

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNICA

FATORES DE RISCO E PREVALÊNCIA DE ANIMAIS
DOMÉSTICOS E SILVESTRES PORTADORES DE
ANTICORPOS CONTRA VACCINIA VÍRUS NA REGIÃO
CENTRO OESTE DO ESTADO DE SÃO PAULO

MARINA GEA PERES

Botucatu / SP

2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNICA

FATORES DE RISCO E PREVALÊNCIA DE ANIMAIS
DOMÉSTICOS E SILVESTRES PORTADORES DE
ANTICORPOS CONTRA VACCINIA VÍRUS NA REGIÃO
CENTRO OESTE DO ESTADO DE SÃO PAULO

MARINA GEA PERES

Dissertação apresentada junto ao
Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária para obtenção do
título de Mestre

Orientadora: Prof^ªDr^a Jane Megid

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

Peres, Marina Gea.

Fatores de risco e prevalência de animais domésticos e silvestres portadores de anticorpos contra Vaccinia Vírus na região centro oeste do estado de São Paulo / Marina Gea Peres. – Botucatu : [s.n.], 2013

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu

Orientador: Jane Megid

Capes: 50502034

1. Vaccinia. 2. Vírus. 3. Animais domésticos - Parasito. 4. Animais selvagens - Parasito. 5. Parasitologia veterinária.

Palavras-chave: Vírus Vaccinia; Reservatório Silvestre; Ciclo silvestre.

Nome da Autora: Marina Gea Peres

Título: FATORES DE RISCO E PREVALÊNCIA DE ANIMAIS DOMÉSTICOS E SILVESTRES PORTADORES DE ANTICORPOS CONTRA VACCINIA VÍRUS NA REGIÃO CENTRO OESTE DO ESTADO DE SÃO PAULO

COMISSÃO EXAMINADORA

ProfªDrª Jane Megid
Orientadora
Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof.Dr. José Carlos de Figueiredo Pantoja
Membro
Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública
FMVZ – UNESP – Botucatu

ProfªDrª Edviges Maristela Pituco
Membro
Centro de Pesquisa e Desenvolvimento em Sanidade Animal
Instituto Biológico – São Paulo

Data da Defesa: 12 de Dezembro de 2012

Dedicatória

À minha mãe, que sempre me incentivou, que acreditou em minha capacidade quando eu mesma não acreditava, que sonhou, lutou, e não me deixou desistir nos dias difíceis. À ela, que me ensinou com tanto amor e dedicação, a mais árdua e gratificante das responsabilidades da mulher, ser mãe.

Agradecimentos

Ao meu Senhor Jesus Cristo, por todas as “portas” que foram fechadas, para que outras pudessem ser abertas, por sua fidelidade e infinita misericórdia.

Ao meu amor e companheiro de jornada, Aécio, por me amar, respeitar, e apoiar. Por todas as trilhas abertas, por todas as armadilhas carregadas, por todas as risadas, por ter me dado o maior e melhor presente de todos, Sofia, nossa pernoca roliça. Por estar sempre ao meu lado nos bons, mas principalmente nos maus momentos. Por ser quem ele é, simples, honesto, amigo, sincero, fiel... e principalmente por me aceitar como sou.

A minha pequena Sofia, que tão inocente ainda não compreende minha ausência, mas retribui com imenso amor e alegria cada instante que estamos juntas.

À Professora e Orientadora Jane, por me receber tão prontamente, pela confiança depositada, pelos “puxões de orelha” quando os mesmos se fizeram necessários e por todos os ensinamentos que vieram com eles, pela compreensão e pela amizade.

Aos amigos do laboratório, Camila, Susan, João Marcelo, e Acácia por serem ombro e ouvidos, por serem em momentos de distração, pura diversão, por serem torcida, por serem fonte de conhecimento, por serem mão de obra, por serem quem eles são, especiais e inesquecíveis.

Ao técnico de laboratório e amigo Clóvis, por todas as extrações, por todas as eletroforeses, por estar sempre pronto a ajudar, pela amizade.

A todos os professores que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização desse trabalho: Professor José Carlos de Figueiredo 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 colegas de profissão que trabalharam arduamente para que tudo desse certo: Thais, Sabrina e Emerson, sem os quais tudo teria sido muito mais difícil.

Ao Sr. Alfronter Bacchiega Junior (Pai da Thais), carinhosamente apelidado de “Professor Pardal” por todas as “engenhocas” criadas para a coleta dos animais selvagens.

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 e soro, por nos proporcionarem momentos de êxtase (captura de um exemplar macho de Jaguatirica – *Leopardus pardalis*), e pelos ensinamentos atingidos.

À FAPESP pelo suporte financeiro ao projeto, e ao CNPq pela bolsa de mestrado.

Epígrafe

“Porque a loucura de Deus é mais sabia do que os homens; e a fraqueza de Deus é mais forte do que os homens”...

“...Deus escolhe as cousas loucas do mundo para envergonhar os sábios e escolhe as cousas fracas do mundo para envergonhar as fortes; e Deus escolhe as cousas humildes do mundo, e as desprezadas, e aquelas que não são, para reduzir a nada as que são; a fim de que ninguém se vanglorie na presença de Deus”. (I Coríntios 1:25; 27-29)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Total of samples collected and the percentage of positives by species	23
Tabela 2 - Wild rodents species sampled and their positivity for OPV	24
Tabela 3 - Percent of neutralizing titers among domestic animals and humans for OPV	24
Tabela 4 - Samples distribution among cities and difference of positivity proportion between humans and animals for OPV	25
Tabela 5 - Differences in the proportion of positive samples between domestic and wild species for OPV	26
Tabela 6 - Risk factor and their association with positivity of humans, domestic and wild animals for OPV	28

LISTA DE FIGURAS

Figura I - Principais surtos afetando rebanhos bovinos e humanos	8
Figura 1 - Map of sites sampling	19
Figura 2 - Blood sample collection from domestic animals	20
Figura 3 – Wild mammals trapping and rodents sample collection	21
Figura 4 - Positivity variation among diferentes age catogories in humans for OPV	25

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1	
1 Introdução	1
2 Revisão de Literatura	3
2.1 Vírus Vaccinia	3
2.1.1 Classificação Taxonomica	3
2.1.2 Morfologia dos Vírions	3
2.1.3 Manifestações Clínicas e Transmissão	4
2.2 VACV no Brasil	5
2.2.1 Breve Histórico	5
2.2.2 Primeiros isolamentos	6
2.2.3 Principais surtos	7
2.2.4 Disseminação do VACV pelo país	9
2.3 Agrupamento dos vírus brasileiros	10
2.4 Origem dos vírus isolados	11
2.5 Possíveis reservatórios	12
2.5.1 Modelo de transmissão	13
2.5.2 Roedores	14
2.5.3 Primatas e outros mamíferos	15
CAPÍTULO 2	
Trabalho Científico	16
CPÍTULO 3	
Conclusões Gerais	36
Referências Bibliográficas	37

PERES, M. G. Fatores de risco e prevalência de animais domésticos e silvestres portadores de anticorpos contra Vaccinia Vírus na região Centro Oeste do estado de São Paulo . Botucatu, 2012. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

O trabalho teve por objetivo avaliar o potencial de roedores silvestres e outros mamíferos selvagens de pequeno e médio porte como reservatório do vírus vaccínia, bem como determinar os possíveis fatores de risco associados à prevalência de portadores de anticorpos contra Orthopoxvirus em vacas leiteiras e outros animais domésticos, animais selvagens e em humanos. Para tanto, questionário epidemiológico foi aplicado a 47 propriedades rurais distribuídas ao longo dos municípios de Torre de Pedra (com registros oficiais de surtos por VACV afetando rebanhos leiteiros e ordenhadores), Bofete e Anhembi (sem registros oficiais de surtos) a fim de levantar dados sobre o estado sanitário de cada propriedade e possíveis fatores de risco. Amostras de sangue e soro foram coletadas, após autorização prévia, de vacas, cavalos, carneiros, suínos, cães e gatos, também dos produtores rurais e seus familiares, e dos animais selvagens capturados em cada propriedade. Foram conduzidas análises sorológicas através das técnicas de vírus neutralização (para amostras de soro humano e de animais domésticos) e teste de neutralização pela redução da formação de placas (para amostras de animais selvagens). Os resultados mostram baixa positividade entre os animais selvagens e alta positividade entre domésticos e humanos, sugerindo que algumas espécies domésticas como cães e cavalos podem representar possíveis reservatórios além de apontar fatores de risco como a fonte de água e animais selvagens de hábitos ribeirinhos, como futuros alvos de estudo sobre as formas de disseminação do vírus vaccínia.

Palavras chave: Vírus Vaccínia; Reservatório Silvestre; Ciclo silvestre.

PERES, M. G. Risk factors and prevalence of domestic and wild animals carrying antibodies against Vaccinia Virus at Central West region of São Paulo State. Botucatu, 2012. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

This work aimed analyze the potential of wild rodents and others wild mammals as vaccinia virus reservoir, as well as to determine the risk factors associated to orthopoxvirus antibodies prevalence in milking cows and other domestic animals, wild animals and humans. An epidemiological questionnaire was applied to 47 farms distributed among Torre de Pedra, Bofete and Anhembi, to obtain data about sanitary situation of the farms and possible risk factors. Blood samples were collected from cows, horses, sheep, swine, dogs and cats, also from milker and their family, and from wild animals trapped in each farm. Serologic analyzes were proceeded using virus neurtalization (for humans and domestic animals samples) and Plaque Reduction Neutralization Test (for wild animals). The results showed low percentage of positivity in wild animals and high positivity between humans and domestic animals, suggesting other possible reservoirs like dogs and horses as possible reservoirs and source of water and riparian wild animals as risk factor for VACV infection opening new targets for future studies about Vaccinia virus dissemination.

Key words: Vaccinia virus; Wild reservoirs; Sylvatic cicle

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

O Vírus Vaccinia (VACV) é o agente etiológico de uma doença exantemática, popularmente conhecida como “varíola bovina”, caracterizada pelo aparecimento de lesões cutâneas localizadas nos tetos e úberes das vacas, e no muflo e mucosa oral dos bezerros (FENNER, 2000). Além dos animais, o VACV afeta também os humanos, que adquirem a infecção pelo contato direto com as lesões no momento da ordenha, desenvolvendo alterações semelhantes a dos animais nas mãos, braços e antebraços (LOBATO et al., 2005).

No Brasil, desde o fim do programa de vacinação mundial maciça, em 1980, quando a Organização Mundial da Saúde (WHO) anunciou a erradicação do Vírus da Varíola Humana (VARV), a “varíola bovina” apresenta-se como importante doença re-emergente, afetando bovinos e humanos acarretando grande perda econômica devido à diminuição na produção de leite e à ocorrência de mastite e outras infecções bacterianas secundárias (DAMASO et al., 2000, SCHATZMAYR et al., 2000, TRINDADE et al., 2003, TRINDADE et al., 2007a). Acreditava-se que tal re-emergência estava relacionada ao fato de o vírus presente nas vacinas utilizadas pela campanha da WHO durante 1960 e 1970, o VACV, tivesse adaptado-se a um 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., 2007; DRUMOND et al., 2008).

A origem dos surtos no país continua desconhecida, entretanto a teoria 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., 2007; DRUMOND et al., 2008; FERREIRA et al., 2008b).

O vírus da “varíola bovina” propriamente dita é o Cowpox Vírus (CPXV), endêmico na Europa e oeste da Ásia que tem como hospedeiros, dentre outros, os bovinos, humanos, felídeos e roedores. Esses últimos atuam também 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* (FLORES, 2007; ESSBAUER et al., 2009).

Existem poucas informações sobre os reservatórios naturais do VACV, mas desde o primeiro e único isolamento do vírus em um roedor silvestre do gênero *Oryzomys* capturado na floresta Amazônica nos arredores de Belém do Pará, somado aos relatos relacionados a roedores reservatórios do CPXV na Europa, promovendo transmissão viral para humanos, gatos e animais de zoológico, que a procura por roedores infectados com VACV em áreas de surto afetando rebanhos bovinos e humanos parece uma estratégia racional (FONSECA et al., 1998; ABRAHÃO et al., 2009a).

Tanto o VACV como o CPXV pertencem ao gênero Orthopoxvírus da família Poxviridae, cujos membros possuem vírions grandes e complexos que podem ser visualizados pela microscopia eletrônica (FLORES, 2007). O diagnóstico clássico do VACV é realizado pelo isolamento viral em membrana corioalantóide de ovos embrionados e em cultivo celular, pela detecção da partícula viral por microscopia eletrônica, por métodos sorológicos e técnicas de biologia molecular, como a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) (NAGASSE – SUGAHARA et al., 2004).

Considerando a importância do VACV e as perdas econômicas ocasionadas pelo vírus na produção leiteira, o presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial de roedores e outros mamíferos silvestres como possíveis reservatórios da enfermidade, assim como verificar a associação de possíveis fatores de risco à positividade nas áreas estudadas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Vírus Vaccínia

2.1.1 Classificação taxonômica

Pertencente à família Poxviridae, o vírus Vaccínia é o protótipo do gênero Orthopoxvirus (SMITH, 1993). A família Poxviridae é dividida nas subfamílias Entomopoxvirinae e Chordopoxvirinae. Os membros da subfamília Entomopoxvirinae infectam diversas ordens da classe Insecta (FLORES, 2007; BECKER et al., 2008). Já a subfamília Chordopoxvirinae infecta os vertebrados e é formada por oito gêneros denominados Orthopoxvirus, Capripoxvirus, Suipoxvirus, Leporipoxvirus, Avipoxvirus, Molluscipoxvirus, Yatapoxvirus e Parapoxvirus (FLORES, 2007).

O gênero Orthopoxvirus possui quatro espécies de vírus que são importantes patógenos zoonóticos: o extinto Vírus da Varíola Humana ou Varíola vírus (VARV), o Vírus da “varíola bovina” ou Cowpox vírus (CPXV) que infecta bovinos, humanos, roedores e felídeos e tem distribuição restrita aos continentes europeu e asiático; o Vírus da Varíola dos Macacos ou Monkeypox vírus (MPXV), que infecta primatas, humanos e esquilos, de distribuição restrita ao oeste e centro do continente africano; e o Vaccinia vírus (VACV) que infecta bovinos, suínos, roedores, coelhos, humanos e outros mamíferos e tem distribuição mundial (DAMASO et al., 2000; LOBATO et al., 2005; FLORES, 2007; ESSBAUER et al., 2009). Os membros do gênero Orthopoxvirus apresentam reação imunológica cruzada, ou seja, após infecção e/ou imunização com qualquer agente desse gênero observa-se uma resposta sorológica protetora frente aos demais (BULLER; PALUMBO, 1991; FLORES, 2007; ESSBAUER et al., 2009).

2.1.2 Morfologia dos virions

Os membros da família Poxviridae possuem virions grandes e complexos, que podem apresentar forma ovóide, retangular arredondada ou pleomórfica, com dimensões variando entre 140-260nm de diâmetro por 220-450nm de comprimento (FLORES, 2007; ESSBAUER et al., 2009). A partícula viral contém mais de 100 proteínas distribuídas em quatro estruturas distintas:

cerne, corpúsculos laterais (corpos laterais), membrana e envelope. 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; FLORES, 2007). 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 (FLORES, 2007; ESSBAUER et al., 2009)

Seu genoma consiste de uma molécula de DNA linear de fita dupla, contendo sequências repetidas invertidas do tipo hairpin (ITRs) nas extremidades e uma única região longa que ocupa a região central. As duas cadeias de DNA são unidas entre si nas extremidades por curvas (loops), sendo as regiões que formam as curvas ricas em A-T não complementares, não sendo possível o pareamento entre elas (SMITH, 1993; FLORES, 2007; BECKER et al., 2008).

2.1.3 Manifestações clínicas e transmissão

Nos tetos e úberes das vacas as lesões causadas pelo VACV são proliferativas, ulcerativas ou em crostas. 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 (SMITH, 1993; LOBATO et al., 2005; FLORES, 2007). Bezerros podem desenvolver lesões no focinho e mucosa oral. O curso da doença varia entre três a quatro semanas (FLORES, 2007; TRINDADE et al., 2007a; TRINDADE et al., 2009; SILVA-FERNANDES et al., 2009; SCHATZMAYR et al., 2009a).

A transmissão entre os animais se dá pelas mãos dos ordenhadores ou equipamentos de ordenha mecânica, sendo que a penetração viral ocorre por soluções de continuidade na pele e em lesões pré-existentes nos tetos das vacas. Os seres 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, um quadro febril com reação ganglionar axilar, por vezes dolorosa, prostração, anorexia, desidratação, cefaleia, sudorese, artralgia, mialgia, e em casos de lesões afetando pescoço e face uma reação ganglionar cervical anterior (DAMASO et al., 2000; LOBATO et al., 2005; FLORES, 2007; TRINDADE et al., 2007a; TRINDADE et al., 2008; SILVA-FERNANDES et al., 2009; SCHATZMAYR et al., 2009a).

2.2 VACV no Brasil

2.2.1 Breve histórico

A importação de VACV para o Brasil data de 1804, quando escravos vindos de Lisboa – Portugal, atracaram em um porto no estado da Bahia trazendo em seus braços a vacina contra varíola humana. Da Bahia os escravos foram enviados ao Rio de Janeiro, possivelmente transmitindo o vírus vacinal para a população local, sendo desta forma, braço a braço, que a população brasileira foi vacinada entre 1804 e 1887 (FERNANDES, 1999).

A primeira vacina animal produzida em bovinos 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 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 a vacina animal 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 (a vacina viva mantida nos Estados Unidos desde os anos 70) (LEWIS et al., 2005). 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., 2007b). 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

Nas décadas de 60 e 70, o governo brasileiro e o Instituto Adolfo Lutz conduziram uma fiscalização da atividade dos arbovírus em áreas de floresta ao redor da cidade de São Paulo. Durante esta investigação em 1961, um poxvírus foi isolado de camundongo-sentinela exposto a vetores aéreos em uma área de floresta no município de Cotia no Estado de São Paulo, sendo nomeado como Cotia Vírus (CV). As análises filogenéticas demonstraram tratar-se de um vírus semelhante ao Vaccinia, principalmente às amostras VACV-WR e LISTER. Posteriormente, em 1979 na mesma floresta, sob as mesmas condições, outro vírus foi isolado de camundongo-sentinela. Inicialmente, acreditou-se tratar de outro CV, mas análises filogenéticas demonstraram uma nova variante do VACV que foi denominado Vírus SPAn232 (SPANv / SAV) (SOUZA et al., 1965; FONSECA et al., 2002). No

entanto, o primeiro isolamento de uma nova variante do Vírus Vaccínia em roedor silvestre data de 1963, quando o vírus chamado BeAn58058 (BAV), foi isolado em amostra de sangue de um *Oryzomys* spp. capturado na floresta Amazônica nos arredores de Belém do Pará. BAV é antigenicamente relacionado ao SAV (FONSECA et al., 1998; MARQUES et al., 2001).

2.2.3 Principais surtos

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 então, diversos casos de doença exantemática afetando rebanhos bovinos e humanos começaram a ser descritos no Brasil. Em 1999 foram registrados surtos nos estados do Rio de Janeiro e São Paulo, e de 2000 a 2005 diversos surtos foram registrados no estado de Minas Gerais, o maior produtor leiteiro do país (DAMASO et al., 2000; TRINDADE et al., 2003; LEITE et al., 2005; TRINDADE et al., 2006; TRINDADE et al., ABRAHÃO et al., 2009; TRINDADE et al., 2009). Até 2005 foram acometidos bovinos leiteiros e ordenhadores, entretanto dois surtos no estado mineiro merecem destaque. O primeiro foi o surto que afetou o município de Guarani, onde duas variantes do VACV foram simultaneamente isoladas, sendo o segundo o 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., 2009). A cronologia dos surtos encontra-se na Figura I.

1999	1999	2000	2001	2003	2005	2005
Cantagalo Vírus (CTGV)	Araçatuba Vírus (ARAV)	Muriae Vírus (MURV)	Guarani P1 Vírus (GP1V) e Guarani P2 Vírus (GP2V)	Passatempo Vírus (PSTV)	Mariana Vírus (MARV)	Serro Vírus (S2V)
Vacas e humanos	Vacas e humanos	Vacas e humanos	Vacas e humanos	Vacas e humanos	Vacas e humanos Mus musculus	Vacas e humanos
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	Cidade de Passatempo Estado de Minas Gerais	Cidade de Mariana Estado de Minas Gerais	Cidade de Serro Estado de Minas Gerais
Damaso et al., 2000	Trindade et al., 2003	Trindade et al., 2007	Trindade et al., 2006	Leite et al., 2005	Abrahão et al., 2009	Trindade et al., 2009

FIGURA I. Principais surtos afetando rebanhos bovinos e humanos

Em Fevereiro de 2008 foi descrito o primeiro surto de VACV afetando cavalos da raça crioulo, no município de Pelotas – Rio Grande do Sul, 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, corroborado por meio de um ensaio biológico em que camundongos

BALB/c foram inoculados por via intranasal com P1V e P2V. 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).

2.2.4 Disseminação do VACV pelo país

Além dos principais relatos que abordam também a classificação do VACV, diversos autores descrevem surtos por todo o território nacional. Em 2007, quatro propriedades localizadas nos municípios de Guareí e Torre de Pedra, na região sudeste do estado de São Paulo, apresentaram surto de doença exantemática, afetando animais e ordenhadores, incluindo uma criança de 11 anos. Crostas das lesões foram coletadas e submetidas a PCR demonstrando resultado positivo para VACV (MEGID et al., 2008).

Em setembro de 2008, 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 a 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. Esses relatos mostraram a propagação do CTGV para a região norte do país. 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 (DAMASO et al., 2009).

De junho de 2008 a junho de 2010 surtos relacionados ao VACV foram investigados nos estado do Mato Grosso e Rondônia. 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).

Em 2009 e 2010, foram relatados surtos de doença exantemática afetando rebanhos leiteiros e ordenhadores dos municípios de Itatinga e Torre de Pedra no interior do estado de São Paulo. O resultado da análise filogenética das amostras coletadas demonstrou alta identidade do VACV envolvido nesses surtos com o ARAV e o CTGV (MEGID et al., 2012).

Um estudo sorológico sobre a prevalência de anticorpos contra Orthopoxvirus foi conduzido por Mota et al. (2010) em 294 amostras de soro, coletadas durante o ano de 2004, de moradores de um assentamento rural de Ramal do Granada no Estado do Acre. Homens e mulheres entre 3 e 79 anos apresentaram soropositividade de 27,89% sendo que 23,38% dos indivíduos que foram identificados como não vacinados contra varíola, devido a idade, resultaram soropositivos, o que sugere que de alguma forma estes indivíduos estão expostos a Orthopoxvirus, que provavelmente circulam na região amazônica.

2.3 Agrupamento dos vírus brasileiros

O achado mais importante sobre a diversidade dos Vaccinia virus brasileiros é uma nítida dicotomia genética e fenotípica entre eles (TRINDADE et al., 2007b; DRUMOND et al., 2008; FERREIRA et al., 2008b). 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 deles, 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 6 aminoácidos (aa) na posição 251, como é o caso do ARAV, CTGV, PSTV, GP2V, MURV, S2V, MARV e P2V, enquanto que GP1V, BHV, P1V, BAV e SAV não apresentam essa deleção (DAMASO et al., 2000; da FONSECA et al., 2002; TRINDADE et al., 2003; TRINDADE et al., 2004; LEITE et al., 2005; ABRAHÃO et al., 2009a). As análises filogenéticas das sequências do gene A56R mostram os vírus brasileiros divididos em dois grupos de acordo com o padrão de deleção dos 6 aminoácidos (TRINDADE et al., 2007b; DRUMOND et al., 2008).

Essa dicotomia encontrada na análise filogenética do gene A56R pode ser estendida ao nível biológico. Em estudo realizado por Ferreira et al. (2008b), 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 severidade das infecções nos humanos e no gado foi observada ou relatada nos surtos em que as amostras destes vírus foram coletados.

2.4 Origem dos vírus isolados

Alguns pesquisadores tem 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 et al. (2008) pelas análises do gene A56R que a LISTER do Butantan não está diretamente agrupada com os VACV brasileiros. Embora a amostra vacinal IOC apresente a mesma deleção de 18 nucleotídeos no gene A56R, ela também apresenta substituições de nucleotídeos em todo o gene que não são compartilhadas pelos vírus brasileiros, o que faz com que não se agrupe aos mesmos. Estudos sugerem que a origem e a história natural do VACV é distinta dos vírus vacinais usados no Brasil (TRINDADE et al., 2007; DRUMOND et al., 2008).

A teoria 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 são transmitidas para hospedeiros acidentais (vacas e humanos). Isso porque observa-se uma diversidade genética e fenotípica entre os vírus isolados, e os mesmos são separados filogeneticamente das cepas vacinais usadas no Brasil (TRINDADE et al., 2007; DRUMOND et al., 2008; FERREIRA et al., 2008b).

Na teoria, cada um dos vírus isolados nos surtos é o resultado de uma nova introdução de vírus de um reservatório selvagem para populações bovinas e humanas, o que provavelmente está relacionada com a intensificação das atividades antropogênicas (ABRAHÃO et al., 2009a). Os distúrbios antropogênicos nos ecossistemas como o desmatamento, a fragmentação dos habitats e avanços da agricultura e pecuária para áreas de floresta aumentam o contato da vida selvagem com as populações rurais, alterando 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) destaca a relação entre a perda da biodiversidade e a emergência de doenças infecciosas, nas quais as alterações nos habitats favorecem poucas espécies, e se essas forem as mais competentes na transmissão de patógenos, haverá maior eficiência de transmissão, aumento das taxas de prevalência entre espécies reservatórios, e maior risco de transmissão a seres humanos. Na prática o avanço da agricultura e pecuária para áreas naturais tem gerado o contato de seres humanos e seus animais domésticos com os animais selvagens em seus habitats, o que facilitaria a disseminação de agentes infecciosos e parasitários para novos hospedeiros e novos ambientes, estabelecendo novas relações entre parasita e hospedeiro e novos nichos ecológicos na cadeia de transmissão de doenças. Como consequência, zoonoses epidêmicas como a causada pelo VACV emergem (KROON et al., 2011).

2.5 Possíveis reservatórios

A maioria dos surtos ocorre na época da seca quando há escassez da oferta de alimentos, o que leva alguns animais selvagens a procurar alimento nas áreas próximas a casa e currais. Ratos, camundongos, gambás, raposas, cachorros e gatos selvagens são frequentemente avistados rodeando as áreas

das propriedades onde os surtos acontecem (ABRAHÃO et al., 2009a). Na teoria, alguma dessas espécies, especialmente os roedores, podem ser os reservatórios (KROON et al., 2011).

2.5.1 Modelo de transmissão

Um modelo de transmissão hipotético vem sendo sugerido, desde o isolamento do MARV em camundongo da espécie *Mus musculus* (ABRAHÃO et al., 2009a), no qual roedores peridomésticos atuam como uma conexão entre os animais selvagens e os animais domésticos na área rural. O roedor peridoméstico pode se infectar por um animal selvagem nos arredores da propriedade, pelas disputas por território, aspiração ou ingestão de excrementos contaminados, 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).

Essa teoria foi parcialmente confirmada por um estudo recente no qual D'Anunciação et al. (2012), mostraram a infecção de camundongos BALB/c expostos a fezes de vacas que haviam sido infectadas experimentalmente por GP2V. 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 et al. (2009b) foi observado que camundongos BALB/c inoculados por 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 et al. (2008a) demonstraram que camundongos-sentinela expostos a fezes e urina de camundongos BALB/c experimentalmente

contaminados com VACV-WR e GP2V por via intranasal, não apenas adquirem a infecção como disseminam DNA e partículas virais em suas fezes, levantando 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., 2008a ;ABRAHÃO et al., 2009b).

2.5.2 Roedores

Existem poucas informações sobre os reservatórios naturais do VACV, mas desde o primeiro e único isolamento do vírus em um roedor silvestre do gênero *Oryzomys*, somado ao modelo de transmissão proposto (ABRAHÃO et al., 2009a), que os roedores silvestres e/ou peridomésticos tem sido apontados como possíveis reservatórios. Desta forma, a procura por roedores infectados com VACV em áreas afetadas pela “variola bovina” parece uma estratégia racional, levando em conta os relatos relacionados a roedores reservatórios do CPXV na Europa, promovendo transmissão viral para humanos, gatos e animais de zoológico (ABRAHÃO et al., 2009a). O Cowpox virus é endêmico na Europa e oeste da Ásia e tem como hospedeiros, dentre outros, os bovinos, humanos, felídeos e roedores. Esses últimos atuam também 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* (FLORES, 2007; ESSBAUER et al., 2009).

Kurth et al. (2008) descreveram transmissão do CPXV de um *Rattus norvegicus* para um elefante de circo, e desse para seu treinador no norte da Alemanha. Casos semelhantes a esse, foram registrados na região noroeste da Itália, envolvendo a transmissão de CPXV de gatos para humanos, sendo os gatos previamente infectados por contato direto com roedores urbanos e silvestres (CARLETTI et al., 2009). Campe et al. (2009) e Ninove et al. (2009), relataram diversos casos de transmissão do CPXV de camundongos tidos como animais de estimação para seus proprietários, na Alemanha e na França, respectivamente.

2.5.3 Primatas e outros mamíferos

O Brasil possui, aproximadamente, 12% das 5416 espécies de mamíferos descritas no mundo (WILSON; REEDER, 2005) e tendo os OPV ampla capacidade de estabelecerem infecções persistentes ou aguda em mamíferos de diferentes ordens, outras espécies de mamíferos devem ser avaliadas como potenciais reservatórios.

Em um estudo sorológico realizado entre Fevereiro de 2001 a Setembro de 2002, 269 Macacos-prego (*Cebus apella*), 27 Bugius (*Alouatta 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), e 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., 2010b).

Comparativamente, em um estudo com uma população de colobos vermelhos de Pennant (*Procolobus pennantii*), primatas que habitam o Parque Nacional de Kibale, a oeste de Uganda, verificou-se evidências sorológicas de infecção por um OPV distinto do MPXV, ainda não caracterizado (GOLDBERG et al., 2008).

A alta taxa de animais positivos tanto na sorologia como na PCR na Amazônia, somada aos achados na África, fazem com que os primatas não humanos se destaquem como possíveis reservatórios naturais do VACV.

CAPÍTULO 2 – TRABALHO CIENTÍFICO

Trabalho a ser enviado para a revista Archives of Virology. Normas disponíveis em: www.springer.com/biomed/virology/journal/705

Serological study of Vaccinia Virus reservoirs in areas with and without official reports of outbreaks in cattle and humans - São Paulo, Brazil

M. G. Peres¹; T. S. Bacchiega¹; C. M. Appolinário¹; A. F. Vicente¹; S. D. Allendorf¹; J. M. A. P. Antunes¹; S. A. Moreira¹; E. Legatti¹; C. R. Fonseca¹; E. M. Pituco²; L. H. Okuda²; J. C. F. Pantoja¹; F. Ferreira³; J. Megid¹

1. Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP- Distrito de Rubião Júnior s/n, Botucatu, São Paulo, Brazil CEP:18618-970
e-mail: jane@fmvz.unesp.br
2. Laboratório de Vírus dos Bovídeos do Instituto Biológico de São Paulo – Av. Conselheiro Rodrigues Alves, 1252, Vila Mariana, São Paulo – SP CEP: 04014-002
3. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo – USP – Av. Prof. Dr. Orlando M. de Paiva, 87, Butantan, São Paulo – SP, Brazil CEP:05508-270

Abstract

Vaccinia virus (VACV), the etiological agent of an exanthematic disease, has been associated with several bovine outbreaks in Brazil since the end of global vaccination campaign against smallpox. It was previously believed that the vaccine virus used for the WHO global campaign had adapted to an unknown wild reservoir and was sporadically re-emerging in outbreaks in cattle and milkers. At present, it is known that Brazilian VACV is phylogenetically different from the Vaccinia virus vaccinal strain, but its origin remains unknown. This study assessed the seroprevalence of Orthopoxvirus in domestic and wild animals and farmers from 47 farms in three cities in the southwest region of the state of São Paulo with or without official reports of outbreaks in cattle or humans. Our data indicate a low seroprevalence of antibodies in wild animals and raise interesting questions about the real potential of wild rodents and marsupials as VACV reservoirs and suggest other routes through which VACV can be spread.

Keywords: Vaccinia virus; wild animals, rodents, Brazil, VACV.

Introduction

Vaccinia Virus (VACV), the prototype of the Orthopoxvirus (OPV) genus, is the etiological agent of an exanthematic disease characterized by cutaneous lesions in cow udders and teats. The disease causes economic losses due to milk production reduction and increased susceptibility to mastitis and secondary bacterial infections. VACV is a zoonotic disease, and viral transmission occurs mainly through direct contact between milkers and cattle [1, 2]. Since the end of the global vaccination campaign against smallpox, several VACV outbreaks affecting both dairy cattle and milkers have been reported in Brazil. The first reported outbreaks occurred in Cantagalo city in Rio de Janeiro State and Araçatuba city in the state of São Paulo. These isolated viruses were named Cantagalo Vírus (CTGV) and Araçatuba Vírus (ARAV), respectively [3, 4, 5, 6].

The greatest milk-producing state in Brazil, Minas Gerais, has reported outbreaks affecting cattle and milkers in the last 10 years [7]. In the state of São Paulo, in Torre de Pedra, Guareí and Itatinga counties, outbreaks have been reported affecting cows and humans since 2007 [8, 9]. Other outbreaks have been reported in the Mato Grosso and Rondonia states; however, the origin of VACV remains unknown [10]. It was previously believed that the Vaccinia vaccinal virus of the WHO smallpox global campaign had adapted to an unknown wild reservoir and was sporadically re-emerging through outbreaks in cattle and milkers. It is now known that Brazilian VACV is phylogenetically different from the Vaccinia vaccinal virus strain, and the most accepted theory is that there are genetically and phenotypically different VACV populations circulating in unknown natural reservoirs. The transmission of these VACV strains to cows and humans depends on biological and geographical conditions [6, 11, 12].

In the present study, we assessed the seroprevalence of OPV in cows, horses, sheep, swine, dogs, cats and wild specimens from the orders of marsupialia, carnivora and rodentia, as well as rural workers, milkers and their families on 47 farms throughout three cities in the southwestern region of the state of São Paulo with or without a history of outbreaks. Our data indicate the low

seroprevalence of antibodies in wild animals and raises interesting questions regarding the real potential of wild rodents and marsupials as reservoirs in addition to suggesting other routes of viral environmental spread.

Materials and Methods

This study was approved by the Ethical Committee of Animals Uses in Veterinary Medicine and Animal Production of São Paulo State University “Júlio de Mesquita Filho” (number 112/2010-CEUA) and by the Ethical Committee of Medicine of that university (number CEP3605-2010).

Epidemiological survey data

To investigate each farm, epidemiological data were collected. The risks factors analyzed were as follows: milking type, presence of domestic mammals (cats, dogs, horses, swine, and sheep), problems with flies and/or ticks affecting herds, presence of synanthropic rodents and bats in the common areas of farms, presence and contact with wild animals in the peridomestic area, source of water, sewage system, garbage destination, history of previous outbreaks affecting cattle and humans and age of rural workers and their families. Data collection was conducted from October to December 2010.

Site sampling

Samples were collected in three counties with and without a history of outbreaks in cattle and humans: Torre de Pedra ($23^{\circ}14'58.76''\text{S}48^{\circ}11'39.49''\text{W}$), where outbreaks were registered in 2007 and 2010 [8, 9], Bofete ($23^{\circ}05'54.51''\text{S}48^{\circ}11'26.61''\text{W}$), and Anhembi ($22^{\circ}47'09.11''\text{S}48^{\circ}07'30.90''\text{W}$). The latter two counties had no history of outbreak reports (Figure 1).

The total number of farms included in the study (48) was calculated based on the population of the farms in the region (Anhembi, Bofete, and Torre de Pedra), a 5% prevalence of positive farms (at least one positive sample), and a 5% margin of error using Epi Info 3.5.4 [13]. Forty-eight daily properties were selected randomly by lot, with 11 properties being in Torre de Pedra, 15 in

Bofete, and 22 in Anhembi (Figure 1). All owners signed an informed consent form before the initiation of sample collection.

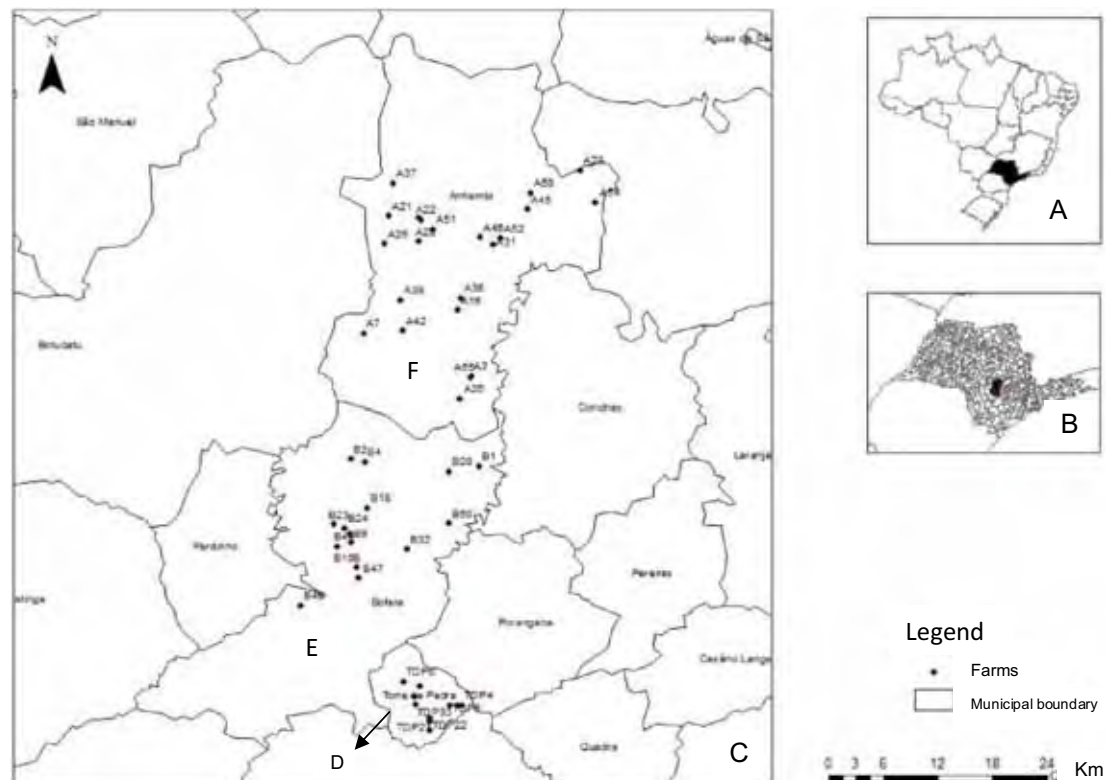


Figure 1. Map of sites sampling showing Brazil map (A) with São Paulo State in black. São Paulo state map (B) with Torre de Pedra, Bofete and Anhembi in red. Map of São Paulo State (C) showing the sites of sampling; the points in red correspond to farms in Torre de Pedra (D), Bofete (E) and Anhembi (F).

Domestic animal sample collection

For each farm, the minimum number of sampled animals was determined using the program HERDACC3.0® [14], assuming a PCR sensitivity of 80%, a specificity of 99.9%, and a proportion of infected animals in a positive herd of 20%. After considering the variation of the herd size and the positive cutoff, the simulations determined that the minimum number of cows that needed to be sampled to ensure a minimum sensitivity and specificity of 95% was 20 animals.

In a cattle herd with more than 20 animals, only 20 samples were collected, but in a herd with fewer than 20 animals, samples from all animals were collected. For other species (horses, sheep, swine, dogs and cats) from one to five samples were collected for each species. Blood samples were

collected by mammary vein puncture or jugular puncture (Figure 2) and later centrifuged, and the sera were stored at -20°C . These samples were collected from February to April 2011.



Figure 2. A) Blood sample collection by mammary vein puncture. B) Blood sample

Wild animal sample collection

Wild animals capture was conducted from May to September 2011. This work was approved by the Environment Ministry – MMA, the Brazilian Institute of Environment and Natural Resources Renewable – IBAMA, the Chico Mendes Biodiversity Conservation Institute – ICMBio and the Biodiversity Information and Authorization System – SISBIO for wild mammal and rodent capture under the number 23918-1.

Tomahawk traps were used for wild mammal capture (Figure 3B) using chicken bait. Wild rodents were captured with pitfall traps (Figure 3A) and Sherman traps. Peanut cream, canned sardines, cornmeal and oatmeal were used as baits. The mammals were anesthetized with tiletamine and zolazepam (Zoletil®) using the recommended dose for each species [15], and blood samples were collected by jugular or cardiac puncture. The animals were put inside the Tomahawk until the cessation of the anesthesia and were released the next morning. During the checking procedure for the Sherman and pitfall traps, a positive pressure mask with a HEPA filter and a triple layer of gloves were used [16]. If there were a rodent in the pitfall trap, the animals were removed and placed in a plastic box for transport to the site of sample collection. Sherman traps containing rodents were transported to the site of sample collection. The transportation of animals and traps were performed with

rodent-related infectious disease control safety procedures to prevent, for instance, Hantavirus infection [16]. The materials used during the collection of the samples and the traps were disinfected with a benzalkonium chloride solution [16].

To collect rodent samples, the researchers used personal protective equipment (PPE) consisting of a waterproof polypropylene disposable apron, two pairs of procedure gloves, rubber boots and a respiratory motorized breathing mask made of Tyvek and including a trachea, motor and HEPA filter [16] (Figure 3D). The rodents were anesthetized in a plastic autoclavable bag containing gauze soaked in ethyl ether (Figure 3C). After sedation, the animals were weighed, and blood samples were collected by cardiac puncture. After this procedure, the rodents were euthanized through the deepening of the anesthetic plan and their organs were collected, placed into microtubes and stored at -80°C for future PCR assays.



Figure 3: A) Pitfall trap. B) *Nasua nasua* in a Tomahawk trap. C) Wild rodents anesthesia. D) EPP to wild rodents sample collection.

Human sample collection

Blood samples of the farmers, rural workers and their families were collected by nurses with cephalic vein puncture during October and November

2011. The blood samples were centrifuged, and the sera were stored at -20°C for serological study.

Virus Neutralizing Test (VN)

Serum samples were inactivated by heating at 56°C for 30 minutes. The Araçatuba Virus (ARAV), isolated from udder cow lesions [5], was used as a standard virus in the virus neutralizing test (VN). In the plates, test serial dilutions were made in serum from 1:2 with a 100 TCID₅₀ (infective dose by tissue culture) viral strain (final dilution = 1:4) and incubated at 37°C with 5% CO₂ for 24 hours followed by the addition of cell VERO suspensions at a concentration 3x10⁵ cells/mL. The plates were reincubated in the same conditions for 96 hours. Inspection of the plates was performed using an inverted optical microscope. Titers equal or greater than 16 for domestic animals and humans were considered positive [18].

Plaque Reduction Neutralizing Test (PRNT)

Serum samples were inactivated by heating at 56°C for 30 minutes, and later, an OPV plaque reduction neutralizing test (PRNT) was performed. Inactivated sera were diluted from 1:20 in MEM and submitted to PRNT in BSC-40 cells as described previously [18] using the VACV-Western Reserve. As positive controls, anti-OPV positive human sera collected during BV outbreaks were used [19]. As negative controls, bovine anti-OPV negative sera were used. The positivity was defined as the serum inhibiting at least 50% of the viral plaques compared with the negative controls (corresponding to a titer equal to 20) [20].

Statistical Analysis

Descriptive analyses were performed to produce frequency distributions for the different types of samples, species, serological results and other variables studied. The chi-square or Fisher's exact tests [21] were used to test the association between the serological positivity for OPV and each factor studied. The aforementioned associations were further adjusted by city using

the Cochran-Mantel-Haenszel method because city was a significant confounding factor.

Results

Missing values

The total number of farms calculated in the study was 48; however, of the 11 farms selected in Torre de Pedra, only 10 farmers authorized the study, resulting in a total of 47 farms sampled.

Samples collected and seropositivity

Of the 1331 sera samples collected, 14% presented positive titers. The highest positivity among domestic species were observed in dogs (22.8%), swine (18.2%), and cows (15.3%). In the general context, humans presented the third highest positivity (17%). The wild species sampled presented lower positivity, with 8.7% of wild rodents being positive, and 8.2% of *Didelphis* spp being positive. Out of four *Nasua nasua*, only one tested positive (Table 1).

Table 1. Total samples collected and the percentage of positives by species

Species	Samples collected	Serological test	Positives (%)
COW	688	VN*	105 (15.3)
HORSE	117	VN	9 (7.7)
SHEEP	44	VN	0 (0.0)
SWINE	22	VN	4 (18.2)
DOG	114	VN	26 (22.8)
CAT	7	VN	1 (14.3)
HUMAN	148	VN	25 (16.9)
<i>Didelphis spp</i> ***	73	PRNT**	6 (8.2)
<i>Gracilinanus microtarsus</i>	6	PRNT	0 (0.0)
<i>Nasua nasua</i>	4	PRNT	1 (25.0)
<i>Cerdocyon thous</i>	4	PRNT	0 (0.0)
<i>Leopardus pardalis</i> ****	1	PRNT	0 (0.0)
WILD RODENTS ¹	103	PRNT	9 (8.7)
Total	1331		186 (13.9)

* VN = Virus neutralization Test

** PRNT = Plaque Reduction Neutralization Test

****Didelphis* spp were grouped: *Didelphis albiventris* (57 samples collected; 4 positives; 7.0%) and *Didelphis aurita* (16 samples collected; 2 positives; 12.5%)

**** *Leopardus pardalis* was not included in the statistical analysis

¹ Wild rodents were analyzed as one group, but the species are specified in Table 2.

From 103 wild rodents sampled, four *Oligoryzomys nigripes*, three *Oligoryzomys flavescens* and two *Sooretamys angouya* tested positive (Table 2). The neutralizing titers ranged from 16 to 2048 for domestic animals (n= 992) and humans (n= 148) (Table 3). In the wild species, 8.4% (n= 190) tested positive in the PRNT. The neutralizing titers were positively associated with human age. The highest percentage of positivity was observed within the older age categories ($p < 0.0001$) (Figure 4).

Table 2. Wild rodents species sampled and their positivity for OPV

Specie	Sample	Positive
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	61	4
<i>Oligoryzomys flavescens</i>	17	3
<i>Calomys tener</i>	4	0
<i>Nectomys squamipes</i>	4	0
<i>Akodon montensis</i>	4	0
<i>Sooretamys angouya</i>	13	2

Table 3. Percent of neutralizing titers among domestic animals and humans for OPV

Neutralizing Titers*	Frequency	Percent
16	56	4.9%
32	33	2.9%
64	32	2.8%
128	19	1.7%
156	12	1.0%
512	7	0.6%
1024	8	0.7%
2048	3	0.3%

* VN test titer equal or greater to 16 is considered positive for OPV

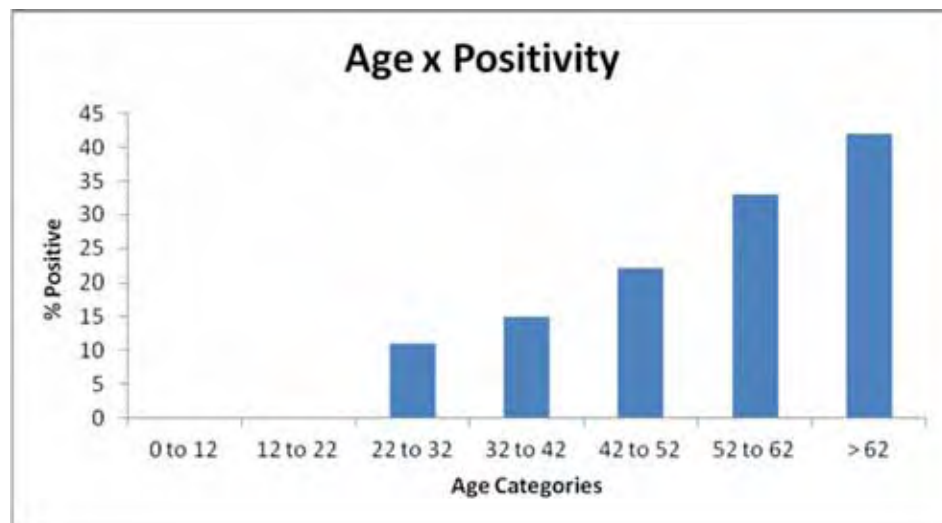


Figure 4. Positivity variation among different age categories in humans for OPV

Of the total collected samples, 683 were from Anhembi, 395 from Bofete and 253 from Torre de Pedra. The proportion of total positive samples among the cities was significantly different ($p < 0.0001$), as well as for domestic animals ($p < 0.0001$). Torre de Pedra presented the highest positivity. No difference was detected for wild animals positivity among these cities ($p = 0.8711$) (Table 4).

Table 4. Samples distribution among cities and difference of positivity proportion between humans and animals for OPV

Samples	Anhembi		Bofete		Torre de Pedra		P-value
	n	Positive (%)	n	Positive (%)	n	Positive (%)	
TOTAL	683	51 (7.5)	395	60 (15.2)	253	75 (29.6)	0.0001
H*	82	12 (14.6)	38	7 (18.4)	28	6 (21.4)	0.2778
DA**	504	31 (6.2)	285	46 (16.1)	203	68 (33.5)	0.0001
WA***	97	8 (8.3)	72	7 (10.0)	22	1 (4.5)	0.8711

H*= humans; DA**= domestic animals; WA**= wild animals

Regardless of the city, the proportion of positive samples was different between domestic and wild animals ($p < 0.0583$), and there were more domestic than wild positive animals (Table 4). Similarly, regardless of the city, the

proportion of positive samples between domestic species was different ($p < 0.0084$), but the proportion was not different among wild species ($p = 0.6962$). Torre de Pedra presented the highest positivity in cows (39%) and horses (22%). Bofete presented the highest positivity for dogs (36%) and demonstrated the second highest positivity for cows (14.2%) and horses (9%). Anhembi presented the lowest positivity of the domestic species. Considering the wild species, Torre de Pedra presented the highest positivity in *Didelphis spp* (10%), Bofete exhibited the highest positivity in wild rodents (11%), and Anhembi demonstrated the highest positivity in *Nasua nasua* (33%) (Table 5).

Table 5. Differences in the proportion of positive samples between domestic and wild species for OPV

	Anhembi		Bofete		Torre de Pedra	
	n	Positive (%)	n	Positive (%)	n	Positive (%)
Domestic						
COW	332	17 (5.1)	204	29 (14.2)	152	59 (38.8)
HORSE	72	2 (2.8)	22	2 (9.0)	23	5 (21.7)
SHEEP	33	0 (0.0)	9	0 (0.0)	2	0 (0.0)
SWINE	9	1 (11.1)	12	2 (16.7)	1	1 (100.0)
DOG	55	11 (20.0)	36	13 (36.1)	23	2 (8.7)
CAT	3	0 (0.0)	2	0 (0.0)	2	1 (50.0)
Wild						
<i>C. thous</i>	3	0 (0.0)	1	0 (0.0)	0	
<i>N. nasua</i>	3	1 (33.3)	1	0 (0.0)	0	
<i>G. microtarsus</i>	2	0 (0.0)	2	0 (0.0)	2	0 (0.0)
<i>Didelphis spp</i>	31	2 (6.5)	32	3 (9.4)	10	1 (10.0)
Wild rodents	57	5 (8.8)	36	4 (11.1)	10	0 (0.0)

- Epidemiological data - Association between risk factors and positivity

The survey indicated that 96% of farmers declared that their domestic animals have contact with wild animals, and 81% reported the presence of rodents and bats in the farm common areas. Regarding problems with flies and ticks, 90% declared problems with flies, and 94% said they had problems with ticks. In addition, 22% reported not having a sewage system, 74% declared owning a cesspit, 2% declared having access to a public sewage treatment system and 1% declared owning two of these sewage treatment systems. Moreover, 75% reported taking garbage to a public collection, while 25% declared burning or burying trash on their farm. Regarding water sources, 72% reported having a headspring, 24% reported owning a well and 4% reported having access to a public water supply. Seventy-five percent of farmers reported manual milking, and 25% reported using mechanical milking systems. Concerning the history of outbreak affecting cattle and humans, 54% said VACV had affected animals in the herd, and 17% also reported encountering the disease in humans.

There was no association between the positivity of cows and the type of milking based on city ($p = 0.5662$) nor between the positivity of humans and the type of milking ($p = 0.5216$). The associations between all the risk factors analyzed regardless of the city and positivity were verified against history of outbreaks affecting humans, history of outbreaks affecting cattle, source of water and destination of garbage. The history of outbreaks affecting humans was associated with the positivity only for humans ($p = 0.02$). A history of outbreaks affecting cattle was associated with the human ($p = 0.00$) and domestic animal ($p = 0.00$) positivity, but there was no association with positive test results for wild animals ($p = 0.60$). The source of water was associated with positivity only for humans ($p = 0.02$). Garbage destination was another factor associated with positivity in domestic animals ($p = 0.03$) (Table 6).

Table 6. Risk factors and their association with the positivity of humans, domestic and wild animals for OPV

Risk Factor	Humans			Domestic			Wild		
	Positive (%)	n	P - value	Positive (%)	n	P - value	Positive (%)	n	P - value
VACV h¹			0.02			0.58			0.10
Yes	2 (6.4)	31		35 (19.8)	177		3 (15.0)	20	
No	23 (19.5)	118		110 (13.5)	815		13 (7.6)	170	
VACV c²			0.00			0.00			0.60
YES	8 (10.0)	80		73 (13.1)	557		8 (9.6)	83	
No	17 (24.6)	69		72 (16.5)	435		8 (7.5)	107	
Water			0.02			0.25			0.79
H ³	23 (21.7)	106		102 (14.6)	699		14 (9.0)	155	
w ⁴	1 (2.6)	38		28 (11.3)	248		2 (6.0)	34	
PWS ⁵	1 (20.0)	5		15 (33.3)	45		0 (0.0)	1	
Garbage			0.87			0.03			0.31
PC ⁶	19 (16.9)	112		127 (16.9)	748		13 (10.0)	133	
BBT ⁷	6 (26.2)	37		18 (7.4)	244		3 (5.3)	57	
Sewage			0.18			0.35			0.56
No ⁸	8 (24.3)	33		36 (16.2)	223		5 (12.5)	40	
C ⁹	16 (14.3)	112		106 (14.5)	728		11 (7.5)	147	
PSS ¹⁰	1 (50.0)	2		1 (3.7)	27		0 (0.0)	1	
O ¹¹	0 (0.0)	2		2 (14.3)	14		0 (0.0)	2	
Bats			0.15			0.66			0.26
Yes	23 (18.8)	122		125 (15.2)	820		13 (9.6)	135	
No	2 (7.4)	27		20 (11.6)	172		3 (5.4)	55	
Rodents			0.51			0.78			0.38
Yes	21 (17.0)	118		122 (14.7)	827		10 (7.3)	137	
No	4 (12.9)	31		23 (13.9)	165		6 (11.3)	53	
Ticks			0.47			0.43			0.69
Yes	24 (17.4)	138		140 (14.8)	945		15 (9.0)	167	
No	1 (9.0)	11		5 (10.6)	47		1 (4.3)	23	
Flies			0.85			0.44			0.40
Yes	22 (16.9)	130		140 (15.9)	883		16 (8.7)	183	
No	3 (15.8)	19		5 (4.6)	109		0 (0.0)	7	
Wild¹²			0.93			0.97			0.82
Yes	24 (16.7)	144		130 (13.7)	947		16 (8.4)	189	
No	1 (20.0)	5		15 (33.3)	45		0 (0.0)	1	

1) VACV h = history of outbreaks affecting humans. 2) VACV c = history of outbreaks affecting cattle. 3) H = headspring; 4) W = Well; 5) PWS = Public Water System; 6) PC = Public Collection; 7) BBT = Burn or Bury trash on farm; 8) No = not have sewage system; 9) C = Cesspit; 10) PSS = Public Sewage System Treatment; 11) O = other (two of these sewage system); 12) Wild = Contact of domestic animals with wild animals

Discussion

The circulation and maintenance of VACV in the environment has been studied in recent years in Brazil, but these conditions have not been fully elucidated, nor has the possible involvement of wild species as reservoirs [6, 22]. In this work, we analyzed the risk factors that could be associated with VACV circulation among humans, domestic animals and wildlife, and the maintenance of this virus in the environment in areas with and without officially reported outbreaks. To the best of our knowledge, this study is the first to investigate the real potential of wild rodents serving as reservoirs in their natural environment in the state of São Paulo.

Since the first and only isolation of a VACV in one wild rodent of *Oryzomys* genus in the Amazon rain forest [23], those rodents have been identified as possible reservoirs of the virus. Experiments have shown that mice can acquire the infection through contact with the feces of experimentally infected cows, and the virus eliminated in their feces can be a source of infection for cows and sentinel mice exposed to them [12, 24]. These data provide the basis of a proposed transmission model that in which peridomestic rodents act as connection between domestic animals and wildlife in the rural environment [22]. However, our data provide evidence of a low seroprevalence of Orthopoxvirus among wild rodents sampled in this region of the state of São Paulo, even though high seroprevalence was observed in domestic animals, which leads us to believe that *Oligoryzomys nigripes*, *Oligoryzomys flavescens*, *Calomys tener*, *Nectomys squamipes*, *Akodon montensis* and *Sooretamys angouya* are not VACV reservoirs in the state of São Paulo.

High seroprevalence was detected in Torre de Pedra, a city where outbreaks affecting cattle and humans have been previously reported [8, 9], compared with Anhembi and Bofete, where outbreaks have not been recorded. However, the absence of positive samples from wild rodents was observed in Torre de Pedra, reinforcing the low probability that these species act as reservoirs in the VACV cycle.

Other wild mammal species have been suggested as VACV reservoirs, such as primates and members of the order carnivora [20]. Our study demonstrated that the positivity in opossums (*Didelphis albiventris* or *Didelphis aurita*) was low in the three cities, and the positivity (25%) in coati (*Nasua nasua*) was not representative because of the small sample size (of 4 samples, only 1 was positive).

In this context, we suggest that if these wild specimens are not involved in the VACV transmission to the cows, they might, in contrast, acquire the virus from cows. It is known that experimentally infected cows eliminate the virus in their feces. D’Anunciação [24] demonstrated that Balb/c mice exposed to feces of experimentally infected cows acquired the infection and eliminated virus in their feces, suggesting that the feces of infected bovines could represent a constant source of environmental virus contamination. Rivetti Jr. [25] demonstrated that experimentally infected cows eliminate viral DNA in their feces from the first day post-infection and continue to do so even after resolution of the lesions for approximately 70 days post-infection. These authors also suggested that feces from infected cows may be an important source of VACV transmission, contributing to virus dissemination among farms. This hypothesis could not be confirmed in the present study, as positivity in wild rodents were not demonstrated in Torre de Pedra, a city with two previous outbreaks in 2007 and 2010 [8, 9] and where a positivity of 39% was detected in the cows sampled (Table 5).

Torre de Pedra was expected to present the highest positivity of wild specimens, but our results demonstrated that Torre de Pedra presented the highest positivity only for *Didelphis* spp (10%) compared to Anhembi and Bofete. This positivity of 10% was not significant, and in addition to the finding that no wild rodents tested positive in Torre de Pedra, we suggest that the feces of infected cows does not represent an efficient way of spreading VACV to the environment; alternatively, we suggest that the wild species studied here are not efficient VACV reservoirs. Opossums have a bigger home range in comparison with wild rodents, and their habits are more peridomestic than the wild rodents, thus, opossums are in closer contacts with domestic animals. In

addition, cows move throughout the forest and may act as a source of infection for wild animals in that environment. Given this finding, we suggest searching for other pathways of VACV transmission and dissemination in the environment.

The highest percentage of positivity was presented by dogs followed by decreasing values of positivity in swine, humans, cows, cats and horses. However, considering the positivity among species in the three cities, dogs had a higher percentage of positive samples only in Bofete and Anhembi because in Torre de Pedra, as expected, the highest percentage of positive samples was demonstrated by cows, among which there had two previous outbreaks [8, 9]. This higher percentage of positive dog samples was not expected, but it does leads us to question if dogs are involved in the spreading process of the virus or are merely an accidental host. As there are no reports of dogs developing exanthematic lesions from VACV, and because dogs did not present suggestive lesions during our sample collections, dogs may be only infected without clinical signs, or they may be a natural reservoir of the virus. The high frequency of positive titers in dogs can be explained by their close contact with humans and their livestock, with sick cows and the environment contaminated environment by cow excretions, being infected without clinical signs and being only an accidental host that might eventually spread VACV to the environment.

Our results are still insufficient to answer such questions, but the dichotomy of VACV isolated in Brazil may be related to the absence of clinic signs in dogs, as group I (ARAV, PSTV, GP2V,) of VACVs when inoculated intranasally in BALB/c mice does not induce clinical signs [6, 11, 12]. As demonstrated by Megid [9], the VACV involved in the Torre de Pedra outbreak in 2010 was closely related to ARAV and CTGV, which are group I viruses. Another possibility to consider is a cross-reaction with another Poxvirus, as serology is not specific for the Vaccinia virus [26]. This possibility must be considered but does not seem probable, as dogs were the third-most prevalent species in Torre de Pedra city, being outnumbered only by cows.

No clinical signs were observed in other domestic species during the collection of samples. VACV outbreaks have been described in horses [27];

however, they were not reported in Torre de Pedra when outbreaks were affecting cows and humans, and according to this study, horses were the second domestic species presenting the highest positivity. This high positivity without clinical signs in horses leads us to suppose horses, such as dogs, may be only subclinically infected, resulting in seropositivity, serving as VACV reservoirs or accidental hosts, or that this VACV strain may only induce clinical signs in cows and humans.

The titers of this virus in humans should be carefully evaluated. The highest percentage of positivity was observed in Bofete and Anhembi, and the second highest positivity was observed in Torre de Pedra compared to the positivity of domestic and wild animals. Studies have associated the titers of antibodies in farmers that were born before 1977 to antibodies induced by the smallpox vaccine [7]. In this study, the humans that were born before 1977 declared that they did not know if they were vaccinated against smallpox. Our results indicated that the positivity was directly correlated to the age, increasing in older persons, and leads us to believe that these antibodies could be associated to the lifelong exposure of farmers to the virus, but smallpox vaccine memory cannot be excluded (Figure 4).

The risk factors analyzed in this study indicated, as expected, that there was an association between a history of outbreaks affecting humans and positivity in humans and between a history of outbreaks affecting cattle and positivity in humans and domestic animals. Conversely, garbage destination was associated with positivity only for domestic animals. The highest positivity of domestic animals was observed when farmers declared that they transported their garbage to a public collection. It is likely that this association is indirectly related with the movement of humans between farms [28]. It is not possible with this study to determine the real mechanisms involved in this association, but this risk factor should be further investigated.

Overall, our results provide a new focus of possible VACV reservoirs and viral spread. In addition, these findings demonstrate that the wild species sampled in this study are not the reservoirs of VACV, but the risk factor of

garbage destination should be a future target of investigation to determinate its role in VACV dissemination.

Acknowledgements We thank Ana Paula Carmignotto from Departamento de Biologia da Universidade Federal de São Carlos, Campus Sorocaba for identification of wild rodents species, Erna Geessien Kroon, Jonatas Santos Abrahão and Giliane de Souza Trindade from Laboratório de Vírus da Universidade Federal de Minas Gerais for Plaque Reduction Neutralizing Test, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) for financial support.

References

1. FENNER, F. Adventures with poxviruses of vertebrates. *FEMS Microbiol. Rev.*, v. 24, p. 123-133, 2000.
2. 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.
3. 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.
4. SCHATZMAYR, H.G. et al. Detection of poxvirus in cattle associated with human cases in the State of Rio de Janeiro: preliminary report. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.95, p.625-627, 2000.
5. 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 Vírus: A *Vaccinia*-like Virus Associated with Infection in Humans and Cattle. *Emerging Infectious Diseases*. Vol. 9, No. 2, February 2003.
6. 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 2007.
7. MOTA, B. E. F.; TRINDADE, G. S.; DINIZ, T. C.; da SILVA-NUNES, M.; BRAGA, E. M.; URBANO-FERREIRA, M.; RODRIGUES, G. O. I.; BONJARDIM, C. A.; FERREIRA, P. C. P.; KROON, E. G. Seroprevalence of orthopoxvirus in na Amazonian rural village, Acre, Brazil. *Archives of Virology*. Vol. 155, p. 1139-1144, 2010.
8. 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.
9. 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.
 10. 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.
 11. DRUMOND, B. P.; LEITE, J. A.; da FONSECA, F. G.; BONJARDIM, C. A.; FERREIRA, P. C. P.; KROON, E. G. Brazilian Vaccinia vírus strains are genetically divergent and differ from the Lister vaccine strain. *Microbes and Infection*. Vol. 10, p. 185-197, 2008.
 12. 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, 2008.
 13. Epi Info version 3.5.4 software (Epi Info, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA).
 14. HERDACC VERSION 3 (University of Gueph)
 15. NUNES, A. L. V., CRUZ, M. L. CORTOPASSI, S. R. G. Anestesiologia. In: CUBAS, S. Z., SILVA, I. C. R., CATÃO-DIAS, J. L. *Tratado de Animais Selvagens*. São Paulo. Pg. 1040-1067; 2006
 16. MILLS, J. N.; CHILDS, J. E.; KAZIAZEK, T. G.; PETERS, C. J.; VELLECA, W. M. *Methods for Trapping and Sampling Small Mammals for Virologic Testing*. U.S. Department of Health & Human Services. Public Health Service. Center for Disease Control and Prevention Atlanta, Georgia, 1995.
 17. ALMEIDA-SILVA, M. J. F. Agentes Causadores de Zoonoses Isolados em *Rattus rattus* Capturados em Áreas Sujeitas a Inundação no Município de São Paulo. Dissertação de mestrado. Instituto Biológico, São Paulo. 2012.
 18. NEWMAN, F. K., FREY, S. E., BLEVINS, T. P., MANDAVA, M., BONIFACIO Jr., A., YAN, L., BELSHE, R. B. Improved assay to detect neutralizing antibody following vaccination with diluted or undiluted Vaccinia (Dryvax) Vaccine. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol.41, N.7, p. 3154-3157, 2003.
 19. SILVA-FERNANDES, A. T., TRAVOSSOS, 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 vírus during bovine vaccinia outbreaks. *Journal of Clinical Virology*. 44, p.3008-313; 2009.
 20. 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 2010.
21. PROC FREQ, SAS: SAS Institute Inc. 2009. SAS/STAT®9.2
 22. 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, 2009.
 23. 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.
 24. 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.
 25. 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*, 2012.
 26. HUGHES, C. M.; NEWMAN, F. K.; DAVIDSON, W. B.; OLSON, V. A.; SMITH, S. K.; HOLMAN, R. C.; YAN, L.; FREY, S. E.; BELSHE, R. B.; KAREN, K. L.; DAMON, I. K. Analysis of Variola and Vaccinia Virus Neutralization Assays for Smallpox Vaccines. *Clinical and Vaccine Immunology*. Vol. 19, N. 7, p.1116-1118. 2012.
 27. 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.
 28. 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.

CAPITULO 3

Conclusões Gerais

- 1- Com nossos resultados, sugere-se a pouca possibilidade da atuação de roedores silvestres das espécies *Olygoryzomys nigripes*, *Oligoryzomys flavescens*, *Akodon montensis*, *Sooretamys angouya*, *Nectomys squamipes*, e *Calomys tener* e de marsupiais das espécies *Didelphis albiventris* e *Didelphis aurita* como reservatórios do vírus *Vaccinia* nesta região do estado de São Paulo, entretanto esses achados não excluem a possibilidade de outras espécies de roedores silvestres ou peridomésticos e marsupiais atuarem como reservatórios;
- 2- Alta prevalência de anticorpos contra OPV entre os cães sugere possível resistência a doença ou atuação como reservatórios virais o que deve ser objeto de investigações futuras;
- 3- O destino do lixo foi positivamente associados a positividade para a infecção para VACV necessitando de futuros estudos
- 4- Positividade em seres humanos associada com o aumento da idade foi comprovada indicando imunidade naturalmente adquirida devido ao contato com o vírus ao longo da vida e também possível memória imunológica decorrente da vacinação contra varíola.

Referências Bibliográficas

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.; 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, 2009b.

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, 2010a.

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 2010b.

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

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.

BULLER, R. M. L.; PALUMBO, G. J. Poxvirus pathogenesis. *Microbiology Review*. Vol. 55, p. 88-122, 1991.

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.

da 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.

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

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.

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.

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*. 4554, p. 1-8, 2009.

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.; 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, 2008a.

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 Distinc Populations of Brazilian Vaccinia Virus Strains. *Plos one*. 3 (8): e3043, 2008b.

FLORES, E. F. *Virologia Veterinária*. Editora da Universidade Federal de Santa Maria. Cap. 18, p. 492-511, 2007.

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.

GOLDBERG, T. L.; CHAPMAN, C. A., et al. Serologic evidence for novel poxvirus in endangered red Colobus monkeys, Westerns Uganda. *Emerging Infectious Diseases*. 2008.

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.

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.

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.

MÄTZ-RENSIG, K.; ELLERBROOK, H.; EHLERS, B.; PAULI, G.; FLOTO, A.; ALEX, M.; CZERNY, C. P.; KAUP, F. J. (2006): Fatal poxvirus outbreak in a colony of New World monkeys. *Vet Pathol*. Vol. 43, No. 2, p. 212-218, 2006.

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.

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.

MOTA, B. E. F.; TRINDADE, G. S.; DINIZ, T. C.; da SILVA-NUNES, M.; BRAGA, E. M.; URBANO-FERREIRA, M.; RODRIGUES, G. O. I.; BONJARDIM, C. A.; FERREIRA, P. C. P.; KROON, E. G. Seroprevalence of orthopoxvirus in na Amazonian rural village, Acre, Brazil. *Archives of Virology*. Vol. 155, p. 1139-1144, 2010.

MOUSSATCHÉ, N., DAMASCO, 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-GAHARA, 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.

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.

SCHATZMAYR, H.G. et al. Detection of poxvirus in cattle associated with human cases in the State of Rio de Janeiro: preliminary report. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.95, p.625-627, 2000.

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, 2009a.

SCHATZMAYR, H. G.; SIMONETTI, B. R.; ABREU, D. C.; SIMONETTI, J. P.; SIMONETTI, S. R.; COSTA, R. V. C.; GONÇALVES, M. C. R.; D'ANDRÉA, P. S.; GERHARDT, M.; SILVA, M. E. V.; FARIAS-FILHO, J. C.; BARTH, O. M. Animal Infections by Vaccinia-like viruses in the State of Rio de Janeiro: Na expanding disease. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. Vol. 29, No. 7, p. 509-514, 2009b.

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.

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 Vírus: 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.; 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, 2007a.

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 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.

VERONA, C. E. S.; PISSINATTI, A. Primates – Primatas do Novo Mundo (Sagüi, Macaco-prego, Macaco-aranha, Bugio). IN: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. *Tratado de Animais Selvagens: medicina veterinária*. Ed. Roca Ltda, 2007. Cap. 24, p. 358 – 376.

WILSON, D. E.; REEDER, D. M. *Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference*. 3rd ed. Johns Hopkins University Press. Baltimore, Maryland, pp. 2142, 2005.