UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Microbiologia

Karolina Lopes Dias

PROSPECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE POXVÍRUS NA AMAZÔNIA BRASILEIRA

Belo Horizonte
2024

Karolina Lopes Dias

PROSPECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE POXVÍRUS NA AMAZÔNIA BRASILEIRA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestra em Microbiologia.

Orientadora: Profª Giliane de Souza Trindade

Belo Horizonte
2024

043 Dias, Karolina Lopes.
Prospecção e Caracterização de Poxvírus na Amazônia Brasileira [manuscrito] / Karolina Lopes Dias. – 2024.
113 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Profa. Giliane de Souza Trindade.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Poxviridae. 3. Orthopoxvirus. 4. Parapoxvirus. 5. Suipoxvirus. 6. Vaccinia vírus. I. Trindade, Giliane de Souza. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 579

Ficha Catalográfica elaborada pela bibliotecária Fabiane C M Reis CRB 6 2680

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE **KAROLINA LOPES DIAS**

Nº REGISTRO: 2022661715

Às 15:00 horas do dia **26 de abril de 2024**, reuniu-se, por via remota, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Erna Geessien Kroon (Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG), Pedro Augusto Alves (Instituto René Rachou) e a Profa. Dra. Giliane de Souza Trindade (Orientadora), para julgar o trabalho final **"Prospecção e caracterização de poxvírus na Amazônia Brasileira"**, da aluna **Karolina Lopes Dias**, requisito final para a obtenção do Grau de **MESTRA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profa. Dra. Giliane de Souza Trindade, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. A candidata foi considerada **APROVADA**. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. A candidata tem 60 (sessenta) dias, a partir desta data, para entregar a versão final da dissertação ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da UFMG e requerer seu diploma.

Belo Horizonte, 26 de abril de 2024

Membros da banca:

Profa. Dra. Erna Geessien Kroon

Dr. Pedro Augusto Alves

De acordo:

Profa. Dra. Giliane de Souza Trindade

(Orientadora)

Prof. Dr. Daniel de Assis Santos

(Coordenador do Programa de Pós-graduação

em Microbiologia)

Documento assinado eletronicamente por **Erna Geessien Kroon**, **Professora do Magistério Superior**, em 30/04/2024, às 07:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Daniel de Assis Santos**, **Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 30/04/2024, às 08:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Giliane de Souza Trindade**, **Professora do Magistério Superior**, em 30/04/2024, às 10:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Pedro Augusto Alves**, **Usuário Externo**, em 02/05/2024, às 14:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3171447** e o código CRC **6D3D3923**.

Referência: Processo nº 23072.215040/2022-20 SEI nº 3171447

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a minha família por todo o apoio durante o desenvolvimento do meu mestrado, especialmente a minha mãe, minha irmã e a Mila. Vocês foram fundamentais neste processo e tudo que rodeia a minha vida, amo vocês. Agradeço ao Daniel, aos meus avós, tias e tios, primos e primas por todo o apoio de sempre!

Agradeço também aos meus amigos do Laboratório de Vírus, que foram essenciais para tornar o processo mais leve, engraçado e que serviram de apoio nas horas difíceis. Thais e AnnaCatarina muito obrigada por tudo, por todo o apoio e amizade, sem vocês esse tempo não teria sido o mesmo. Aos meus amigos Matheus, Gabi, Isa, Iago, Iara, Natalinha, Ana Luísa, Gabriel e Pedro obrigada por todo o apoio e todos os almoços especiais na varandinha, vocês foram fundamentais. Um agradecimento em especial a Ana Gabriella, que foi a minha mãe científica, que me ensinou tudo que sei e me socorreu em todos os momentos de desespero, serei para sempre grata.

Ao ECOVIR, eu não poderia ter escolhido um grupo de pesquisa mais unido e acolhedor para fazer parte. Obrigada a todos vocês pelos momentos de discussão, descontração e apoio. Vocês foram essenciais para essa jornada e vocês também fazem parte da construção desse projeto. Um agradecimento em especial as ICs Iara e Thallyta que me auxiliaram nos experimentos e estavam sempre dispostas a aprender e a participar. Ao Iago por todo o apoio e na execução dos belíssimos mapas. A Débora por todos os conselhos e ensinamentos valiosos e mais uma vez a Ana Gabi por ter me guiado nesse processo.

Agradeço também à minha orientadora, Profa. Giliane Trindade, por ter me recebido no grupo com tanto acolhimento. Sempre serei grata por ter me recebido e me orientado durante o desenvolvimento desse projeto. Te admiro muito pela sua trajetória e pela pessoa incrível que você é. Obrigada!

Aos professores do Laboratório de Vírus, obrigada pelas trocas, ensinamentos, discussões e acolhimento. A todos os outros colegas do LabVírus, também agradeço pelas trocas e discussões enriquecedoras. Foi um prazer trabalhar com vocês!

Agradeço também aos meus amigos de longa data, Helen, Maíra, Tamiris, Laura, Ana, Pietra, Bruna, Isadora, Augusto, Isabela, Lala e Couy, que não estavam presentes na rotina do mestrado, mas mesmo assim sempre me apoiaram e me deram suporte quando precisei. Obrigada pela parceria de sempre.

Por fim, agradeço às agências de fomento, CAPES, CNPq e a FAPEMIG, a UFMG, o ICB e o Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. Também agradeço a banca avaliadora que aceitou contribuir para a discussão deste trabalho.

RESUMO

A emergência de doenças infecciosas é uma das mais sérias ameaças à saúde global, causando impactos clínicos, sociais e econômicos, e, nesse contexto, os vírus representam uma grande preocupação visto que são a segunda maior fonte de doenças emergentes e reemergentes do planeta. Dentre os vírus emergentes, pode-se destacar os poxvírus, os quais são responsáveis por viroses de interesse e impacto no contexto de saúde pública e animal. Os gêneros *Orthopoxvirus* (OPXV), *Parapoxvirus* (PPV) e *Suipoxvirus* (SPV) possuem relevância para a saúde humana e veterinária, sendo responsáveis por causar doenças exantemáticas e vesículo pustulares, caracterizadas por lesões ulcerativas na pele e nas mucosas, que podem acometer o gado leiteiro, pequenos ruminantes e suínos, respectivamente. Sendo assim, este trabalho visou prospectar e caracterizar poxvírus em amostras biológicas de animais provenientes da Amazônia brasileira. Para isso, um total de 309 amostras biológicas de bovinos, ovinos, capivaras, búfalos, equídeos e suínos do estado do Pará, coletadas nos anos de 2021 e 2022, foram submetidas à investigação molecular para detecção de OPXV, PPV e SPV por qPCR e as amostras de soro foram submetidas a investigação da presença de anticorpos neutralizantes anti-OPXV por meio do teste de neutralização por redução de placas (PRNT). Além de que, as amostras positivas foram submetidas a isolamento viral e sequenciamento. De forma geral, 21 amostras foram positivas para poxvírus pesquisados neste estudo, correspondendo a um percentual de 6,8% (21/309) de positividade. Para PPV, 14 amostras foram positivas na qPCR, sendo elas amostras de búfalos, caprinos e ovinos, para OPXV cinco amostras de bovinos foram positivas na qPCR e uma amostra de búfalo foi positiva na PRNT, por fim, uma amostra de suíno foi positiva para SPV na qPCR. Além disso, neste estudo, foi possível isolar um vaccínia vírus e um swinepox vírus a partir de amostra de crostas de um bovino e um suíno, respectivamente. Ademais, foi possível confirmar o resultado positivo das crostas mencionadas por sequenciamento do genoma total.

Palavras-chaves: *Poxvirus; Orthopoxvirus; Parapoxvirus; Suipoxvirus; Vaccinia virusus;* Vaccínia bovina; Amazônia.

ABSTRACT

The emergence of infectious diseases is one of the most serious threats to global health, causing clinical, social and economic impacts and, in this context, viruses represent a major concern as they are the second largest source of emerging and re-emerging diseases on the planet. Among the emerging viruses, we can highlight the poxviruses, which are responsible for viruses of interest and impact in the context of public and animal health. The *Orthopoxvirus* (OPXV), *Parapoxvirus* (PPV) and *Suipoxvirus* (SPV) genera are relevant to human and veterinary health and are responsible for causing exanthematous and vesicular pustular diseases, characterized by ulcerative lesions on the skin and mucous membranes, which can affect dairy cattle, small ruminants and pigs, respectively. Therefore, this study aimed to prospect and characterize poxviruses in biological samples of animals from the Brazilian Amazon. To this end, a total of 309 biological samples from cattle, sheep, capybaras, buffalo, horses and pigs from the state of Pará, collected in 2021 and 2022, were subjected to molecular investigation for the detection of OPXV, PPV and SPV by qPCR and the serum samples were subjected to investigation for the presence of neutralizing antibodies anti-OPXV using the plaque reduction neutralization test (PRNT). In addition, the positive samples were subjected to viral isolation and DNA sequencing. Overall, 21 samples were positive for the poxviruses investigated in this study, corresponding to a percentage of 6.8% (21/309) positivity. For PPV, 14 samples were positive in qPCR, including buffalo, goat and sheep samples, for OPXV five bovine samples were positive in qPCR and one buffalo sample was positive in PRNT, finally, one pig sample was positive for SPV in qPCR. Furthermore, in this study, it was possible to isolate a vaccinia virus and a swinepox virus from scab samples from one bovine and one porcine animal, respectively. In addition, it was possible to confirm the positive results of the aforementioned scabs by whole genome sequencing.

Key-words: *Poxvirus; Orthopoxvirus; Parapoxvirus; Suipoxvirus; Vaccinia virus*; Vaccinia bovina; Amazon.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Dinâmica da transmissão de patógenos entre animais de vida selvagem-rebanhos-humanos. 17

Figura 2. Rebanhos de animais domésticos de produção na Amazônia Brasileira. 19

Figura 3. Modelos de conservação da Bacia Amazônica em 2050. 21

Figura 4. Organização das proteínas de superfície em ortopoxvírus e parapoxvírus. 25

Figura 5. Partículas virais formadas pelos poxvírus durante o ciclo de multiplicação. 26

Figura 6. Representação esquemática do genoma dos POXV. 27

Figura 7. Ciclo de multiplicação dos POXV. 30

Figura 8. Distribuição geográfica de ortopoxvírus zoonóticos. 32

Figura 9. Manifestações clínicas da vaccínia bovina em bovinos e humanos. 37

Figura 10. Circulação de VACV no Brasil e na América do Sul. 39

Figura 11. Rotas de transmissão confirmadas e hipotéticas de VB. 41

Figura 12. Lesões causadas pela infecção por BPSV. 44

Figura 13. Lesões causadas pela infecção por ORFV. 44

Figura 14. Lesões causadas pela infecção por PCPV. 45

Figura 15. Lesões provocadas pela coinfecção de VACV e PCPV. 46

Figura 16. Lesões causadas pela infecção por SWPV em suínos. 47

Figura 17. POXV na Amazônia brasileira. 52

Figura 18. Municípios onde foram realizadas as coletas de amostras. 57

Figura 19. Mapa com as amostras positivas para POXV e seus hospedeiros. 71

Figura 20. Curvas de dissociação para o gene da β-actina bovina. 72

Figura 21. Diferenciação entre grupo 1 e 2 dos VACV-Br. 74

Figura 22. Curva de amplificação para o gene E9L. 75

Figura 23. Células Vero infectadas com a 2ª passagem do isolamento de um VACV. 76

Figura 24. Células Vero infectadas com a 3ª passagem de um isolado de VACV. 77

Figura 25. Placas de lise do VACV isolado da amostra BOV 5. 78

Figura 26. Células Vero infectadas com a 2ª passagem do isolado de VACV. 79

Figura 27. Árvore filogenética de VACV. 80

Figura 28. PRNT para a amostra BUF 48. 81

Figura 29. Células MDBK infectadas após a 3ª passagem da amostra OV3. 84

Figura 30. Lesões causadas pela infecção do SWPV em suínos do estado do Pará. 85

Figura 31. Células PK-15 infectadas após a 1ª passagem da amostra SUI 7. 86

Figura 32. Células PK-15 infectadas após a 2ª passagem da amostra SUI 7. 87

Figura 33. Árvore filogenética de SWPV. 88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação taxonômica da família Poxviridae. 23

Tabela 2. Espécies zoonóticas de parapoxvírus e as doenças associadas. 42

Tabela 3. Banco de amostras do estado do Pará. 58

Tabela 4. Iniciadores e sonda para detecção de ortopoxvírus por qPCR. 63

Tabela 5. Iniciadores e sonda para detecção de parapoxvírus por qPCR. 64

Tabela 6. Iniciadores e sonda para detecção de suipoxvírus por qPCR. 65

Tabela 7. Amostras de bovinos positivos para VACV na qPCR. 73

Tabela 8. Amostras positivas para PCPV e ORFV na qPCR. 82

Tabela 9. Amostra positiva para SWPV na qPCR. 85

LISTA DE ABREVIATURAS

BAU - *business-as-usual*
(BPSV) - Vírus da estomatite papular bovina
CEV – Vírus envelopado extracelular associada à célula
CO_2 – Dióxido de carbono
CPXV – Cowpox vírus
DIE – Doenças Infecciosas Emergentes
DNA – Ácido desoxirribonucleico
dsDNA - DNA de dupla fita
Fig. Figura
IEV – Vírus envelopado intracelular
ICTV – Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus
kpb - Kilo pares de bases
MEM – Meio mínimo essencial
DMEM - Meio
µL – Microlitro
mg – Miligrama
mL – Mililitro
MPXV - Monkeypox vírus
MV – Vírus maduro
OPXV - Ortopoxvírus
ORF - *Open reading frames* (região aberta de leitura)
ORFV - Orf vírus
PBS – Tampão salina tamponada por fosfato
PCPV - *Pseudocowpox vírus*
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
PFU – Unidade formadora de placas
POXV - Poxvírus
PPV - Parapoxvírus
qPCR – PCR quantitativa em tempo real
RNA – Ácido ribonucleico
SFB – Soro fetal bovino
SPV - *Suipoxvirus*

SWPV - *Swinepox virus*

VACV – Vaccínia vírus

VACV-Br - Vaccínia vírus brasileiros

VB - Vaccínia bovina

VARV - Varíola vírus

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 16
1.1. Doenças emergentes e reemergentes 16
1.2. O desmatamento e a expansão agropecuária na Amazônia brasileira 18
1.3. Doenças infecciosas na Amazônia brasileira 21
1.4. Poxvírus 22
1.4.1. Morfologia 24
1.4.2. Genoma 26
1.5. Ortopoxvírus 31
1.5.1. Patogênese dos ortopoxvírus 32
1.5.2. Varíola vírus 33
1.5.3. Monkeypox vírus 33
1.5.4. Cowpox vírus 35
1.6. Vaccínia vírus 35
1.6.1. Vaccínia bovina 37
1.6.2. Circulação do VACV no Brasil 37
1.6.3. Transmissão dos VACV-Br 39
1.7. Parapoxvírus 41
1.7.1. Patogênese dos parapoxvírus 43
1.7.2. Vírus da estomatite papular bovina 43
1.7.3. Orf vírus 44
1.7.4. Pseudocowpox vírus 44
1.7.5. Circulação de parapoxvírus no Brasil 45
1.8. Coinfecção entre ortopoxvírus e parapoxvírus 45
1.9. Suipoxvírus 46
1.9.1. Patogênese de suipoxvírus 48
1.9.2. Circulação de suipoxvírus no Brasil 48
1.10. Circulação de poxvírus na Amazônia brasileira 49
1.11. Diagnóstico das poxviroses no Brasil 53
2. JUSTIFICATIVA 54
3. OBJETIVOS 56
3.1. Objetivo geral 56
3.2. Objetivos específicos 56
4. METODOLOGIA 57
4.1. Comitê de Ética 57
4.2. Área de estudo 57
4.3. Coleção biológica 58
4.4. Abordagem molecular 59
4.4.1. Extração de DNA 59
4.4.2. Quantificação e análise de qualidade da extração do DNA 60
4.4.3. Controle endógeno de extração 60

4.4.4. Detecção molecular por PCR em tempo real 60
4.4.5. Detecção molecular de OPXV por qPCR 61
4.4.6. Detecção molecular de parapoxvírus por qPCR 63
4.4.7. Detecção molecular de suipoxvírus por qPCR 64
4.4.8. Sequenciamento 65
4.5. Linhagens celulares 66
4.5.1. Células Vero 66
4.5.2. Células BSC-40 66
4.5.3. MDBK 67
4.5.4. PK-15 67
4.6. Vírus 67
4.7. Isolamento viral 67
4.8. Titulação viral 69
4.9. Abordagem sorológica 69
4.9.1. Teste de neutralização por redução de placas (PRNT) 69
5. RESULTADOS 71
5.1. Controle endógeno 71
5.2. Prospecção de ortopoxvírus 72
5.2.1. Prospecção molecular por qPCR 72
5.2.2. Isolamento viral 74
5.2.3. Sequenciamento 79
5.2.4. Prospecção sorológica de ortopoxvírus por PRNT 80
5.3. Prospecção de parapoxvírus 81
5.3.1. Prospecção molecular por qPCR 81
5.3.2. Isolamento viral 83
5.4. Prospecção de suipoxvírus 85
5.4.1. Prospecção molecular por qPCR 85
5.4.2. Isolamento viral 85
5.4.3. Sequenciamento 87
6. DISCUSSÃO 89
7. CONCLUSÕES 97
8. PERSPECTIVAS 98
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 99
10. OUTRAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS 111
10.1. Participação em eventos científicos 111
10.2. Organização de eventos 111
10.3. Apresentação de trabalhos em eventos científicos 111
10.4. Prêmios e menções honrosas 112
10.5. Treinamento 112
10.6. Publicações 112

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doenças emergentes e reemergentes

Doenças infecciosas emergentes (DIE) são doenças causadas por organismos infecciosos que passam a ser detectados em uma população ou região, também podem ser infecções que já existiam, mas cuja incidência e dispersão para outras áreas geográficas aumentaram nas últimas décadas (MCARTHUR, 2019). Sendo assim, a emergência de doenças infecciosas é uma das mais sérias ameaças à saúde global, causando impactos clínicos, sociais e econômicos e está associada com fatores ambientais, ecológicos, socioeconômicos, comportamentais, entre outros (JONES et al., 2008).

Nesse sentido, um dos fatores principais que pode acarretar o surgimento de DIE é a alteração nos padrões de uso da terra, desencadeada principalmente devido a ações antrópicas, como o crescimento populacional e a expansão da agropecuária. Nestes processos, o ser humano e os animais domésticos passam a ocupar áreas que anteriormente não possuíam interferência antrópica, invadindo habitats naturais e provocando modificações nos ecossistemas. Consequentemente, o que se observa é o aumento do contato dos seres humanos e dos animais domésticos, principalmente o gado, com os animais silvestres. Sendo assim, as zoonoses são doenças causadas por patógenos capazes de ser transmitidas entre animais e os seres humanos (CDC, 2021; BAKER et al., 2022; JONES et al., 2013).

A intensificação dessas interações pode criar condições favoráveis para circulação de patógenos zoonóticos de origem silvestre em animais domésticos, que podem passar a ser reservatórios de agentes infecciosos com potencial de causar doenças em humanos que interagem com esses animais, estabelecendo assim novos ciclos de transmissão (Fig. 1) (BAKER et al., 2022; JONES et al., 2013). Desta forma, os animais domésticos podem servir como ‘“hospedeiros ponte” entre os patógenos oriundos da vida selvagem e os seres humanos (KEESING; OSTFELD, 2021; PLOWRIGHT et al., 2017; WELLS et al., 2020).

Quando patógenos de animais são transmitidos para o ser humano e conseguem estabelecer uma infecção, este fenômeno é denominado “*spillover*”, ou transbordamento entre espécies. Uma série de fatores e interações podem influenciar na ocorrência do transbordamento zoonótico, como determinantes

ecológicos e epidemiológicos, formas de exposição ao patógeno, a dose de exposição, fatores intra-humanos, além de características comportamentais dos hospedeiros (KEESING; OSTFELD, 2021; PLOWRIGHT et al., 2017).

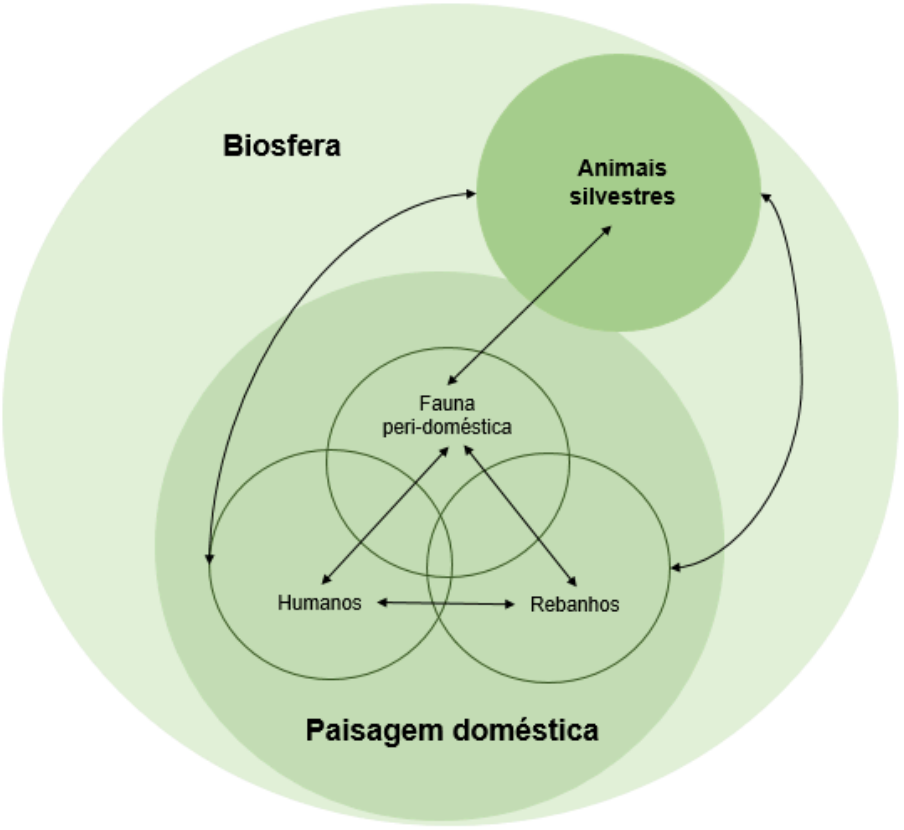


Figura 1. Dinâmica da transmissão de patógenos entre animais de vida selvagem-rebanhos-humanos. O esquema representa o fluxo de patógenos, indicado pelas setas, entre hospedeiros selvagens, animais peri-domésticos, rebanhos e seres humanos. A transmissão e o estabelecimento de uma infecção dependem da forma e da intensidade das interações entre a vida selvagem, rebanhos e os humanos. Fatores como a expansão agropecuária, desmatamento, fragmentação de habitats e o consumo de carne de caça podem contribuir para a emergência de doenças infecciosas oriundas da vida selvagem. Adaptado de JONES et al., 2013.

Além disso, existem outros fatores que desempenham um papel fundamental no surgimento e no aumento da dispersão de patógenos ao redor do mundo. As mudanças climáticas, mudanças demográficas e a globalização são fundamentais para a rápida disseminação de doenças infecciosas emergentes (BAKER et al., 2022).

As mudanças climáticas são outro fator importante para o aumento da disseminação de patógenos, uma vez que variações nas condições ambientais

desencadeiam uma série de alterações nas interações ecológicas entre espécies, aumentando o risco de emergência de patógenos zoonóticos (CARLSON et al., 2022). Mudanças demográficas, causadas principalmente pela urbanização, associada com a alta densidade populacional e condições precárias de saúde e saneamento básico podem favorecer a disseminação rápida e descontrolada de patógenos emergentes. A globalização facilitou a conexão entre os países e continentes por meio de viagens internacionais e o comércio de mercadorias, plantas e animais. Por isso, a globalização pode favorecer a dispersão de doenças infecciosas para outros continentes e a introdução de patógenos e vetores para determinadas espécies residentes em locais não endêmicos (BAKER et al., 2022).

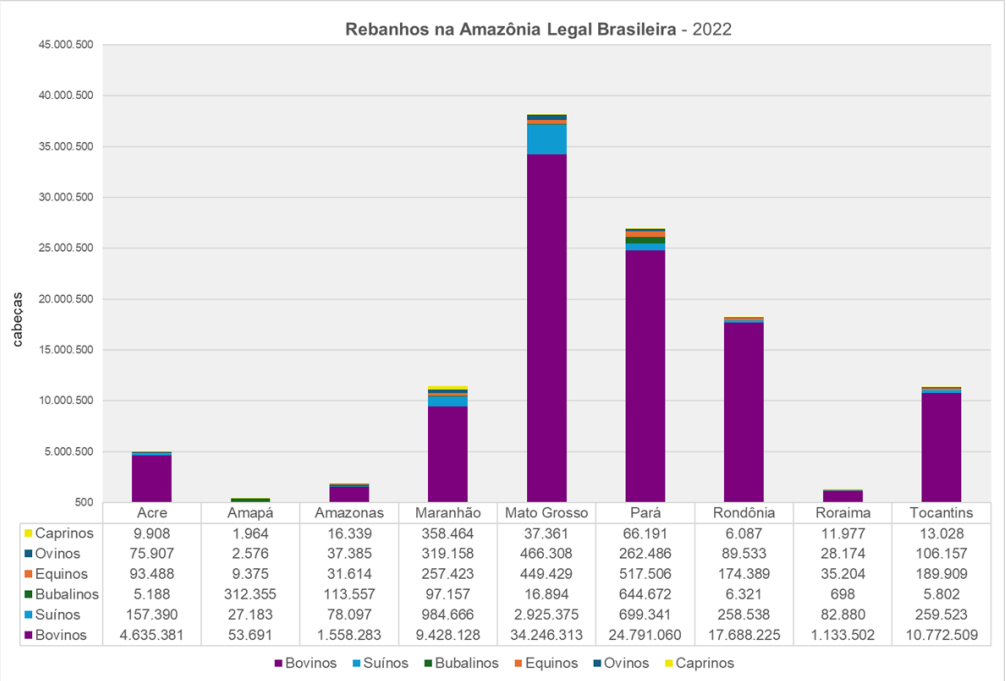
Outro aspecto que deve ser considerado é o fato de os patógenos zoonóticos corresponderem a 60% dos agentes responsáveis pela emergência de doenças infecciosas, sendo 71,8% desses patógenos oriundos da vida selvagem (JONES et al., 2008), confirmando que os patógenos zoonóticos estão diretamente relacionados com a emergência e reemergência de doenças infecciosas (WOOLHOUSE; GOWTAGE-SEQUERIA, 2005).

Alguns estudos demonstram que regiões de florestas tropicais, com alta taxa de biodiversidade de mamíferos e que vem passando por alterações no uso da terra, principalmente relacionadas com atividades agrícolas, possuem um risco elevado para o surgimento de doenças infecciosas emergentes (ALLEN et al., 2017; KEESING; OSTFELD, 2021; MCFARLANE; SLEIGH; MCMICHAEL, 2013; WEISS; MCMICHAEL, 2004). Segundo o estudo realizado por Allen e colaboradores (2017), a América do Sul, em especial o Brasil, pode ser considerado um *hotspot* para o surgimento de DIEs.

1.2. O desmatamento e a expansão agropecuária na Amazônia brasileira

As principais alterações provocadas pela expansão agrícola envolvem a fragmentação de habitats, o desmatamento e a substituição da vegetação nativa por plantações agrícolas e áreas de pastagem (JONES et al., 2013). A Amazônia enfrenta altas taxas de desmatamento devido à expansão das atividades pecuárias e o aumento da produção de soja na região (NEPSTAD; STICKLER; ALMEIDA, 2006).

Neste sentido, o Pará é o segundo estado brasileiro com maior número de bovinos do país, com 24,8 milhões cabeças de gado, tendo três municípios no *ranking* de municípios com mais cabeças de gado do Brasil, com São Félix do Xingu em primeiro lugar (2,5 milhões), Novo Repartimento em quarto (1,3 milhões) e Marabá em quinto (1,3 milhões) (IBGE, 2022). Além disso, o Mato Grosso, outro estado pertencente ao bioma amazônico, se destaca em primeiro lugar com mais de 34 milhões de cabeças de gado (IBGE, 2022). Segundo as estimativas do IBGE, a região norte foi a que mais cresceu em número de cabeças de gado no país, sendo responsável por abrigar 25,9% (60,6 milhões) do rebanho nacional. De forma geral, os estados da região Norte abrigam um abundante número de animais de produção, importantes para a agropecuária nacional, com destaque para os estados do Mato Grosso, Pará e Rondônia, como visualizado no gráfico da figura 2.



	Acre	Amapá	Amazonas	Maranhão	Mato Grosso	Pará	Rondônia	Roraima	Tocantins
Caprinos	9.908	1.964	16.339	358.464	37.361	66.191	6.087	11.977	13.028
Ovinos	75.907	2.576	37.385	319.158	466.308	262.486	89.533	28.174	106.157
Equinos	93.488	9.375	31.614	257.423	449.429	517.506	174.389	35.204	189.909
Bubalinos	5.188	312.355	113.557	97.157	16.894	644.672	6.321	698	5.802
Suínos	157.390	27.183	78.097	984.666	2.925.375	699.341	258.538	82.880	259.523
Bovinos	4.635.381	53.691	1.558.283	9.428.128	34.246.313	24.791.060	17.688.225	1.133.502	10.772.509

Figura 2. Rebanhos de animais domésticos de produção na Amazônia Brasileira. O gráfico mostra o número de grupos de animais de produção presentes nos estados que compõem a região Norte do país. Em amarelo estão representados os caprinos, azul-escuro os ovinos, laranja os equinos, em verde os bubalinos, azul-claro, os suínos e em roxo os bovinos. Dados são do IBGE (2022).

Estas alterações no uso da terra, associadas com as mudanças climáticas, expõem a região amazônica e a região de fronteira da Amazônia com o cerrado a condições climáticas extremas (MARENGO et al., 2022) como, por exemplo, a

redução de chuva em determinadas regiões do bioma amazônico (LEITE-FILHO et al., 2021).

Segundo o Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE), até 2020, 813.063,44 km^2 (12,13%) do bioma amazônico que pertencem a Amazônia Legal (Amazônia brasileira) já foi desmatado (INPE, 2021). O Projeto de Monitoramento do Desmatamento na Amazônia Legal por Satélite (Prodes) registrou um aumento de 21,98% na taxa de desmatamento da Amazônia Legal de 2020 para 2021, sendo o maior número desde 2006 (PRODES, 2021).

Uma modelagem sobre a conservação na bacia Amazônica foi desenvolvida por Soares-Filho e colaboradores (2006), utilizando modelos para dois cenários diferentes. O primeiro cenário seria o atual, chamado de "*business-as-usual*" (BAU), em que foram considerados 4 aspectos: (i) as tendências recentes de desmatamento continuarão as mesmas; (ii) as rodovias atualmente previstas para pavimentação serão pavimentadas; (iii) as reservas florestais em terras privadas permanecerão baixas e (iv) novas áreas de preservação (APs) não serão criadas. O segundo cenário proposto, chamado de "governança", assumiu que: (i) a legislação ambiental seria implementada com melhorias e atualizações em toda a Bacia Amazônica; (ii) implementação de reservas florestais obrigatórias em propriedades privadas; (iii) zoneamento agroecológico do uso da terra e (iv) expansão e criação de novas unidades de conservação.

Os resultados da modelagem no cenário BAU mostraram que os 5,3 milhões de km² (85% da área original) de área total de floresta de dossel fechado serão reduzidos a 3,2 milhões de km² (53%) até o ano de 2050 (SOARES-FILHO et al., 2006). Conforme visto na figura 3, a adoção das medidas propostas para o cenário "governança" poderia diminuir os índices de desmatamento.

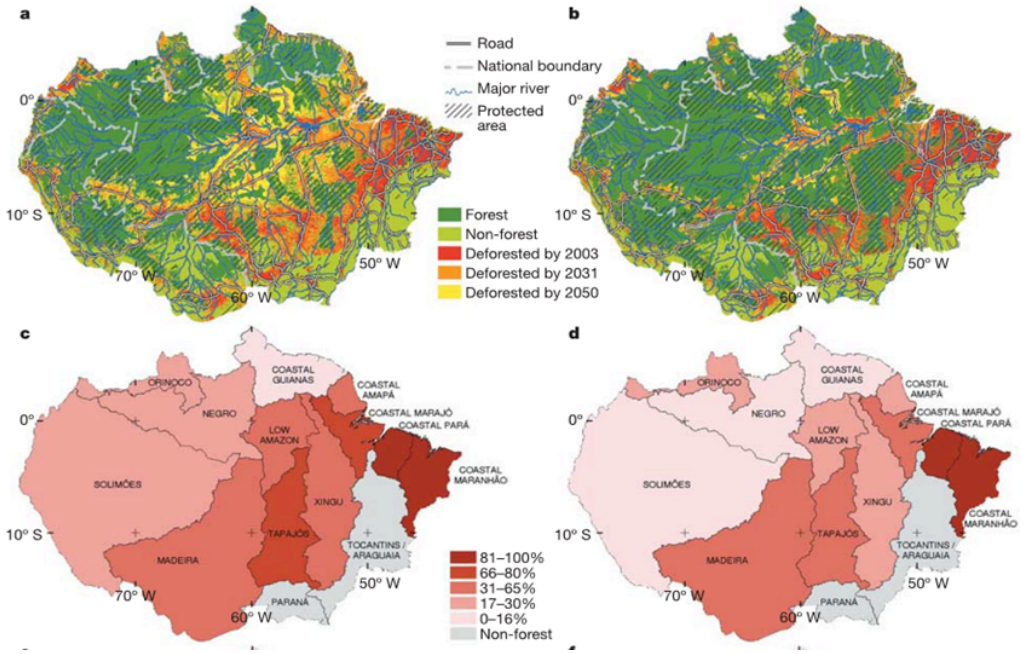


Figura 3. Modelos de conservação da Bacia Amazônica em 2050. Os mapas mostram modelos de conservação florestal na Amazônia brasileira, indicando uma estimativa percentual para o desmatamento no ano de 2050 em dois cenários distintos (BAU = cenário atual, sem mudanças no quesito conservação; governança = com mudanças no quesito conservação). (a) Cobertura florestal no cenário BAU em 2050 e (b) no cenário governança. (c) Perda florestal em bacias hidrográficas para o cenário BAU em 2050 (d) e para o cenário governança. Adaptado de SOARES-FILHO et al., 2006.

1.3. Doenças infecciosas na Amazônia brasileira

Nesse sentido, existem trabalhos demostrando o impacto da perda de biodiversidade e das alterações climáticas na emergência de doenças infecciosas na Amazônia brasileira (ELLWANGER et al., 2020). A emergência da paracoccidioidomicose em regiões da Amazônia brasileira foi associada com a maior exposição aos esporos do fungo devido à remoção do solo causada pelo intenso desmatamento (MARQUES-DA-SILVA et al., 2012).

Além disso, a mineração também está relacionada com a emergência de doenças infecciosas da Amazônia, existindo relação entre a mineração de ouro e a alta prevalência de malária e da síndrome pulmonar causada por hantavírus em garimpeiros da região Amazônica (BAUCH et al., 2015; SANCHEZ et al., 2017; TERÇAS-TRETTEL et al., 2019).

Ademais, já foi demonstrado que a emergência e a reemergência de arboviroses e a dispersão destas doenças para áreas urbanas está associado com o

desmatamento. O desflorestamento causa um desequilíbrio ecológico, levando, por exemplo, à perda de habitats de primatas não-humanos, a realocação de mosquitos vetores de arboviroses e a colonização desses espaços pelo ser humano. Estas novas interações estabelecidas promovem a dispersão dos vírus para novas áreas e a consequente infecção dos seres humanos (FAVORETTO et al., 2019; REZENDE et al., 2018).

Desta forma, quando se trata de doenças infecciosas emergentes, os vírus representam uma grande preocupação, visto que eles são a segunda maior fonte de doenças emergentes e reemergentes do planeta, com grande potencial de causar epidemias e pandemias (JONES et al., 2008). Dentre os diferentes grupos de vírus zoonóticos, os poxvírus, alvo deste estudo, se destacam pela capacidade de infectar uma ampla diversidade de hospedeiros e por apresentarem, no Brasil, ampla distribuição em outros biomas anteriormente estudados (SILVA et al., 2021).

1.4. Poxvírus

Os poxvírus (POXV), pertencentes à família *Poxviridae*, são patógenos de interesse humano e veterinário, possuindo um amplo espectro de hospedeiros. São descritas duas subfamílias, a *Entomopoxvirinae* compreendendo os vírus que infectam invertebrados, constituída por 4 gêneros, e a *Chordopoxvirinae* que possui os vertebrados como hospedeiros, sendo composta por 18 gêneros (Tabela 1) (ICTV, 2024). Nesta última subfamília, estão presentes os gêneros *Orthopoxvirus*, *Parapoxvirus*, *Yatapoxvirus* e *Molluscipoxvirus* capazes de infectar os seres humanos.

Tabela 1. Classificação taxonômica da família *Poxviridae*.

Subfamílias	Gêneros	Espécies
Chordopoxvirinae	*Avipoxvirus*	12
	Capripoxvirus	3
	Centapoxvirus	2
	Cervidpoxvirus	1
	Crocodylidpoxvirus	1
	Leporipoxvirus	4
	Macropopoxvirus	2
	Molluscipoxvirus	1
	Mustelpoxvirus	1
	Orthopoxvirus	12
	Oryzopoxvirus	1
	Parapoxvirus	5
	Pteropopoxvirus	1
	Salmonpoxvirus	1
	Sciuripoxvirus	1
	Suipoxviurs	1
	Vespertilionpoxvirus	1
	Betaentomopoxvirus	16
	Yatapoxvirus	*2*
		Diachasmimorpha entomopoxvirus
Entomopoxvirinae	*Alphaentomopoxvirus*	7
	Betaentomopoxvirus	16
	Deltaentomopoxvirus	1
	Gammaentomopoxvirus	6
		Diachasmimorpha entomopoxvirus

Fonte: ICTV, 2022

1.4.1. Morfologia

Em comparação com outros vírus que infectam animais, os POXV são considerados vírus grandes, com partículas de aproximadamente 360 nanômetros (nm), e possuem uma morfologia complexa, com formato ovóide ou semelhante a um tijolo (MOSS, 2013b). As partículas virais são envoltas por uma bicamada lipídica, possuem uma estrutura interna complexa, um cerne em forma de haltere envolto por uma parede composta por duas membranas. A partícula ainda apresenta dois corpúsculos laterais que estão presentes entre as concavidades do cerne e a membrana externa (Fig. 4) (CYRKLAFF et al., 2005; MOSS, 2013a).

A membrana lipídica externa possui proteínas de superfície tubulares ou globulares que se dispõem irregularmente nos OPXV e helicoidalmente nos PPV (Fig. 4)(BURRELL; HOWARD; MURPHY, 2017).

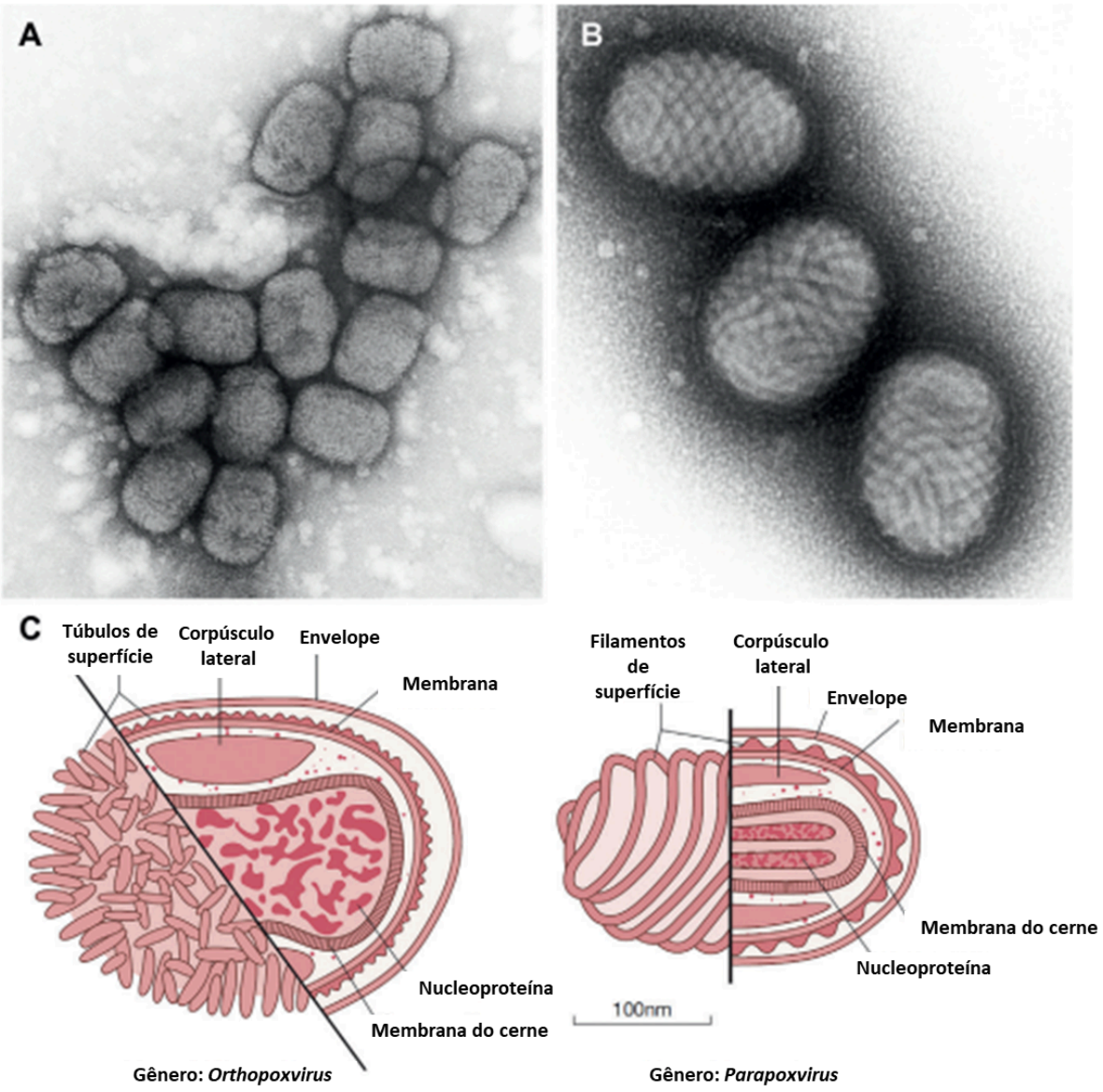


Figura 4. Organização das proteínas de superfície em ortopoxvírus e parapoxvírus. (A) Microscopia de coloração negativa de partículas de vaccínia vírus, mostrando a organização dos túbulos de superfície dos ortopoxvírus. (B) Microscopia de coloração negativa de orf vírus, mostrando os filamentos de superfície. (C) Esquematização da partícula de vírus dos gêneros Orthopoxvirus e Parapoxvirus, evidenciando a diferença na disposição das proteínas de superfície. Os ortopoxvírus possuem os túbulos de superfícies organizados irregularmente, enquanto os parapoxvírus possuem filamentos de superfície, organizados helicoidalmente. Adaptado de BURRELL; HOWARD; MURPHY, 2017.

Estudos relacionados com a penetração viral demonstraram que os POXVs possuem múltiplas formas infecciosas, diferenciadas somente pela membrana externa (Fig. 5). A forma mais abundante são os vírus maduros (MV) que possuem uma única membrana externa (MOSS, 2006). O MV pode ser envolto por uma dupla membrana proveniente do Golgi ou de endossomos formando o vírus envolto (WV)

(ou vírus envelopado intracelular - IEV). O WV se move para a periferia da célula e se funde com a membrana plasmática, após a exocitose os vírus extracelulares (EV), que possuem uma membrana adicional com uma composição protéica diferente, são liberados (SMITH; VANDERPLASSCHEN; LAW, 2002).

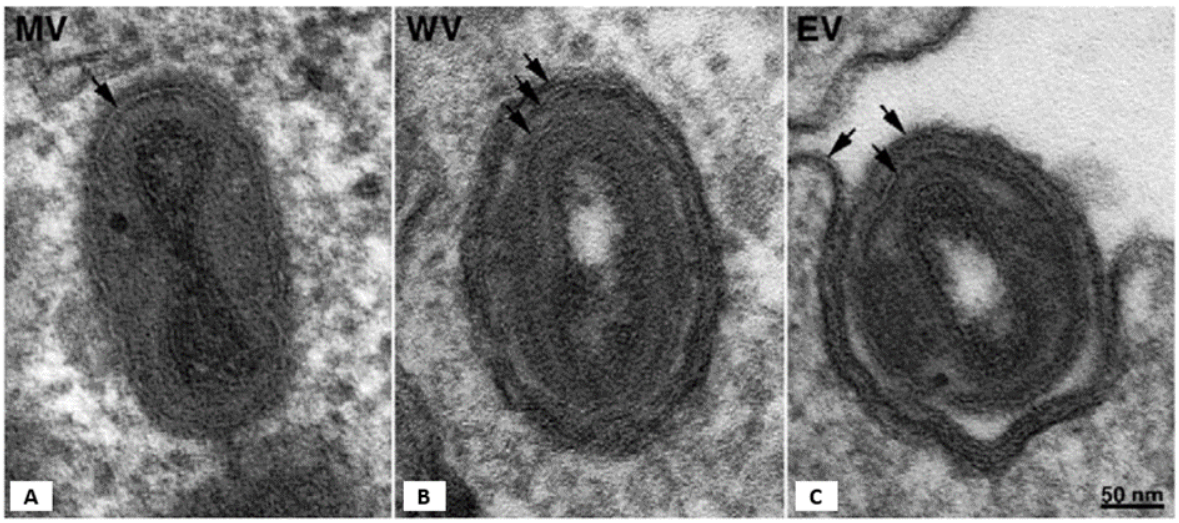


Figura 5. Partículas virais formadas pelos poxvírus durante o ciclo de multiplicação. Microscopias eletrônicas do vaccínia vírus mostrando os três tipos de partículas formadas: (A) os vírus maduros (MV), (B) vírus envolto (WV) e (C) EV vírus extracelulares (MOSS, 2006).

1.4.2. Genoma

Os POXV possuem um genoma de DNA dupla fita (dsDNA) que varia, em média, de 130 a 300 mil pares de bases (kpb). A molécula de DNA dos POXV possui regiões de repetições terminais invertidas (ITR) localizadas nas extremidades do genoma constituídas por sequências idênticas com orientações opostas, sendo importantes na formação de concatâmeros durante a replicação do genoma. As ITRs formam alças terminais em formato de grampo, são ricas em adenida e timina (A-T), sendo responsáveis por conectar ambas as fitas de DNA (BAROUDY; VENKATESAN; MOSS, 1982). As ITRs podem variar de tamanho entre os POXV devido a transposições, deleções e repetições e nelas estão presentes as ORFs (regiões abertas de leitura, do inglês "*open reading frames*") responsáveis pela modulação da patogênese viral (MOSS, 2013a).

Ao contrário das ITRs que podem variar entre os POXV, a região central do genoma é altamente conservada, com aproximadamente 80-100 kpb. Entre os chordopoxvírus, a organização da região central é muito semelhante entre os

gêneros pertencentes à subfamília. Nos OPXV, são codificados em torno de 90 genes que se localizam continuamente no centro do genoma. Esta região concentra os genes essenciais para a replicação do DNA, como a RNA polimerase DNA dependente, poli A polimerase, enzima de metilação e fatores de transcrição (Fig. 6) (GUBSER et al., 2004; MOSS, 2013b).

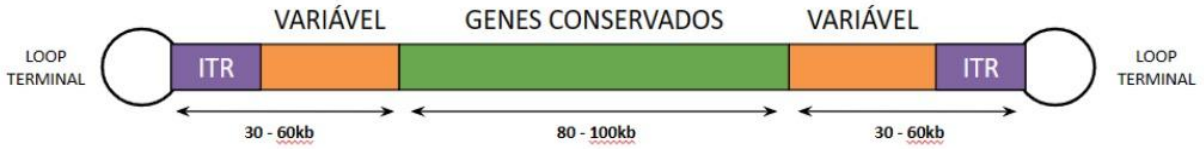


Figura 6. Representação esquemática do genoma dos POXV. O genoma dos POXV é constituído por um DNA linear de dupla fita e possui uma região central conservada, que codifica genes essenciais para a replicação viral e proteínas estruturais, e regiões terminais, que codificam fatores de interação vírus-hospedeiros. Nas extremidades do genoma estão presentes as repetições terminais invertidas (ITR). Na figura, os genes utilizados como marcadores moleculares estão destacados em vermelho. SMITH e MCFADDEN (2002), adaptado por OLIVEIRA, 2021.

1.4.3. Ciclo de multiplicação

Poxviridae é uma família de vírus de DNA dupla fita que, à exceção da maioria dos vírus DNA, realizam todas as etapas do seu ciclo de multiplicação no citoplasma (Fig. 7), pois os POXV codificam enzimas que não estão presentes em outros vírus de DNA, como a RNA polimerase dependente de DNA, além de proteínas de expressão de fatores de transcrição gênica. Além disso, carregam na partícula infecciosa a maquinaria necessária para o início da transcrição, sem a necessidade de utilizar enzimas do hospedeiro (FENNER et al., 1988; MOSS, 2013b).

Os vírus maduros (MV) usualmente penetram na célula por fusão com a membrana plasmática ou via endocitose (LAW et al., 2006), mas também já foi demonstrado que os MVs podem penetrar na célula via macropinocitose induzida pelas fosfatidilserinas expostas na superfície dos vírus (MERCER et al., 2010). A acidificação do endossomo promove a penetração do core viral para o interior do citoplasma. Glicosaminoglicanos e lamininas de superfície celular podem mediar a adsorção do vírus à célula. As proteínas virais D8 ligam-se ao sulfato de condroitina, A27 e H3 ligam-se ao sulfato de heparina, já a proteína A26 liga-se a laminina. As proteínas A26 e A27 interagem entre si e a A17 é responsável por ancorar A27.

Além das proteínas citadas anteriormente, mais 8 proteínas estão associadas com a fusão e penetração do vírus na célula hospedeira (MOSS, 2016). A conservação dessas proteínas em todos os POXV indica um mecanismo de penetração em comum entre esses vírus (MOSS, 2013). A infecção por vírus envelopados extracelulares (EV) está associada com o mecanismo de disseminação célula a célula, proporcionado por longas projeções de actina (BLASCO; MOSS, 1992; CONDIT, 2010; DOCEUL et al., 2010). A penetração de EV na célula ocorre por meio de endocitose ou fusão de membranas, assim como acontece para os MVs (SCHMIDT et al., 2011).

O ciclo de multiplicação dos POXV envolve uma expressão temporal de genes. Para o início do ciclo, uma partícula infecciosa carrega no cerne o genoma, enzimas virais e fatores necessários para a transcrição de genes precoces, fornecendo meios para ocorrer a síntese de RNA mensageiro (RNAm) precoces logo após a infecção (MOSS, 2013).

Após o desnudamento primário, o DNA é transcrito em RNAm precoces que codificam enzimas e proteínas moduladoras do sistema imune do hospedeiro, fatores de crescimento celular e outros fatores necessários para a replicação do DNA viral e para a transcrição de genes intermediários. A replicação do DNA de POXV acontece em fábricas virais localizadas no citoplasma celular e se inicia após o desnudamento secundário. Um corte em uma extremidade da molécula de DNA deixa uma região 3’ livre que é utilizada como *primer* para a síntese do DNA utilizando a fita complementar como molde. Este processo de replicação dos POXV forma uma estrutura semelhante a um grampo, resultando em um mecanismo denominado replicação “grampo deslizante”. O produto deste tipo de replicação é um concatâmero de dsDNA, que após o término da replicação é clivado. Em seguida, são codificadas enzimas e fatores para a expressão de genes tardios, que codificam proteínas estruturais, e fatores de transcrição precoce necessário para uma nova infecção, que serão empacotados com a RNA polimerase e outras enzimas na progênie viral (MOSS, 2013b; WHELAN, 2013).

A montagem das progênies acontece em fábricas virais localizadas no citoplasma celular, onde estão presentes os genomas virais produzidos, as proteínas estruturais e os fatores de transcrição precoces. As primeiras estruturas visualizadas são os vírus imaturos (IVs), o qual o mecanismo de formação ainda não é

completamente elucidado. Após clivagem do capsídeo viral, condensamento do cerne, mudança para o formato de tijolo ou oval, são formados os vírus maduros intracelulares (MVs), liberados por lise celular. Os MVs também podem ser ou direcionados para o Complexo de Golgi onde adquirirem duas membranas, formando os WVs (CONDIT; MOUSSATCHE; TRAKTMAN, 2006; MOSS, 2013b).

A exocitose dos WVs libera os EVs (vírus envelopados extracelulares), caso ocorra a associação com a membrana da célula, podem ser formados os vírus envelopados associados à célula (CEV). Os CEVs são responsáveis por induzir a formação de uma cauda de actina que promovem a rápida disseminação dos vírus para outras células (DOCEUL et al., 2010; MOSS, 2013b). A figura abaixo ilustra as etapas da replicação dos POXV de uma maneira geral, mas a maioria das informações sobre a replicação destes vírus foi obtida, principalmente, a partir dos estudos com o VACV, pertencente ao gênero *Othopoxvirus*.

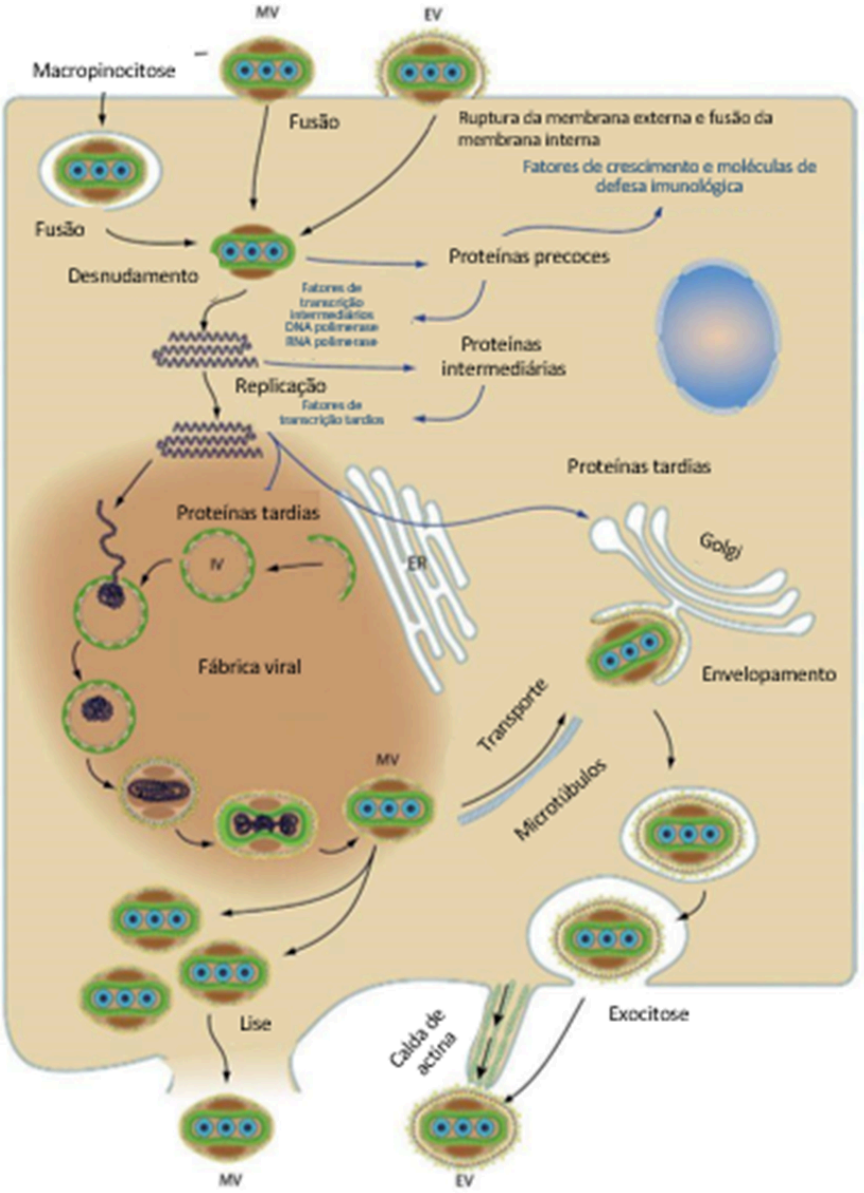


Figura 7. Ciclo de multiplicação dos POXV. O ciclo de multiplicação dos POXV começa com a penetração viral, através da fusão de membranas ou pela via endossomal. Com o desnudamento, acontece a transcrição de genes precoces envolvidos na modulação da resposta imune do hospedeiro e fatores de transcrição de fatores intermediários. Em seguida, as proteínas intermediárias envolvidas na replicação e transcrição do genoma e os fatores de transcrição tardios são codificados. O DNA é replicado e as proteínas tardias, incluindo as proteínas estruturais, são traduzidas. O DNA e as proteínas estruturais seguem para as fábricas, onde as partículas são montadas e posteriormente liberadas por exocitose, lise celular ou de célula a célula por meio de caudas de actina. (BURRELL; HOWARD; MURPHY, 2017).

1.5. Ortopoxvírus

O gênero *Orthopoxvirus* (OPXV) é um grupo de vírus de importância para a saúde humana e veterinária e o mais bem estudado da família *Poxviridae*. Atualmente, o gênero possui 12 espécies catalogadas (ICTV, 2024), sendo que todas apresentam reatividade imunológica cruzada entre si. Esta alta reatividade imunológica observada entre as espécies do gênero OPXV se deve ao fato de a região central do genoma dos OPXVs ser altamente conservada entre as espécies, estando presentes nessas regiões sequências codificadoras de proteínas com funções comuns aos OPXV (GROSSEGESSE et al., 2023; MACKETT; ARCHARD, 1979).

Os vírus pertencentes a este gênero com maior destaque são o varíola vírus (VARV), um patógeno exclusivamente humano, porém, já erradicado, e outros vírus zoonóticos como monkeypox vírus (MPXV), cowpox vírus (CPXV) e o vaccínia vírus (VACV). Os OPXVs citados já foram detectados em diversos hospedeiros nas Américas, África, Europa e Ásia (Fig. 8), além disso, o VACV e o MPXV são vírus associados com surtos emergentes em populações humanas (revisado por SILVA et al., 2021).

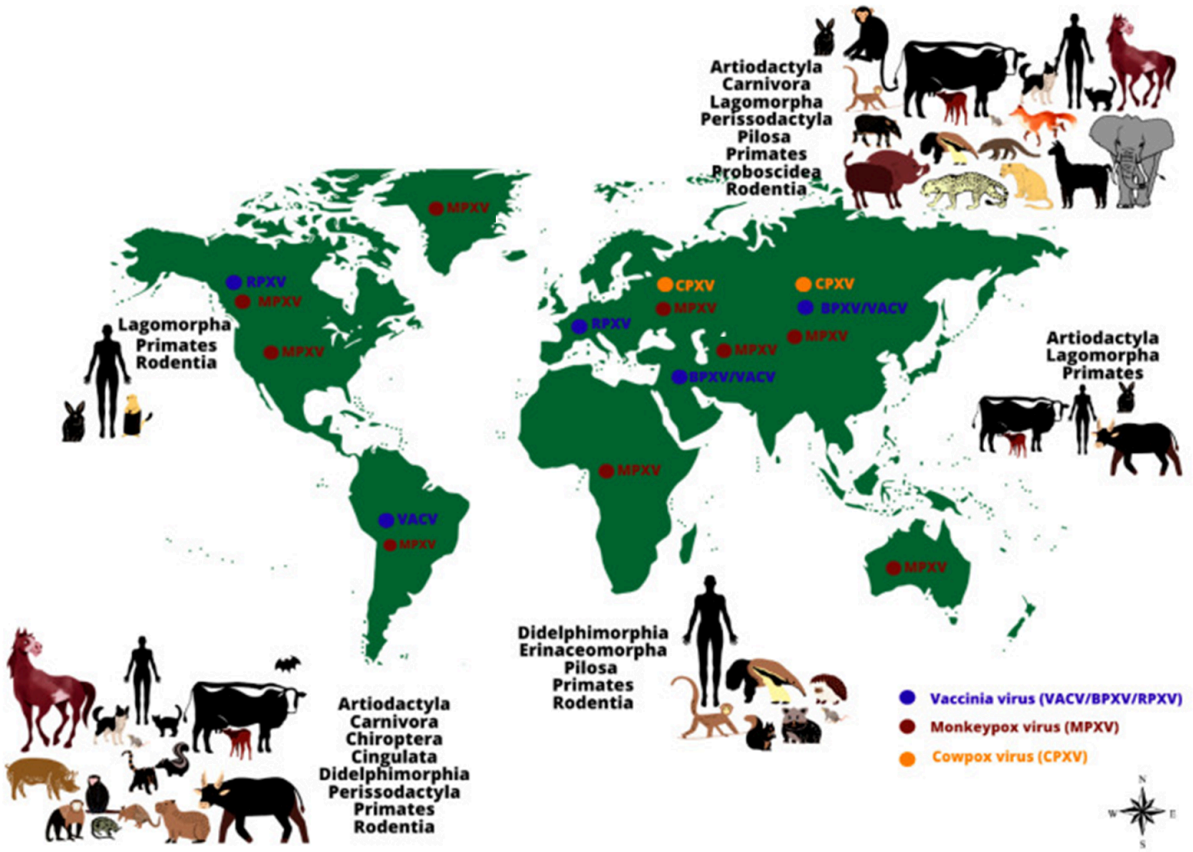


Figura 8. Distribuição geográfica de ortopoxvírus zoonóticos. Representação da distribuição geográfica dos OPXVs zoonóticos e o espectro de hospedeiros em cada região até o ano de 2021. A circulação de Cowpox vírus (CPXV) fica restrita a Europa e ao oeste asiático. O vaccínia vírus (VACV) é detectado principalmente no Brasil e na Índia, mas já foi demonstrado a circulação de VACV no Oriente Médio, na Europa e nos Estados Unidos. A circulação de monkeypox vírus (MPXV) já foi detectada em todos os continentes depois do surto de 2022. (Adaptado de SILVA et al., 2021).

1.5.1. Patogênese dos ortopoxvírus

A patogênese dos OPXVs é baseada, principalmente, em estudos realizados com o varíola vírus e o vaccínia vírus. As infecções causadas pelos OPXV podem ser localizadas ou sistêmicas, dependendo, da espécie, do tropismo viral, da forma de infecção (rotas de entrada), do hospedeiro e do seu estado imunológico. Geralmente, a entrada dos OPXVs no hospedeiro se dá por via percutânea ou pela via respiratória, entretanto evidências demonstram que a rota natural de transmissão dos OPXVs zoonóticos ocorre por meio de contato com animais ou fômites infectados (DAMON, 2013; MCFADDEN, 2005).

Pela via respiratória, os vírus se multiplicam em macrófagos alveolares e bronquíolos, partindo para os linfonodos regionais, disseminam pelo organismo do hospedeiro, promovem viremia e terminam por atingir a pele, provocando erupções cutâneas. Pela via percutânea ou pelas mucosas, a multiplicação dos vírus acontece nos sítios primários de infecção, posteriormente, seguem para os linfonodos regionais e em seguida para a corrente sanguínea, causando a primeira viremia. A partir disso, os vírus podem chegar a vários órgãos, infectando-os. Após a multiplicação em órgãos vascularizados como o fígado e o baço, acontece a segunda viremia, acarretando a chegada dos vírus na pele e manifestação em forma de lesões ulcerativas. As lesões começam como máculas que evoluem para pápulas, vesículas, pústulas, formação de crosta, seguida da resolução da lesão (DAMON, 2013).

1.5.2. Varíola vírus

O VARV é o agente etiológico da varíola, uma doença responsável por milhares de mortes em todo o mundo, com aproximadamente 300 milhões de óbitos registrados somente durante o século XX. O VARV é um vírus que infecta exclusivamente humanos, que possui distribuição global. O VARV foi o primeiro patógeno a ser erradicado no mundo, com o último caso registrado na Somália em 1977. A erradicação da varíola só foi possível devido a uma intensa e extensa campanha de vacinação mundial orquestrada pela Organização Mundial da Saúde na década de 70 (FENNER et al., 1988) e ao fato do VARV infectar apenas seres humanos e não possuir outros hospedeiros reservatórios na natureza (MCFADDEN, 2005; SMITH; MCFADDEN, 2002).

1.5.3. Monkeypox vírus

O MPXV é um vírus zoonótico que foi inicialmente isolado em macacos capturados na Malásia em 1958 e levados a Copenhague (MAGNUS et al., 1959). Entretanto, estudos indicam que roedores endêmicos da África Central e Ocidental sejam os potenciais reservatórios naturais deste vírus. Existem descrições eventuais de infecções por MPXV em primatas não-humanos (ARITA; HENDERSON, 1968), além do vírus poder infectar outros animais (CDC, 2022).

O primeiro registro de infecção por MPXV em humanos foi em 1970, quando o vírus foi isolado de um paciente na República Democrática do Congo (RDC) (LADNYJ; ZIEGLER; KIMA, 1972). Desde então o vírus circula de forma endêmica em países da África Ocidental e Central, causando surtos eventuais nestes países (BEER; RAO, 2019).

Estudos filogenéticos demonstraram que os isolados de MPXV podem ser divididos em dois grandes grupos geneticamente distintos, sendo eles o clado I (antigo clado Bacia do Congo) e o clado II (antigo clado África Ocidental), subdividido em dois clados, o clado IIa e o IIb (NAKAZAWA et al., 2015; WHO, 2022). Os vírus pertencentes ao clado I demonstraram ser mais transmissíveis entre os humanos e, também, causam um quadro clínico mais grave do que os vírus pertencentes ao clado II (LI et al., 2010).

Entre 2005 e 2007, 760 casos de infecção por MPXV foram confirmadas na RDC (RIMOIN et al., 2010). Em 2017, após 40 anos, a Nigéria presenciou a reemergência do mpox (doença causada pelo MPXV), entre setembro de 2017 a novembro de 2019. Durante este período, 183 casos e 9 mortes foram registradas no país (“Monkeypox Outbreak in Nigeria”, 2019). Estudos recentes demostraram um aumento significativo na incidência de infecções humanas por MPXV em países do continente africano 30 anos após a descontinuação da campanha de vacinação contra a varíola, demonstrando preocupação com a disseminação do vírus para outros países africanos e para outros continentes (BUNGE et al., 2022; RIMOIN et al., 2010).

Em 2003 ocorreu nos Estados Unidos um surto de MPXV causado pela importação de roedores da África. Durante o surto nos EUA foram registrados 81 casos de mpox em humanos, sendo 32 casos confirmados por exames laboratoriais, sem nenhuma morte associada (GIULIO; ECKBURG, 2004). Em anos mais recentes, casos importados também foram registrados no Reino Unido, Israel, Cingapura e novamente nos Estados Unidos (COSTELLO et al., 2022; EREZ et al., 2019; VAUGHAN et al., 2018; YONG et al., 2020).

Desde o começo de maio de 2022, casos de mpox estão sendo registrados em países não endêmicos para o vírus. Esta é a primeira vez em que a transmissão comunitária e sem ligação com viagens para países endêmicos para MPXV é

relatada (VENKATESAN, 2022). Até o dia 10 de abril de 2024 já foram registrados mais de 94 mil casos confirmados no mundo e 178 mortes, e, destes casos, 91 mil foram reportados em 111 países não endêmicos para MPXV (CDC, 2024). No Brasil, entre os anos de 2022 e 2024 já foram confirmados aproximadamente 12 mil casos de mpox. Os casos relacionados com a dispersão do mpox para outros continentes são derivados do clado IIb que estão associados com uma manifestação menos grave da doença (ISIDRO et al., 2022).

1.5.4. Cowpox vírus

O CPXV é um OPXV endêmico do continente europeu e do oeste asiático e possui roedores silvestres como hospedeiros, em especial as espécies *Clethrionomys glareolus* e *Apodemus sylvaticus* (CHANTREY et al., 1999; SILVA et al., 2021). Além disso, o isolamento viral e a detecção de anticorpos contra OPXV já foram relatados em outras espécies, como *Citellus fulvus*, *Rhombomys opimus*, *Microtus oeconomus* e *Microtus agrestis* (BENNETT; BAXBY, 1996). Mais recentemente, os gatos assumem um papel relevante para o ciclo de manutenção do CPXV, uma vez que eles possuem um papel importante na transmissão do vírus para os seres humanos, funcionando como hospedeiros intermediários (BENNETT et al., 1990; CORAS et al., 2005; EDER et al., 2017).

Um fato interessante sobre o CPXV é que ele recebeu este nome, por historicamente causar a doença denominada de “varíola bovina”. O CPXV presente nas lesões de vacas foi utilizado pelo naturalista e médico Edward Jenner para o desenvolvimento de uma vacina antivariólica em 1798 (JENNER, 1800; JENSON; GHIM; SUNDBERG, 2016). E, apesar do nome do vírus se referenciar as vacas, a infecção de bovinos atualmente não tem sido muito comum, sem casos confirmados no Reino Unido desde 1979 e somente 0,7% de soroprevalência entre os animais (BAXBY; OSBORNE, 1979; BENNETT; BAXBY, 1996).

1.6. Vaccínia vírus

O VACV é um vírus de importância histórica devido a sua utilização na campanha mundial de erradicação da varíola (FENNER et al., 1988). VACV é um vírus zoonótico que apresenta um amplo espectro de hospedeiros e, no Brasil, é responsável por diversos surtos de uma doença denominada de vaccínia bovina

(VB) que acomete bovinos e seres humanos (ABRAHÃO et al., 2015; ASSIS et al., 2013; DAMASO et al., 2000; LEITE et al., 2005a; TRINDADE et al., 2003). Na Índia ocorre a circulação de uma linhagem de VACV conhecida como Buffalopox vírus (BPXV) e está associada ao surto de doenças exantemáticas em búfalos e humanos (ELTOM et al., 2020). Infecções relacionadas ao BPXV já foram identificadas no Paquistão, Bangladesh, Indonésia, Grécia, Egito e Rússia (ZAFAR et al., 2007).

Apesar dos diversos estudos envolvendo VACV, a origem do vírus ainda não foi elucidada e os seus hospedeiros naturais ainda não são conhecidos (DOMINGOS et al., 2021; OLIVEIRA et al., 2015). A detecção do VACV em ambientes domésticos e em ambientes silvestres pode ser uma forma de ampliar o conhecimento sobre a história natural, biologia evolutiva, hospedeiros e formas de manutenção da cadeia de transmissão deste vírus (KROON et al., 2011).

Com o isolamento de vários VACV no Brasil, foi possível entender melhor a diversidade dos VACV brasileiros (VACV-Br). A dicotomia genética e fenotípica é o fato mais interessante sobre os VACV-Br, permitindo a divisão em dois grupos distintos (DRUMOND et al., 2008; FERREIRA et al., 2008; TRINDADE et al., 2008b, 2006, 2007).

Os vírus pertencentes ao Grupo 1 apresentam uma deleção de 18 nucleotídeos no gene A56R que codifica a hemaglutinina, além de ser menos virulento em modelo murino e apresentarem placas de lise menores quando comparados ao protótipo laboratorial VACV Western Reserve (WR). No entanto, os vírus do Grupo 2 não apresentam a referida deleção no gene A56R, são mais virulentos em modelo murino e apresentam placas de lise maiores que os do grupo 1 (DRUMOND et al., 2008; FERREIRA et al., 2008; TRINDADE et al., 2008b, 2006, 2007). Os grupos de VACV-Br também podem ser distinguidos a partir da análise de outros marcadores moleculares, como o gene C23L que codifica a proteína solúvel de ligação a quimiocinas. No grupo 1, os vírus possuem uma deleção de 10 nucleotídeos neste gene, enquanto os vírus do grupo 2 não apresentam a deleção no gene C23L (ASSIS et al., 2012). Casos de coinfecção por ambos os grupos (CAMPOS et al., 2011) e a circulação dos vírus em uma mesma área geográfica já foram relatados (TRINDADE et al., 2006).

1.6.1. Vaccínia bovina

A VB é uma zoonose caracterizada por ser uma doença exantemática manifestada por lesões ulcerativas na pele e nas mucosas, e acomete principalmente o gado leiteiro e os ordenhadores. No gado leiteiro as lesões são mais comuns nos úberes e nos tetos das vacas (Fig. 9A), podendo evoluir para mastites (LEITE et al., 2005a; LOBATO et al., 2005), causando impactos na produção de leite, saúde e economia de cidades rurais (KROON et al., 2011; MATOS et al., 2018; RIVETTI et al., 2013). Devido à amamentação, em bezerros as lesões são observadas nas gengivas, lábios e no focinho (Fig. 9B) (LEITE et al., 2005; LOBATO et al., 2005). Em humanos, as infecções por VACV são mais incidentes em ordenhadores, e, por isso, é considerada uma doença ocupacional. As manifestações clínicas são em forma de lesões nos sítios primários de infecção, normalmente nos dedos e nas mãos dos trabalhadores (Fig. 9C e D) (OLIVEIRA et al., 2017; TRINDADE et al., 2003).



Figura 9. Manifestações clínicas da vaccínia bovina em bovinos e humanos. As imagens mostram as lesões típicas de vaccínia bovina em (A) úberes de vacas, (B) gengiva de bezerros, (C e D) mãos de ordenhadores. Adaptado de MADUREIRA, 2009.

1.6.2. Circulação do VACV no Brasil

Os primeiros isolados do VACV no Brasil ocorreram na década de 60. O vírus SPAn 232 foi isolado de um camundongo sentinela na estação florestal de Cotia,

localizada no estado de São Paulo (DA FONSECA et al., 2002; LOPES et al., 1965). Também na década de 60, o vírus BeAn58058 foi isolado a partir de amostras de sangue de um roedor do gênero *Oryzomys* capturado da floresta de Utinga na cidade de Belém, no estado do Pará (FONSECA et al., 1998; MARQUES et al., 2001).

Após 30 anos dos isolamentos de VACV-Br em roedores, foram registrados os primeiros isolamentos de VACV associados a humanos e ao gado bovino durante surtos de VB no estado do Rio de Janeiro em 1999, onde foi isolado o Cantagalo vírus (CTGV) (DAMASO et al., 2000). No mesmo ano, foram relatados surtos em bovinos e humanos em Araçatuba, no estado de São Paulo (TRINDADE et al., 2003). Após a notificação dos primeiros surtos, o VACV foi rapidamente detectado em outras regiões do Brasil. Até 2021, evidências moleculares e sorológicas demonstraram a circulação do VACV em pelo menos 15 estados brasileiros. (Fig. 10) (DOMINGOS et al., 2021).

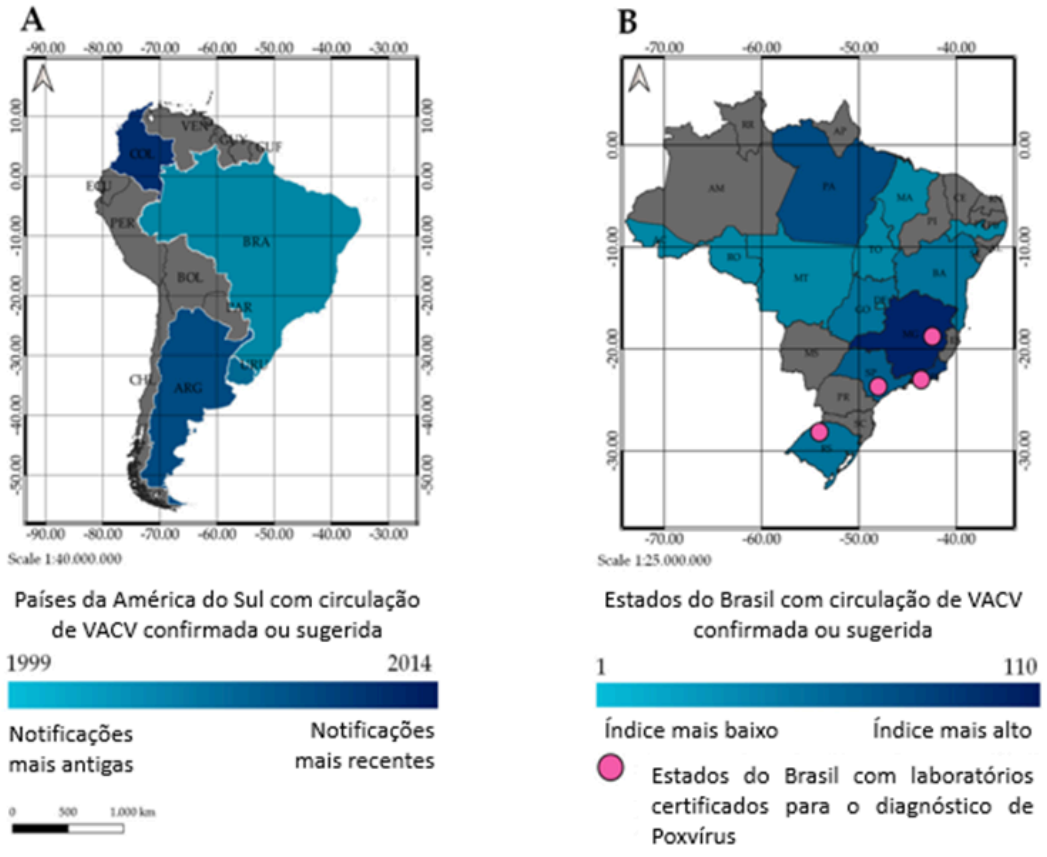


Figura 10. Circulação de VACV no Brasil e na América do Sul. (A) Países da América do Sul onde já foram demonstradas evidências moleculares e sorológicas da circulação de VACV. (B) Estados brasileiros onde já foram reportados a detecção molecular e sorológica para VACV. (DOMINGOS et al., 2021).

Além do Brasil, a detecção molecular e sorológica do VACV já foi relatada em outros países da América do Sul. A circulação do VACV foi detectada em rebanhos de bovinos na Argentina (FRANCO-LUIZ et al., 2014), em humanos na região amazônica da Colômbia (LAITON-DONATO et al., 2020; USME-CIRO et al., 2017) e no gado leiteiro no Uruguai (FRANCO-LUIZ et al., 2016b), mostrando a dispersão do vírus para outras regiões do continente sul-americano (Fig. 10).

1.6.3. Transmissão dos VACV-Br

A transmissão de VACV entre membros de um rebanho está estreitamente associada com a ordenha manual, onde um ordenhador ao entrar em contato com a lesão de um animal infectado durante a ordenha, pode transmitir para outros animais. Entretanto, surtos relacionados com a ordenha mecânica já foram demonstrados e a transmissão do vírus pode acontecer pela falta de higienização

das ordenhadeiras e o compartilhamento entre os animais (BORGES *et al.*, 2017). A introdução do vírus em uma nova propriedade pode acontecer pela introdução de um animal infectado ou pela rotatividade de ordenhadores entre as fazendas da região. (LOBATO et al., 2005; MATOS et al., 2018).

A infecção de outros animais, como os bezerros, pode acontecer pelo contato direto com os bovinos infectados e existem hipóteses de que a infecção pode acontecer por meio do contato indireto com secreções de lesões, com o leite ou em fezes de animais infectados. Além disso, o DNA de VACV já foi detectado no leite e queijo (ABRAHÃO et al., 2009d; DE OLIVEIRA et al., 2010, 2015) e em fezes de animais infectados por VACV (RIVETTI et al., 2013). E nesse cenário já foi demonstrada a infecção de camundongos sentinelas por meio de fezes de bovinos infectados (D'ANUNCIAÇÃO et al., 2012).

A circulação do VACV no Brasil não fica restrita somente a bovinos e humanos (LIMA et al., 2018). O genoma viral e anticorpos anti-OPXVs já foram detectados em uma ampla gama de hospedeiros silvestres, sendo eles quatis, primatas não-humanos, marsupiais, roedores e morcegos (ABRAHÃO et al., 2010c; MARTINS DA COSTA et al., 2020; MIRANDA et al., 2017; PERES et al., 2013) e também em animais domésticos e peridomiciliares como ratos, camundongos, gatos, cães, capivaras, equinos, suínos e búfalos (ABRAHÃO et al., 2009c; BARBOSA et al., 2014; BRUM et al., 2010; CAMPOS et al., 2011; COSTA et al., 2017a; DE ASSIS et al., 2012; FRANCO-LUIZ et al., 2016a; PERES et al., 2016). Estes dados sugerem que os animais silvestres e peri-domésticos podem estar envolvidos na cadeia de manutenção do VACV, como demonstrado na figura 11.

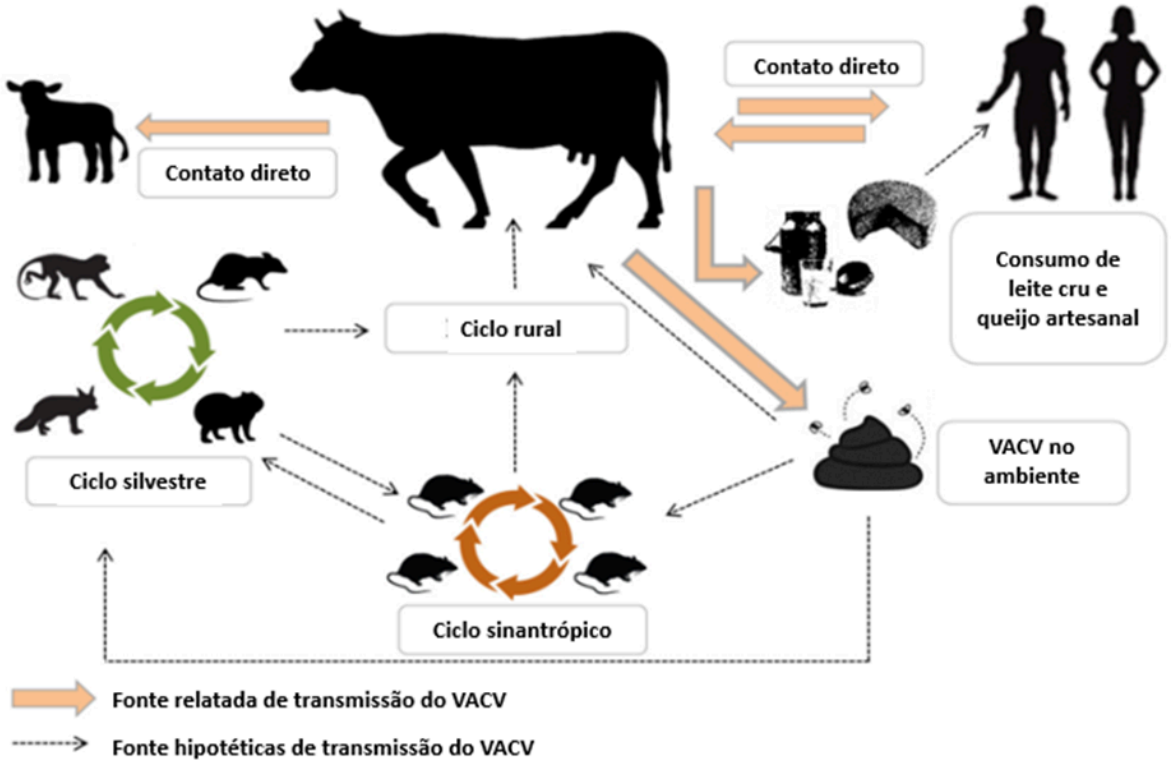


Figura 11. Rotas de transmissão confirmadas e hipotéticas de VB. A contaminação de humanos e animais pode acontecer através do contato direto com lesões de animais infectados por VACV. Estudos demonstram a eliminação de VACV nas fezes e no leite de animais infectados, sugerindo a participação do leite e das fezes na transmissão e na manutenção do vírus no ambiente. A detecção molecular e sorológica de VACV em animais sinantrópicos e silvestres sugere a participação destes no ciclo de manutenção e transmissão da VB. MATOS et al., (2018).

1.7. Parapoxvírus

O gênero *Parapoxvirus*, pertencente à família *Poxviridae*, é constituído por 5 espécies capazes de infectar vertebrados, sendo elas: *Bovine papular stomatitis virus* (BPSV), *Grey sealpox virus, Orf virus* (ORFV), *Pseudocowpox virus* (PCPV) e *Red deerpox virus* (ICTV, 2022). Os parapoxvírus (PPV) possuem um amplo espectro de hospedeiros, sendo os principais os pequenos ruminantes como ovinos, caprinos e bovinos. Entretanto, os PPV já foram detectados em infecções em camelos, renas, bois almiscarados e serau japonês. Estes vírus também já foram isolados em esquilos vermelhos e focas (BÜTTNER; RZIHA, 2002; INOSHIMA et al., 2002; TIKKANEN et al., 2004).

Os vírus BPSV, ORFV e PCPV, circulantes no Brasil, são vírus zoonóticos e são os mais associados com infecções em ovinos, caprinos e bovinos (BÜTTNER; RZIHA, 2002; FLEMING; MERCER, 2007). Eventualmente, estes vírus podem causar infecções em humanos, devido ao contato próximo com animais infectados (BOWMAN et al., 1981; MACNEIL et al., 2010). A tabela 2 mostra as doenças causadas pelas espécies zoonóticas do gênero *Parapoxvirus*.

Tabela 2. Espécies zoonóticas de parapoxvírus e as doenças associadas.

Espécies zoonóticas de PPV	**Doença associada**
Bovine papular stomatitis virus (BPSV)	Estomatite papular
Orf virus (ORFV)	Ectima contagioso
Pseudocowpox virus (PCPV)	Pseudovaríola

Os PPV podem ser diferenciados de outros gêneros da família *Poxviridae* através da visualização por microscopia eletrônica, visto que eles apresentam morfologia distinta. O genoma dos PPV possuem aproximadamente 140 kb, sendo aproximadamente 65% do genoma composto por conteúdo G+C (FLEMING; MERCER, 2007; WITTEK; KUENZLE; WYLER, 1979) e, apesar desta diferença, a organização do genoma é bem semelhante aos outros POXV, apresentando uma região central conservada e as regiões terminais são variáveis (DELHON et al., 2004; GASSMANN; WYLER; WITTEK, 1985). As regiões terminais possuem genes envolvidos na virulência e patogênese, incluindo VEGF (fator de crescimento endotelial vascular), e a vIL-10 (proteína homóloga a interleucina 10) (FLEMING et al., 1997; LYTTLE et al., 1994).

No Brasil e no mundo, a caracterização dos genomas dos PPV fica restrita ao conhecimento sobre os ORFVs, no qual mais genes já foram sequenciados e caracterizados (ABDULLAH et al., 2015; ABRAHÃO et al., 2009b; DALTON et al., 2023; DE OLIVEIRA et al., 2012; FLEMING; WISE; MERCER, 2015; MARTINS et al., 2014; MAZUR et al., 2000), quando comparado com as outras espécies do gênero, como PCPV (ABRAHÃO et al., 2010a; ALVES et al., 2016; OĞUZOĞLU et al., 2014; OHTANI et al., 2017; ZIBA et al., 2020).

1.7.1. Patogênese dos parapoxvírus

As infecções causadas pelos PPV estão restritas ao epitélio e a mucosa oral, onde normalmente os vírus entram por meio de pequenas lesões na pele e infectam queratinócitos epidérmicos em regeneração, onde acontece a replicação viral (DAMON, 2013; MCKEEVER et al., 1988). As manifestações clínicas das parapoxviroses são caracterizadas pela formação de pústulas e crostas no local da infecção, não existindo evidências suficientes de infecções sistêmicas causadas por estes vírus (revisado por FLEMING; MERCER, 2007).

Os estágios das lesões evoluem semelhantemente ao dos OPXVs, um fator que pode dificultar a diferenciação das lesões entre os dois gêneros. As lesões podem evoluir de mácula, pápula, vesícula e, por fim, crosta até a resolução da doença. Os primeiros sinais de infecção, são sinais de inchaço, vermelhidão e aparecimento de vesículas no local da inoculação viral (FLEMING; MERCER, 2007). As lesões são formadas devido à hipertrofia e proliferação de células da epiderme em conjunto com a infiltração de leucócitos (DAMON, 2013).

1.7.2. Vírus da estomatite papular bovina

A estomatite papular bovina é uma doença zoonótica, causada pelo BPSV, que acomete principalmente o gado, com manifestações clínicas na pele e nas mucosas, com lesões normalmente encontradas na cavidade oral, ao redor da boca, no focinho e ocasionalmente nos úberes (DINTER; MOREIN, 1990). A manifestação clínica da infecção por BPSV em humanos é geralmente em forma de nódulos nas mãos e na face (BOWMAN et al., 1981). As pápulas formadas nas mãos da pessoa infectada podem evoluir para lesões ulcerativas entre 4 e 7 dias, conforme relatado em um caso descrito por Sant’ana e colaboradores (2012), ilustrado na figura 12.

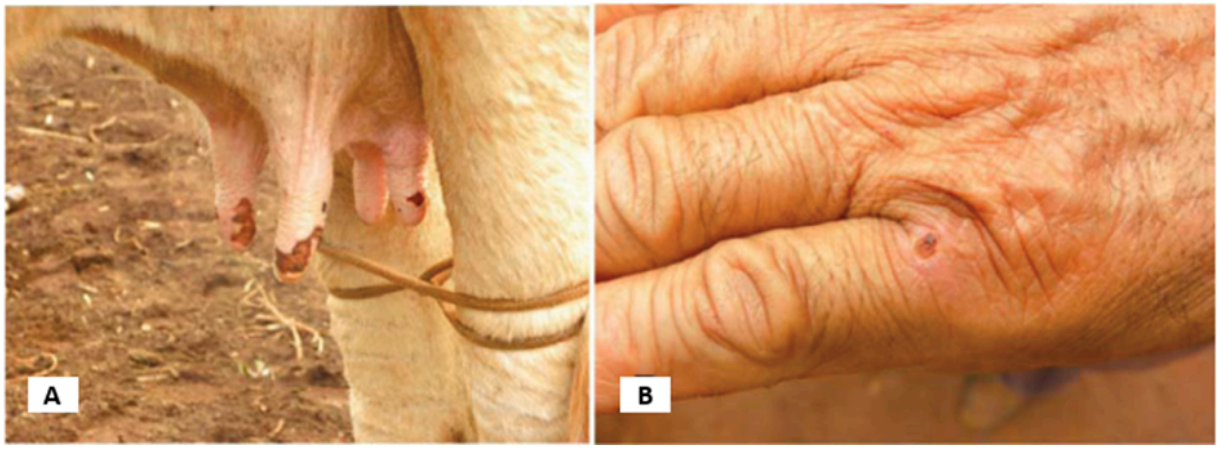


Figura 12. Lesões causadas pela infecção por BPSV. (A) Lesões escamosas e úlceras nos tetos de vaca-leiteira. (B) Lesão ulcerativa na mão de um ordenhador após 4 dias do início das manifestações clínicas. Modificado de SANT'ANA et al., 2012.

1.7.3. Orf vírus

ORFV é o agente etiológico do ectima contagioso (EC), uma dermatite exantemática que atinge animais domésticos e ruminantes, em especial, ovelhas e cabras. Em geral, a infecção por ORFV resulta em uma estomatite pápulo-erosiva, que pode afetar toda a cavidade oral do animal infectado (Fig. 13) (FLEMING; MERCER, 2007; FLEMING; WISE; MERCER, 2015; MCELROY; BASSETT, 2007).

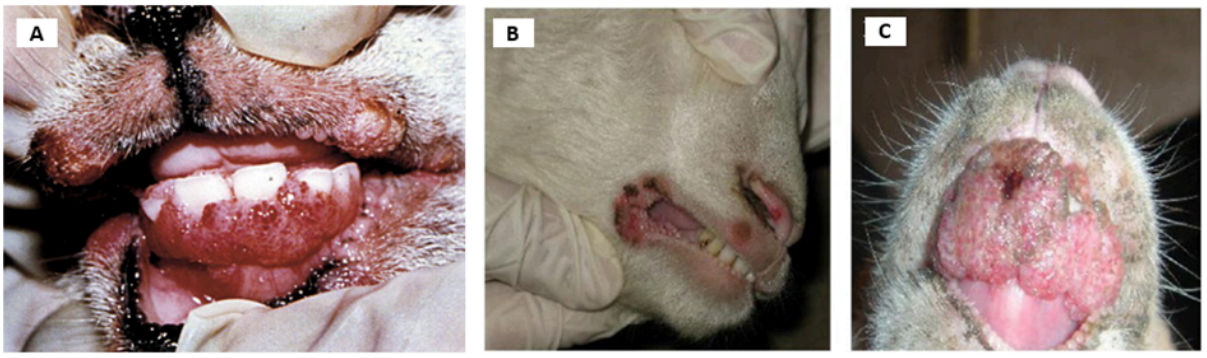


Figura 13. Lesões causadas pela infecção por ORFV. (A) Pápulas verrugosas na gengiva de um cordeiro após 10 dias de infecção por orf vírus. (B e C) Lesões nodulares e proliferativas nos lábios de ovinos. Adaptado de FLEMING; WISE; MERCER, 2015 e MCELROY; BASSETT, 2007.

1.7.4. Pseudocowpox vírus

A pseudovaríola possui o PCPV como agente etiológico e, assim como, o BPSV acomete principalmente o gado leiteiro, afetando os úberes e os tetos de

vacas-leiteiras e a cavidade oral de bezerros (Fig. 14). Infecções de PCPV em humanos causam uma doença ocupacional, denominada “nódulo do ordenhador”, em ordenhadores ou trabalhadores em contato direto com animais infectados (ABRAHÃO et al., 2010a; ALONSO, 2018; FLEMING; MERCER, 2007; MACNEIL et al., 2010).

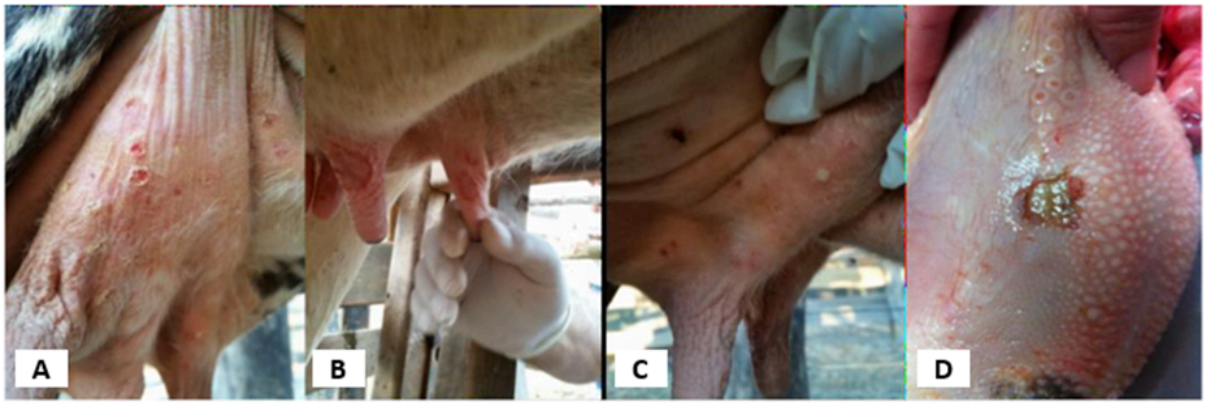


Figura 14. Lesões causadas pela infecção por PCPV. (A e B) Lesões ulcerativas e crostas na região dos úberes de vacas. (C) Pústulas nos tetos das vacas. (D) Úlceras localizadas na língua de vacas. Adaptado de ALONSO, 2018.

1.7.5. Circulação de parapoxvírus no Brasil

A detecção de PPV no Brasil vem se intensificando nos últimos anos, onde estes vírus vem sendo associados com lesões papulovesiculares e doenças vesiculares em bovinos no Pará, Goiás, Distrito Federal, Rondônia, Rio Grande do Sul e Mato Grosso (ALONSO, 2018, p. 201; ALVES et al., 2016; CARGNELUTTI et al., 2012, 2014; SANT’ANA et al., 2012; SILVA et al., 2016) e em humanos no estado do Rio de Janeiro (SCHATZMAYR et al., 2000).

Os PPV também já foram detectados e isolados de ovinos e caprinos oriundos de diversas regiões do país, nos estados do Mato Grosso, Paraíba, Pernambuco, Minas Gerais e Rio Grande do Sul (ABRAHÃO et al., 2009b; MAZUR et al., 2000; NÓBREGA JR et al., 2008). Estes dados mostram a circulação dos PPV em todas as regiões do Brasil.

1.8. Coinfecção entre ortopoxvírus e parapoxvírus

Coinfecções entre gêneros OPXV e PPV já foram relatadas, sem distinção entre espécies de ambos os gêneros, mas também já foram demonstrados casos de coinfecção entre VACV e PCPV em humanos e gado bovino, assim como a

coinfecção entre VACV e um PPV semelhante ao ORFV no gado leiteiro (Fig.14) (ABRAHÃO et al., 2010a; REHFELD et al., 2018; SANT'ANA et al., 2013).

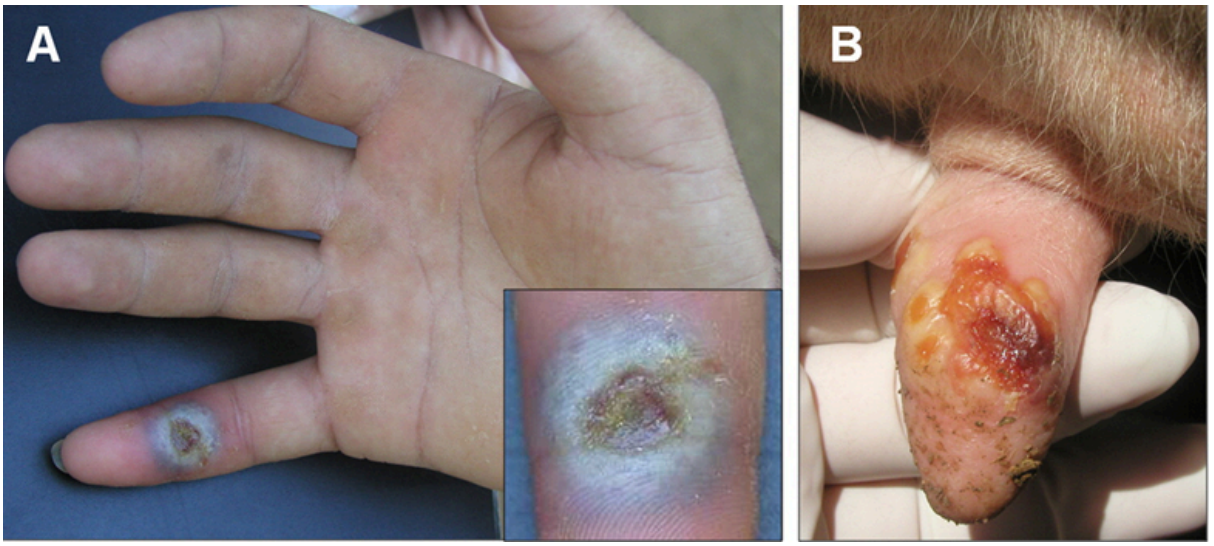


Figura 15. Lesões provocadas pela coinfecção de VACV e PCPV. (A) Lesão exantemática pustular ulcerativa no dedo de um ordenhador que teve contato com uma vaca coinfectada. (B) Úlcera central rodeada por pústulas em tetos de vacas causadas pela coinfecção dos dois vírus. (ABRAHÃO et al., 2010a).

Os padrões de transmissão entre OPXV e PPV, os hospedeiros compartilhados, fatores associados com os surtos de doenças exantemáticas como a ordenha manual, condições sanitárias precárias e o movimento de animais entre fazendas podem estar relacionados com a coinfecção entre OPXV e PPV (ABRAHÃO et al., 2010a; SANT'ANA et al., 2013).

1.9. Suipoxvírus

O gênero *Suipoxvirus* (SPV) também pertence à família *Poxviridae*, sendo a espécie *Swinepox virus* (SWPV) a única representante do gênero. Atualmente, os suínos são os únicos hospedeiros conhecidos dos SWPV (DELHON et al., 2007). A varíola suína, doença causada pelo SWPV, acomete suínos do mundo todo e está associada com condições sanitárias precárias, em que a transmissão pode acontecer por meio do contato direto com as lesões ou pela transmissão mecânica através do piolho de porco da espécie *Haematopinus suis* e de mosca-doméstica (*Musca domestica*) (AFONSO et al., 2002; DAMON, 2013; KAISER et al., 2021).



Figura 16. Lesões causadas pela infecção por SWPV em suínos. (A) Presença de vesículas e pápulas no pescoço e membros anteriores de suínos. (B) Lesões e crostas presentes na orelha de suínos. (OLINDA et al., 2016).

Casos de SWPV são reportados principalmente na Europa e na Ásia, mas casos da doença também já foram notificados na Austrália (JUBB et al., 1992). Durante os anos de 2015 a 2017, alguns surtos da doença em suínos de 6 meses a um ano foram registrados em cidades do estado de Assam, na Índia, onde foi possível isolar o vírus das três regiões investigadas (MECH et al., 2018). Outro surto, também na Índia, foi registrado em suínos localizados em fazendas no estado de Haryana nos anos de 2015 e 2016 (KUMAR et al., 2023). Em 2022, um javali macho, ainda jovem, veio a óbito devido à infecção pelo vírus na Itália. O diagnóstico foi realizado por histopatologia e análises moleculares (PCR e sequenciamento) (GUARDONE et al., 2023). Outro país europeu com registros da circulação do vírus é a Alemanha, onde, entre os anos de 2019 e 2020, foi possível isolar o vírus a partir de amostras coletadas em um surto em uma fazenda de criação de suínos e a partir de amostras de javalis (KAISER et al., 2021). Na Rússia, pesquisadores conseguiram isolar o vírus de amostras coletadas em um surto que ocorreu em um complexo de criação de suínos no ano de 2013 (KOLTSOV et al., 2023). Em 2022, foi reportado um caso de co-circulaçao de SWPV e MPXV em uma área endêmica para mpox na RDC (KALONJI et al., 2024).

Em relação ao suipoxvírus, o genoma possui em torno de 148 a 150 kb, apresentando um conteúdo G+C de 27,5%, já a composição A+T (72%) é distribuída uniformemente pelo genoma (MASSUNG; MOYER, 1991). De forma geral, a organização do genoma de SPV é bem semelhante a dos outros POXVs, com a região central conservada, regiões terminais invertidas, contendo genes

relacionados com a patogênese e a presença de ITRs. Dentre os cordopoxvírus, os SWPV são mais relacionados com os gêneros *Capripoxvirus*, *Leporipoxvirus* e *Yatapoxvirus* (AFONSO et al., 2002).

A caracterização do genoma do SWPV é pouco conhecida, ao comparar com os outros gêneros pertencentes à subfamília *Chordopoxvirinae*. Existem caracterizações dos vírus circulantes na Itália, Alemanha, Rússia e Índia (GUARDONE et al., 2023; KAISER et al., 2021; KOLTSOV et al., 2023; KUMAR et al., 2023; MECH et al., 2018). A anotação do primeiro genoma completo de SWPV (de uma linhagem eurasiática), proveniente de uma amostra indiana de SWPV, sugere a divergência genética das linhagens americanas e eurasiáticas, e apontam a introdução do SWPV no continente americano depois do século XVI, com a introdução de suínos no continente pelos europeus (AASDEV et al., 2021). Em relação às linhagens circulantes no Brasil, estudos demonstram 100% de identidade com a linhagem americana do Nebraska (MEDAGLIA et al., 2011; OLINDA et al., 2016).

1.9.1. Patogênese de suipoxvírus

Os animais infectados por SWPV apresentam uma doença com manifestações clínicas semelhantes a outras poxviroses, com duração de cerca de 3 semanas. A porta de entrada para os SWPV nos hospedeiros se dá por meio de abrasão na pele, onde o vírus se replica em queratinócitos epidérmico (DELHON et al., 2007). Após a infecção, os suínos apresentam febre baixa, com o típico desenvolvimento das lesões causadas pelos POXV, com a formação de pápulas que progridem para vesículas e depois pústulas, com formação de crostas após 7 dias. Em geral, os animais jovens são os mais acometidos pela doença, apresentando lesões espalhadas pelo corpo, especialmente nos flancos, na região abdominal, pernas e orelhas (DAMON, 2013; DELHON et al., 2007).

1.9.2. Circulação de suipoxvírus no Brasil

Infecções causadas por SWPV em suínos já foram reportadas no Brasil. Os primeiros surtos associados com o SWPV foram registrados no estado de São Paulo nas décadas de 1970 e 1980 e em 2001 no estado do Tocantins (BERSANO et al., 2003). Em 2010 e 2011 um surto de SWPV foi notificado na cidade de Holambra,

São Paulo, onde aproximadamente 850 suínos de 3 fazendas foram afetados pela doença, apresentando lesões generalizadas em todo o corpo, febre e perda de peso (MEDAGLIA et al., 2011). Surtos de SWPV também já foram descritos no Nordeste do país, no estado do Rio Grande do Norte, onde rebanhos de suínos domésticos de fazendas de dois municípios foram acometidos pela doença entre os anos de 2008 e 2014 (OLINDA et al., 2016).

1.10. Circulação de poxvírus na Amazônia brasileira

Após o isolamento do vírus BeAn58058 da floresta de Utinga no Pará (FONSECA et al., 1998; MARQUES et al., 2001), alguns surtos de VB foram registrados na região. Em 2010, na cidade de Bom Jesus do Tocantins, no estado do Pará, foi reportado um surto de VB, onde gado leiteiro e ordenhadores do município foram afetados (ASSIS et al., 2013). No estudo conduzido por Assis e colaboradores (2013), foi observado a soroprevalência de anticorpos anti-OPXV em 90% dos bovinos (40 animais) e 100% dos trabalhadores (três ordenhadores). Dentre as amostras, apenas uma foi possível realizar a detecção molecular do vírus, da qual um VACV pertencente ao grupo I foi isolado e nomeado Pará vírus (PARV).

A presença de anticorpos contra OPXV já foi detectada no estado do Acre (MOTA et al., 2010). Em 2010, um estudo realizado por Mota e colaboradores (2010) mostrou a soroprevalência de 27,9% na comunidade rural de Ramal do Granada, localizada no município acreano de Acrelândia. O estudo utilizou amostras de soro da população coletadas em 2004 durante um surto de arboviroses e malária na região.

Em um estudo feito por Abrahão e colaboradores (2010), utilizando amostras de 344 mamíferos capturados durante um programa de resgate de fauna realizado entre 2001 e 2002 nas cidades de Lajeado e Ipueiras no Tocantins, uma alta soroprevalência entre primatas não humanos foi notada. No estudo, 25,3% dos soros de *Cebus apella* e 48,8% dos soros de *Allouata caraya* apresentam anticorpos anti-OPXV. Dentre os macacos, 11 animais da espécie *C. apella* e 7 da espécie *A. caraya* foram positivos para ensaios moleculares, mostrando a circulação do vírus em primatas não-humanos (ABRAHÃO et al., 2010c). Segundo Abrahão et al. (2010), os animais foram capturados em áreas silvestres e não possuíam contato com o gado leiteiro ou com humanos.

Entre os anos de 2008 e 2010, um estudo conduzido por Quixabeira-Santos et al. (2011) investigou surtos de doenças relacionadas a POXV em 56 fazendas leiteiras no estado do Mato Grosso e de Rondônia, localizadas no bioma Amazônia. Das 52 amostras de gado bovino coletadas, 35 foram positivas para VACV, e análises moleculares mostraram que o CTGV foi o responsável pelos surtos de VB nas fazendas (QUIXABEIRA-SANTOS et al., 2011). Ademais, apesar dos surtos nas fazendas do Mato Grosso não possuírem um link com os surtos nas fazendas de Rondônia, análises realizadas no estudo associam o estabelecimento do vírus pelo movimento animal e de trabalhadores rurais pelas rodovias que adentram a região amazônica (QUIXABEIRA-SANTOS et al., 2011).

A investigação de anticorpos anti-OPXV em búfalos da Ilha de Marajó, no estado do Pará, demonstrou a presença de anticorpos neutralizantes em 70% dos animais analisados (FRANCO-LUIZ et al., 2016a). Além disso, no trabalho de Franco-Luiz e colaboradores (2016), dos 150 animais testados, 32 foram positivos para os ensaios de PCR para o gene C11R, nas quais foram possíveis a detecção do genoma viral em amostras de soro de 21% dos búfalos.

Casos de infecção por PPV também já foram registrados na região amazônica. Em 2011, casos de doenças vesiculares foram notificadas nos gados leiteiros de fazendas dos estados do Tocantins e do Maranhão, onde dois animais foram positivos para PCPV (ALVES et al., 2016).

Em 2012, durante uma vistoria em fazendas localizadas no município de Nova Brasilândia, em Rondônia, foram relatados casos de animais com doenças vesiculares. Amostras dos animais foram coletadas e quatro bovinos tiveram resultado do diagnóstico molecular positivo para PPV, sendo 3 animais positivos para PCPV e um para BPSV (CARGNELUTTI et al., 2014).

Também em 2012, foram reportados dois casos de ORFV em cabras em uma fazenda localizada no nordeste do Pará, no qual um dos animais veio a óbito devido ao ectima contagioso (DE OLIVEIRA et al., 2012).

Casos de múltiplas infecções por PPV e outras doenças vesiculares em gado e búfalos foram relatados na região amazônica em 2016. No estudo de Laguardia-Nascimento e colaboradores (2016), foi relatado o primeiro caso de búfalo infectado por PCPV na região, no estado do Amazonas. Além disso, foram

detectados bovinos com infecções por BPSV e por PCPV nos estados de Roraima e Mato Grosso (LAGUARDIA-NASCIMENTO et al., 2016).

Em relação à circulação de swinepoxvírus nos estados que pertencem a Amazônia brasileira, o único caso relatado na literatura foi no Tocantins, onde animais de 5 propriedades foram acometidos pelo vírus em 2001. Os animais infectados apresentaram febre, prostração, emagrecimento e lesões espalhadas pela cabeça e pelo abdômen (BERSANO et al., 2003).

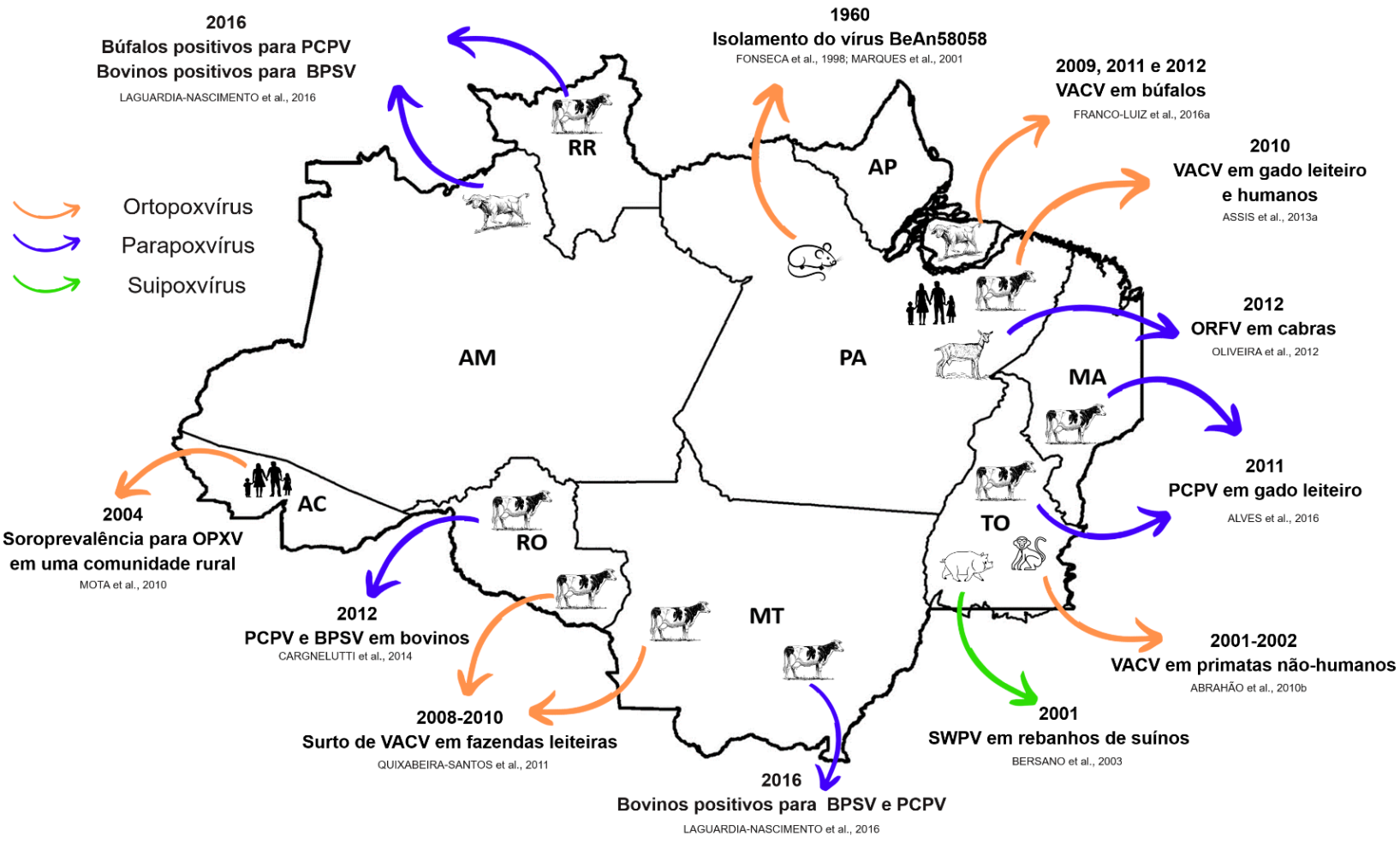


Figura 17. POXV na Amazônia brasileira. O mapa mostra a circulação de POXV na Amazônia brasileira até o ano de 2021. As setas laranjas indicam a circulação de ortopoxvírus, as azuis dos parapoxvírus e a verde dos suipoxvírus. Fonte: Autor.

1.11. Diagnóstico das poxviroses no Brasil

O diagnóstico das poxviroses no Brasil pode ser realizado por estratégias moleculares e/ou sorológicas e pelo isolamento viral a partir de amostras biológicas de animais e pessoas com suspeita de doenças vesiculares.

O diagnóstico molecular se baseia principalmente na amplificação de genes pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e PCR em tempo real. Para a investigação de OPXV, com exceção do varíola vírus, são investigados os genes E9L, que codifica DNA polimerase viral e, especificamente para o VACV são utilizados os genes A56R (hemaglutinina viral) e o gene C11R (fator de crescimento viral) (KROON et al., 2016; LI et al., 2006; TRINDADE et al., 2008). Com a introdução do MPXV no país, o diagnóstico molecular também é realizado por PCR em tempo real para os genes C3L (proteína de ligação ao complemento) e G2R (receptor de TNF), estes dois genes permitem a diferenciação dos clados I (C3L) e II (G2R) (LI et al., 2010). Em relação ao diagnóstico das parapoxviroses e da varíola suína, no estado de Minas Gerais, é realizado no Laboratório Federal de Defesa Agropecuária de Minas Gerais, referência no diagnóstico de doenças vesiculares, de onde vem sendo desenvolvidas estratégias de diagnóstico molecular, especialmente para o PCPV (FONSECA JÚNIOR et al., 2022; LOPES et al., 2021). Para o diagnóstico molecular dos PPV são utilizados iniciadores para a investigação do gene J6R e para o swinepoxvírus a região C20P-C1L (SOUZA *et al*., 2019; ZHAO et al., 2013).

O diagnóstico sorológico de OPXV através da utilização de testes de soroneutralização por redução de placas (PRNT), possibilita detectar a presença de anticorpos neutralizantes anti-OPXVs (NEWMAN et al., 2003; KOON et al., 2016). No Brasil, o diagnóstico sorológico para PPV e para SWPV não é realizado.

Além disso, o diagnóstico dos POXV pode ser realizado pelo isolamento de partículas virais utilizando amostras biológicas como as lesões e crostas de animais infectados. O isolamento para os OPXV pode ser realizado utilizando as células Vero, culturas primárias de embriões de galinha e em membrana corialantoide de galinha (KROON et al., 2016).

2. JUSTIFICATIVA

O aumento de viroses emergentes nas últimas décadas está relacionado com mudanças no comportamento da espécie humana, que levaram a alterações no uso da terra, alterações demográficas, climáticas e a globalização. A invasão de habitats silvestres promovida pela expansão do setor agropecuário provoca transformações nas relações ecológicas antes estabelecidas, aumentando o contato dos animais silvestres com animais domésticos. Esta nova dinâmica firmada favorece a disseminação de vírus zoonóticos provenientes da vida selvagem para os animais domésticos e, consequentemente, para os seres humanos, gerando novas cadeias de transmissão para viroses.

A notificação de surtos associados aos vírus VACV, PCPV, ORFV, BPSV e SWPV no Brasil está associada com a presença de gado leiteiro, rebanhos de ovinos e suínos, onde a transmissão destes vírus estão relacionadas com a ordenha manual, condições sanitárias precárias e a movimentação de animais infectados pelas fazendas. Neste sentido, no Brasil, as poxviroses são doenças infecciosas emergentes de preocupação para a saúde humana e veterinária, causando doenças ocupacionais, que prejudicam a saúde do animal e do trabalhador, impactando nas atividades pecuárias, como a produção de leite e laticínios, afetando a economia de cidades localizadas em bacias leiteiras.

A detecção de casos de OPXV e PPV em diferentes estados e hospedeiros na Amazônia brasileira mostra a circulação de ambos os gêneros nessa região e reforçam a importância de trabalhos de prospecção, caracterização e epidemiologia deste vírus neste bioma que vem sofrendo intensas transformações ao longo das últimas décadas. Além disso, apesar de estudos demonstrando o acometimento de rebanhos suínos por SWPV, existem poucos trabalhos caracterizando surtos de varíola suína no Brasil, tornando necessário a investigação da circulação deste vírus no território nacional.

O atual projeto visa prospectar e caracterizar OPXV, PPV e SPV em animais silvestres e domésticos da Amazônia brasileira para expandir as pesquisas referentes aos POXV no Brasil, sendo importante para ampliar o conhecimento sobre a biodiversidade, cadeia de transmissão e hospedeiros destes vírus, além de proporcionar um melhor entendimento sobre o ciclo de manutenção da VB, das

parapoxviroses e da varíola suína no Brasil. Tudo isso em conjunto permite subsidiar ações futuras para vigilância destes vírus no país.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

- Avaliar a circulação de POXV em animais de propriedades rurais, localizadas na Amazônia brasileira.

3.2. Objetivos específicos

- Investigar a presença de DNA de ortopoxvírus, parapoxvirus e suipoxvírus em amostras biológicas de animais provenientes da Amazônia brasileira;
- Isolar POXV a partir de amostras biológicas que foram positivas nos testes moleculares;
- Caracterizar as amostras positivas nos testes moleculares para POXV por sequenciamento;
- Investigar a presença de anticorpos neutralizantes anti-ortopoxvírus em amostras de soro de animais provenientes da Amazônia brasileira.

4. METODOLOGIA

4.1. Comitê de Ética

O uso das amostras nas metodologias propostas neste projeto foram aprovadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG (CEUA/UFMG) no protocolo 348/2023.

4.2. Área de estudo

A prospecção de POXV foi realizada em amostras provenientes de fazendas localizadas no estado do Pará inseridas em área correspondente ao bioma Amazônico. O estado do Pará compreende um território de 1.245.870 km², com uma população de 8,7 milhões de pessoas, cuja economia se baseia, principalmente, em atividades agropecuárias e no extrativismo mineral e vegetal (IBGE, 2022). Os municípios amostrados pertencem ao do nordeste do estado do Pará, como Cachoeira do Arari (Ilha do Marajó), Santo Antônio do Tauá, Castanhal e Nova Timboteua e municípios do sudeste do estado, como as cidades de Bom Jesus do Tocantins e Eldorado do Carajás (Fig. 18).

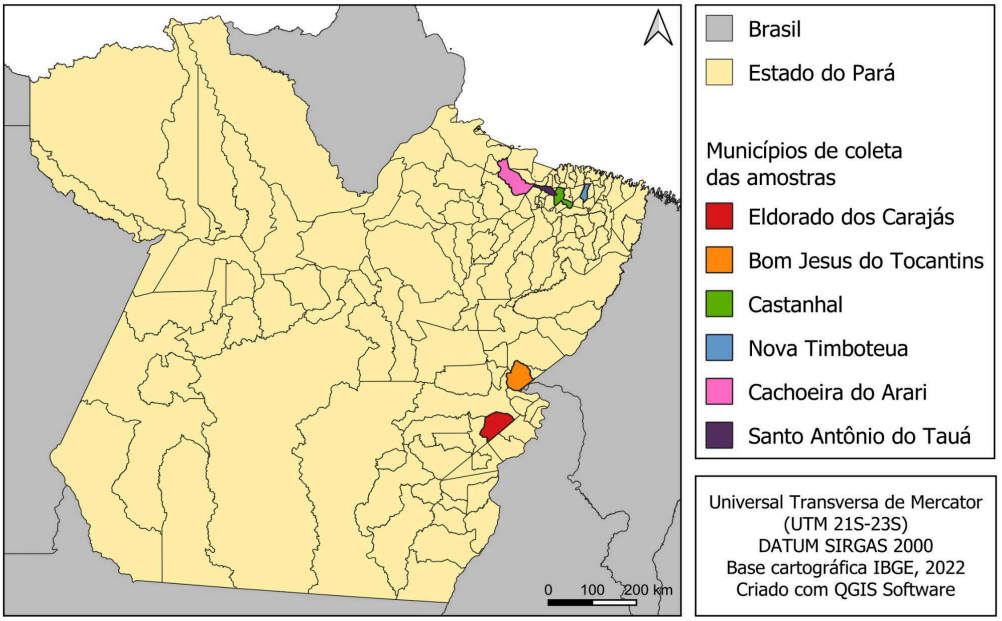


Figura 18. Municípios onde foram realizadas as coletas de amostras. Os municípios foram Bom Jesus do Tocantins (laranja), Cachoeira do Arari (rosa), Nova Timboteua (azul), Santo Antônio do Tauá (roxo), Castanhal (verde) e Eldorado do Carajás (vermelho). Fonte: Autor. Mapa construído com dados do IBGE, no software QGIS, versão 3.24.3.

4.3. Coleção biológica

As amostras analisadas neste projeto foram coletadas nos anos de 2021 e 2022 e são provenientes de animais domésticos e capivaras do estado do Pará. O número amostral é de 309 espécimes biológicos de 288 indivíduos, sendo 20 amostras de crosta, 176 de soro, 28 de fezes e 85 de sangue. A coleção está descrita na tabela 3.

Tabela 3. Banco de amostras do estado do Pará.

Ano	Município	Animal	Tipo de amostra	n amostral
2021	Bom Jesus do Tocantins	Bovinos	Crosta	5
	Castanhal	Ovinos	Crosta	5
	Eldorado do Carajás	Suínos	Crosta	1
			Sangue	4
		Bubalinos	Sangue	32
		Capivaras	Sangue	4
		Equinos	Sangue	39
			Total:	**90**
2022	Eldorado do Carajás	Bovinos	Soro	7
	Santo Antônio do Tauá	Ovinos	Soro	21
		Caprinos	Crosta	3
			Soro	8
		Suínos	Soro	51
	Cachoeira do Arari	Capivaras	Soro	15
			Fezes	10
		Bubalinos	Soro	45
		Equinos	Soro	25
		Canino	Soro	4
	Nova Timboteua	Bubalinos	Crosta	6
			Fezes	24
			Total:	**219**

As amostras foram enviadas pelo Prof. Dr. José Diomedes Barbosa Neto da Universidade Federal do Pará. Todas as amostras deste trabalho foram coletadas de fazendas com suspeita de surto de doenças vesiculares. Ou seja, os veterinários da Universidade Federal do Pará prestavam assistência para essas fazendas e coletavam o material dos animais com sinais clínicos e de alguns animais sem sinais

clínicos para realizar o diagnóstico. Parte dessas amostras foram encaminhadas para o Laboratório de Vírus, onde foi realizado o diagnóstico sorológico e molecular. Para a coleta de sangue, de crostas e para realização de biópsia, os animais foram contidos fisicamente por meio de troncos de contenção específicos para a espécie. As amostras de sangue foram coletadas por punção venosa da jugular com utilização de sistema de coleta de sangue a vácuo, em tubos estéreis sem e com anticoagulante EDTA (Ácido Etilenodiamino Tetra-acético) para obtenção de soro e sangue total, respectivamente. As crostas de pele foram coletadas com auxílio de uma pinça anatômica e armazenadas em tubos estéreis, identificadas e devidamente refrigeradas.

4.4. Abordagem molecular

4.4.1. Extração de DNA

Para realizar a prospecção molecular para OPXV, PPV e SPV as amostras de crosta, sangue e fezes foram submetidas a extração de DNA utilizando o kit *High Pure Viral Nucleic Acid* (Roche), seguindo as orientações do fabricante.

As amostras de crosta e de fezes foram pesadas, sendo 20 mg para crostas, 30 mg para fezes e diluídas em razão de 1:10 em PBS 1X. Em seguida, as amostras de crosta e de fezes foram maceradas utilizando o *bead beater homogenizer* (BioSpec). Depois da maceração, as amostras foram submetidas à extração, onde foram adicionadas a uma *working solution*, contendo *binding buffer*, poly A e proteínase K. Em seguida, a solução contendo as amostras foram adicionadas em colunas e centrifugadas. Posteriormente, o *inhibitor removal buffer* foi adicionado, seguido de mais uma centrifugação. As colunas foram lavadas com *wash buffer*, e as amostras foram eluídas com o *elution buffer.* Para o sangue e soro, foram utilizados 200 µL para realizar a extração. O DNA extraído foi imediatamente armazenado em freezer a -20 °C até o momento da dosagem e utilização como *template* na Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR).

As amostras de soro foram diluídas na proporção de 1:10 em PBS 1X e submetidas diretamente à PCR (Abrahão, et al., 2010).

4.4.2. Quantificação e análise de qualidade da extração do DNA

A dosagem do DNA extraído foi realizada utilizando um espectrofotômetro, o *NanoDrop*, de onde foram coletados dados sobre a concentração em ng/µL e sobre as taxas de absorção 260/280 e 260/230. A taxa de absorção 260/280 é uma forma de avaliação de contaminação por proteínas, o ideal é que ela seja maior que 1,8, indicando um DNA puro. Já a taxa de absorção 230/260, quando menor do que 1,8, indica contaminação por compostos orgânicos (DESJARDINS; CONKLIN, 2010; WILFINGER; MACKEY; CHOMCZYNSKI, 1997).

4.4.3. Controle endógeno de extração

Para garantir a qualidade do processo de extração de DNA das amostras utilizadas no projeto, foram realizadas qPCRs para o gene β-actina, um gene constitutivo e conservado em organismos eucariotos. Para as capivaras foi utilizado o gene da β-actina murina como controle de extração, e o gene da β-actina bovina foi utilizado para as demais amostras. Nas reações de β-actina murina foram utilizados os iniciadores 5'-AAATCGTGCGTGACATCAAAGA-3' e 5'-GCCATCTCCTGCTCGAAGTC-3' e para as reações de β-actina bovina foram utilizados os iniciadores 5'-CATTCACGAAACTACCTTCAATTCC-3' e 5'-GATGTTCTTGATCTTCATTGTGCTGG-3', com as seguintes quantidades de reagentes: 5 µL de SYBR Green PCR Master Mix, 0,5 µL de cada iniciador, 10 pmol, 2 µL de amostra e 2 µL de água de livre de nucleasse. As condições do ciclo das reações foram de 94 °C por 2 minutos para desnaturação inicial, 40 ciclos de desnaturação a 94 °C por 15 segundos, 60 °C por um minuto para o pareamento dos iniciadores extensão, seguidos de curva de *melt* com 95 °C por 15 segundos, 60 °C por 1 minuto e 95 °C por 1 minuto, sendo que a cada 2 segundos, aumenta 1 °C de 60 °C para 95 °C (ALVES, 2010).

4.4.4. Detecção molecular por PCR em tempo real

Neste projeto, as amostras de todos os animais foram testadas para OPXV (crosta, fezes, soro e sangue por qPCR e soro por PRNT), entretanto, o SWPV foi investigado somente em amostras de suínos e capivaras e os PPV foram investigados nas amostras de crosta, fezes, e sangue de bovinos, ovinos, caprinos, equídeos e bubalinos.

Para realizar as qPCR para OPXV das amostras de soro, estas foram diluídas em uma proporção de 1:10 em solução salina (PBS) e, em seguida, foram submetidas a qPCR somente para o gene C11R (VGF).

Além disso, os experimentos de detecção de OPXVs foram realizados no Laboratório de Vírus, enquanto os experimentos para a investigação de SWPV e PPV foram realizados no Laboratório Federal de Defesa Agropecuária de Minas Gerais (LFDA/MG), em parceria com a equipe coordenado pelo Dr. Antônio Fonseca Júnior.

As amostras foram testadas em duplicatas e consideradas positivas quando apresentaram amplificação com um Cq (Ciclo de quantificação) menor que 38 e se a curva de dissociação (curva de *melting*) ou temperatura de *melting* foi igual ao do controle positivo com ±1°C de diferença. No caso das amostras positivas, uma nova extração de DNA foi realizada e a qPCR foi repetida para confirmar o resultado.

O DNA extraído do VACV amostra *Western Reserve* (VACV-WR) foi utilizado como controle positivo para as qPCRs de OPXV. Já para as reações de PPV e SWPV, foram utilizados plasmídeos produzidos a partir de quimeras dos amplicons gerados para os genes específicos.

4.4.5. Detecção molecular de OPXV por qPCR

Os ensaios iniciais para triar as amostras foram realizados utilizando o gene E9L que codifica a DNA polimerase viral e permite a identificação de infecções causadas por OPXV (LI et al., 2006). Para as qPCRs de E9L foi utilizado o kit GoTaq® Probe qPCR Master Mix (PROMEGA).

Para cada reação foi utilizado PCR Master Mix; iniciadores *foward* e *reverse* (10μM); sonda (10μM); 2 μL de DNA e água livre de nucleases q.s.p. 10,0 mL. Em todas as reações de qPCR as amostras foram testadas em duplicata e a cada placa foram incluídos controle positivo e controle negativo (água). As reações foram realizadas em aparelho StepOne e QuantStudio (Applied biossystems™), com as seguintes condições de ciclo: um ciclo de 95 °C, por 10 minutos; seguido por 40 ciclos de 95 °C por 10 segundos para dissociação das fitas e 60 °C por 40 segundos para o pareamento dos iniciadores e da sonda e para a extensão (LI et al. 2006).

Ainda, visando utilizar uma estratégia de detecção multialvos, após a triagem inicial das amostras para o gene E9L, as amostras foram submetidas a um ensaio de qPCR para detecção do gene C11R que codifica o fator de crescimento viral (VGF) e para o gene A56R que codifica a hemaglutinina (HA). O gene A56R é um marcador molecular que possibilita a diferenciação do VACV-Br em grupo 1 e grupo 2. Neste estudo foi utilizada uma combinação de três iniciadores para detecção do A56R como descrito por Trindade *et al.* (2008). Os iniciadores para HA genérico (HA-gen *Foward* e HA-gen *Reverse*) permitem amplificar todos os VACV, sem distinção de grupo, inclusive amostras vacinais e outros OPXV. Entretanto, é possível diferenciar os grupos de VACV-Br em grupo 1 ou grupo 2 com a utilização dos iniciadores HA-BVV *Foward* e HA-BVV-nDEL *Foward*, cada um combinado com o HA-gen *Reverse,* sendo o primeiro capaz de amplificar todos os VACVs brasileiros, com exceção dos vacinais, e o segundo detecta somente os VACV-Br sem deleção. Por isso, se uma amostra demonstrar amplificação somente para o HA-BVV ela é considerada do grupo I, mas se amplificar para o BVV e para o BVV-ndel é considerada do grupo II (TRINDADE et al., 2008).

Para as reações de amplificação de C11R e A56R foi utilizado o kit SYBR® Green. Para cada reação de amplificação dos genes C11R e A56R foi utilizado SYBR Green PCR Master Mix; iniciadores *foward* e *reverse* (10μM); DNA das amostras e água livre de nucleases q.s.p. 10 μL.

Assim como para as reações de E9L, as para os genes C11R e A56R também foram realizadas em aparelhos StepOne e QuantStudio (Applied biossystems™), com as seguintes condições: um ciclo de 95 °C, por 10 minutos; seguido por 40 ciclos de 95 °C por 10 segundos para a desnaturação e 58 °C por 40 segundos para o pareamento dos iniciadores e para a extensão. Para a curva de *melt*, a temperatura inicial é de 95 °C por 15 segundos, abaixando para 58 °C por 15 segundos. A cada 2 segundos, aumenta 1 °C de 60 °C para 95 °C (KROON et al., 2016).

Tabela 4. Iniciadores e sonda para detecção de ortopoxvírus por qPCR.

Alvos		Sequências	Fragmento (pb)
E9L	Primer forward	5′-TCAACTGAAAAGGCCATCTATGA-3′	100
	Primer reverse	5′-GAGTATAGAGCACTATTTCTAAATCCCA-3′	
	Sonda	5′TET-CCATGCAATATACGTACAAGATAGTAGCCAAC-QSY73′	
C11R	Primer forward	5′-CGCTACAACAGATATTCCAGCTATCAG-3′	80
	Primer reverse	5′-AGCGTGGATACAGTCACCGTGTAA-3′	
A56R	HA-generic F	5’-CATCATCTGGAATTGTCACTACTAAA-3’	166-184
	HA-generic R	5’-ACGGCCGACAATATAATTAATGC-3’	
	HA-BVV F	5’-ACCGATGATGCGGATCTTTA-3’	
	HA BVV-nDEL F	5’-GCGGATCTTTATGATACGTACAATG-3’	

(KROON et al., 2016; LI et al., 2006; TRINDADE et al., 2008a)

4.4.6. Detecção molecular de parapoxvírus por qPCR

Para realizar o diagnóstico molecular de ORFV e BPSV as amostras foram submetidas à qPCR em tempo real. Os ensaios iniciais para triar as amostras foram realizados utilizando o gene J6R que codifica a RNA polimerase viral e permite a identificação de infecções causadas por PPV (ZHAO et al., 2013). Já para a detecção de PCPV, foi utilizada uma reação de qPCR multiplex, contendo um conjunto de 3 pares de iniciadores e as respectivas sondas, descritos da tabela 6 (LOPES et al., 2021).

Para cada reação foram utilizados 1X PCR Master Mix GoTaq Probe (Promega); iniciadores *foward* e *reverse* (10μM); sonda TaqMan (10μM); água livre de nucleases q.s.p. 25 μL e o DNA das amostras. As condições do ciclo foram: um ciclo de 95 °C, por 2 minutos; seguido por 45 ciclos de 95 °C por 10 segundos para dissociação das fitas, 60 °C por 1 minuto para o pareamento dos iniciadores, da sonda e para a extensão.

Tabela 5. Iniciadores e sonda para detecção de parapoxvírus por qPCR.

Alvos		Sequências	Fragmento (pb)
PPV_J6R	Primer forward	5′-CGCGGTCTGGTCCTTG-3′	93
	Primer reverse	5′-CAGCATCAACCTCTCCTACATCA-3′	
	Sonda	5-′FAM-CCACGAAGCTGCGCAGCAT-BHQ1-3′	
ORF_J6R	Primer forward	5'-GAGTTCGAGGAGATGATCTTGA-3'	90
	Primer reverse	5'-GCCGAGGAGCAGGTCA-3'	
	Sonda	5'-FAM-CTCGATCACGGCGCGCT-BHQ1-3'	
BPSV_J6R	Primer forward	5'-GAGATGATCTTGATGTTGTCGTACT-3'	99
	Primer reverse	5'-TGGGCATGATCGTGAAGTAC-3'	
	Sonda	5'-FAM-ATCATCGCGCGCTGGATCAC-BHQ1-3'	
PCPV.ORF80	Primer forward	5'-GATGGTATCCTTGGTGCTAGATC-3'	150
	Primer reverse	5'-AGACCCAGTTTGTACCACAATC-3'	
	Sonda	5'-HEX-CGCACGCGCTTGCTGGT-IowaBlack-3'	
PCPV.ORF029	Primer forward	5'-AGGCCATTCCGTAGTTGATG-3'	79
	Primer reverse	5'-TACAGCGTGCAGTTCAACAC-3'	
	Sonda	5'-FAM-AGCTCGTCGTCCAGCGTGACGTAGT-IowaBlack-3'	
PCPV.ORF80	Primer forward	5'-AGTTCGACATCAGCATGGAG-3'	135
	Primer reverse	5'-GCGTCTTGTCGAAGTTGTCC-3'	
	Sonda	5'-FAM-TACCTGATCCTGAACTCGGACAGCG-IowaBlack-3'	

(LOPES et al., 2021; ZHAO et al., 2013)

4.4.7. Detecção molecular de suipoxvírus por qPCR

Para a detecção molecular de SPV, as amostras foram submetidas a uma qPCR para a região C20P-C1LN (SOUZA et al., 2019). Para cada reação foram utilizados 1X PCR Master Mix GoTaq Probe (Promega); iniciadores *foward* e *reverse* (10μM); sonda TaqMan (10μM); água livre de nucleases q.s.p. 25 μL e DNA das amostras. As condições do ciclo foram: um ciclo de 95 °C, por 2 minutos; seguido por 45 ciclos de 95 °C por 10 segundos para dissociação das fitas e 60 °C por 1 minuto para o pareamento dos iniciadores, da sonda e para a extensão.

Tabela 6. Iniciadores e sonda para detecção de suipoxvírus por qPCR.

Alvos		Sequências	Fragmento (pb)
C20L-C1L	Primer forward	5′-TAATCCGGGCATCAATCCTC-3′	163
	Primer reverse	5′-GCTGATTGGGCCAGAAAATG-3′	
	Sonda	5′-FAM-TTCCCTCCACAGCTGAAATGCT-IowaBlack-3′	

(SOUZA et al., 2019)

4.4.8. Sequenciamento

Para o sequenciamento do VACV isolado a partir da amostra BOV 5, o sobrenadante de cultura viral em fase de lise foi utilizado. O sobrenadante foi clarificado por centrifugação a 700 × g por 10 minutos, com posterior coleta do sobrenadante sem incluir o precipitado. Previamente à extração, o sobrenadante foi incubado a 75 °C por uma hora para otimizar a liberação do material genético das partículas virais. A extração do material genético da amostra foi realizada utilizando um extrator automatizado MAGNA 96, empregando *beads* magnéticas.

Após a extração, o DNA foi quantificado utilizando um fluorímetro Qubit 3.0 (ThermoFisher Scientific). A biblioteca genômica foi preparada utilizando o kit Illumina CovidSeq (Illumina), com etapas de purificação utilizando *beads* magnéticas 1x AMPure XP (Beckman Coulter). A amostra foi sequenciada na plataforma MiSeq (Illumina) utilizando cartuchos v3 (600 ciclos), seguindo as instruções do fabricante (QUICK et al., 2017).

A análise evolutiva foi realizada utilizando a hemaglutinina viral (A56R) como referência. Este estudo abrangeu 157 sequências nucleotídicas, totalizando 686 posições. O alinhamento das sequências foi realizado com o MAFFT. Em seguida, utilizando o programa MEGA11, foi construída uma árvore filogenética por meio do método da máxima verossimilhança com o modelo Hasegawa-Kishino-Yano, empregando 1000 replicatas (*bootstrap*) para garantir a robustez dos resultados.

Para o sequenciamento do SWPV (amostra SUI 7), o DNA extraído passou por amplificação por PCR multiplex seguindo a padronização de Quick et al., 2017, utilizando dois conjuntos de 84 primers construídos para amplificação do genoma completo (dados não publicados). A polimerase de alta fidelidade Q5® High-Fidelity

DNA Polymerase (New England Biolabs) foi utilizada para a amplificação. Posteriormente, os amplicons resultantes foram purificados utilizando *beads* magnéticas 1x AMPure XP (Beckman Coulter) e o DNA foi quantificado em um fluorímetro Qubit 3.0 (ThermoFisher Scientific) com o Kit de ensaio Qubit™ dsDNA HS (ThermoFisher Scientific). Em seguida, a biblioteca genômica foi preparada utilizando o NEBNext Fast DNA Library Prep Set for Ion Torrent (New England Biolabs) e sequenciada na plataforma Ion Torrent PGM (Thermo Fisher Scientific), seguindo as instruções do fabricante.

A análise evolutiva foi realizada utilizando a DNA polimerase viral (E9L; SPV036) como referência. Este estudo abrangeu 11 sequências nucleotídicas, totalizando 494 posições. O alinhamento das sequências foi realizado com o MAFFT. Em seguida, foi utilizado o programa MEGA11 para a construção de uma árvore filogenética por meio do método da máxima verossimilhança com o modelo Tamura-Nei, empregando 1000 replicatas (*bootstrap*).

Os sequenciamentos e a construção das árvores filogenéticas foi realizada em parceria com o Dr. Maurício Teixeira Lima na Fundação Ezequiel Dias (FUNED).

4.5. Linhagens celulares

4.5.1. Células Vero

As células Vero são uma linhagem celular isolada de células epiteliais de rins de macaco verde africano da espécie *Cercopithecus aethiops* (American Type Culture Collection – ATCC). As células foram cultivadas com o meio mínimo de Earle (MEM), suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB), antibacterianos (estreptomicina 100 mg/mL, penicilina 100 UI/mL e antifúngico (anfotericina B 1 mg/mL) a 37 °C, sob atmosfera de 5% de CO_2. Neste projeto, as células Vero foram utilizadas para os ensaios de isolamento viral, multiplicação viral e titulação.

4.5.2. Células BSC-40

A linhagem celular BSC-40 também é derivada de células epiteliais de rins de macaco verde africano, *Cercopithecus aethiops* (American Type Culture Collection – ATCC). As células BSC-40 também foram cultivadas com MEM, suplementado com 5% de SFB, antibacterianos (estreptomicina 100 mg/mL, penicilina 100 UI/mL e antifúngico (anfotericina B 1 mg/mL) a temperatura de 37 °C e atmosfera de 5% de

CO_2. Estas células foram utilizadas em experimentos de titulação viral e soroneutralização.

4.5.3. MDBK

MDBK é uma linhagem celular epitelial derivada de rim de um boi adulto da espécie *Bos taurus* (American Type Culture Collection – ATCC). Estas células foram cultivadas utilizando MEM suplementado com 7% de SFB, antibacterianos (estreptomicina 100 mg/mL, penicilina 100 UI/mL e antifúngico (anfotericina B 1 mg/mL) a 37 °C, sob atmosfera de 5% de CO_2. Neste projeto, as células MDBK foram utilizadas para o isolamento de PCPV e ORFV.

4.5.4. PK-15

Células PK-15, é uma linhagem celular epitelial derivada de rim de javali euro-asiático da espécie *Sus scrofa* (American Type Culture Collection – ATCC). As células PK-15 foram cultivadas com o meio DMEM, suplementado com 5% de SFB, antibacterianos (estreptomicina 100 mg/mL, penicilina 100 UI/mL e antifúngico (anfotericina B 1 mg/mL) a 37 °C, sob atmosfera de 5% de CO_2. Neste projeto, as células PK-15 foram utilizadas para o isolamento de SWPV.

4.6. Vírus

O vírus utilizado como controle positivo dos experimentos de qPCR e PRNT foi o vaccínia vírus *Western Reserve* (VACV-WR), produzido e purificado no Laboratório de Vírus.

4.7. Isolamento viral

As amostras positivas para VACV em qPCR foram submetidas ao ensaio de isolamento viral utilizando linhagens de células Vero, como descrito por Kroon e colaboradores (2016). Para isso, as células foram cultivadas utilizando MEM suplementado com 5% de SFB, incubadas por 24 horas a 37 °C e 5% de CO_2 ou até a monocamada atingir entre 90–95% de confluência. Duas garrafas de 12,5 cm^2 foram utilizadas para realizar o isolamento viral, sendo uma para a amostra e outra para o controle de células. Após a monocamada celular atingir a confluência desejada, a amostra clínica foi processa em *bead beater homogenizer*, em seguida

foi submetida a três ciclos de congelamento (-20 °C) e descongelamento (37 °C), sendo clarificada em baixa centrifugação (2000 x g por 3 minutos). Posteriormente, o sobrenadante foi diluído e inoculado conforme o protocolo de Kroon e colaboradores (2016), seguida de uma adsorção por 1 hora, realizando uma homogeneização a cada 10 minutos.

Após uma hora, 2 mL de MEM suplementado com 2% de SFB foi adicionado em cada garrafa e as células foram incubadas por 48 horas a 37 °C e 5% de CO_2. A monocamada foi observada diariamente para verificação do aparecimento do efeito citopático (ECP). Após a visualização de efeito citopático, as células foram raspadas com o auxílio de um *scrapper* apropriado e o sobrenadante e as células foram submetidas a três ciclos de congelamento e descongelamento para liberação da partícula viral da célula. O sobrenadante e as células lisadas foram coletados e armazenados a −70 °C. Em caso de não observação de ECP, o sobrenadante foi removido e as células foram submetidas a três ciclos de congelamento (-70 °C) e descongelamento (37 °C). O sobrenadante e as células lisadas foram coletados e utilizados para realizar uma nova passagem em células Vero.

Para o isolamento de amostras positivas para SWPV, foram utilizadas células PK-15. A amostra foi processada, como mencionado anteriormente, e inoculada em monocamadas de células PK-15, seguido de 90 minutos de adsorção com intervalos de 15 minutos para a homogeneização. Posteriormente, DMEM suplementado com 2% de SFB foi adicionado e as células foram incubadas por 48 horas a 37 °C e 5% de CO_2. A monocamada foi observada diariamente para verificar se houve efeito citopático (ECP). Após 48 horas, o efeito citopático foi observado e o sobrenadante e as células foram coletados para realizar novas passagens (RIYESH et al., 2016).

A tentativa de isolamento de partículas virais a partir de amostras positivas para PPV foi realizado como descrito anteriormente para os outros vírus, as amostras positivas na qPCR foram devidamente processadas e inoculadas em células MDBK, em confluência de 90%, seguido de uma hora de adsorção com intervalos de 10 minutos para a homogeneização. Posteriormente, MEM suplementado com 2% de SFB foi adicionado e as células foram incubadas por 2 dias a 37 °C e 5% de CO_2, após esse período a monocamada foi coletada tendo sido realizadas novas passagens (EBLING et al., 2020).

4.8. Titulação viral

Os ensaios de titulação viral foram executados como descrito por Kroon et. al 2016. Placas de 6 poços contendo 5 × 10^5 células Vero e BSC-40 foram preparadas e as monocamadas em confluência entre 80–90% foram infectadas com diluições de até 10^{-10}. A adsorção viral ocorreu por 1 hora, realizando uma homogeneização a cada 10 minutos. Em seguida, cada poço recebeu 2 mL MEM suplementado com 1% de SFB. As placas foram incubadas a 37 °C e 5% de CO_2 por 48 horas. Posteriormente, as monocamadas foram fixadas utilizando formaldeído 3,7% e coradas com cristal violeta 1%. As diluições que tiveram entre 30 e 300 placas de lise foram contadas e o título viral foi calculado em PFU/mL.

4.9. Abordagem sorológica

Para avaliar a presença de anticorpos neutralizantes contra OPXV, testes de soroneutralização por redução de placas (PRNT) foram realizados. A PRNT foi realizada somente para OPXV, sendo que os outros dois gêneros não foram contemplados nesta abordagem.

4.9.1. Teste de neutralização por redução de placas (PRNT)

Para realizar os ensaios de soroneutralização, placas de 6 poços contendo 3 x 10^5 células BSC-40 foram preparadas e incubadas até chegarem a uma confluência de 90%. Alíquotas contendo 22,5 µL de soro de cada amostra foram preparadas, sendo aquecidas a 56 °C por 30 minutos para inativar moléculas do sistema complemento. Em seguida, os soros foram diluídos em uma proporção de 1:20 em MEM sem adição de SFB. O estoque do VACV-WR utilizado no experimento passou por três ciclos de 30 segundos no banho ultrassônico (Ultronique, 55W) e com intervalos de 30 segundos no gelo, posteriormente, foi diluído para 150 PFU. Em seguida, 450 µL da diluição do soro foi adicionado em 450 µL da diluição viral, sendo essa mistura incubada por 16 horas. Portanto, a diluição final do soro testada era de 1:40. Após a incubação, as monocamadas foram infectadas com a diluição de vírus + soro, seguida da adsorção viral por uma hora. Logo após a adsorção, foram adicionados 2 mL de MEM acrescido de 2% de SFB, seguido de incubação a 37 °C e 5% de CO_2 por 48 horas. Posteriormente, as monocamadas foram fixadas utilizando formaldeído 3,7% e coradas com cristal violeta 1%. As placas de lise foram contadas

e as amostras foram consideradas positivas se a redução no número de placa de lise fosse ≥ 50% em relação ao controle contendo um soro negativo (NEWMAN et al., 2003; Kroon et al., 2016). O vírus VACV-WR foi utilizado como controle de vírus e o soro fetal bovino foi utilizado como soro controle negativo.

5. RESULTADOS

Durante o desenvolvimento deste projeto, um total de 309 amostras foram testadas para POXV utilizando a estratégia de investigação molecular por PCR em tempo real e a investigação sorológica por PRNT. De forma geral, 21 amostras foram positivas para POXV, correspondendo a um percentual de 6,8% (21/309) de positividade.

Em todos os municípios onde foram realizadas as coletas de material para diagnóstico de POXV, foram observadas amostras positivas, como demonstrado na figura 19.

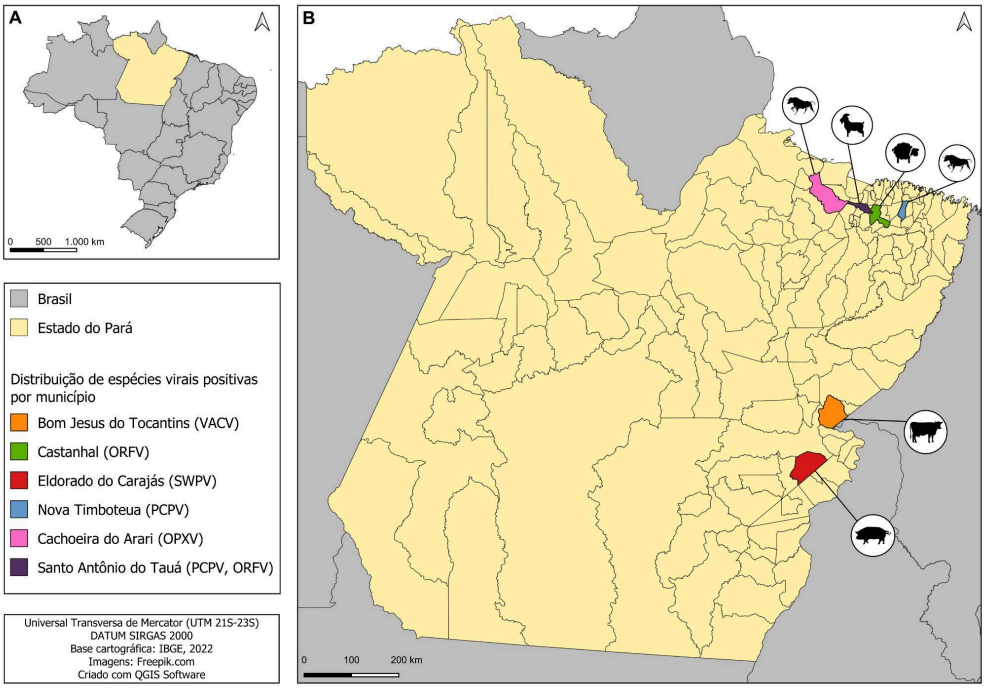


Figura 19. Mapa com as amostras positivas para POXV e seus hospedeiros. Os municípios de Bom Jesus do Tocantins (laranja) e Cachoeira do Arari (rosa) tiveram amostras positivas para ortopoxvírus. Os municípios de Nova Timboteua (azul) e Santo Antônio do Tauá (roxo) tiveram animais positivos para pseudocowpox vírus. Castanhal (verde) e Santo Antônio do Tauá (roxo) tiveram amostras positivas para orf vírus. O município de Eldorado do Carajás (vermelho) teve suíno positivo para swinepox vírus. Fonte: Autor. Mapa construído com dados do IBGE, no software QGIS, versão 3.24.3.

5.1. Controle endógeno

Após a extração do DNA das amostras, o gene da β-actina, utilizado como controle endógeno das extrações de DNA, foi amplificado por uma PCR em tempo real (qPCR). Todas as amostras testadas apresentaram amplificação para o gene

mencionado e, em seguida, foram direcionadas para a investigação molecular de POXV.

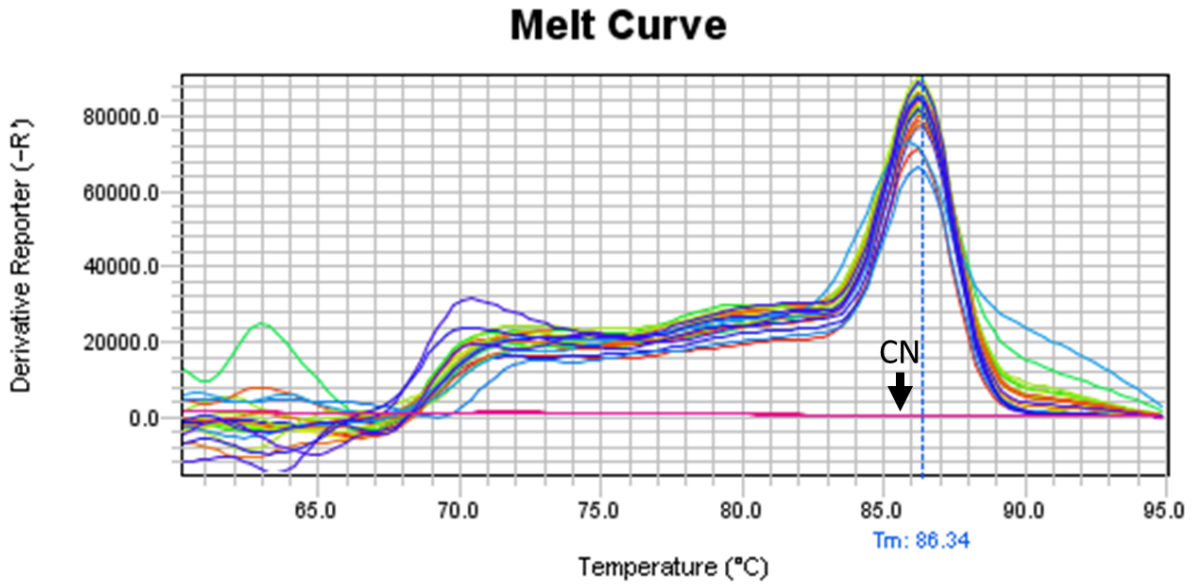


Figura 20. Curvas de dissociação para o gene da β-actina bovina. Na figura está representada a curva de dissociação gerada a partir de um resultado de uma PCR em tempo real para o gene β-actina bovina para algumas amostras de sangue de bovinos e equinos.

5.2. Prospecção de ortopoxvírus

5.2.1. Prospecção molecular por qPCR

No que se refere à investigação de OPXV, as amostras foram testadas por qPCR em uma estratégia multialvo, entretanto, os soros foram testados apenas para C11R (VGF). Como resultado, para a investigação deste gênero, cinco amostras de crosta de bovinos foram positivas para os três alvos investigados (E9L, A56R e C11R), correspondendo a 1,61% do total. As amostras tiveram um Cq variando de 16 a 29 nos diferentes alvos. Os valores de Cq médio e a temperatura de dissociação (Tm) de cada amostra estão representados na tabela 7.

Tabela 7. Amostras de bovinos positivas para VACV na qPCR.

Amostra	Tipo de amostra	Local	Data	Cq E9L	Cq - Tm A56R	Cq - Tm C11R
BOV 1	Crosta	Bom Jesus do Tocantins	2021	19.98	22.29 - 78.13	18 - 79.03
BOV 2	Crosta	Bom Jesus do Tocantins	2021	20.54	17.93 - 77.38	16.53 - 78.43
BOV 3	Crosta	Bom Jesus do Tocantins	2021	21.16	20.52 - 77.53	17.64 - 78.43
BOV 4	Crosta	Bom Jesus do Tocantins	2021	29.85	27.80 - 77.53	25.35 - 78.73
BOV 5	Crosta	Bom Jesus do Tocantins	2021	16.26	18.15 - 77.98	17 - 79.03
Controle positivo	DNA VACV-WR	-	-	11	22 - 77.7	22 - 79

As amostras de soro, sangue e fezes dos outros animais foram negativas para OPXV em todos os alvos testados.

Em relação aos bovinos positivos, estes estão localizados no município de Bom Jesus do Tocantins, com idade entre quatro e cinco anos. Os animais são criados em sistema extensivo, com finalidade de produção de leite e a ordenha era feita manualmente.

Para essas amostras foi realizado uma qPCR utilizando os iniciadores HA-BVV e HA-nDEL do gene A56R, que possibilita a diferenciação entre os grupos 1 e 2 dos VACV-Br. Todas as amostras amplificaram na reação contendo o iniciador HA-BVV. Entretanto, nenhuma amostra amplificou para as reações contendo o iniciador HA-nDEL, como observado na figura 21, indicando que as amostras pertencem ao grupo 1.

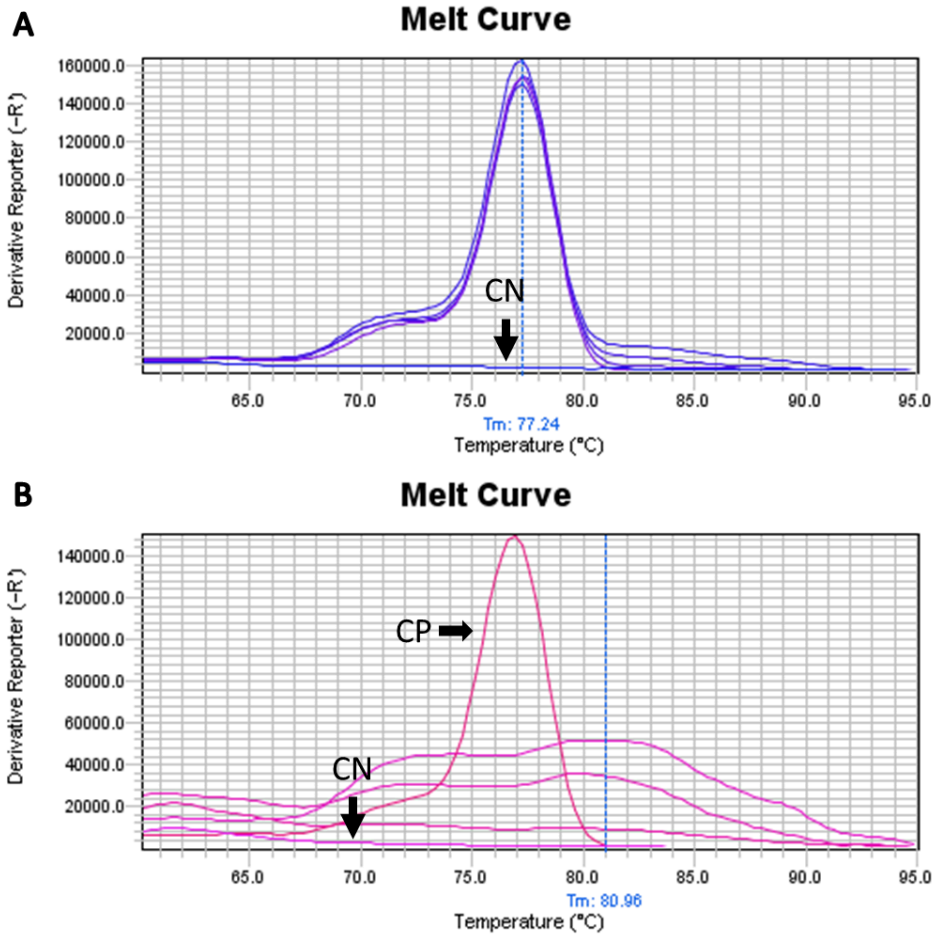


Figura 21. Diferenciação entre grupo 1 e 2 dos VACV-Br. (A) mostra a curva de dissociação para a reação que amplifica todos os vaccínia vírus brasileiros para as amostras BOV 2, BOV 3 e BOV4 (B) mostra a reação para o gene A56R sem deleção (grupo 2), na qual as amostras não amplificaram, indicando que pertencem ao grupo 1. O controle positivo é o VACV-WR, que pertence ao grupo 2, por isso amplificou.

5.2.2. Isolamento viral

O isolamento viral foi realizado a partir da amostra de crosta (BOV 5 - Cq 16.26) em células Vero. Após a primeira passagem da amostra em células Vero, não foi possível observar efeito citopático. Por isso, foi realizada a extração do DNA do material coletado após a primeira passagem para realizar uma qPCR para o gene E9L e verificar se havia, de fato, a presença do material genético do vírus após 48 horas. O resultado da qPCR foi positivo, como observado na figura 22, apresentando um Cq de 15.52, sendo assim, foi dado prosseguimento das próximas passagens, como descrito na metodologia. Como o Cq do coletado depois da primeira passagem foi menor do que o Cq apresentado pela amostra na triagem, foi

concluído que não se tratava do DNA residual da amostra e sim vírus replicante, uma vez que constatamos um aumento da quantidade de DNA nas células.

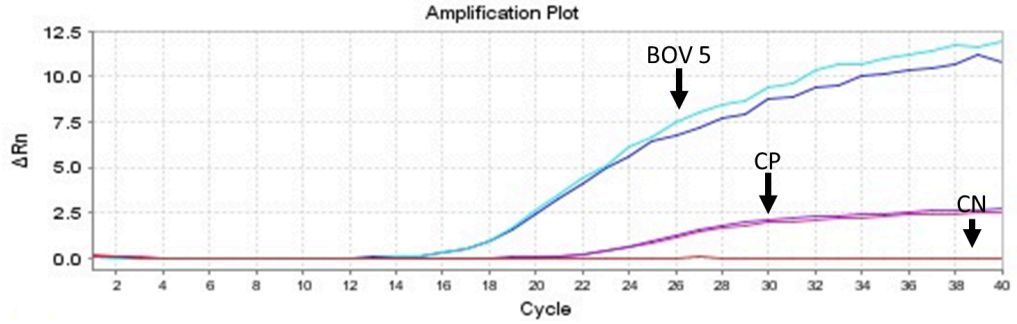


Figura 22. Curva de amplificação para o gene E9L. O DNA foi extraído de células Vero infectadas com amostra positiva para VACV (BOV 5) após 1ª passagem (48 horas). O Cq do isolado foi de 15.52 e do controle positivo foi de 21.97. CP: controle positivo; CN: controle negativo.

Após a 2ª passagem foi possível observar a presença de efeito citopático (ECP), como placas de lise, (círculos azuis Fig. 23), destruição da monocamada, mudança na morfologia celular e aglomerado de células. Nas imagens abaixo é possível observar os ECPs citados, quando comparamos com o controle celular (Fig. 23F).

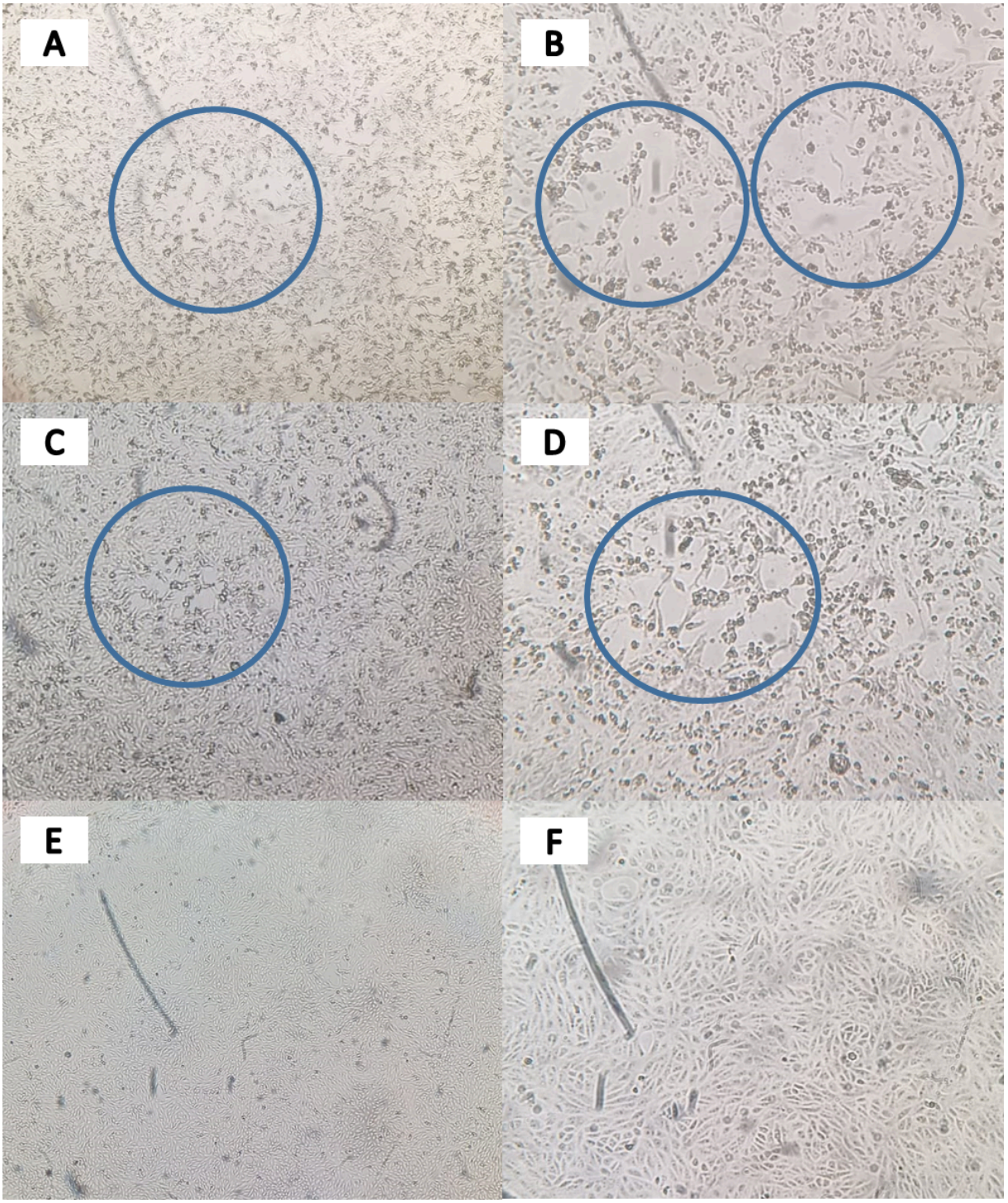


Figura 23. Células Vero infectadas com a 2ª passagem do isolamento de um VACV. (A) e (C) Mudança de morfologia, agrupamento celular, morte celular e formação de placas de lise. Aumento de 40x. (B) e (D) Formação de placas de lise. Aumento 100x. Os círculos azuis mostram a formação de placas de lise (E) e (F) Controle celular. Aumento de 40x e 100x respectivamente.

Em seguida foi realizada a terceira passagem do vírus em monocamadas de células Vero. Neste experimento, após a monocamada ser coletada e ser devidamente processada, o material foi diluído em 1:10, 1:20, 1:30 e 1:40 e novamente inoculado em uma nova monocamada de células Vero. Como observado na figura 24, após 48 horas, a monocamada infectada com a diluição 1:10 estava completamente destruída, indicando um ECP generalizado, e nas outras diluições foi possível observar o efeito da infecção pelo VACV, como formação de placas de lise, indicadas pelos círculos azuis (FIG. 24C).

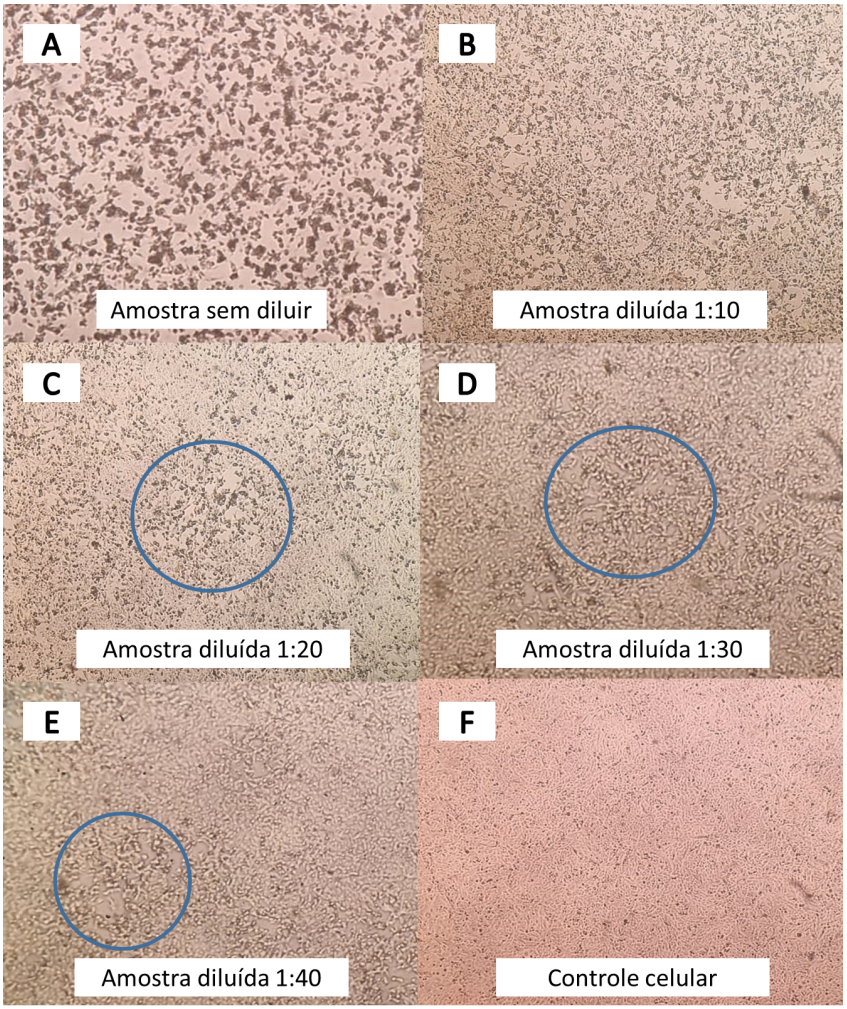


Figura 24. Células Vero infectadas com a 3ª passagem de um isolado de VACV. (A) Células infectadas com o vírus sem diluir apresentaram morte celular ou ECP generalizado após 48 horas de infecção. (B) Vírus diluído em 1:10. (C) Vírus diluído em 1:20. (D) Vírus diluído em 1:30. (E) Vírus diluído em 1:40. Em todas as diluições foi possível observar efeitos citopáticos e formação de placas de lise (círculos azuis) (F) Controle celular. Aumento de 40x.

Para a melhor visualização das placas de lise, a monocamada infectada com a amostra BOV 5, após 48 horas a monocamada foi fixada utilizando formaldeído 3,7% e corada com cristal violeta 1%. Como observado na figura 25, as placas de lise apresentam as bordas irregulares e possuem células mortas no interior.

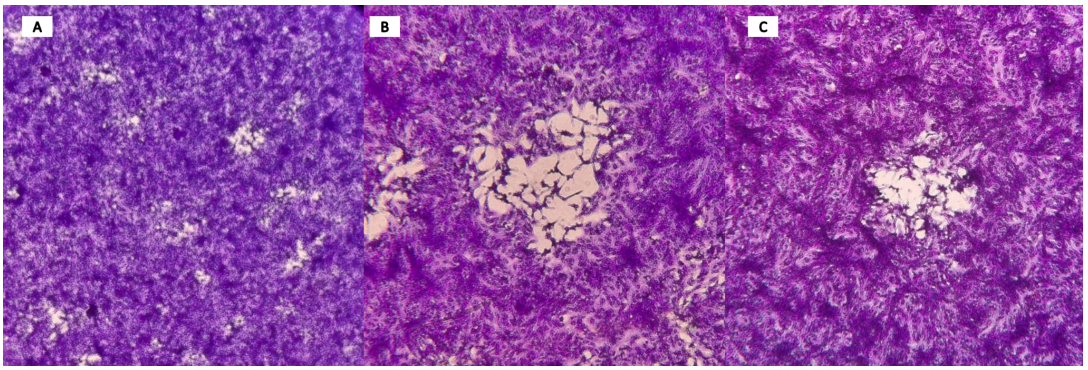


Figura 25. Placas de lise do VACV isolado da amostra BOV 5. (A) aumento de 40x. (B) e (C) aumento de 100x das placas de lise observadas no isolamento do VACV proveniente da amostra BOV 5.

Em seguida, com o material coletado da 2ª passagem, foi realizada uma titulação em placa de 6 poços contendo células Vero, infectadas com 5 diluições do vírus isolado (10^{-1} a 10^{-5}). Após 48 horas, a monocamada foi fixada com formaldeído 3,7% e corada com cristal violeta 1%. Como observado na figura 26, foi possível observar a formação de placas de lise até a diluição 10^{-4}. O título do isolado foi de $4{,}75 \times 10^{5}$ PFU/mL.

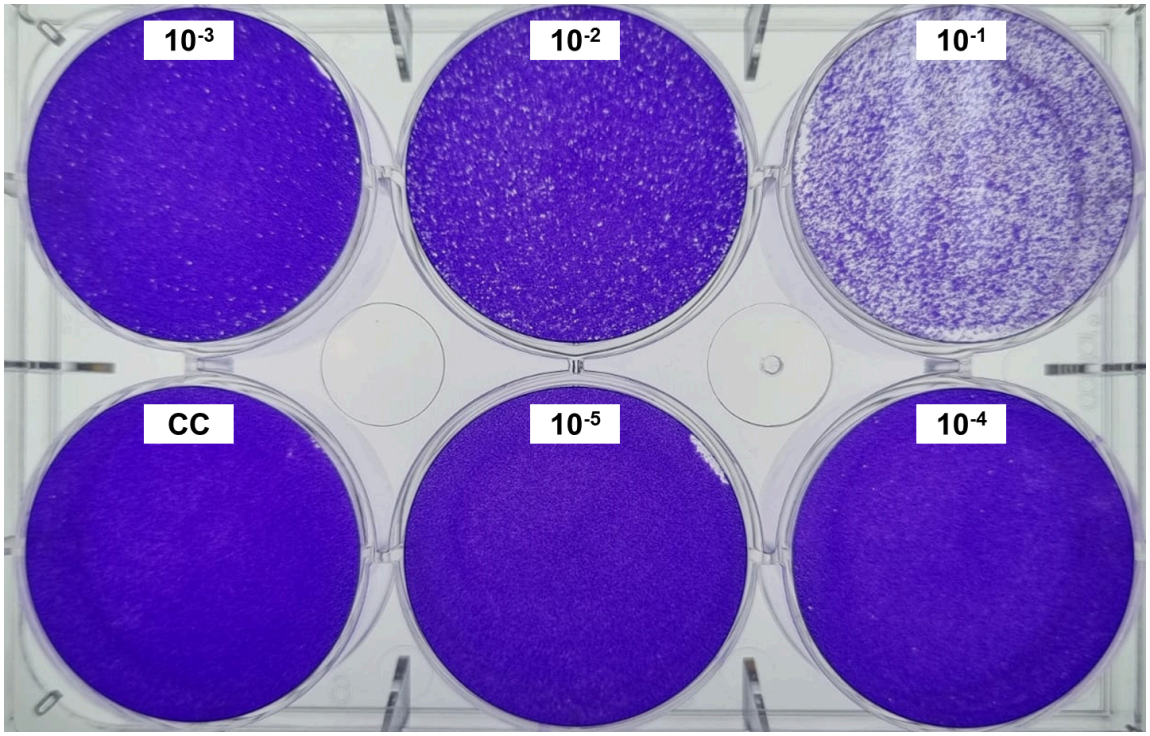


Figura 26. Células Vero infectadas com a 2ª passagem do isolado de VACV. Placa de seis poços contendo monocamada de células Vero corada com cristal violeta mostrando a formação de placas de lise com células infectadas da diluição 10^{-1} a 10^{-5}. Na titulação viral foi possível observar a formação de placas de lise até a diluição 10^{-5}. CC: Controle celular.

5.2.3. Sequenciamento

O vírus isolado a partir da amostra BOV 5 (VACV - BJT) teve o seu DNA sequenciado utilizando a metodologia MiSeq, na qual foi possível obter o genoma completo do vírus. As análises filogenéticas foram realizadas utilizando o gene A56R de sequências brasileiras , que permite a diferenciação dos grupos de VACV-Br. As análises confirmaram que o isolado pertence ao grupo 1, uma vez que a sequência se alinhou com os outros vírus do grupo 1 e divergiu de VACV pertencentes ao grupo 2, como demonstrado na figura 27. Os vírus do grupo 1 estão representados em azul, os vírus do grupo 2 em vermelho e o isolado VACV - BJT está representado em verde. Além disso, é possível observar que o VACV - BJT se agrupou com o MRV, um VACV isolado no estado do Maranhão.

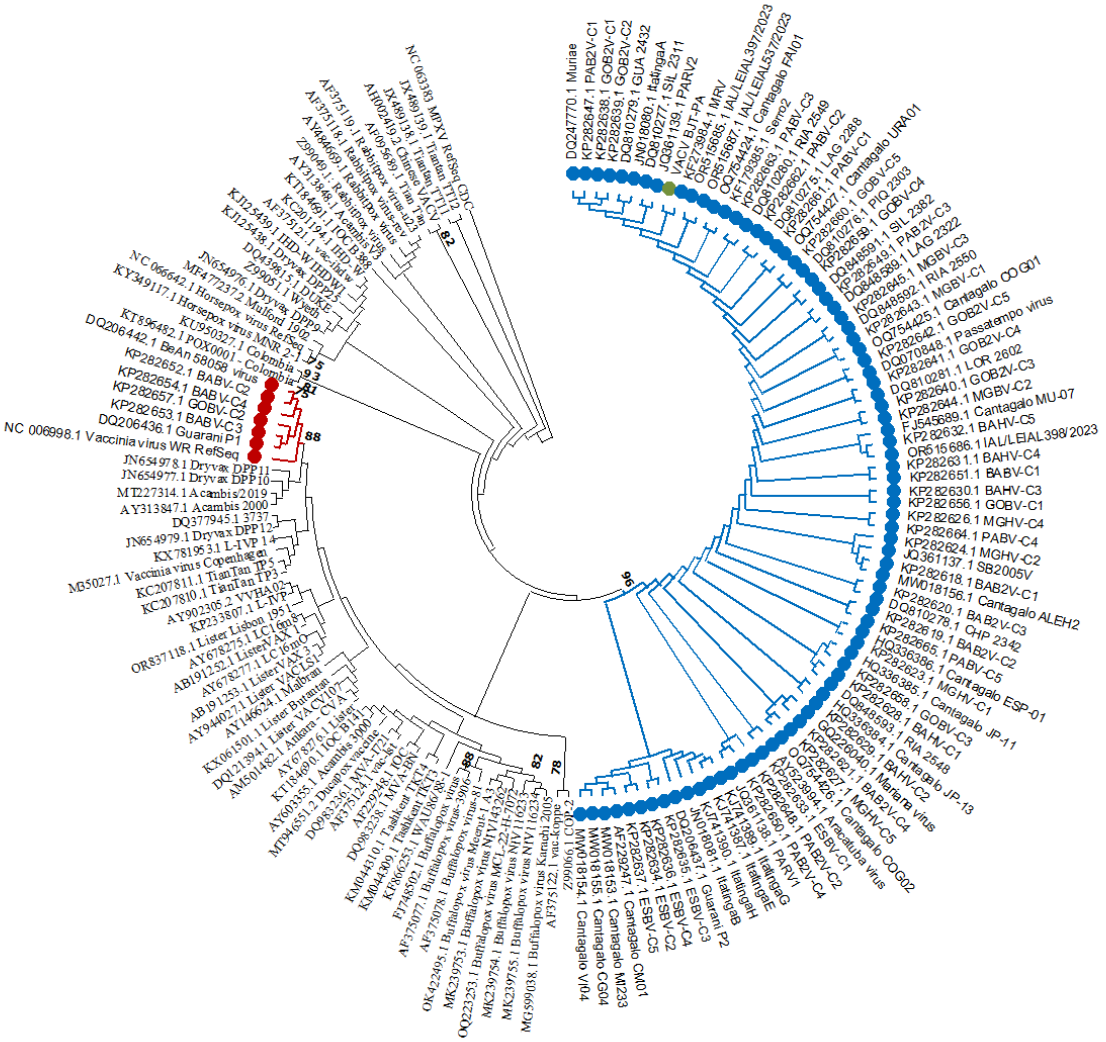


Figura 27. Árvore filogenética de VACV. A árvore foi construída utilizando o gene A56R, com o método de máxima verossimilhança com o modelo Hasegawa-Kishino-Yano, empregando um *bootstrap* de 1000. O VACV isolado (VACV - BJT) está destacado em verde, o agrupamento dos VACV do grupo 1 está sendo representado de azul e dos VACV do grupo 2 em vermelho.

5.2.4. Prospecção sorológica de ortopoxvírus por PRNT

A investigação de anticorpos neutralizantes anti-OPXV (anti-OPXV) foi realizada em um número amostral de 176 soros coletados no estado do Pará nos anos de 2021 e 2022. Dentre as amostras testadas, somente uma amostra foi positiva. A amostra positiva é referente a um búfalo do município de Cachoeira do Arari (BUF 48) que apresentou 53% de soroneutralização em uma diluição de 1:40

do soro. O resultado da titulação dos anticorpos da amostra de soro de BUF 48 mostrou a soroneutralização apenas na diluição de 1:20, apresentando 59,17% de redução em relação ao controle de soro negativo. Sendo assim, como base nesse dado, o título de anticorpos para essa amostra foi de 50 UN/mL.

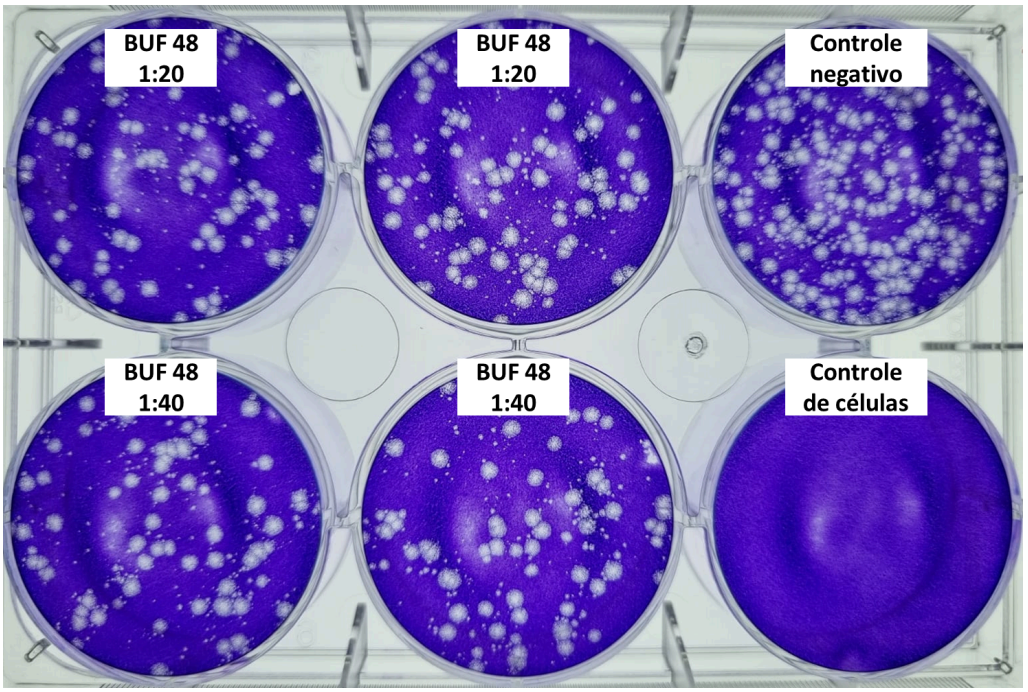


Figura 28. PRNT para a amostra BUF 48. Placa de seis poços infectadas com VACV-WR + soro de búfalo positivo para anticorpos anti-OPXV, mostrando a redução no número de placas de lise nas diluições 1:20 e 1:40 quando comparado com o controle contendo um soro negativo para OPXV.

5.3. Prospecção de parapoxvírus

5.3.1. Prospecção molecular por qPCR

Em relação à investigação do genoma de PPV, 114 amostras (sendo essas amostras de búfalos, caprinos, ovinos e bovinos) foram testadas. Após as análises moleculares, 14 amostras (12,28%) foram consideradas positivas para PPV. Dentre as amostras positivas, cinco amostras de crosta de ovinos (4,38%) foram positivas para ORFV e oito amostras de búfalos (7,01%) foram positivas para PCPV, sendo seis amostras de crosta e duas amostras de fezes. Um resultado interessante foi uma crosta de caprino (CAPRI 1) positiva para dois vírus, ORFV e PCPV, demonstrando uma coinfecção entre duas espécies do mesmo gênero. Para as

reações de PCPV, os Cqs variaram de 16 a 35 e para as amostras positivas para ORFV os Cqs variaram de 16 a 18, como demonstrado na Tabela 10.

Tabela 8. Amostras positivas para PCPV e ORFV na qPCR.

Amostra	Tipo de amostra	Local	Data	Cq - J6R - ORFV	Cq - PCPV
BUF 57	Crosta	Nova Timboteua	2022	-	18.25
BUF 61	Crosta	Nova Timboteua	2022	-	23.46
BUF 64	Crosta	Nova Timboteua	2022	-	19.31
BUF 74	Fezes	Nova Timboteua	2022	-	35.11
BUF 81	Crosta	Nova Timboteua	2022	-	20.19
BUF 83	Crosta	Nova Timboteua	2022	-	18.29
BUF 85	Crosta	Nova Timboteua	2022	-	16.26
BUF 95	Fezes	Nova Timboteua	2022	-	31.47
OV 1	Crosta	Castanhal	2021	18.14	-
OV 2	Crosta	Castanhal	2021	16.80	-
OV 3	Crosta	Castanhal	2021	17.01	-
OV 4	Crosta	Castanhal	2021	17.84	-
OV 5	Crosta	Castanhal	2021	18.93	-
CAPRI 1	Crosta	Santo Antônio do Tauá	2022	29.96	33.73
Controle positivo	Plasmid	-	-	24.21	39.88

Os ovinos positivos para ORFV possuíam entre três e quatro anos, são da raça Santa Inês, provenientes do município de Castanhal. Os ovinos eram criados em sistema extensivo, ou seja, eram criados de uma maneira livre com alimentação à base de pasto.

Em relação aos búfalos, estes eram da raça Murrah e estão localizados no município de Nova Timboteua. Os búfalos positivos para PCPV eram animais entre três e oito meses, em período de amamentação, apresentavam sinais clínicos com lesões localizadas na região da cabeça, eram criados em sistema semi-extensivo. As búfalas desta fazenda, durante o período de lactação, eram ordenhadas de forma mecânica. A crosta proveniente da amostra BUF 57 pertencia a uma bezerra de búfalo que veio a óbito devido às complicações causadas pela infecção do PCPV.

5.3.2. Isolamento viral

Para a tentativa de isolamento de PPV, as amostras OV3 (positiva para ORFV) e BUF 85 (positiva para PCPV) foram processadas e utilizadas para infectar monocamadas de células MDBK. Para amostras BUF 85 foram realizadas duas passagens cegas e para OV3 três passagens cegas. Em ambas tentativas, não foi possível isolar o vírus. Na figura 28 está representada a terceira passagem para a amostra OV3, onde as figuras 28A, B e C são as monocamadas infectadas nas diluições 1:10, 1:100 e 1:1000, respectivamente, 48 horas após a infecção. As monocamadas infectadas apresentam uma diferença na morfologia celular e mais morte celular, quando comparadas ao controle, mas não foi possível descrever nenhum efeito citopático característico da infecção por PPV, descritos como vacuolização, balonamento e arredondamento celular.

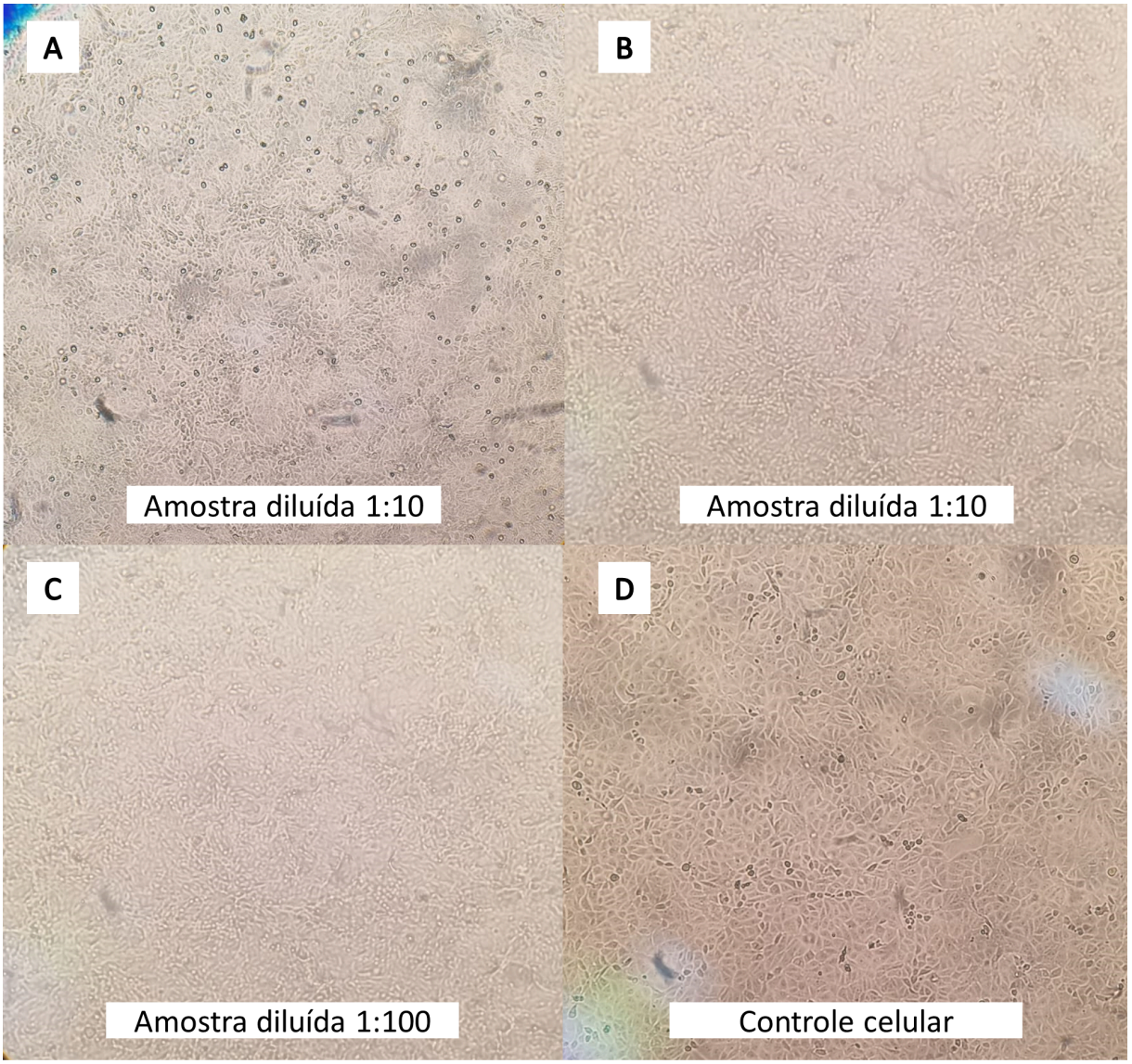


Figura 29. Células MDBK infectadas após a 3ª passagem da amostra OV3. (A) e (B) Células infectadas com a amostras diluída em 1:10 apresentaram mudança de morfologia e morte celular após 48 horas de infecção, aumento de 40x e 100x. (C) Células infectadas com a diluição 1:100 apresentaram mudança de morfologia e morte celular 48 horas pós-infecção, aumento de 100x. (D) Controle celular, aumento de 100x.

O material coletado após a 2ª passagem, que foi utilizado para a 3ª passagem, foi submetido a uma extração de DNA, seguido de uma qPCR para ORFV e apresentou um Cq de 31.5.

5.4. Prospecção de suipoxvírus

5.4.1. Prospecção molecular por qPCR

Tabela 9. Amostra positiva para SWPV na qPCR.

Amostra	Tipo de amostra	Local	Data	Cq - SWPV
SUI 7	Crosta	Eldorado do Carajás	2021	16.05
Controle positivo	Plasmídeo	-	-	25.44

A amostra positiva foi coletada a partir de um surto de varíola suína que acometeu uma propriedade rural localizada no município de Eldorado do Carajás em dezembro de 2021. A propriedade contava com 28 suínos, entre jovens e adultos, criados soltos para a subsistência da família. Dentre os animais da fazenda, nove leitões apresentavam lesões cutâneas na cabeça, pescoço, tronco e membros, como demonstrado na figura 29.



Figura 30. Lesões causadas pela infecção do SWPV em suínos do estado do Pará. Os animais possuíam lesões em torno de um centímetro de diâmetro distribuída por todo o corpo, com aspecto elevado e eram crostosas. Fonte: cedida por colaborador.

5.4.2. Isolamento viral

A tentativa de isolamento viral foi realizada a partir da amostra de crosta positiva para SWPV (SUI 7) em células PK-15. Após 48 horas da primeira

passagem, foi possível observar efeitos citopáticos como a mudança de morfologia, formação de agrupamentos celulares e morte celular nas diluições 1:10 (Fig. 30A e B) e mudança de morfologia na diluição 1:100 (Fig. 30C) quando comparado com o controle celular (Fig. 30D).

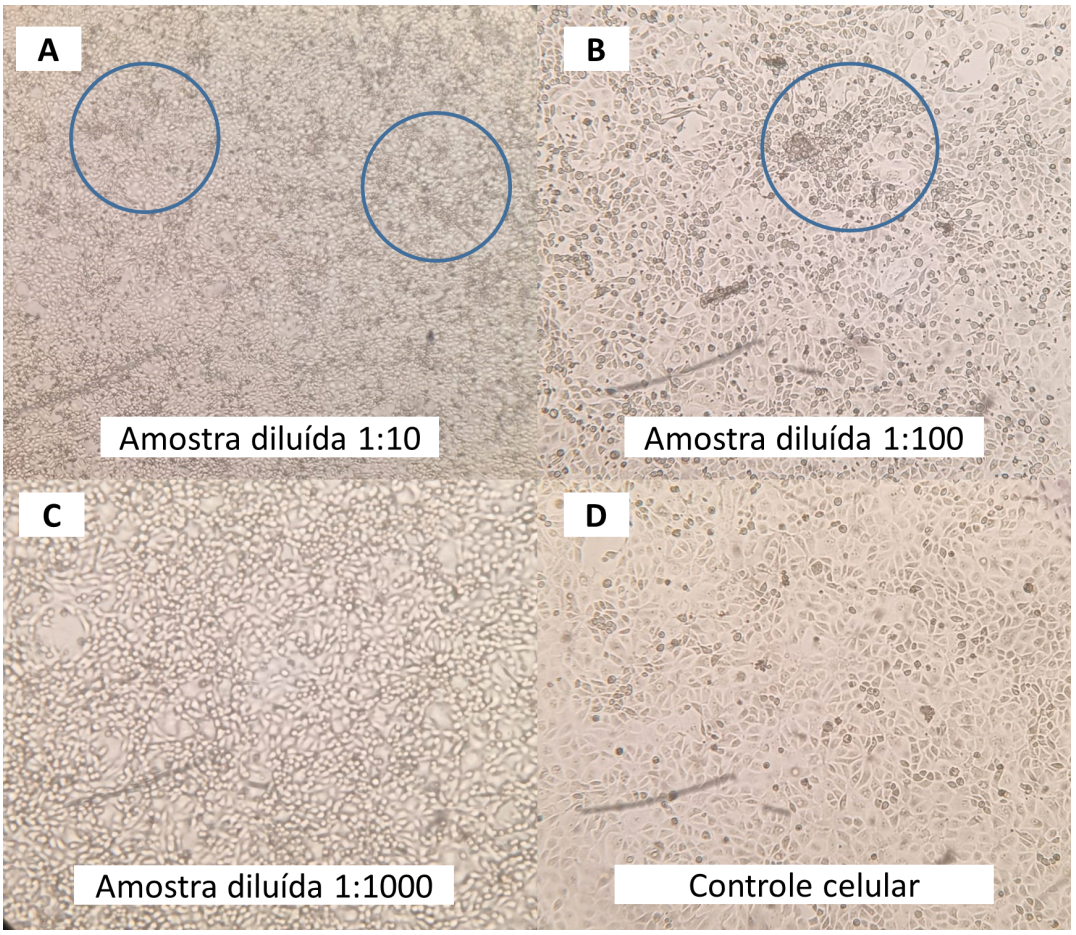


Figura 31. Células PK-15 infectadas após a 1ª passagem da amostra SUI 7. (A) e (B) Células infectadas com a amostras diluída em 1:10 apresentaram mudança de morfologia, formação de grumos e morte celular após 48 horas de infecção, aumento de 40x e 100x. (C) Células infectadas com a diluição 1:100 apresentaram mudança de morfologia e morte celular 48 horas pós-infecção, aumento de 100x. (F) Controle celular, aumento de 100x.

A partir da monocamada coletada da diluição 1:10 após 48 horas de infecção, foi realizada uma segunda passagem, também em células PK-15. Após 24 horas de infecção, foi possível observar a formação de grumos, desprendimento da monocamada e mudança de morfologia quando comparado com o controle celular (Fig. 31).

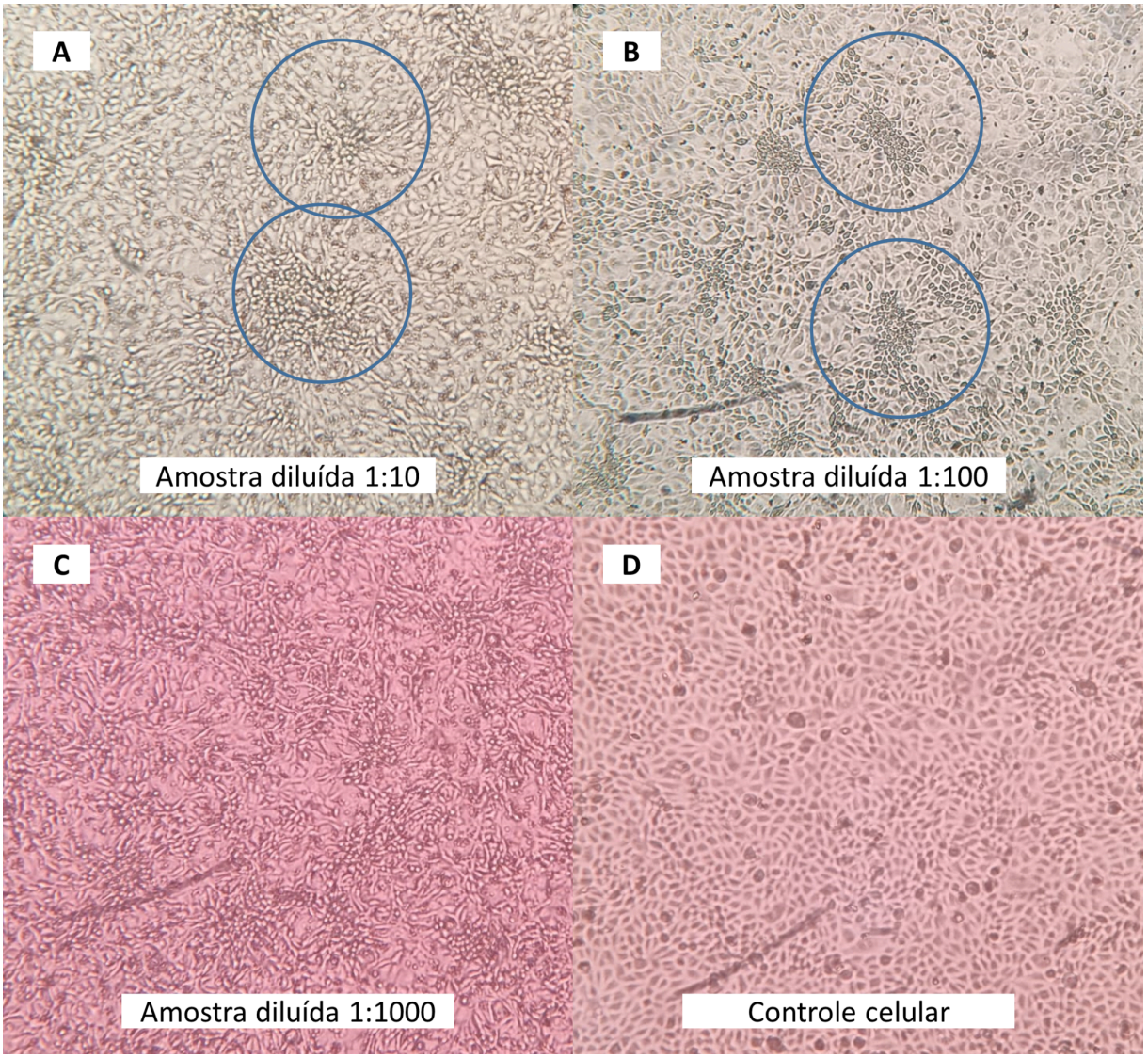


Figura 32. Células PK-15 infectadas após a 2ª passagem da amostra SUI 7. (A) e (B) Células infectadas com a amostras diluída em 1:10 (A), 1:100 (B) e 1:1000 (C) apresentaram mudança de morfologia, formação de grumos e morte celular após 24 horas de infecção, aumento de 100x. (D) Controle celular, aumento de 100x.

A monocamada coletada a partir da diluição 1:10 teve o seu DNA extraído e encaminhado para a PCR em tempo real para a identificação de SWPV. O resultado da reação mostrou a amplificação e um Cq de 25.82, implicando na presença do material genético do vírus mesmo após duas passagens, o que pode indicar o isolamento viral.

5.4.3. Sequenciamento

O DNA extraído da amostra SUI 7 foi submetido a sequenciamento do genoma completo utilizando a plataforma Ion Torrent PGM. Para realizar as análises

filogenéticas foi utilizado o gene da DNA polimerase viral (E9L) e a árvore foi construída utilizando o método de máxima verossimilhança com o modelo Tamura-Nei e *bootstrap* de 1000. A amostra SWPV EC-PA, destacada em verde, se agrupou com outras amostras sequenciadas no Brasil (SWPV Holambra e SWPV SV627/14). Ademais, os resultados do sequenciamento confirmam que o vírus responsável por causar a infecção no suíno é um SWPV.

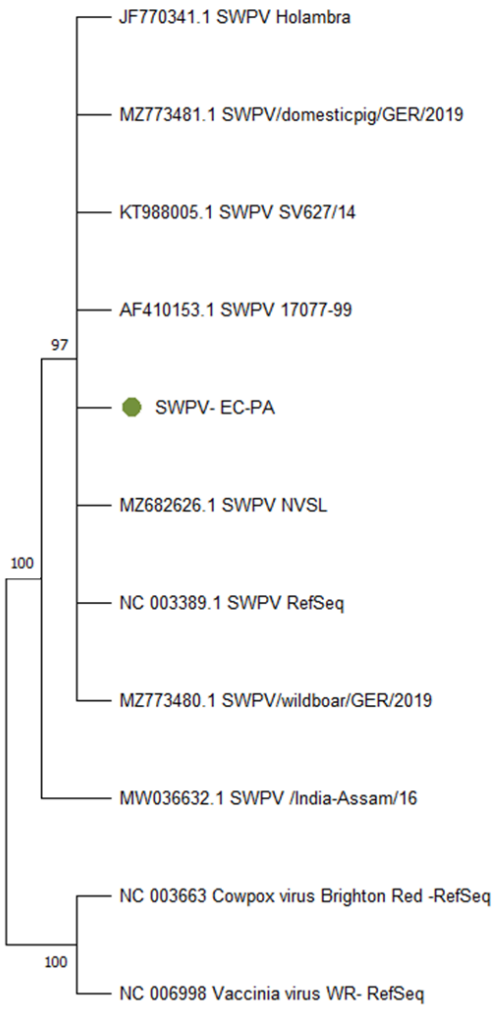


Figura 33. Árvore filogenética de SWPV. A árvore foi construída utilizando o gene da DNA polimerase (E9L), o método de máxima verossimilhança com o modelo Tamura-Nei, empregando um *bootstrap* de 1000. A amostra SWPV EC-PA está destacada em verde.

6. DISCUSSÃO

As amostras foram coletadas em ambientes rurais, inseridos em um bioma que vem passando por altas taxas de desmatamento para dar local a sistemas de produção agropecuária (SANTOS et al., 2021). As fazendas onde as amostras foram coletadas são de sistemas semi-extensivo e extensivo, produtoras de insumos agrícolas, principalmente do leite, no caso das fazendas de gado e búfalos e nas fazendas que possuíam suínos, a produção era para subsistência familiar. Já foi demonstrado anteriormente em outros trabalhos que as infecções causadas pelos POXV, alvos deste estudo, estão intimamente relacionadas a esse tipo de ambiente, que pode ser uma importante fonte de disseminação para as poxviroses circulantes no Brasil.

No Brasil, o VACV é considerado um vírus endêmico, responsável por causar uma zoonose ocupacional, a vaccínia bovina, que acomete principalmente o gado leiteiro e os ordenhadores (ABRAHÃO et al., 2015; ASSIS et al., 2013b; DAMASO et al., 2000; LEITE et al., 2005; TRINDADE et al., 2003). Neste trabalho, cinco amostras de bovinos foram positivas para VACV, estes animais estavam localizados em um ambiente de criação extensiva, onde o leite era um produto resultante dessa criação e a ordenha era feita manualmente. Este resultado, corrobora com a epidemiologia da doença descrita no Brasil, pois apesar do genoma do VACV já ter sido detectado em uma ampla gama de espécies, tanto em espécies domésticas como silvestres, o bovino ainda continua sendo o principal hospedeiro do VACV, se mostrando o principal amplificador do vírus do país. Além disso, já foi demonstrado em outros trabalhos que a ordenha de leite, tanto manual como mecânica, estão relacionadas com a transmissão do VACV entre os animais (BORGES et al., 2017; LOBATO et al., 2005; MATOS et al., 2018).

O diagnóstico do VACV foi realizado a partir de amostras de crostas, o que indica que todos os animais positivos apresentavam manifestações clínicas típicas da doença, nas quais alta carga viral pode ser inferida, com crostas apresentando o Cq médio de 16.26 na qPCR para o gene E9L. O VACV foi investigado em outros tipos de amostras como sangue, fezes e soro, mas não foi possível detectar o genoma do vírus, indicando que os animais sem sinais clínicos não estavam infectados no momento da coleta. Vale destacar que as amostras positivas para VACV neste estudo pertencem ao mesmo município (Bom Jesus do Tocantins) onde

foi relatado um surto do VACV em gado bovino e ordenhadores em 2010 (ASSIS et al., 2013), mostrando que o vírus continua provocando surtos de vaccínia bovina em áreas rurais da cidade.

Apesar de apenas 1,61% da coleção de amostras testadas terem sido positivas para VACV na qPCR, vale ressaltar que 41,6% das amostras de bovinos testadas foram positivas. Um aspecto importante de ser destacado é que o número de amostras de bovinos foi baixo (n=12) e isso pode ter influenciado na baixa positividade total para OPXV neste estudo, uma vez que os bovinos são os principais hospedeiros do VACV. Esta hipótese é reforçada por estudos realizados em ambientes remotos da Amazônia que não detectaram VACV, principalmente em animais silvestres, onde a interferência antrópica e a presença de gado é baixa (COSTA et al., 2017b).

Em relação aos testes sorológicos para OPXV, de todos os soros testados, somente uma amostra de búfalo da Ilha do Marajó (Cachoeira do Arari) coletada em 2022 foi positiva (1/176 — 2,43%). Este resultado se diferencia de outro estudo que demonstrou a positividade de 70% (103/150) na PRNT para OPXV em amostras de soro de búfalos da Ilha do Marajó coletados nos anos de 2009, 2011 e 2012 (FRANCO-LUIZ et al., 2016a). A baixa detecção de anticorpos neutralizantes contra OPXV pode indicar a baixa circulação do VACV nas fazendas investigadas no momento da coleta. Vale destacar que nenhuma amostra de soro foi coletada na cidade de Bom Jesus do Tocantins, local onde havia animais infectados por VACV tanto em 2010 como em 2021.

A circulação de OPXV na Amazônia já foi descrita em bovinos, búfalos, primatas não-humanos (PNH) e humanos. Em outros hospedeiros como os equinos, caprinos, ovinos, suínos e capivaras, a detecção tanto sorológica como do genoma nunca foi relatada, mas existem evidências da circulação de OPXV nestes animais como demonstrado em alguns estudos realizados em outras regiões do Brasil (ABRAHÃO et al., 2009a; BORGES et al., 2018; DUTRA et al., 2017; PERES et al., 2013). A ausência de detecção do genoma de VACV e anticorpos anti-OPXV nestas espécies neste estudo indicam a ausência de circulação do vírus nestes animais, nas fazendas e nas datas investigadas.

Assim como outros VACV isolados na região (ASSIS et al., 2013), o vírus isolado neste trabalho pertence ao grupo 1 de VACV-Br. O resultado foi confirmado

por qPCR para o gene A56R e por sequenciamento do gene. As análises do gene sequenciado confirmam que o VACV - BJT pertence ao grupo 1 e está mais próximo filogeneticamente ao MRV, um VACV isolado no estado do Maranhão decorrente de um surto de vaccínia bovina em 2009 (OLIVEIRA et al., 2013). Além disso, após duas passagens, foi possível observar a formação de placas de lise típicas para os VACV-Br do grupo I (menores quando comparadas com as placas de lise do VACV-WR), morte celular e mudança de morfologia celular. O isolamento de um VACV do grupo 1 demonstra a prevalência da circulação de vírus pertencentes a este grupo no país, uma vez que eles são mais isolados do que vírus do grupo 2 e estão diretamente associados com a vaccínia bovina (OLIVEIRA et al., 2015).

Os PPV são pouco investigados no Brasil, sendo raro os trabalhos que caracterizam essas doenças no território nacional. Entretanto, doenças associadas com os PPV continuam sendo notificadas no país e no bioma amazônico (ALVES et al., 2016; CARGNELUTTI et al., 2014; DE OLIVEIRA et al., 2012; LAGUARDIA-NASCIMENTO et al., 2017).

Nosso estudo demonstrou a presença de infecção por PCPV em amostras de sete búfalos do estado do Pará. Na Amazônia brasileira, a detecção de PCPV é relatada em gado bovino e já foi registrada nos estados do Amazonas, Roraima, Rondônia, Tocantins e Maranhão, com apenas um caso reportado em búfalos no estado do Amazonas (ALVES et al., 2016; CARGNELUTTI et al., 2014; LAGUARDIA-NASCIMENTO et al., 2016). No Brasil, há relatos de búfalos infectados por PCPV no estado de São Paulo, na região sudeste (LAGUARDIA-NASCIMENTO et al., 2017), além da detecção viral também em um bisão nos Estados Unidos (SHIVANNA et al., 2020). Estes dados demonstram o aumento de detecção de PCPV em búfalos, o que pode implicar que estes animais possuem uma importância como hospedeiro para o vírus, especialmente no bioma amazônico.

As amostras positivas para PCPV foram, majoritariamente, de crostas, indicando uma infecção com sinais clínicos. Entretanto, foi possível detectar o genoma de PCPV em duas amostras de fezes de búfalo (BUF 74 e BUF 95), sendo uma evidência para uma possível infecção sistêmica nesses animais. A detecção do genoma viral em fezes pode indicar que o vírus está sendo expelido por outra rota alternativa ao convencional, que seriam as lesões exantemáticas, o que pode favorecer novas vias de infecção, visto que as fezes são mais disponíveis no

ambiente do que as crostas infectadas. Estudos realizados com vacas infectadas experimentalmente com VACV, demonstraram a eliminação do vírus nas fezes (RIVETTI et al., 2013), indicando uma infecção sistêmica nestes animais, como discutido por Matos e colaboradores (2018), o que pode ser um aspecto semelhante para os PPV. Além disso, já foi demonstrada a presença de DNA do PCPV em amostras de leite de vacas infectadas pelo vírus, sendo evidências de que o vírus pode estar sendo expelido por outras rotas (REHFELD et al., 2018). Apesar da detecção molecular do PCPV em fezes de búfalos, neste estudo, a tentativa de isolamento a partir destas amostras ainda não foi realizada, então não podemos afirmar existirem partículas viáveis, capazes de provocar uma nova infecção. Dessa forma, são necessários mais estudos sobre a patogênese dos PPV circulantes no país.

No contexto brasileiro, um aspecto importante dos PPV é o compartilhamento de hospedeiros com os ortopoxvírus e os casos de coinfecção entre os dois gêneros, o que pode ser um problema no diagnóstico diferencial somente com base nos sinais clínicos (ABRAHÃO et al., 2009a, 2010b; REHFELD et al., 2018; SANT'ANA et al., 2013). Além disso, o gado bovino e os búfalos são espécies relacionadas que passaram a ocupar a mesma área nas últimas décadas, processo que pode facilitar a transmissão de patógenos entre as espécies (LAGUARDIA-NASCIMENTO et al., 2017). Isso pode ser observado com os resultados obtidos neste trabalho, uma vez que PCPV é um vírus associado principalmente a infecções em gado bovino, mas foram encontrados causando infecções somente em búfalos.

A Amazônia brasileira é a maior produtora de búfalos da América do Sul, contendo mais de um milhão de cabeças na região, sendo o estado do Pará, em especial a Ilha do Marajó, o abrigo da maioria dos animais (DA SILVA et al., 2021). Somente no estado do Pará, existem mais de 640 mil cabeças de bubalinos (IBGE, 2022). Dessa forma, a produção de carne, leite e outros produtos derivados do leite de búfalo nessa região representa uma grande importância para a economia local, e doenças causadas pelos POXV podem representar prejuízos econômicos, reforçando a importância do entendimento da circulação desses vírus nos animais desta região. Como foi relatado, uma bezerra de búfalo foi levada a óbito devido à

infecção causada pelo PCPV, pelas graves lesões na região da cabeça e pela progressão da doença.

Um surto de ORFV foi relatado em 2012 em uma fazenda localizada no estado do Amazonas, onde uma cabra foi levada a óbito devido à doença (DE OLIVEIRA et al., 2012). Neste trabalho detectamos a presença de ORFV em crostas provenientes de cinco ovinos do estado do Pará coletadas em 2021. Sendo assim, estes dados demonstram que o vírus continua circulando na região Norte, destacando a importância da investigação de possíveis infecções causadas por ORFV. Estes dados mostram os ovinos e os caprinos como os principais hospedeiros para o ORFV no Brasil, sem expansão de hospedeiros até o momento.

Neste estudo, uma amostra de crosta de caprino (CAPRI 1) foi positiva para duas espécies de PPV, PCPV e ORFV, demonstrando uma evidência de coinfecção de PPV em um mesmo animal. No Brasil, já foi demonstrada a coinfecção de OPXV e PPV (ABRAHÃO et al., 2009a, 2010b; REHFELD et al., 2018; SANT'ANA et al., 2013) e coinfecção entre patógenos causadores de doenças vesiculares como *Bluetongue virus* (BTV), *Bovine herpesvirus 1* (BoHV-1), *Bovine viral diarrhea virus-1* (BVDV-1) e PPV (ALVES et al., 2016; LAGUARDIA-NASCIMENTO et al., 2016), mas está é a primeira vez que um animal é detectado com duas espécies de um mesmo gênero. A coinfecção de um mesmo animal por dois vírus diferentes pode se dar pelas características do patógeno, como a forma de transmissão e o sítio primário de infecção ser o mesmo e pode ser explicado pela presença de animais infectados por patógenos diferentes localizados em uma mesma fazenda.

Um fator que pode contribuir para a disseminação das poxviroses aqui estudadas é o movimento de animais infectados e trabalhadores entre fazendas, que pode contribuir para o surto em novas cidades (LAGUARDIA-NASCIMENTO et al., 2016; QUIXABEIRA-SANTOS et al., 2011). Neste trabalho, o município de Santo Antônio do Tauá teve um animal positivo para PCPV e ORFV, e pode-se observar (Fig. 18) que as cidades que tiveram animais infectados com PCPV (Nova Timboteua) e ORFV (Castanhal) são muito próximas de Santo Antônio do Tauá. Sendo assim, o movimento de animais entre fazendas pode ser uma hipótese para a presença de um mesmo vírus em cidades diferentes.

Em relação ao BPSV, já foram relatados três registros de infecções em gado nos estados de Rondônia e no Amazonas (CARGNELUTTI et al., 2014;

LAGUARDIA-NASCIMENTO et al., 2016), entretanto neste trabalho nenhuma amostra foi positiva para este vírus, o que pode demonstrar a ausência de circulação do vírus no estado do Pará, onde já não havia registros da ocorrência da doença causada pelo BPSV até o momento.

Apesar das tentativas de isolamento viral para PPV, não foi possível isolar os vírus ORFV e PCPV a partir das crostas positivas, isto pode ter acontecido devido às condições de armazenamento e de transporte das amostras. As amostras foram transportadas do Pará para Minas Gerais, uma grande distância a temperaturas superiores à de −20 °C e isso pode ter causado a inativação das partículas virais e a queda da carga viral, fatores que podem ter dificultado ou inviabilizado o isolamento em linhagem celular MDBK. Apesar de existirem estudos com isolados a partir de MDBK (EBLING et al., 2020), também existem trabalhos que demonstraram sucesso em isolar PPV a partir de linhagens primárias de testículo de caprinos e bovinos, sem ECP observado em MDBK (ABDULLAH et al., 2015; HOSAMANI et al., 2007; OHTANI et al., 2017).

No Brasil existem poucos relatos de surtos causados por SWPV e há uma escassez de trabalhos que investiguem a epidemiologia da doença no país. Até o momento surtos foram reportados no estado de São Paulo, Rio Grande do Norte e no Tocantins, este último sendo o único caso reportado na Amazônia brasileira (BERSANO et al., 2003; MEDAGLIA et al., 2011; OLINDA et al., 2016). Neste trabalho, uma amostra de suíno do estado do município de Eldorado do Carajás foi positiva para SWPV, demonstrando a permanência do vírus na região. Entre 2016 e 2021 não existem dados na literatura relatando a notificação de surtos de varíola suína no Brasil. Além disso, vale mencionar que o estudo de Bersano et al. (2003), não definiu o patógeno associado com os surtos em rebanhos de suínos, visto que nenhuma estratégia de identificação molecular foi utilizada e o diagnóstico foi realizado apenas com os sinais clínicos e histopatologia.

Um fator importante que pode dificultar a notificação da doença é realizar o diagnóstico diferencial entre as infecções causadas por SWPV e VACV, uma vez que as lesões causadas pelos dois vírus podem ser facilmente confundidas entre si, necessitando de um diagnóstico laboratorial (DELHON et al., 2007; OLINDA et al., 2016; SOUZA et al., 2019).

Em relação ao isolamento de SWPV, apesar do Cq da 2ª passagem ter sido maior do que o da amostra, os ECPs observados durante os experimentos como arredondamento celular, formação de grumos, desprendimento da monocamada e morte celular generalizada são condizentes com os ECPs observados em outros estudos utilizando PK-15 e outras linhagens celulares (KAISER et al., 2021; KOLTSOV et al., 2023; MECH et al., 2018; RIYESH et al., 2016).

O resultado observado na qPCR para a amostra SUI 7 foi confirmado por meio de sequenciamento. A partir da análise de verossimilhança foi demonstrado que a sequência proveniente de SWPV EC-PA, se agrupou com outros SWPV. Bem como, se agrupou com sequências responsáveis pelos surtos dos estados do Rio Grande do Norte e da cidade de Holambra, São Paulo (MEDAGLIA et al., 2011; OLINDA et al., 2016). A utilização do gene da DNA polimerase nas análises filogenéticas realizadas neste estudo limitam observar características genéticas deste grupo, visto que este gene é extremamente conservado nos POXV. Entretanto, foi necessário utilizá-lo para ser possível comparar com as sequências brasileiras, uma vez que a DNA polimerase foi escolhida para o sequenciamento e para as análises realizadas pelos outros estudos no Brasil.

Além disso, a escassez de sequências de SWPV depositadas nos bancos de dados públicos, restringe a escolha de genes para outras análises que elucidem melhor as divergências entre os SWPV. Desta forma, existem perspectivas para tentativas de novas análises que ajudem a entender melhor as características do genoma do vírus responsável pelo surto de 2021 no município de Eldorado do Carajás, Pará.

Os dados da literatura e desse trabalho demonstram que existe a persistência do SWPV em rebanhos de suínos no país. Dessa forma, percebe-se a importância de aumentar os esforços para o diagnóstico correto do patógeno causador de doenças que acometem grandes produções de suínos, visando entender melhor a epidemiologia da doença no país, as formas de transmissão associadas e medidas profiláticas adequadas a fim de prevenir o adoecimento de animais e prejuízos econômicos.

Com exceção do gênero *Suipoxvirus*, os outros dois gêneros alvos deste estudo são vírus zoonóticos com potencial de causar surtos em humanos, em especial o VACV. Desta maneira, a infecção causada por estes vírus pode ser

considerada um problema de saúde pública, sendo de extrema importância que os proprietários dessas fazendas saibam sobre as doenças que estão acometendo os seus rebanhos e tomem medidas profiláticas a fim de evitar a infecção dos animais e dos trabalhadores.

7. CONCLUSÕES

Os resultados de bovinos positivos para VACV, tanto na qPCR como no isolamento viral, no estado do Pará confirmam que estes animais são importantes hospedeiros para o vírus também no bioma amazônico.

O sequenciamento do genoma completo do VACV isolado neste estudo mostra a circulação de um VACV do grupo I em bovinos do estado do Pará.

A detecção de anticorpos neutralizantes anti-OPXV em uma amostra de búfalo mostra que o VACV continua circulando em búfalos no bioma amazônico.

Os resultados de detecção de genoma de PCPV em amostras de crosta de búfalos demonstram que estes animais podem ser importantes para a manutenção da cadeia de transmissão de PPV no bioma amazônico, local onde a presença de búfalos é a maior do Brasil.

A detecção de ORFV em amostras de ovinos mostra que o vírus continua circulando no estado, sem expansão de hospedeiros neste bioma.

A detecção de genoma de ORFV e de PCPV em uma mesma amostra de crosta de cabra pode indicar a coinfecção no animal e a co-circulação dos vírus em uma mesma fazenda.

A ausência de detecção de BPSV demonstra que o vírus pode não estar circulando nos municípios e nos hospedeiros investigados.

O sequenciamento do genoma completo de um SWPV a partir de uma amostra de crosta de um suíno, demonstra que o vírus é o responsável por acometer rebanhos de suínos, causando doença vesicular no bioma amazônico.

8. PERSPECTIVAS

- Tentativa de isolamento viral a partir das amostras positivas para PPV.
- Tentativa de sequenciamento das amostras positivas para PPV para caracterização dos vírus circulantes na região.
- Produção de estoques virais a partir dos vírus isolados neste trabalho.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AASDEV, A. et al. First complete genome characterization of swinepox virus directly from a clinical sample indicates divergence of a Eurasian-lineage virus. **Archives of Virology**, v. 166, n. 4, p. 1217–1225, 1 abr. 2021.

ABDULLAH, A. A. et al. Isolation and phylogenetic analysis of caprine Orf virus in Malaysia. **Virusdisease**, v. 26, n. 4, p. 255–259, dez. 2015.

ABRAHÃO, J. S. et al. Nested-multiplex PCR detection of Orthopoxvirus and Parapoxvirus directly from exanthematic clinical samples. **Virology Journal**, v. 6, p. 140, 2009a.

ABRAHÃO, J. S. et al. Detection and phylogenetic analysis of Orf virus from sheep in Brazil: a case report. **Virology Journal**, v. 6, n. 1, p. 47, 4 maio 2009b.

ABRAHÃO, J. S. et al. One More Piece in the VACV Ecological Puzzle: Could Peridomestic Rodents Be the Link between Wildlife and Bovine Vaccinia Outbreaks in Brazil? **PLOS ONE**, v. 4, n. 10, p. e7428, 19 out. 2009c.

ABRAHÃO, J. S. et al. Bovine Vaccinia Outbreaks: Detection and Isolation of Vaccinia Virus in Milk Samples. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 6, n. 9, p. 1141–1146, nov. 2009d.

ABRAHÃO, J. S. et al. Human Vaccinia virus and Pseudocowpox virus co-infection: clinical description and phylogenetic characterization. **Journal of Clinical Virology**, v. 48, n. 1, p. 69–72, 2010a.

ABRAHÃO, J. S. et al. Vaccinia Virus Infection in Monkeys, Brazilian Amazon. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 6, p. 976, jun. 2010c.

ABRAHÃO, J. S. et al. Outbreak of Severe Zoonotic Vaccinia Virus Infection, Southeastern Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 4, p. 695, 2015.

AFONSO, C. L. et al. The Genome of Swinepox Virus. **Journal of Virology**, v. 76, n. 2, p. 783–790, 15 jan. 2002.

ALLEN, T. et al. Global hotspots and correlates of emerging zoonotic diseases. **Nature Communications**, v. 8, p. 1124, 24 out. 2017.

ALONSO, R. C. Aspectos clínico-patológicos das poxviroses em bovinos no Distrito Federal (2015-2018). 20 dez. 2018.

ALVES, P. A. et al. Occurrence of Pseudocowpox virus associated to Bovine viral diarrhea virus-1, Brazilian Amazon. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 49, p. 70–75, 1 dez. 2016.

ARITA, I.; HENDERSON, D. A. Smallpox and monkeypox in non-human primates. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 39, n. 2, p. 277–283, 1968.

ASSIS, F. L. DE et al. Reemergence of Vaccinia Virus during Zoonotic Outbreak, Pará State, Brazil - Volume 19, Number 12—December 2013 - Emerging Infectious Diseases journal - CDC. dez. 2013.

ASSIS, F. L. et al. Characterization of a New Vaccinia virus Isolate Reveals the C23L Gene as a Putative Genetic Marker for Autochthonous Group 1 Brazilian Vaccinia virus. **PLOS ONE**, v. 7, n. 11, p. e50413, 26 nov. 2012.

BAKER, R. E. et al. Infectious disease in an era of global change. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 20, n. 4, p. 193–205, abr. 2022.

BARBOSA, A. V. et al. Presence of neutralizing antibodies to Orthopoxvirus in Capybaras (Hydrochoerus hydrochaeris) in Brazil. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 8, n. 12, p. 1646–1649, 15 dez. 2014.

BAROUDY, B. M.; VENKATESAN, S.; MOSS, B. Incompletely base-paired flip-flop terminal loops link the two DNA strands of the vaccinia virus genome into one uninterrupted polynucleotide chain. **Cell**, v. 28, n. 2, p. 315–324, 1 fev. 1982.

BAUCH, S. C. et al. Public health impacts of ecosystem change in the Brazilian Amazon. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 24, p. 7414–7419, 16 jun. 2015.

BAXBY, D.; OSBORNE, A. D. Antibody studies in natural bovine cowpox. **Epidemiology & Infection**, v. 83, n. 3, p. 425–428, dez. 1979.

BEER, E. M.; RAO, V. B. A systematic review of the epidemiology of human monkeypox outbreaks and implications for outbreak strategy. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 10, p. e0007791, 16 out. 2019.

BENNETT, M. et al. Feline cowpox virus infection. **Journal of Small Animal Practice**, v. 31, n. 4, p. 167–173, 1990.

BENNETT, M.; BAXBY, D. Y. 1996. Cowpox. **Journal of Medical Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 157–158, 1 set. 1996.

BERSANO, J. G. et al. VARÍOLA SUÍNA: ESTUDO SOBRE A OCORRÊNCIA DE SURTOS NOS ESTADOS DE SÃO PAULO E TOCANTINS, BRASIL. **São Paulo**, p. 10, 2003.

BLASCO, R.; MOSS, B. Role of cell-associated enveloped vaccinia virus in cell-to-cell spread. **Journal of Virology**, v. 66, n. 7, p. 4170–4179, jul. 1992.

BORGES, I. A. et al. Dairy production practices and associated risks for bovine vaccinia exposure in cattle, Brazil. **New Microbes and New Infections**, v. 20, p. 43, 1 nov. 2017.

BORGES, I. A. et al. Serological Evidence of Orthopoxvirus Circulation Among Equids, Southeast Brazil. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. MAR, 8 mar. 2018.

BOWMAN, K. F. et al. Cutaneous form of bovine papular stomatitis in man. **JAMA**, v. 246, n. 24, p. 2813–2818, 18 dez. 1981.

BRUM, M. C. S. et al. An Outbreak of Orthopoxvirus-Associated Disease in Horses in Southern Brazil. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 22, n. 1, p. 143–147, 1 jan. 2010.

BUNGE, E. M. et al. The changing epidemiology of human monkeypox—A potential threat? A systematic review. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 16, n. 2, p. e0010141, 11 fev. 2022.

BURRELL, C. J.; HOWARD, C. R.; MURPHY, F. A. **Fenner and White's Medical Virology**. 5. ed. [s.l.] Elsevier, 2017.

BÜTTNER, M.; RZIHA, H.-J. Parapoxviruses: From the Lesion to the Viral Genome. **Journal of Veterinary Medicine, Series B**, v. 49, n. 1, p. 7–16, 2002.

CAMPOS, R. K. et al. Assessing the variability of Brazilian Vaccinia virus isolates from a horse exanthematic lesion: coinfection with distinct viruses. **Archives of Virology**, v. 156, n. 2, p. 275–283, 1 fev. 2011.

CARGNELUTTI, J. F. et al. An outbreak of pseudocowpox in fattening calves in southern Brazil. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 24, n. 2, p. 437–441, 1 mar. 2012.

CARGNELUTTI, J. F. et al. Pseudovaríola e estomatite papular em bovinos no Estado de Rondônia, Brasil. **Ciência Rural**, v. 44, p. 479–485, mar. 2014.

CARLSON, C. J. et al. Climate change increases cross-species viral transmission risk. **Nature**, v. 607, n. 7919, p. 555–562, jul. 2022.

CDC. **Monkeypox in the U.S.** Disponível em: <https://www.cdc.gov/poxvirus/monkeypox/response/2022/world-map.html>. Acesso em: 28 jul. 2022.

CHANTREY, J. et al. Cowpox: reservoir hosts and geographic range. **Epidemiology & Infection**, v. 122, n. 3, p. 455–460, jun. 1999.

CONDIT, R. C. Surf and Turf: Mechanism of Enhanced Virus Spread During Poxvirus Infection. **Viruses**, v. 2, n. 5, p. 1050–1054, maio 2010.

CONDIT, R. C.; MOUSSATCHE, N.; TRAKTMAN, P. In A Nutshell: Structure and Assembly of the Vaccinia Virion. Em: **Advances in Virus Research**. [s.l.] Academic Press, 2006. v. 66p. 31–124.

CORAS, B. et al. Cowpox and a cat. **The Lancet**, v. 365, n. 9457, p. 446, 29 jan. 2005.

COSTA, G. B. et al. Detection of Vaccinia Virus in Urban Domestic Cats, Brazil - Volume 23, Number 2—February 2017 - Emerging Infectious Diseases journal - CDC. fev. 2017a.

COSTA, G. B. et al. Absence of vaccinia virus detection in a remote region of the Northern Amazon forests, 2005-2015. **Archives of Virology**, v. 162, n. 8, p. 2369–2373, 1 ago. 2017b.

COSTELLO, V. et al. Imported Monkeypox from International Traveler, Maryland, USA, 2021. **Emerging Infectious Diseases**, v. 28, n. 5, p. 1002–1005, maio 2022.

CYRKLAFF, M. et al. Cryo-electron tomography of vaccinia virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 8, p. 2772–2777, 22 fev. 2005.

DA FONSECA, F. G. et al. Characterization of a vaccinia-like virus isolated in a Brazilian forest. **Journal of General Virology**, v. 83, n. 1, p. 223–228, 1 jan. 2002.

DA SILVA, J. A. R. et al. Water buffalo production in the Brazilian Amazon Basin: a review. **Tropical Animal Health and Production**, v. 53, n. 3, p. 343, 5 jun. 2021.

DALTON, C. S. et al. Next-generation sequencing approach to investigate genome variability of Parapoxvirus in Canadian muskoxen (*Ovibos moschatus*). **Infection, Genetics and Evolution**, v. 109, p. 105414, 1 abr. 2023.

DAMASO, C. R. A. et al. An Emergent Poxvirus from Humans and Cattle in Rio de Janeiro State: Cantagalo Virus May Derive from Brazilian Smallpox Vaccine. **Virology**, v. 277, n. 2, p. 439–449, 25 nov. 2000.

DAMON, I. K. Poxviruses. Em: **Fields Virology**. 6. ed. [s.l.] Wolters Kluwer | Lippincott Williams & Wilkins, 2013. v. 2.

D'ANUNCIAÇÃO, L. et al. Filling One More Gap: Experimental Evidence of Horizontal Transmission of Vaccinia Virus Between Bovines and Rodents. **Vector-Borne and Zoonotic**

Diseases, v. 12, n. 1, p. 61–64, jan. 2012.

DE ASSIS, F. L. et al. Serologic Evidence of Orthopoxvirus Infection in Buffaloes, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 4, p. 698, abr. 2012.

DE OLIVEIRA, C. H. S. et al. Multifocal cutaneous ORF virus infection in goats in the Amazon region, Brazil. **Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)**, v. 12, n. 4, p. 336–340, abr. 2012.

DE OLIVEIRA, T. M. L. et al. Vaccinia Virus Is Not Inactivated After Thermal Treatment and Cheese Production Using Experimentally Contaminated Milk. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 7, n. 12, p. 1491–1496, dez. 2010.

DE OLIVEIRA, T. M. L. et al. Detection of Vaccinia Virus in Milk: Evidence of a Systemic and Persistent Infection in Experimentally Infected Cows. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 12, n. 11, p. 898–903, nov. 2015.

DELHON, G. et al. Genomes of the Parapoxviruses Orf Virus and Bovine Papular Stomatitis Virus. **Journal of Virology**, v. 78, n. 1, p. 168–177, jan. 2004.

DELHON, G. A. et al. Genus Suipoxvirus. Em: MERCER, A. A.; SCHMIDT, A.; WEBER, O. (Eds.). **Poxviruses**. Birkhäuser Advances in Infectious Diseases. Basel: Birkhäuser, 2007. p. 203–215.

DESJARDINS, P.; CONKLIN, D. NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. **Journal of Visualized Experiments: JoVE**, n. 45, p. 2565, 22 nov. 2010.

DINTER, Z.; MOREIN, B. **Virus Infections of Ruminants: Virus Infections of Vertebrates Series**. [s.l.] Elsevier Health Sciences, 1990.

DOCEUL, V. et al. Repulsion of Superinfecting Virions: A Mechanism for Rapid Virus Spread. **Science**, v. 327, n. 5967, p. 873–876, 12 fev. 2010.

DOMINGOS, I. J. DA S. et al. Twenty years after bovine vaccinia in brazil: Where we are and where are we going? **Pathogens**, v. 10, n. 4, 1 abr. 2021.

DRUMOND, B. P. et al. Brazilian Vaccinia virus strains are genetically divergent and differ from the Lister vaccine strain. **Microbes and Infection**, v. 10, n. 2, p. 185–197, 1 fev. 2008.

DUTRA, L. A. L. et al. Molecular evidence of Orthopoxvirus DNA in capybara (Hydrochoerus hydrochaeris) stool samples. **Archives of Virology**, v. 162, n. 2, p. 439–448, 1 fev. 2017.

EBLING, R. et al. Late development of pustular, erosive lesions in the muzzle of calves inoculated with Pseudocowpox virus. **Microbial Pathogenesis**, v. 143, p. 104122, jun. 2020.

EDER, I. et al. Two Distinct Clinical Courses of Human Cowpox, Germany, 2015. **Viruses**, v. 9, n. 12, p. 375, 7 dez. 2017.

ELLWANGER, J. H. et al. Beyond diversity loss and climate change: Impacts of Amazon deforestation on infectious diseases and public health. **Anais Da Academia Brasileira De Ciencias**, v. 92, n. 1, p. e20191375, 2020.

ELTOM, K. H. et al. Buffalopox Virus: An Emerging Virus in Livestock and Humans. **Pathogens**, v. 9, n. 9, p. 676, set. 2020.

EREZ, N. et al. Diagnosis of Imported Monkeypox, Israel, 2018. **Emerging Infectious Diseases**, v. 25, n. 5, p. 980–983, maio 2019.

FAVORETTO, S. R. et al. Zika Virus in Peridomestic Neotropical Primates, Northeast Brazil. **EcoHealth**, v. 16, n. 1, p. 61–69, 1 mar. 2019.

FENNER, F. et al. **Smallpox and its erradication**. [s.l.] World Health Organization, 1988. v. 6

FERREIRA, J. M. S. et al. Virulence in Murine Model Shows the Existence of Two Distinct Populations of Brazilian Vaccinia virus Strains. **PLOS ONE**, v. 3, n. 8, p. e3043, 26 ago. 2008.

FLEMING, S. B. et al. A homolog of interleukin-10 is encoded by the poxvirus orf virus. **Journal of Virology**, v. 71, n. 6, p. 4857–4861, jun. 1997.

FLEMING, S. B.; MERCER, A. A. Genus Parapoxvirus. Em: MERCER, A. A.; SCHMIDT, A.; WEBER, O. (Eds.). **Poxviruses**. Birkhäuser Advances in Infectious Diseases. Basel: Birkhäuser, 2007. p. 127–165.

FLEMING, S. B.; WISE, L. M.; MERCER, A. A. Molecular Genetic Analysis of Orf Virus: A Poxvirus That Has Adapted to Skin. **Viruses**, v. 7, n. 3, p. 1505–1539, mar. 2015.

FONSECA, F. G. et al. Morphological and molecular characterization of the poxvirus BeAn 58058. **Archives of Virology**, v. 143, n. 6, p. 1171–1186, 1 jun. 1998.

FONSECA JÚNIOR, A. A. et al. Validation of molecular diagnostics for the detection of pseudocowpox virus. **Brazilian Journal of Microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]**, v. 53, n. 2, p. 1077–1080, jun. 2022.

FRANCO-LUIZ, A. P. M. et al. Spread of Vaccinia Virus to Cattle Herds, Argentina, 2011. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, n. 9, set. 2014.

FRANCO-LUIZ, A. P. M. et al. The detection of Vaccinia virus confirms the high circulation of Orthopoxvirus in buffaloes living in geographical isolation, Marajó Island, Brazilian Amazon. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 46, p. 16–19, 1 jun. 2016a.

FRANCO-LUIZ, A. P. M. et al. Detection of Vaccinia Virus in Dairy Cattle Serum Samples from 2009, Uruguay. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 12, dez. 2016b.

GASSMANN, U.; WYLER, R.; WITTEK, R. Analysis of parapoxvirus genomes. **Archives of Virology**, v. 83, n. 1–2, p. 17–31, 1985.

GIULIO, D. B. D.; ECKBURG, P. B. Human monkeypox: an emerging zoonosis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 4, n. 1, p. 15–25, 1 jan. 2004.

GROSSEGESSE, M. et al. Serological methods for the detection of antibodies against monkeypox virus applicable for laboratories with different biosafety levels. **Journal of Medical Virology**, v. 95, n. 12, p. e29261, 2023.

GUARDONE, L. et al. First Report of Swinepox in a Wild Boar in Italy: Pathologic and Molecular Findings. **Pathogens**, v. 12, n. 3, p. 472, 16 mar. 2023.

GUBSER, C. et al. Poxvirus genomes: a phylogenetic analysis. **Journal of General Virology**, v. 85, n. 1, p. 105–117, 1 jan. 2004.

HOSAMANI, M. et al. Isolation and characterization of an Indian ORF virus from goats. **Zoonoses and Public Health**, v. 54, n. 5, p. 204–208, 2007.

IBGE | Biblioteca | Detalhes | Produção da pecuária municipal. Disponível em:

<https://biblioteca.ibge.gov.br/index.php/biblioteca-catalogo?view=detalhes&id=784>. Acesso em: 11 abr. 2024.

INOSHIMA, Y. et al. Characterization of Parapoxviruses Circulating among Wild Japanese Serows (Capricornis crispus). **Microbiology and Immunology**, v. 46, n. 8, p. 583–587, 2002.

INPE - Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais. Disponível em: <http://www.inpe.br/faq/index.php?pai=6>. Acesso em: 5 out. 2022.

ISIDRO, J. et al. Phylogenomic characterization and signs of microevolution in the 2022 multi-country outbreak of monkeypox virus. **Nature Medicine**, v. 28, n. 8, p. 1569–1572, ago. 2022.

JENNER, E. **An Inquiry Into the Causes and Effects of the Variolae Vaccinae, a Disease Discovered in Some of the Western Counties of England, Particularly Gloucestershire, and Known by the Name of the Cow Pox**. [s.l.] printed, for the author, by Sampson Low ... ; and sold by Law ... and Murray and Hihghley, 1800.

JENSON, A. B.; GHIM, S.; SUNDBERG, J. P. An inquiry into the causes and effects of the variolae (or Cow-pox. 1798). **Experimental Dermatology**, v. 25, n. 3, p. 178–180, 2016.

JONES, B. A. et al. Zoonosis emergence linked to agricultural intensification and environmental change. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 21, p. 8399–8404, 21 maio 2013.

JONES, K. E. et al. Global trends in emerging infectious diseases. **Nature**, v. 451, n. 7181, p. 990–993, fev. 2008.

JUBB, T. et al. Swinepox in pigs in northern Western Australia. **Australian Veterinary Journal**, v. 69, n. 4, p. 99–99, 1992.

KAISER, F. K. et al. Swinepox Virus Strains Isolated from Domestic Pigs and Wild Boar in Germany Display Altered Coding Capacity in the Terminal Genome Region Encoding for Species-Specific Genes. **Viruses**, v. 13, n. 10, p. 2038, out. 2021.

KALONJI, T. et al. Co-Circulating Monkeypox and Swinepox Viruses, Democratic Republic of the Congo, 2022 - Volume 30, Number 4—April 2024 - Emerging Infectious Diseases journal - CDC. 2024.

KEESING, F.; OSTFELD, R. S. Impacts of biodiversity and biodiversity loss on zoonotic diseases. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 118, n. 17, p. e2023540118, 27 abr. 2021.

KOLTSOV, A. et al. Isolation and Characterization of Swinepox Virus from Outbreak in Russia. **Animals : an Open Access Journal from MDPI**, v. 13, n. 11, p. 1786, 27 maio 2023.

KROON, E. G. et al. Zoonotic Brazilian Vaccinia virus: From field to therapy. **Antiviral Research**, v. 92, n. 2, p. 150–163, 1 nov. 2011.

KROON, E. G. et al. Natural Vaccinia Virus Infection: Diagnosis, Isolation, and Characterization. **Current Protocols in Microbiology**, v. 42, n. 1, p. 14A.5.1-14A.5.43, 2016.

KUMAR, A. et al. Molecular epidemiology of swinepox viruses circulating in India. **The Veterinary Quarterly**, v. 43, n. 1, p. 1–10, 2023.

LADNYJ, I. D.; ZIEGLER, P.; KIMA, E. A human infection caused by monkeypox virus in Basankusu Territory, Democratic Republic of the Congo. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 46, n. 5, p. 593–597, 1972.

LAGUARDIA-NASCIMENTO, M. et al. Detection of multiple viral infections in cattle and buffalo with suspected vesicular disease in Brazil. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 28, n. 4, p. 377–381, 1 jul. 2016.

LAGUARDIA-NASCIMENTO, M. et al. Detection of pseudocowpox virus in water buffalo (Bubalus bubalis) with vesicular disease in the state of São Paulo, Brazil, in 2016. **The Veterinary Quarterly**, v. 37, n. 1, p. 16–22, dez. 2017.

LAITON-DONATO, K. et al. Progressive Vaccinia Acquired through Zoonotic Transmission in a Patient with HIV/AIDS, Colombia. **Emerging Infectious Diseases**, v. 26, n. 3, p. 601–605, mar. 2020.

LAW, M. et al. Ligand-induced and nonfusogenic dissolution of a viral membrane. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 15, p. 5989–5994, 11 abr. 2006.

LEITE, J. A. et al. Passatempo Virus, a Vaccinia Virus Strain, Brazil - Volume 11, Number 12—December 2005 - Emerging Infectious Diseases journal - CDC. dez. 2005a.

LEITE-FILHO, A. T. et al. Deforestation reduces rainfall and agricultural revenues in the Brazilian Amazon. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 2591, 10 maio 2021.

LI, Y. et al. Detection of monkeypox virus with real-time PCR assays. **Journal of Clinical Virology**, v. 36, n. 3, p. 194–203, 1 jul. 2006.

LI, Y. et al. Real-time PCR assays for the specific detection of monkeypox virus West African and Congo Basin strain DNA. **Journal of Virological Methods**, v. 169, n. 1, p. 223–227, out. 2010.

LIMA, M. T. et al. An Update on the Known Host Range of the Brazilian Vaccinia Virus: An Outbreak in Buffalo Calves. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. JAN, 2018.

LOBATO, Z. I. P. et al. Surto de varíola bovina causada pelo vírus Vaccinia na região da Zona da Mata Mineira. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, p. 423–429, ago. 2005.

LOPES, G. A. DE O. et al. qPCR assay for the detection of pseudocowpox virus. **Archives of Virology**, v. 166, n. 1, p. 243–247, 1 jan. 2021.

LOPES, O. D. S. et al. Cotia Virus: A New Agent Isolated from Sentinel Mice in São Paulo, Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 14, n. 1, p. 156–157, 1 jan. 1965.

LYTTLE, D. J. et al. Homologs of vascular endothelial growth factor are encoded by the poxvirus orf virus. **Journal of Virology**, v. 68, n. 1, p. 84–92, jan. 1994.

MACKETT, M.; ARCHARD, L. C. Y. 1979. Conservation and Variation in Orthopoxvirus Genome Structure. **Journal of General Virology**, v. 45, n. 3, p. 683–701, 1 dez. 1979.

MACNEIL, A. et al. Diagnosis of Bovine-Associated Parapoxvirus Infections in Humans: Molecular and Epidemiological Evidence. **Zoonoses and Public Health**, v. 57, n. 7–8, p. e161-164, 2010.

MADUREIRA, M. C. Vaccínia bovina no estado de Minas Gerais, 2005-2007. 30 mar. 2009.

MAGNUS, P. VON et al. A Pox-Like Disease in Cynomolgus Monkeys. **Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica**, v. 46, n. 2, p. 156–176, 1959.

MARENGO, J. A. et al. Increased climate pressure on the agricultural frontier in the Eastern Amazonia–Cerrado transition zone. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 457, 10 jan. 2022.

MARQUES, J. T. et al. Characterization of ATI, TK and IFN-α/βR Genes in the Genome of the BeAn 58058 Virus, a Naturally Attenuated Wild Orthopoxvirus. **Virus Genes**, v. 23, n. 3, p. 291–301, 1 dez. 2001.

MARQUES-DA-SILVA, S. H. et al. Occurrence of Paracoccidioides lutzii in the Amazon region: description of two cases. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 87, n. 4, p. 710–714, 1 out. 2012.

MARTINS DA COSTA, P. S. P. et al. Circulation of vaccinia virus in southern and south-eastern wildlife, Brazil. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 67, n. 5, p. 1781–1785, 2020.

MARTINS, M. et al. Pathogenesis in lambs and sequence analysis of putative virulence genes of Brazilian orf virus isolates. **Veterinary Microbiology**, v. 174, n. 1, p. 69–77, 7 nov. 2014.

MASSUNG, R. F.; MOYER, R. W. The molecular biology of swinepox virus. I. A characterization of the viral DNA. **Virology**, v. 180, n. 1, p. 347–354, jan. 1991.

MATOS, A. C. D. et al. Bovine Vaccinia: Insights into the Disease in Cattle. **Viruses**, v. 10, n. 3, p. 120, 9 mar. 2018.

MAZUR, C. et al. Molecular characterization of Brazilian isolates of orf virus. **Veterinary Microbiology**, v. 73, n. 4, p. 253–259, 11 maio 2000.

MCARTHUR, D. B. Emerging Infectious Diseases. **The Nursing Clinics of North America**, v. 54, n. 2, p. 297–311, jun. 2019.

MCELROY, M. C.; BASSETT, H. F. The development of oral lesions in lambs naturally infected with orf virus. **The Veterinary Journal**, v. 174, n. 3, p. 663–664, 1 nov. 2007.

MCFADDEN, G. Poxvirus tropism. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 3, p. 201–213, mar. 2005.

MCFARLANE, R. A.; SLEIGH, A. C.; MCMICHAEL, A. J. Land-Use Change and Emerging Infectious Disease on an Island Continent. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 10, n. 7, p. 2699, jul. 2013.

MECH, P. et al. Identification of swinepox virus from natural outbreaks in pig population of Assam. **VirusDisease**, v. 29, n. 3, p. 395–399, set. 2018.

MEDAGLIA, M. L. G. et al. Swinepox Virus Outbreak, Brazil, 2011 - Volume 17, Number 10—October 2011 - Emerging Infectious Diseases journal - CDC. 2011.

MERCER, Jason; KNÉBEL, Stephan; SCHMIDT, Florian I.; CROUSE, Josh; BURKARD, Christine; HELENIUS, Ari. Vaccinia virus strains use distinct forms of macropinocytosis for host-cell entry. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 107, n. 20, p. 9346-9351, 3 maio 2010. Proceedings of the National Academy of Sciences.

MIRANDA, J. B. et al. Serologic and Molecular Evidence of Vaccinia Virus Circulation among

Small Mammals from Different Biomes, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 6, p. 931, 1 jun. 2017.

Monkeypox Outbreak in Nigeria: Situation Report #12 (December 2019) - Nigeria | ReliefWeb. Disponível em: <https://reliefweb.int/report/nigeria/monkeypox-outbreak-nigeria-situation-report-12-december-2019>. Acesso em: 28 jul. 2022.

MOSS, B. Poxvirus entry and membrane fusion. **Virology**, Virology 50th Anniversary Issue. v. 344, n. 1, p. 48–54, 5 jan. 2006.

MOSS, B. Poxviridae. Em: **Fields Virology**. 6. ed. [s.l.] Wolters Kluwer | Lippincott Williams & Wilkins, 2013a. v. 2.

MOSS, B. Poxvirus DNA Replication. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 5, n. 9, p. a010199, 9 jan. 2013b.

MOSS, B. Membrane fusion during poxvirus entry. **Seminars in cell & developmental biology**, v. 60, p. 89–96, dez. 2016.

MOTA, B. E. F. et al. Seroprevalence of orthopoxvirus in an Amazonian rural village, Acre, Brazil. **Archives of Virology**, v. 155, n. 7, p. 1139–1144, 1 jul. 2010.

NAKAZAWA, Y. et al. A Phylogeographic Investigation of African Monkeypox. **Viruses**, v. 7, n. 4, p. 2168–2184, abr. 2015.

NEPSTAD, D. C.; STICKLER, C. M.; ALMEIDA, O. T. Globalization of the Amazon Soy and Beef Industries: Opportunities for Conservation. **Conservation Biology**, v. 20, n. 6, p. 1595–1603, 2006.

NÓBREGA JR, J. E. et al. Ectima contagioso em ovinos e caprinos no semi-árido da Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, p. 135–139, mar. 2008.

OĞUZOĞLU, T. Ç. et al. Evidence of zoonotic pseudocowpox virus infection from a cattle in Turkey. **VirusDisease**, v. 25, n. 3, p. 381–384, set. 2014.

OHTANI, A. et al. First isolation and genetic characterization of pseudocowpox virus from cattle in Japan. **Virology Journal**, v. 14, n. 1, p. 172, 6 set. 2017.

OLINDA, R. G. et al. Swinepox dermatitis in backyard pigs in Northeastern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, p. 468–472, jun. 2016.

OLIVEIRA, D. B. et al. Group 1 Vaccinia virus zoonotic outbreak in Maranhao State, Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 89, n. 6, p. 1142–1145, dez. 2013.

OLIVEIRA, J. S. DE et al. Vaccinia Virus Natural Infections in Brazil: The Good, the Bad, and the Ugly. **Viruses**, v. 9, n. 11, p. E340, 15 nov. 2017.

OLIVEIRA, J. S. DE. **AVALIAÇÃO DE ROTAS ALTERNATIVAS DE TRANSMISSÃO DO VACCINIA VIRUS (VACV) EM ÁREAS URBANIZADAS DO ESTADO DE MINAS GERAIS, BRASIL.** [s.l.] Universidade Federal de Minas Gerais, 2021.

OLIVEIRA, G. et al. From Lesions to Viral Clones: Biological and Molecular Diversity amongst Autochthonous Brazilian Vaccinia Virus. **Viruses**, v. 7, n. 3, p. 1218–1237, 16 mar. 2015.

PERES, M. G. et al. Serological study of vaccinia virus reservoirs in areas with and without

official reports of outbreaks in cattle and humans in São Paulo, Brazil. **Archives of Virology**, v. 158, n. 12, p. 2433–2441, 1 dez. 2013.

PERES, M. G. et al. Dogs and Opossums Positive for Vaccinia Virus during Outbreak Affecting Cattle and Humans, São Paulo State, Brazil - Volume 22, Number 2—February 2016 - Emerging Infectious Diseases journal - CDC. fev. 2016.

PLOWRIGHT, R. K. et al. Pathways to zoonotic spillover. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 8, p. 502–510, ago. 2017.

PRODES — Coordenação-Geral de Observação da Terra. Disponível em: <http://www.obt.inpe.br/OBT/assuntos/programas/amazonia/prodes>. Acesso em: 5 out. 2022.

QUICK, J. et al. Multiplex PCR method for MinION and Illumina sequencing of Zika and other virus genomes directly from clinical samples. **Nature Protocols**, v. 12, n. 6, p. 1261–1276, jun. 2017.

QUIXABEIRA-SANTOS, J. C. et al. Animal Movement and Establishment of Vaccinia Virus Cantagalo Strain in Amazon Biome, Brazil - Volume 17, Number 4—April 2011 - Emerging Infectious Diseases journal - CDC. abr. 2011.

REHFELD, I. S. et al. Short communication: Parapoxvirus and Orthopoxvirus coinfection in milk of naturally infected cows. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 9, p. 7801–7803, 1 set. 2018.

REZENDE, I. M. DE et al. Persistence of Yellow fever virus outside the Amazon Basin, causing epidemics in Southeast Brazil, from 2016 to 2018. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 6, p. e0006538, 4 jun. 2018.

RIMOIN, A. W. et al. Major increase in human monkeypox incidence 30 years after smallpox vaccination campaigns cease in the Democratic Republic of Congo. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 37, p. 16262–16267, 14 set. 2010.

RIVETTI, A. V. et al. Bovine vaccinia, a systemic infection: evidence of fecal shedding, viremia and detection in lymphoid organs. **Veterinary Microbiology**, v. 162, n. 1, p. 103–111, 22 fev. 2013.

RIYESH, T. et al. Isolation and genetic characterization of swinepox virus from pigs in India. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 46, p. 60–65, jun. 2016.

SANCHEZ, J. F. et al. Unstable Malaria Transmission in the Southern Peruvian Amazon and Its Association with Gold Mining, Madre de Dios, 2001-2012. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, n. 2, p. 304–311, 8 fev. 2017.

SANT'ANA, F. J. F. DE et al. Coinfection by Vaccinia virus and an Orf virus–like parapoxvirus in an outbreak of vesicular disease in dairy cows in midwestern Brazil. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 25, n. 2, p. 267–272, 1 mar. 2013.

SANT'ANA, F. J. F. et al. Bovine papular stomatitis affecting dairy cows and milkers in midwestern Brazil. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 24, n. 2, p. 442–445, 1 mar. 2012.

SANTOS, A. M. D. et al. Deforestation drivers in the Brazilian Amazon: assessing new spatial predictors. **Journal of Environmental Management**, v. 294, p. 113020, 15 set. 2021.

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

SCHMIDT, F. I. et al. Vaccinia extracellular virions enter cells by macropinocytosis and acid-activated membrane rupture. **The EMBO journal**, v. 30, n. 17, p. 3647–3661, 26 jul. 2011.

SHIVANNA, V. et al. Pseudocowpox virus infection in an American bison (Bison bison). **BMC Veterinary Research**, v. 16, n. 1, p. 241, 13 jul. 2020.

SILVA, J. A. G. et al. Detecção de parapoxivírus pelo serviço veterinário oficial (svo) em bovinos com suspeita de doença vesicular (DV) Em Mirassol D'oeste-MT. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 14, n. 2, p. 79–79, 29 ago. 2016.

SILVA, N. I. O. et al. Here, There, and Everywhere: The Wide Host Range and Geographic Distribution of Zoonotic Orthopoxviruses. **Viruses**, v. 13, n. 1, 1 jan. 2021.

SMITH, G. L.; MCFADDEN, G. Smallpox: anything to declare? **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 7, p. 521–527, jul. 2002.

SMITH, G. L.; VANDERPLASSCHEN, A.; LAW, M. 2002. The formation and function of extracellular enveloped vaccinia virus. **Journal of General Virology**, v. 83, n. 12, p. 2915–2931, 2002.

SOARES-FILHO, B. S. et al. Modelling conservation in the Amazon basin. **Nature**, v. 440, n. 7083, p. 520–523, mar. 2006.

SOUZA, F. A. et al. Validation of a real-time PCR assay for detection of swinepox virus. **Archives of Virology**, v. 164, n. 12, p. 3059–3063, 1 dez. 2019.

TERÇAS-TRETTEL, A. C. P. et al. Malaria and Hantavirus Pulmonary Syndrome in Gold Mining in the Amazon Region, Brazil. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 16, n. 10, p. E1852, 25 maio 2019.

TIKKANEN, M. K. et al. Recent isolates of parapoxvirus of Finnish reindeer (Rangifer tarandus tarandus) are closely related to bovine pseudocowpox virus. **Journal of General Virology**, v. 85, n. 6, p. 1413–1418, 1 jun. 2004.

TRINDADE, G. DE S. et al. Araçatuba Virus: A Vaccinialike Virus Associated with Infection in Humans and Cattle - Volume 9, Number 2—February 2003 - Emerging Infectious Diseases journal - CDC. fev. 2003.

TRINDADE, G. DE S. et al. Real-time PCR assay to identify variants of Vaccinia virus: implications for the diagnosis of bovine vaccinia in Brazil. **Journal of Virological Methods**, v. 152, n. 1–2, p. 63–71, set. 2008a.

TRINDADE, G. S. et al. ISOLATION OF TWO VACCINIA VIRUS STRAINS FROM A SINGLE BOVINE VACCINIA OUTBREAK IN RURAL AREA FROM BRAZIL: IMPLICATIONS ON THE EMERGENCE OF ZOONOTIC ORTHOPOXVIRUSES. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 75, n. 3, p. 486–490, 1 set. 2006.

TRINDADE, G. S. et al. Brazilian Vaccinia Viruses and Their Origins. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 7, p. 965, 2007.

USME-CIRO, J. A. et al. Detection and Molecular Characterization of Zoonotic Poxviruses

Circulating in the Amazon Region of Colombia, 2014. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 4, p. 649–653, abr. 2017.

VAUGHAN, A. et al. Two cases of monkeypox imported to the United Kingdom, September 2018. **Euro Surveillance: Bulletin Europeen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin**, v. 23, n. 38, p. 1800509, set. 2018.

VENKATESAN, P. Global monkeypox outbreak. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 22, n. 7, p. 950, 1 jul. 2022.

WEISS, R. A.; MCMICHAEL, A. J. Social and environmental risk factors in the emergence of infectious diseases. **Nature Medicine**, v. 10, n. 12 Suppl, p. S70-76, dez. 2004.

WELLS, K. et al. Distinct spread of DNA and RNA viruses among mammals amid prominent role of domestic species. **Global Ecology and Biogeography**, v. 29, n. 3, p. 470–481, mar. 2020.

WHELAN, S. Viral Replication Strategies. Em: **Fields Virology**. 6. ed. [s.l.] Wolters Kluwer | Lippincott Williams & Wilkins, 2013. v. 2.

WILFINGER, W. W.; MACKEY, K.; CHOMCZYNSKI, P. Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. **BioTechniques**, v. 22, n. 3, p. 474–476, 478–481, mar. 1997.

WITTEK, R.; KUENZLE, C. C.; WYLER, R. High C + G content in parapoxvirus DNA. **The Journal of General Virology**, v. 43, n. 1, p. 231–234, abr. 1979.

WOOLHOUSE, M. E. J.; GOWTAGE-SEQUERIA, S. Host Range and Emerging and Reemerging Pathogens - Volume 11, Number 12—December 2005 - Emerging Infectious Diseases journal - CDC. 2005.

YONG, S. E. F. et al. Imported Monkeypox, Singapore. **Emerging Infectious Diseases**, v. 26, n. 8, p. 1826–1830, ago. 2020.

ZAFAR, A. et al. Nosocomial Buffalopoxvirus Infection, Karachi, Pakistan. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 6, 6 jun. 2007.

ZHAO, H. et al. Specific qPCR assays for the detection of orf virus, pseudocowpox virus and bovine papular stomatitis virus. **Journal of Virological Methods**, v. 194, n. 1, p. 229–234, 1 dez. 2013.

ZIBA, M. W. et al. First detection and molecular characterisation of pseudocowpox virus in a cattle herd in Zambia. **Virology Journal**, v. 17, p. 152, 9 out. 2020.

10. OUTRAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

10.1. Participação em eventos científicos

IX Simpósio de Microbiologia da UFMG. A Microbiologia no Brasil: A ciência de hoje para soluções dos problemas do amanhã. Belo Horizonte–MG. Setembro de 2022.

XXXIII Congresso Brasileiro de Virologia. Sociedade Brasileira de Virologia. Porto Seguro–BA. Outubro de 2022.

VI Simpósio Avançado de Virologia Hermann Schatzmayr. Instituto Oswaldo Cruz. Maio de 2023.

XXXIV Congresso Brasileiro de Virologia. Sociedade Brasileira de Virologia. Ouro Preto–MG. Setembro de 2023.

X Simpósio de Microbiologia da UFMG. Professor Jaques R. Nicoli. Belo Horizonte–MG. Novembro de 2023.

10.2. Organização de eventos

IX Simpósio de Microbiologia da UFMG. A Microbiologia no Brasil: A ciência de hoje para soluções dos problemas do amanhã. Belo Horizonte–MG. Setembro de 2022.

10.3. Apresentação de trabalhos em eventos científicos

DIAS, K.L.; STOFFELLA-DUTRA, A.G.; OLIVEIRA, D.M.S.; ALMEIDA, I.M.; BARBOSA, C.C.; BOMJARDIM, H.A.; CAMPOS, K.F.; BARBOSA-NETO, J.D.; TRINDADE, G.S. PROSPECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE POXVÍRUS NA AMAZÔNIA BRASILEIRA. Em: IX Simpósio de Microbiologia da UFMG. A Microbiologia no Brasil: A ciência de hoje para soluções dos problemas do amanhã. Belo Horizonte–MG. Setembro de 2022.

DIAS, K.L.; STOFFELLA-DUTRA, A.G.; OLIVEIRA, D.M.S.; ALMEIDA, I.M.; BARBOSA, C.C.; BOMJARDIM, H.A.; CAMPOS, K.F.; FONSECA-JÚNIOR, A.A.; BARBOSA-NETO, J.D.; TRINDADE, G. S. PROSPECÇÃO DE SUIPOXVÍRUS E PARAPOXVÍRUS NA AMAZÔNIA BRASILEIRA. Em: IX Simpósio de Microbiologia da UFMG. A Microbiologia no Brasil: A ciência de hoje para soluções dos problemas do amanhã. Belo Horizonte–MG. Setembro de 2022.

DIAS, K.L.; STOFFELLA-DUTRA, A.G.; OLIVEIRA, D.M.S.; ALMEIDA, I.M.; BARBOSA, C.C.; BOMJARDIM, H.A.; CAMPOS, K.F.; BARBOSA-NETO, J.D.; TRINDADE, G.S. PROSPECTION AND CHARACTERIZATION OF POXVIRUSES IN THE BRAZILIAN AMAZON. Em: XXXIII Congresso Brasileiro de Virologia. Sociedade Brasileira de Virologia. Porto Seguro–BA. Outubro de 2022.

DIAS, K.L.; STOFFELLA-DUTRA, A.G.; ALMEIDA, I.M.; OLIVEIRA, D.M.S.; BARBOSA, C.C.; BOMJARDIM, H.A.; CAMPOS, K.F.; FONSECA-JÚNIOR, A.A.; BARBOSA-NETO, J.D.; TRINDADE, G. S. PROSPECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE POXVÍRUS NA AMAZÔNIA BRASILEIRA. Em: VI Simpósio Avançado de Virologia Hermann Schatzmayr. Instituto Oswaldo Cruz. Maio de 2023.

DIAS, K.L.; ALMEIDA, I.M.; STOFFELLA-DUTRA, A.G.; OLIVEIRA, D.M.S.; DOMINGOS, I.J.S.; BARBOSA, C.C.; BOMJARDIM, H.A.; CAMPOS, K.F.; FONSECA-JÚNIOR, A.A.; BARBOSA-NETO, J.D.; TRINDADE, G. S. PROSPECTING POXVIRUSES IN THE BRAZILIAN AMAZON. Em: XXXIV Congresso Brasileiro de Virologia. Sociedade Brasileira de Virologia. Ouro Preto–MG. Setembro de 2023.

DIAS, K.L.; ALMEIDA, I.M.; STOFFELLA-DUTRA, A.G.; BASTOS E SILVA, P. H; OLIVEIRA, D.M.S.; DOMINGOS, I.J.S.; BARBOSA, C.C.; BOMJARDIM, H.A.; CAMPOS, K.F.; FONSECA-JÚNIOR, A.A.; KROON, E.G.; BARBOSA-NETO, J.D.; TRINDADE, G. S. ISOLAMENTO DE UM VACCÍNIA VÍRUS DA AMAZÔNIA BRASILEIRA. Em: X Simpósio de Microbiologia da UFMG. Professor Jaques R. Nicoli. Belo Horizonte–MG. Novembro de 2023.

10.4. Prêmios e menções honrosas

Menção honrosa na modalidade pôster. Trabalho ISOLAMENTO DE UM VACCÍNIA VÍRUS DA AMAZÔNIA BRASILEIRA. Em: no X Simpósio de Microbiologia da UFMG, promovido pelo Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, realizado nos dias 27 e 28 de novembro de 2023.

10.5. Treinamento

Treinamento teórico/prático Laboratório-NB3-ICB. (Carga horária: 20h). Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Brasil. (2024).

10.6. Publicações

STOFFELLA-DUTRA, A. G., DE CAMPOS, B. H., BASTOS E SILVA, P. H., **DIAS, K.** L., DA SILVA DOMINGOS, I. J. S., HEMETRIO, N. S., XAVIER, J., IANI, F., FONSECA, V., GIOVANETTI, M., DE OLIVEIRA, L. C., TEIXEIRA, M. M., LOBATO, Z. I. P., FERREIRA, H. L., ARNS, C. W., DURIGON, E., DRUMOND, B. P., ALCANTARA, L. C. J., DE CARVALHO, M. P. N., & DE SOUZA TRINDADE, G. SARS-CoV-2 Spillback to Wild Coatis in Sylvatic-Urban Hotspot, Brazil. Emerging infectious diseases, 29(3), 664–667, mar. 2023.