absence of viral DNA in the blood of seropositive subjects may be due to constant contact with clinically or sub-clinically infected domestic animals, especially as seropositivity was observed in regions with and without reports of VACV infection.

The opossums (*D. aurita*; *D. albiventris*) that were PCR-positive were previously classified as seronegative because their antibody titers were insufficient to induce 50% or more of reduction of viral plaques (18). However, the presence of viral DNA in the blood, along with the low percentage (9% in *D. albiventris*; 13% and 14% in both *D. aurita*) of samples with neutralizing titers, may suggest acute infection with initial production of neutralizing antibodies; these animals may present clinical signs in the future, but subclinical infection cannot be ruled out. In a previous report (19), blood

samples from apparently healthy *Didelphis albiventris* were also PCR-positive during a zoonotic VACV outbreak; both subclinical infection and a role for these animals as a VACV reservoir are possibilities .

We did not detect viral DNA in blood sampled from wild rodents in this area, and low rates of seropositivity were previously detected in these animals (18). However, VACV DNA was detected in the feces of *O. flavescens*, *O. nigripes* and *S. angouya*, as well as in urine of *O. flavescens* from the same area (Peres et al., unpublished data). The simultaneous detection of VACV DNA in feces and neutralizing antibodies in serum samples from two *O. flavescens* from Bofete were observed (Peres et al., unpublished data; 18). These animals were apparently healthy and showed 54% and 59% of reduction in viral plaques, making them seropositive for OPV (18). These findings together suggest acute infection with initial production of neutralizing antibodies, which might or might not develop into clinical disease. Sentinel mice exposed to the feces of experimentally infected cows and mice showed no clinical signs but did become PCR-positive in their blood, organs and feces, suggesting subclinical infection (15, 17).

Our findings do not rule out the possibility that animals (DNA positive) may develop clinical disease, but as no VACV-like outbreaks were reported in the three sampled counties from the time of sample collection until the present, these animals were presumably sub-clinically infected and sustain viral circulation in the area.

Accordingly, in Torre de Pedra, a county in which two zoonotic VACV outbreaks occurred in 2007 and 2010 (3; 6), no viral DNA was detected in blood samples, feces or urine samples from wild rodents (Peres et al., unpublished data). On the other hand, this county showed the highest rate of seropositivity in cows (39%) and horses (22%), while 10% of sampled opossums were seropositive and all wild rodents were seronegative (18). Comparatively, viral DNA was detected in blood samples from

one cow and two *D. aurita* and in feces of two *O. flavescens* and one *O. nigripes* in Bofete (Peres et al., unpublished data). Bofete also had the second-highest seropositivity rate in cows (14%) and horses (9%) and opossums (9%) [*D. albiventris* and *D. aurita*]; additionally, the highest seropositivity rate in wild rodents (11%) (18). In contrast, in Anhembi, blood samples from three cows, one horse and one *D. albiventris*, feces samples from one *O. nigripes* and two *S. angouya* and urine samples from one *O. flavescens* were PCR-positive (Peres et al., unpublished data). In addition, Anhembi showed the lowest rate of seropositivity in cows (5%) and horses (3%), and opossums (6.5%) and second high rate in wild rodents, with 9% of seropositivity (18).

Considering our previous serology results in association with outbreak history, region and PCR results, we consider that the high prevalence of neutralizing antibodies against OPV in domestic animals from Torre de Pedra could be explained and associated with the VACV outbreak that occurred previously; on the other hand, Bofete and Anhembi presented a lower seropositivity rate and positive detection of VACV DNA in animal population being compatible with the model of endemic infection known as the SIR model (26): after the outbreaks in Torre de Pedra, the number of removals (R) increased due to long-term immunity promoted by VACV, resulting in a reduction in susceptibles (S) and infectives (I) and accounting for the absence of viral DNA from sampled species. In contrast, the findings from Bofete and Anhembi suggest that there were still a large number of susceptibles (S = DNA negative and seronegative) that acquired the infection (I = DNA positive), thus resulting in an ongoing increase in removals (R = seropositive). In addition, these data suggest viral spread by contiguity, from Torre de Pedra to Bofete and from there to Anhembi. It is possible that the virus circulates in opossums and wild rodents, the latter of which shed low viral loads in their feces and urine (Peres et al., unpublished data), contaminating

the environment. The low viral loads in the environment can induce subclinical infections, as evidenced by the presence of viral DNA and neutralizing antibodies in the blood of apparently healthy domestic and wild animals. While wild rodents eliminate DNA viral in their feces, there was no evidence to this effect found in Torre de Pedra, probably due to the small sample size in this county or the short average lifespan of these species of wild rodents (27). Both PCR of blood and the Plaque Reduction Neutralizing Test (PRNT) were negative in samples from this county, suggesting that the virus is no longer circulating there.

The spread of infectious agents by contiguity relies on a shared border (28). Torre de Pedra, Bofete and Anhembi are neighboring municipalities (Figure 1). Most emerging infections originate in one geographic location and then disseminate to new places (29), and thus Torre de Pedra could be the origin from this circulating virus in this region. The spread of VACV to other regions has been attributed to the movement of infected cattle for trade between neighboring municipalities and states (30, 31, 32). The movement of herds among municipalities can promote viral spread. In addition, if the reservoir host becomes more widely disseminated, the infectious agent can appear in new places (29). Accordingly, both opossums (*D. albiventris* and *D. aurita*) and wild rodents (*O. nigripes*, *O. flavescens* and *S. agouya*) were the most-sampled wild mammals (Table 2). The factors involved in the interaction between these species is still unclear but may include contact with feces, social interactions, and predation, among others, as previously suggested in the murine-transmission model proposed by Abrahão et al. (13).

A possible role of rodents and opossums in the spread and environmental maintenance of VACV have been suggested (13, 16, 19); subclinical infection was observed in sentinel mice exposed to feces of experimentally infected mice (15, 17)

reinforcing our suggestion that the low viral load spread through the feces and urine of wild rodents could induces subclinical infections.

In an attempt to test our suggestion that the virus from the Torre de Pedra outbreak is the same virus circulating as a subclinical infection in wild and domestic animals from the studied region, all blood samples that were PCR-positive for the *vgf* gene were tested by PCR for the gene that encodes viral hemagglutinin (*ha*) (33). Amino-acid deletions in the *ha* gene can be used to classify Brazilian VACV into two groups (11, 12) and infer the origin of a given virus. All tested samples were negative for amplification of the *ha* gene, which we attribute this a low viral load in animals with subclinical infections. This protocol is less sensitive and does not detect low viral loads (33), which reinforces our hypothesis of low viral loads circulating in animals with subclinical infections. As mentioned in the materials and methods, PCR products from all samples that were positive for the *vgf* gene were submitted to cloning because the initial DNA concentration was insufficient to allow direct sequencing. This low DNA concentration might be due to low viral load in the blood of subclinically infected animals.

In an attempt to increase the viral load, although it was not described in the materials and methods, all positive samples were submitted to virus isolation in Vero cell culture at the Biologic Institute of São Paulo State, which would allow amplification and sequencing of the *ha* gene. After six passages in Vero cell cultures, no cytopathic effect was observed in any inoculated sample. We attribute this outcome to the low viral load in the blood of apparently healthy animals, evidenced by the low DNA concentrations observed in PCR tests.

Additionally, the presence of viral DNA in blood samples from apparently healthy animals does not mean that viable viral particles are present in the blood.

Previous reports demonstrated that individuals vaccinated against smallpox with the Dryvax vaccine had detectable VACV DNA in their blood but no infectious virus detectable by viral isolation (21). VACV was only isolated from blood samples from individuals who experienced moderate or severe complications of the vaccinia vaccine (21). It is possible that viable viral particles are not present in the blood during subclinical infections.

The second possibility is that viable viral particles are not detectable in the blood at the same frequency at which viral DNA is detected. Rivetti Jr et al. (22) showed that one of eight experimentally infected cows were positive for VACV isolation in cell culture only on the fourth day post-inoculation out of 70 days of blood-sample collection and analysis. Over that period, intermittent detection of VACV DNA was observed between the 2nd and 15th days post-inoculation. This hypothesis could explain both the absence of viable viral particles and the low levels of DNA detected in sampled blood.

Despite our efforts to elucidate the source of the VACV found in blood samples from domestic and wild mammals, it was not possible to conclude that there was any similarity to the VACV previously detected in Torre de Pedra. However, the results of the *vgf* gene analysis in the present study showed that the virus detected in blood samples from domestic and wild mammals was a *Vaccinia virus*. Our results corroborate previous findings that VACV induces systemic infection with viral DNA detectable in the blood (22), as well as subclinical infection in experimentally and naturally infected animals (15, 17, 19). We suggest that the sampled animals in the present study might have been subclinically infected. Additionally, we suggest that the virus may be circulating by contiguity in this region, but more studies are needed to confirm this hypothesis.

Acknowledgment: We thank Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) for financial support (Process:2013/07693-1).

Biographical sketch: Ms. Peres is a PhD student at the Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, São Paulo, Brazil. Her research interest is zoonotic and infectious diseases of wild and domestic animals.

References

1. Damaso CRA, Esposito JJ, Condit RC, Moussatche N. An emergente poxvirus from humans and cattle in Rio de Janeiro State: Cantagalo Virus may derive from Brazilian Smallpox Vaccine. *Virology*. 2000; 277: 439-49.
2. Negasse-segahara TK, Kisielius JJ, Ueda-Ito M, Curtis SP, Figueiredo CA, Cruz AS, Silv MMJ, Ramos CH, Silva MCC, Sakurati T, Sales-Gomes, LF. Human Vaccinia-like outbreaks in São Paulo and Goiás States, Brazil: vírus detection, isolation and identification. *Revista do Instituto de Medicina Tropical São Paulo*. 2004; 46: 315-22.
3. Megid J, Appolinário CM, Langoni H, Pituco EM, Okuda LH. Short Report: Vaccinia virus in humans and cattle in southwest region of São Paulo State, Brazil. 2008;79: 647-51.
4. Abrahão JS, Sival-Fernandes AT, Assis FL, Guedes MI, Drumond BP, Leite JA, Coelho LFL, Turrini F, Fonseca FG, Lobato ZIP, Madureira M, Ferreira PC, Bonjardim CA, Trindade GS, Kroon EG. Human Vaccinia vírus and Pseudocowpox viru co-infection: Clinical description and phylogenetic characterization. *Journal of Clinical Virology*. 2010; 48: 69-72.

5. Brum MCS, dos Anjos BL, Nogueira CEW, Amaral LA, Wiblen R, Flores EF. Na outbreak of orthopoxvirus-associated disease in horse in Southern Brazil. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2010;22: 143-47.
6. Megid J, Borges IA, Abrahão JS, Trindade GS, Appolinário CM, Ribeiro MG, Allendorf SD, Antunes JMAP, Silva-Fernandes AT, Kroon EG. Vaccinia Virus, Zoonotic Infection, São Paulo State, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*. 2012; 18: 189-91.
7. Assis FL, Vinhote WM, BarbosaJD, Oliveira CHS, Oliveira CMG, Trindade GS, Abrahão JS, Kroon EG. Reemergence of Vaccinnia vírus during zoonotic outbreak, Pará State, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*. 2013;19: 2017-20.
8. Oliveira GP, Fernandes ATS, Assis FL, Alves PA, Luiz APMF, Figueiredo LB, Almeida CMC, Travassos CEPF, Trindade GS, Abrahão JS, Kroon EG. Short Report: Intrafamilia transmission of Vaccinia vírus during a bovine Vaccinia outbreak in Brazil: A New Insight in Viral Transmission Chain. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2014: 1021-23.
9. Abrahão JS, Campos RK, Trindade GS, Fonseca FG, Ferreira PCP, Kroon EG. Outbreak of severe zoonotic Vaccinia vírus infection, Southeastern Brazil. *Emerging Infectious Diseases*. 2015;21: 695-98.
10. Moussatche N, Damaso CR, McFadden G. When good vaccine go wild: Feral Orthopoxvirus in developing countries and beyond. *Journal of Infected Developing Countries*. 2008; 2: 156-73.
11. Trindade GS, Emerson GL, Carroli DS, Kroon EG, Damon IK. Brazilian Vaccinia virus and their origins. *Emerging Infectious Diseases*. 2007; 13

12. Drumond BP, Leite JA, da Fonseca FG, Bonjardim CA, Ferreira PCP, Kroon EG. Brazilian Vaccinia virus strains are genetically divergent and differ from the Lister vaccine strain. *Microbes and Infection*. 2008;10: 185-97.
13. Abrahão JS, Guedes MIM, Trindade GS, Fonseca FG, Campos RK, Mota BF, Lobato ZIP, Silva-Fernandes AT, Rodrigues GO, Lima LS, Ferreira PCP, Bonjardim CS, Kroon EG. One more piece in the VACV ecological puzzle: Could Peridomestic Rodents be the link between wildlife and bovine Vaccinia outbreaks in Brazil? *Plos one*. 2009;4: e7428.
14. Esbauer S, Pfeffer M, Hermann M. Zoonotic poxviruses. *Veterinary Microbiology*. 2009;4554: 1-8.
15. Ferreira JMS, Abrahão JS, Drumond BP, Oliveira FM, Alves PA, Pascola-Xavier MA, Lobato ZIP, Bonjardim CA, Ferreira PCP, Kroon EG. Vaccinia virus: shedding and horizontal transmission in a murine model. *Journal of General Virology*. 2008;89: 2986-91.
16. Abrahão JS, Trindade GS, Ferreira JMS, Campos RK, Bonjardim CA, Ferreira PCP, Kroon EG. Long-lasting stability of Vaccinia virus strains in murine feces: implications for virus circulation and environmental maintenance. *Archives of Virology*. 2009;145: 1551-53.
17. D'Anunção L, Guedes MIM, Oliveira TL, Rehfeld I, Bonjardim CA, Ferreira PP, Trindade GS, Lobato ZP, Kroon EG, Abrahão JS. Filling one more gap: Experimental evidence of horizontal transmission of Vaccinia virus between bovines and rodents. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 2012;12.
18. Peres MG, Bacchiega TS, Appolinário CM, Vicente AF, Allendorf SD, Antunes JMAP, Moreira SA, Legatti E, Fonseca CR, Pituco EM, Okuda LH, Pantoja JCF, Ferreira F, Megid J. Serological study of vaccinia virus reservoirs in areas

with and without official reports of outbreaks in cattle and humans in São Paulo, Brazil. *Archives of Virology*. 2013;158 :2433-41.

19. Peres MG, Barros CB, Appolinário CM, Antunes JMAP, Mioni MSR, Bacchiega TS, Allendorf SD, Vicente AF, Fonseca CR, Megid J. Dogs and opossums positive for vaccinia virus during outbreak affecting cattle and humans, São Paulo State, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*. 2016;22: 271-273.
20. Costa GB, Borges IA, Alves PA, Miranda JB, Luiz APMF, Ferreira PCP, Abrahão JS, Moreno EC, Kroon EG, Trindade GS. Alternative routes of zoonotic Vaccinia virus transmission, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*. 2015;15: 12-14.
21. Cohen JI, Hohman P, Preuss JC, Li L, Fischer SH, Fedorko DP. Detection of Vaccinia virus DNA, but not infectious virus in the blood of smallpox vaccine recipients. *National Institute of Health, Vaccine*. 2007;25: 4571-4574.
22. Rivetti Jr AV, Guedes MIMC, Rehfeldt IS, Oliveira TML, Matos ACD, Abrahão JS, Kroon EG, Lobato ZIP. Bovine vaccinia, a systemic infection: Evidence of fecal shedding, viremia and detection in lymphoid organs. *Veterinary Microbiology*. 2013;162: 103-111.
23. Nunes ALV, Cruz ML, Cortopasso SRG. Anestesiologia. In Cubas SZ, Silva ICR, Catão JL. *Tratado de Animais Selvagens*. São Paulo 2006:1040-67.
24. Abrahão JS, Lima LS, Assis FL, Alves PA, Silva-Fernandes AT, Cota MMG, Ferreira VM, Campos RK, Mazur C, Lobato ZIP, Trindade GS, Kroon EG. Nested-multiplex PCR detection of Orthopoxvirus and Parapoxvirus directly from exanthematic clinical samples. *Virology Journal*. 2009;6:140.

25. Assis FL, Franco-Luiz APM, Paim LM, Oliveira GP, Pereira AF, Almeida GMF, Figueiredo LB, Tanus A, Trindade GS, Ferreira PP, Kroon EG, Abrahão JS. Horizontal study of vaccinia virus infections in an endemic area: epidemiologic, phylogenetic and economic aspects. *Archives of Virology*. 2015;160: 2703-2708.
26. Kermack WO and McKendrick AG. A contribution to the mathematical theory of epidemics. *Roya Society of London. Series A*.1927;115:700-21.
27. Reis NL, Perachi AL, Pedro WA, Lima IP. *Mamíferos do Brasil*, Londrina, 2006. p. 364-365.
28. Flood JS, Prophyre T, Tindesley MJ, Wollhouse ME. The performance of approximations of farm contiguity compared to contiguity defined using detailed geographical information in two sample areas in Scotland: implications for foot-and-mouth disease modelling. *Veterinary Research*. 2013;9:2-13.
29. Morse SS. Factor in the emergence of infectious diseases. *Emerging Infectious Diseases*. 1995;1: 7-15.
30. Medaglia MLG, Pessoa LCGD, Sales ERC, Freitas TRP, Damaso CR. Spread of Cantagalo Vírus to Northern Brazil. *Emerging Infectious Diseases*. 2009;15:1142-3.
31. Quixabeira-Santos JC, Medaglia MLG, Pescador CA, Damaso CR. Animal movement and establishment of Vaccinia virus Cantagalo strain in Amazon Biome Brazil. *Emerging Infectious Diseases*. 2011;4:726-9.
32. Assis FL, Franco-Luiz APM, Paim LM, Oliveira GP, Pereira AF, Almeida GMF, Figueiredo LB, Tanus A, Trindade GS, Ferreira PP, Kroon EG, Abrahão JS. Horizontal study of vaccinia virus infections in an endemic area:

epidemiologic, phylogenetic and economic aspects. Archives of Virology.

2015;160:2703-08.

- 33.** Damaso CRA, Reis SA, Jesus DM, Lima PSF, Moussatché N. A PCR-based assay for detection of emerging vaccinia-like viroses isolated in Brazil. Diagnostic Microbiology and infectious Disease. 2007;57:39-46.

CAPÍTULO IV

DISCUSSÃO GERAL

Na presente tese foi avaliada a presença de DNA viral em amostras de sangue coletadas de bovinos, outros mamíferos domésticos e selvagens, bem como de humanos, provenientes de áreas com e sem histórico de surtos de VACV. Adicionalmente foi verificada a presença de DNA viral em amostras de fezes e urina de pequenos roedores silvestres capturados nas áreas de mata das 47 propriedades produtoras de leite analisadas.

Nossos resultados mostraram a presença de DNA viral em amostras de sangue de quatro vacas, um cavalo, três gambas (um *Didelphis albiventris* e dois *Didelphis aurita*), bem como em amostras de fezes e urina de pequenos roedores silvestres, sendo seis amostras positivas para DNA viral nas fezes (dois *Oligoryzomys flavescens*, dois *Oligoryzomys nigripes* e dois *Sooretamys angouya*), uma para DNA viral na urina (*Oligoryzomys flavescens*). Relata-se pela primeira vez a detecção de DNA viral em amostras de sangue, fezes e urinas de animais saudáveis, naturalmente infectados.

A detecção de anticorpos soroneutralizantes para *Orthopoxvirus* foi realizada, previamente, em todos os animais e humanos do presente estudo (PERES et al., 2013). A presença simultânea de DNA viral no sangue e anticorpos neutralizantes foi observada em uma vaca e nas fezes de dois *Oligoryzomys flavescens* que também apresentavam anticorpos neutralizantes.

De forma geral, a ausência de sinais clínicos, somada à detecção de DNA viral associada ou não a presença de anticorpos, sugere um estágio inicial de infecção que posteriormente poderia levar os animais ou não a desenvolverem sinais clínicos. De fato detecção de DNA viral no sangue com ausência de sinais clínicos já foi observada em um roedor do gênero *Oryzomys* capturado na floresta Amazônica nos arredores de Belém do Pará (FONSECA et al., 1998), em Macacos prego (*Cebus apella*) e Bugius (*Allouata Caraya*) durante resgate de fauna no Tocantins (ABRAHÃO et al., 2010c), em cães e gambas (*Didelphis albiventris*) durante surto zoonótico em Itatinga – SP (PERES et al., 2016), e em humanos durante surto zoonótico em Serro – MG (COSTA et al., 2015). O que sugere que o VACV possa estar circulando de forma subclínica entre os animais selvagens e domésticos.

Foi também demonstrado que camundongos sentinelas, expostos a fezes de camundongos experimentalmente infectados, não apresentam sinais clínicos, mas DNA viral pode ser detectado em suas fezes, sugerindo infecção subclínica (FERREIRA et al., 2008b). Considerando a longa persistência do VACV evidenciada em fezes de camundongos infectados experimentalmente (ABRAHÃO et al., 2009d), e a detecção de DNA viral nas fezes dos roedores amostrados aqui, sugere-se eliminação viral pelas fezes e possível contaminação do meio ambiente, e manutenção da circulação viral entre animais selvagens e domésticos. Adicionalmente sugere-se que a eliminação viral pelas fezes ocorra com baixas cargas virais, o que justificaria as infecções subclínicas, uma vez que um fator que influencia o aparecimento e a gravidade de uma enfermidade infecciosa é a dose infectante, representada pelo número de unidade requeridas do agente infeccioso para produzir a doença (BARRETO et al., 2006).

Outros achados do presente estudo também sugerem baixa carga viral, tanto no sangue quanto nas fezes, como a baixa concentração de DNA viral nas amostras positivas. Em ambas as situações, os resultados da PCR para amplificação do gene *vgf* resultaram em baixas concentrações de DNA, sendo necessário a clonagem para possibilitar o sequenciamento das amostras de sangue. O fato de que todas as amostras positivas para amplificação do gene *vgf*, resultaram negativas nas tentativas de amplificação do gene *ha*, também reforça a sugestão de baixas cargas virais, uma vez que a reação para amplificação do gene *ha* utilizada (DAMASO et al., 2007) apresenta menor sensibilidade que a reação para detecção do gene *vgf* (ABRAHÃO et al., 2009c).

Considerando a possível baixa carga viral eliminada nas fezes, associada a ausência de sinais clínicos, tanto nos animais selvagens quanto nos animais domésticos em que houve detecção do DNA viral, questiona-se o impacto epidemiológico da disseminação viral nas fezes de roedores selvagens para a indução de infecções clínicas nos rebanhos bovinos. Apesar de um camundongo (*Mus musculus*) sem sinais clínicos ter apresentado positividade ao VACV durante surto zoonótico (ABRAHÃO et al., 2009a), a transmissão de VACV de roedores para vacas ou humanos ainda não foi comprovada durante os surtos brasileiros. O *Mus musculus* é um roedor peridoméstico do velho mundo que foi

introduzido no Brasil (DELARIVA et al., 1999). Na Europa, espécies peridomésticas como *Rattus rattus* e *Rattus norvegicus* dentre outras espécies selvagens, atuam como reservatório naturais do Cowpox virus (ESSBAUER et al., 2010; FLORES et al., 2012). Casos de transmissão de Cowpox virus de ratos (*Rattus norvegicus*) tidos como animais de estimação para seus proprietários ou para outros animais de estimação tem sido descritos (CAMPE et al., 2009; NINOVE et al., 2009). Entretanto nesses casos os animais envolvidos tornaram-se doentes e evoluíram para óbito, ocorrendo a transmissão pelo contato direto com as lesões cutâneas dos ratos. Levando em consideração que tanto o VACV quanto o Cowpox induzem infecção clínica através do contato direto com as lesões, nós questionamos se a eliminação viral pelas fezes dos roedores selvagens seria capaz de resultar em infecção clínica em bovinos, em outros animais domésticos e selvagens, e em humanos, entretanto mais estudos são necessários para elucidar tal questionamento.

Por outro lado, nossos achados fornecem evidencia de circulação viral em regiões sem histórico de surto (Bofete e Anhembi), porém vizinhas a Torre de Pedra, que já registrou dois surtos prévios a esta pesquisa (MEGID et al., 2008; MEGID et al., 2012). O surto de VACV em Torre de Pedra justifica a elevada prevalência de anticorpos neutralizantes nos animais domésticos previamente relatada nesse município (PERES et al., 2013), e sugerem que existe uma circulação viral por contiguidade de Torre de Pedra para Bofete e deste para Anhembi, evidenciada através do aumento de anticorpos neutralizantes em Bofete comparativamente a Anhembi. É possível que a circulação viral por contiguidade ocorra em marsupiais e roedores selvagens, e estes últimos eliminem o vírus em suas fezes e urina, contaminando o meio ambiente, mas com baixa carga viral (sugerindo infecção subclínica) o que é evidenciado pela presença de DNA viral e anticorpos neutralizantes no sangue de animais domésticos e selvagens aparentemente saudáveis. Apesar de roedores silvestres eliminarem DNA viral em suas fezes, isso não foi evidenciado em Torre de Pedra, provavelmente devido ao pequeno N amostral nessa cidade, ou devido a vida média dessas espécies de roedores selvagens (REIS et al., 2006), também evidenciado pela ausência de positividade na PCR de sangue e na prova sorológica. Contudo o insucesso da amplificação e posterior análise das

sequências do gene *ha*, nos impossibilitou de confirmar que o vírus circulante em Anhembi e Bofete, detectado pela presença de DNA viral em animais domésticos e selvagens bem como nas fezes dos roedores selvagens, seja o mesmo vírus responsável pelos surtos em Torre de Pedra. Em suma mais estudos são necessários para confirmar a circulação viral de forma subclínica e seu impacto epidemiológico nas populações bovinas e em humanos.

CONCLUSÕES GERAIS

- 1- Nossos resultados sugerem que na infecção natural por *Vaccinia virus* em bovinos, equinos e gambás (*Didelphis aurita* e *Didelphis albiventris*), aparentemente saudáveis exista um período de circulação viral no sangue
- 2- Roedores silvestres naturalmente infectados e aparentemente saudáveis são potenciais fontes de infecção evidenciada por eliminação de vírus *Vaccinia* em amostras de fezes e urina
- 3- A análise das sequências do gene *vgf* mostrou nossas amostras agrupadas com amostras de *Vaccinia vírus* Brasileiras e vacinais, nos permitindo classificar o vírus detectado nas amostras de sangue, fezes e urina, como *Vaccinia vírus*.
- 4- Nossos resultados sugerem que o *Vaccinia vírus* circula de forma subclínica na região amostrada.

BIBLIOGRAFIA

ABRAHÃO, J. S.; GUEDES, M. I. M.; TRINDADE, G. S.; FONSECA, F. G.; CAMPOS, R. K.; MOTA, B. F.; LOBATO, Z. I. P.; SILVA-FERNANDES, A. T.; RODRIGUES, G. O. L.; LIMA, L. S.; FERREIRA, P. C. P.; BONJARDIM, C. A.; KROON, E. G. One More Piece in the VACV Ecological Puzzle: Could Peridomestic Rodents Be the Link between Wildlife and Bovine Vaccinia Outbreaks in Brazil? *Plos one*. 4 (10): e 7428, 2009a.

ABRAHÃO, J. S.; OLIVEIRA, T. M.; CAMPOS, R. K.; MADUREIRA, M. C.; KROON, E. G.; LOBATO, Z. L. Bovine vaccinia outbreaks: detection and isolation of Vaccinia virus in milk samples. *Foodborne Pathogens and Disease*. 6, p. 1141-1146, 2009b.

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. S.; KROON, E. G. Nested multiplex PCR detection of Orthopoxvirus and Parapoxvirus directly from exanthematic clinical samples. *Virology Journal*. 6 (140), p. 1-5, 2009c.

ABRAHÃO, J. S.; TRINDADE, G. S.; FERREIRA, J. M. S.; CAMPOS, R. K.; BONJARDIM, C. A.; FERREIRA, P. C. P.; KROON, E. G. Long-lasting stability of Vaccinia virus strains in murine feces: implications for virus circulation and environmental maintenance. *Archives of Virology*. Vol.154, p. 1551-1553, 2009d.

ABRAHÃO, J. S.; DRUMOND, B. P.; TRINDADE, G. S.; SILVA-FERNANDES, A. T.; FERREIRA, J. M. S.; ALVES, P. A.; CAMPOS, R. K.; SIQUEIRA, L.; BONJARDIM, C. A.; FERREIRA, P. C. P.; KROON, E. G. Rapide detection of orthopoxvirus by semi-nested pcr directly from clinical specimens: a useful alternative fro routine laboratories. *Journal of Medical Virology*. 82, p. 692-699, 2010a.

ABRAHÃO, J. S.; SILVA-FERNANDES, A. T.; ASSIS, F. L.; GUEDES, M. I.; DRUMOND, B. P.; LEITE, J. A.; COELHO, L. F. L.; TURRINI, F.; FONSECA, F. G.; LOBATO, Z. I. P.; MADUREIRA, M.; FERREIRA, P. C.; BONJARDIM, C. A.; TRINDADE, G. S.; KROON, E. G. Human Vaccinia virus and Pseudocowpox virus co-infection: Clinical description and phylogenetic characterization. *Journal of Clinical Virology*. Vol. 48, p. 69-72, 2010b.

ABRAHÃO, J. S.; SILVA-FERNANDES, A. T.; LIMA, L. S.; CAMPOS, R. K.; GUEDES, M. I. M. C.; COTA, M. M. G.; ASSIS, F. L. BORGES, I. A.; SOUZA-JUNIOR, M. F.; LOBATO, Z. I. P.; BONJARDIM, C. A.; FERREIRA, P. C. P.; TRINDADE, G. S.; KROON, E. G. Vaccinia Virus Infection in Monkeys, Brazilian Amazon. *Emerging Infectious Diseases*. Vol. 16, No. 6, June 2010c.

ABRAHÃO, J. S.; CAMPOS, R. K.; TRINDADE, G. S.; FONSECA, F. G. F.; FERREIRA, P. C. P.; KROON, E. G. Outbreak of Severe Zoonotic Vaccinis Virus

Infection, Southeastern Brazil. Emerging Infectious Diseases. Vol. 21, NO.4, April 2015

AFONSO, P. O.; SILVA, P. M.; SCNELLRATH, L. C.; JESUS, D. M.; HU, J.; YANG, Y.; RENNE, R.; ATTIAS, M.; CONDIT, R. C.; MOUSSATCHÉ, N.; DAMASO, C. R. . Biological Characterization and Next-Generation Genome Sequencing of the Unclassified Cotia Virus SPAn232 (*Poxviridae* Journal of Virology. p. 5039-5054, 2012.

ASSIS, F. L.; BORGES, I. A.; FERREIRA, P. C. P.; BONJARDIM, C. A.; TRINDADE, G.S.; LOBATO, Z. I. P.; GUEDES, M. I. M.; MESQUITA, V.; KROON, E. G.; ABRAHÃO, J. S. Group 2 Vaccinia Virus, Brazil. Emerging Infectious Diseases. Vol.18, No.12, p.2035-2038, 2012.

ASSIS, F. L.; BORGES, I. A.; MESQUITA, V. S.; FERREIRA, P. C.; TRINDADE, G. S.; KROON, E. G.; ABRAHÃO, J. S. Vaccinia virus in household environment during bovine vaccinia outbreak, Brazil. Emerging Infectious Diseases. Vol. 19, No. 12, p. 2045-2047, 2013a.

ASSIS, F. L.; VINHOTE, W. M.; BARBOSA, J. D.; OLIVEIRA, C. H. S.; OLIVEIRA, C. M. G.; CAMPOS, K. F.; SILVA, N. S.; TRINDADE, G. S.; ABRAHÃO, J. S.; KROON, E. G. Reemergence of Vaccinia Virus during Zoonotic Outbreak, Pará State, Brazil. Emerging Infectious Diseases. Vol. 19, No.12, December 2013b.

ASSIS, F. L.; FRANCO-LUIZ, A. P. M.; PAIM, L. M.; OLIVEIRA, G. P.; PEREIRA, A. F.; ALMEIDA, G. M. F.; FIGUEIREDO, L. B.; TANUS, A.; TRINDADE, G. S.; FERREIRA, P. P.; KROON, E. G.; ABRAHÃO, J. S. Horizontal study of vaccinia virus infections in na endemic area: epidemiologic, phylogenetic and economic aspects. Archives of Virology. 160, 2703-2708, 2015.

BARRETO, M. L.; TEIXEIRA, M. G.; CARMO, E. H. Infectious diseases epidemiology. Journal of Epidemiology Community Health. Vol. 60, p. 192-195, 2006.

BECKER, M. N.; OBRAZTSOVA M.; et al. Isolation and characterization of codofovir resistant vaccinia viruses. Virology Journal. 2008.

BHANUPRAKASH, V.; HOSAMANI, M.; VENKATESAN, G.; BALAMURUGAN, V.; YOGISHARADHYA, R.; SINGH, R. K. Animal poxvirus vaccines: a comprehensive review. Expert Review of Vaccines. 11(11), 1355-1374, 2012

BRADLEY, C. A and ALTIZER, S. Urbanization and the ecology of wildlife diseases. TRENDS in Ecology and Evolution, vol.22, no.2, p. 95-103, 2006.

BRUM, M. C. S.; dos ANJOS, B. L.; NOGUEIRA, C. E. W.; AMARAL, L. A.; WIBLEN, R.; FLORES, E. F. An outbreak of orthopoxvirus-associated disease in horse in southern Brazil. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. Vol. 22, p. 143-147, 2010.

CAMPE, H.; ZIMMERMANN, P.; GLOS, K.; BAYER, M.; BERGEMANN, H.; DREWEK, C.; GRAF, P.; WEBER, B. K.; MEYER, H.; BUTTNER, M.; BUSCH, U.; SING, A. Cowpox Virus Transmission from Pet Rats to Humans, Germany. *Emerging Infectious Diseases*. Vol. 15, No. 5, p. 777 – 780, 2009.

CAMPOS, R. K.; BRUM, M. C. S.; NOGUEIRA, C. E. W.; DRUMOND, B. P.; ALVES, P. A.; SIQUEIRA-LIMA, L.; ASSIS, F. L.; TRINDADE, G. S.; BONJARDIM, C. A.; FERREIRA, P. C.; WEIBLEN, R.; FLORES, E. F.; KROON, E. G.; ABRAHÃO, J. S. Assessing the variability of Brazilian Vaccinia Virus isolates from a horse exanthematic lesion: coinfection with distinct viruses. *Archives of Virology*. Vol. 156, p. 275-283, 2011.

CARLETTI, F.; BORDI, L.; CASTILLETI, C.; CARO, A. D.; FALASCA, L.; GIOIA, C.; IPPOLITO, G.; ZANIRATTI, S.; BELTRAME, A.; VIALE, P.; CAPOBIANCHI, M. R. Cat to Human Orthopoxvirus Transmission, northeastern Italy. *Emerging Infectious Diseases*. Vol. 15, No. 3, p. 499-500, 2009.

CHANTREY, J.; MEYER, H.; BAXBY, D.; BEGON, M.; BOWN, K. J.; HANZEL, S. M.; JONES, T.; MONTGOMERY, W. I.; BENNETT, M. Cowpox: reservoir hosts and geographic range. *Epidemiological Infectious*. 122, 455-460, 1999.

COSTA, G. B.; BORGES, I. A.; ALVES, P. A.; MIRANDA, J. B.; LUIZ, A. P. M. F.; FERREIRA, P. C. P.; ABRAHÃO, J. S.; MORENO, E. C.; KROON, E. G.; TRINDADE, G. S. Alternative routes of zoonotic Vaccinia virus transmission, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, Vol. 21, No. 12, p. 2244-2246, 2015.

DAMASO, C. R. A.; ESPOSITO, J. J.; CONDIT, R. C.; MOUSSATCHE, N. An Emergent Poxvirus from Humans and Cattle in Rio de Janeiro State: Cantagalo Virus may Derive from Brazilian Smallpox Vaccine. *Virology*. 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. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. Vol. 57, p. 39-46, 2007.

D'ANUNCIAÇÃO, L.; GUEDES, M. I. M.; OLIVEIRA, T. L.; REHFELD, I.; BONJARDIM, C. A.; FERREIRA, P. P.; TRINDADE, G. S.; LOBATO, Z. P.; KROON, E. G.; ABRAHÃO, J. S. Filling one More Gap: Experimental Evidence of Horizontal Transmission of Vaccinia Virus Between Bovines and Rodents. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. Vol. 12, No. 1, 2012.

DELARIVA, R. L.; AGOSTINHO, A. A.; Introdução de espécies: uma síntese comentada. *Acta scientiarum*. Vol. 21, p. 255-262, 1999.

DRUMOND, B. P.; LEITE, J. A.; da FONSECA, F. G.; BONJARDIM, C. A.; FERREIRA, P. C. P.; KROON, E. G. Brazilian Vaccinia virus strains are genetically divergent and differ from the Lister vaccine strain. *Microbes and Infection*. Vol. 10, p. 185-197, 2008.

ESSBAUER, S.; PFEFFER, M.; HERMANN, M. Zoonotic poxviruses. *Veterinary Microbiology*. 140, p. 229-236, 2010.

FENNER, F. Adventures with poxviruses of vertebrates. *FEMS Microbiol. Rev.*, v. 24, p. 123-133, 2000.

FERNANDES, T. The smallpox vaccine: its first century in Brazil (from the Jennerian to the animal vaccine). *História, Ciência, Saúde-Manguinhos*. Vol. 6, p. 29-51, 1999

FERREIRA, J. M. S.; DRUMOND, B. P.; GUEDES, M. I. M. C; PASCOAL-XAVIER, M. A.; ALMEIDA-LEITE, C. M.; ARANTES, R. M. E.; MOTA, B. E. F.; ABRAHÃO, J. S.; ALVES, P. A.; OLIVEIRA, F. M.; FERREIRA, P. C. P. BONJARDIM, C. A.; LOBATO, Z. I. P.; KROON, E. G. Virulence in Murine Model Shows the Existence of Two Distinct Populations of Brazilian Vaccinia Virus Strains. *Plos one*. 3 (8): e3043, 2008a.

FERREIRA, J. M. S.; ABRAHÃO, J. S.; DRUMOND, B. P.; OLIVEIRA, F. M.; ALVES, P. A.; PASCOAL-XAVIER, M. A.; LOBATO, Z. I. P.; BONJARDIM, C. A.; FERREIRA, P. C. P.; KROON, E. G. Vaccinia vírus: shedding and horizontal transmission in a murine model. *Journal of General Virology*. Vol. 89, p. 2986-2991, 2008b.

FLORES, E. F. *Virologia Veterinária*. Editora da Universidade Federal de Santa Maria. Cap. 19, p. 571-603, 2012.

FONSECA, F. G.; LANNA, M. C. S.; CAMPOS, M. A. S.; KITAJIMA, E. W.; PERES, J. N.; GOLGHER, R. R.; FERREIRA, P. C. P.; KROON, E. G. Morphological and molecular characterization of the poxvirus BeAn58058. *Archives of Virology*. 143, p. 1171-1186, 1998.

FONSECA, F. G.; TRINDADE, G. S.; SILVA, R. L. A.; BONJARDIM, C. A.; FERREIRA, P. C. P.; KROON, E. G. Characterization of Vaccinia-like Virus Isolated in a Brazilian Forest. *Journal of General Virology*. Vol. 83, p. 223-228, 2002.

FONSECA, F. G.; KROON, E. G.; NOGUEIRA, M. I.; TRINDADE, G. S. Zoonotica vaccinia vírus outbreaks in Brazil: a review. *Future Virology*. Vol. 6, p. 697-707, 2011.

JACOBS, B. L.; LANGLAND, J. O.; KIBLER, K. V.; DENZLER, K. L.; WHITE, S. D.; HOLECHEK, S. A.; WONG, S.; HUYNH, T.; BASKIN, C. R. Vaccinia virus vaccines: Past, present and future. *Antiviral Research*. Vol.84, p. 1-13, 2009.

KROON, E. G.; MOTA, B. E. F.; ABRAHÃO, J. S.; da FONSECA, F. G.; TRINDADE, G. S. Zoonotic Brazilian Vaccinia Virus: From Field to therapy. *Antiviral Research*. Vol. 92, p. 150-163, 2011.

KROON, E. G.; LOBATO, Z. I. P.; GUEDES, M. I. M. C. *Enfermidades Causadas por Orthopoxvirus e Parapoxvirus*. Em: MEGID, J.; RIBEIRO, M. G.; PAES, A. C. *Doenças infecciosas dos animais de produção e Companhia*. 1.ed. Roca. Cap. 58, p. 641-656, 2016.

KURTH, A.; WIBBELT, G.; GERBER, H. P.; PETSCHAEIS, A.; PAULI, G.; NITSCHKE, A. Rat to Elephant to Human Transmission of Cowpox Virus. *Emerging Infectious Diseases*. Vol. 14, No. 4, p. 670-671, 2008.

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. C.; FERREIRA, J. M. S.; BONJARDIM, C. A.; FERREIRA, P.C .P.; KROON, E. G. Passatempo Virus, a Vaccinia Virus Strain, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*. Vol. 11, No. 12, December 2005.

LEWIS, A.; BOK, K.; PEREZ, O.; DE FILLIPO, J., PAOLAZZI, C.; GOMES, J. A. Characterization of a Vaccinia vírus strains used to produce smallpox vaccine in Argentina between 1937 and 1970. *Archives Virology*. Vol. 150, No. 14, p. 85-91, 2005.

LOBATO, Z. I. P.; TRINDADE, G. S.; FROIS, M. C. M.; RIBEIRO, E. B. T.; DIAS, G. R. C.; TEIXEIRA, B. M.; LIMA, F. A., ALMEIDA, G. M. F.; KROON, E. G. Surto de varíola bovina causada pelo vírus Vaccinia na região da Zona da Mata Mineira. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. Vol. 57, No. 4, p. 423-429, 2005.

LOPESODE, S.; LACERDA, J. P.; FONSECA, I. E.; CASTRO, D. P.; FORATTINI, O. P.; RABELLO, E. X. . Cotia vírus: a new agent isolated from sentinel mice in São Paulo, Brazil. *The American Journal of tropical medicine and hygiene*. Vol. 14, p. 156-157, 1965.

MARQUES, J. T.; TRINDADE, G. S. T.; da FONSECA, F. G.; dos SANTOS, J. R.; BONJARDIM, C. A.; FERREIRA, P. C. P.; KROON, E. G. Characterization of ATI, TK and IFN- α/β R Genes in the Genoma of the BeAn 58058 Virus, a Naturally Attenuated Wild *Orthopoxvirus*. *Virus Genes*. 23:3, p. 291-301, 2001.

MEDAGLIA, M. L. G.; PESSOA, L. C. G. D.; SALES, E. R. C.; FREITAS, T. R. P.; DAMASO, C. R. Spread of Cantagalo Virus to Northern Brazil. *Emerging Infectious Diseases*. Vol. 15, No. 7, July, 2009.

MEDEIROS-SILVA, D. C.; MOREIRA-SILVA, E. A. dos SANTOS.; GOMES, J. A, S.; da FONSECA, F. G.; CORREA-OLIVEIRA, R. Clinical signs, diagnosis, and case reports of Vaccinia vírus infections. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. Vol. 14, No. 2, p. 129-134, 2010.

MEGID, J.; APPOLINÁRIO, C. M.; LANGONI, H.; PITUCO, E. M.; OKUDA, L. H.; Short Report: Vaccinia Virus in Humans and Cattle in Southwest Region of São

Paulo State, Brazil. The American Society of Tropical Medicine and Hygiene. 79 (5), p. 647-651, 2008.

MEGID, J.; BORGES, I. A.; ABRAHÃO, J. S.; TRINDADE, G. S.; APPOLINÁRIO, C. M.; RIBEIRO, M. G.; ALLENDORF, S. D.; ANTUNES, J. M. A. P.; SILVA-FERNANDES, A. T.; KROON, E. G. Vaccinia Virus, Zoonotic Infection, São Paulo State, Brazil. Emerging Infectious Diseases. Vol.18, No. 1, p.189-191, 2012.

MILLS, J. N. Biodiversity Loss and Emerging Infectious Disease: An Example from the Rodent-borne Hemorrhagic Fevers. Biodiversity. Vol. 7, No. 1, 2006.

MOUSSATCHÉ, N., DAMASO, C.R., McFADDEN, G., When good vaccines go wild: Feral Orthopoxvirus in developing countries and beyond. J Infect Developing Countries. v.2, n.3, p.156-173, 2008.

NAGASSE-SUGAHARA, T. K.; KISIELIUS, J. J.; UEDA-ITO, M.; CURTI, S. P.; FIGUEIREDO, C. A.; CRUZ, A. S.; SILVA, M. M. J.; RAMOS, C. H.; SILVA, M. C. C.; SAKURAI, T.; SALES-GOMES, L. F. Human vaccinia-like outbreaks in São Paulo and Goiás States, Brazil: vírus detection, isolation and identification. Revista do Instituto de Medicina Tropical São Paulo. Vol. 46, No. 6, p. 315-322, 2004.

NINOVE, L.; DOMART, Y.; VERVEL, C.; VOINOT, C.; SALEZ, N.; RAOULT, D.; MEYER, H.; CAPEK, I.; ZANDOTTI, C.; CHARREL, R. N. Cowpox Virus Transmission from Pet Rats to Humans, France. Emerging Infectious Diseases. Vol. 15, No. 5, p. 781-783, 2009.

OLIVEIRA, D. B.; ASSIS, F. L.; FERREIRA, P. C. P.; BONJARDIM, C. A.; TRINDADE, G. S.; KROON, E. G.; ABRAHÃO, J. S. Short Report: Group 1 Vaccinia vírus Zoonotic Outbreak in Maranhao State, Brazil. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 89(6), p.1142-1145, 2013.

OLIVEIRA, G. P.; FERNANDES, A. T. S.; ASSIS, F. L.; ALVESS, P. A.; LUIZ, A. P. M. F.; FIGUEIREDO, L. B.; ALMEIDA, C. M. C.; TRAVOSSOS, C. E. P. F.; TRINDADE, G. S.; ABRAHÃO, J. S.; KROON, E. G. Short Report: Intrafamiliar Transmission of Vaccinia vírus during a Bovine Vaccinia Outbreak in Brazil: A New Insight in Viral Transmission Chain. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 90(6), p.1021-1023, 2014.

PERES, M. G.; BACCHIEGA, T. S.; APPOLINÁRIO, C. M.; ALLENDORF, S. D.; ANTUNES, J. M. A. P.; MOREIRA, S. A.; LEGATTI, E.; FONSECA, C. R.; PITUCO, M. E.; OKUDA, L. H.; PANTOJA, J. C. F.; FERREIRA, F.; MEGID, J. Serological study of Vaccinia vírus reservoirs in áreas with and without official reports of outbreaks in cattle and humans in São Paulo, Brazil. Archives of Virology. Vol.158, p.2433-2441, 2013.

PERES, M. G.; BARROS, C. B.; APPOLINÁRIO, C. M.; ANTUNES, J. M. A. P.; MIONI, M. S. R.; BACCHIEGA, T. S.; ALLENDORF, S. D.; VICENTE, A. F.; FONSECA, C. R.; MEGID, J. Dogs and opossums positive for Vaccinia vírus

during outbreak affecting cattle and humans, São Paulos State, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*. 22(2), p.271-273, 2016.

QUIXABEIRA-SANTOS, J. C.; MEDAGLIA, M. L. G.; PESCADOR, C. A.; DAMASO, C. R. Animal Movement and Establishment of Vaccinia Virus Cantagalo Strain in Amazon Biome Brazil. *Emerging Infectious Diseases*. Vol. 17, No. 4, April 2011.

REIS, N. L.; PERACHI, A. L.; PEDRO, W. A.; LIMA, I. P. Mamíferos do Brasil, Londrina, p. 364-365, 2006.

REHFELD, I. S.; GUEDES, M. I. M. C.; FRAIHA, A. L. S.; COSTA, A. G.; MATOS, A. C. D.; FIUZA, A. T. L.; LOBATO, Z. I. P. Vaccinia virus transmission through experimentally contaminated milk using a murine model. *Plos One*, Vol.10, p. 1-3, 2015

RIVETTI JR, A. V.; GUEDES, M. I. M. C.; REHFELD, I. S.; OLIVEIRA, T. M. L.; MATOS, A. C. D.; ABRAHÃO, J. S.; KROON, E. G.; LOBATO, Z. I. P. Bovine vaccinia, a systemic infection: Evidence of fecal shedding, viremia and detection in lymphoid organs. *Veterinary Microbiology*. P.1-9, 2012.

SANT'ANA, F. J. F.; LEAL, A. A.; RABELO, R. E.; VULCANI, V. A. S.; JUNIOR, J. A. F.; CARGNELUTTI, J. F.; FLORES, E. F. Outbreaks of vesicular disease caused by Vaccinia virus in dairy cattle from Goias State, Brazil (2010-2012). *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 33(7), p.860-866, julho 2013.

SCHATZMAYR, H. G.; COSTA, R. V. C.; GONÇALVES, M. C. R.; BARRETO, D. F.; BATISTA, V. H.; SILVA, M. E. V.; BRUST, L. A. C.; BARTH, O. M. Infecções humanas causadas por poxvirus relacionados ao vírus vaccinia no Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 42 (6), p. 672-676, nov-dez, 2009.

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. *Journal of Clinical Virology*. Vol.44, p.3008-313, 2009.

SMITH, G. L. In: DAVISON, A. J. and ELLIOTT, R. M. (The Practical Approach Series) *Molecular Virology A Practical Approach*. IRLPRESS at Oxford University Press, P. 255-281, 1993.

SMITHSON, C.; KAMPMAN, S., HETMAN, B. M., UPTON, C. Incongruencies in Vaccinia virus phylogenetic tree. *Computation*. 2, p. 182-198, 2014.

TRINDADE, G. S.; da 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 Infectious Diseases*. Vol. 9, No. 2, February 2003.

TRINDADE, G. S.; da FONSECA, F. G.; MARQUES, J. T.; DINIZ, S.; LEITE, J. A.; BODT, S. D.; der PEER, Y. V.; BONJARDIM, C. A.; FERREIRA, P. C. P.; KROON, E. G. Belo Horizonte Virus: a Vaccinia-like Virus lacking the A-type inclusion body gene isolated from infected mice. *Journal of General Virology*. Vol. 85, p. 2015-2021, 2004.

TRINDADE, G. S.; LOBATO, Z. I. P.; DRUMOND, B. P.; LEITE, J. A.; TRIGUEIRO, R. C.; GUEDES, M. I. M.; da FONSECA, dos SANTOS, J. R.; BONJARDIM, C. A.; FERREIRA, P. C. P.; KROON, E. G. Short Report: Isolation of two Vaccinia Virus Strains from a single Bovine Vaccinia Outbreak in a Rural Area from Brazil: Implications on the Emergence of Zoonotic Orthopoxviruses. *American Society of Tropical Medicine and Hygiene*. Vol. 75, No. 3, p. 486-490, 2006.

TRINDADE, G. S.; EMERSON, G. L.; CARROLI, D. S.; KROON, E. G.; DAMON, I. K. Brazilian Vaccinia Viruses and Their Origins. *Emerging Infectious Diseases*. Vol. 13, No. 7, July 2007a.

TRINDADE, G. S.; DRUMOND, B. P.; GUEDES, M. I. M. C.; LEITE, J. A.; MOTA, B. E. F.; CAMPOS, M. A. da FONSECA, F. G.; NOGUEIRA, M. L.; LOBATO, Z. I. P.; BONJARDIM, C. A.; FERREIRA, P. C. P.; KROON, E. G. Zoonotic Vaccinia Virus Infection in Brazil: Clinical Description and Implications for Health Professionals. *Journal of Clinical Microbiology*. p. 1370-1372, 2007b.

TRINDADE, G. S.; GUEDES, M. I. C.; DRUMOND, B. P.; MOTA, B. E. F.; ABRAHÃO, J. S.; LOBATO, Z. I. P.; GOMES, J. A. S.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; NOGUEIRA, M. L.; KROON, E. G. da FONSECA, F. G. Zoonotic Vaccinia Virus: Clinical and Immunological Characteristics in a Naturally Infected Patient. *Clinical Infectious Diseases*, Vol. 48, p. 37-40, 2009.

VORA, S.; DAMON, I.; FULGINITI, V.; WEBER, S. G.; KAHANA, M. STEIN, S. L.; GERBER, S. I.; HOUCHINS, S. G.; LERDEMAN, E.; HRUBY, D.; COLLINS, L.; SCOTT, D.; THOMPSON, K.; BARSON, J. V.; REGENER, R.; HUGHES, C.; DAUM, R. S.; LI, Y.; ZHAO, H.; SMITH, S.; BRADEN, Z.; KAREM, K.; OLSON, V.; DAVDSON, W.; TRINDADE, G. S.; BOLKEN, T.; JORDAN, R.; TIEN, D.; MARCINAK, J. Severe eczema vaccinatum in a household contact of a smallpox vaccine. *Clinical Infectious Diseases*. 46, p. 1555-1561, 2008.