

GALILEU BARBOSA COSTA

**ECOEPIDEMIOLOGIA DO *VACCINIA VIRUS*: CONECTANDO
PATÓGENO, HOSPEDEIROS E O AMBIENTE**

Orientadora: Profa. Dra. Giliane de Souza Trindade

Belo Horizonte, Março de 2018

GALILEU BARBOSA COSTA

**ECOEPIDEMIOLOGIA DO *VACCINIA VIRUS*: CONECTANDO
PATÓGENO, HOSPEDEIROS E O AMBIENTE**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do Título de Doutor em Microbiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Giliane de Souza Trindade

Belo Horizonte, Março de 2018

043

Costa, Galileu Barbosa.

Ecoepidemiologia do Vaccinia virus: conectando patógeno, hospedeiros e o ambiente [manuscrito] / Galileu Barbosa Costa. - 2018.

123 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Giliane de Souza Trindade.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Doenças Transmissíveis Emergentes. 3. Orthopoxvirus. 4. Vírus Vaccinia. 5. Epidemiologia. I. Trindade, Giliane de Souza. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ATA DA DEFESA DE TESE DE GALILEU BARBOSA COSTA

Nº REGISTRO: 2014699547

Relatora e Suplente: Profa. Dr. Zélia Inês Portela Lobato

Suplente externo: Prof. Dr. Danilo Bretas

Às 14:00 horas do dia 01 de março de 2018, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Flávio Guimarães da Fonseca (Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG), Danielle da Glória de Souza (Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG), Jane Megid (UNESP), Cíntia Lopes de Brito Magalhães (UFOP) e a Profa. Giliane de Souza Trindade - Orientadora, para julgar o trabalho final "Ecoepidemiologia do Vaccinia virus: conectando patógeno, hospedeiros e o ambiente", do aluno **Galileu Barbosa Costa**, requisito final para a obtenção do Grau de **DOUTOR EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Flávio Guimarães da Fonseca - Coordenador do Programa, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição de resultado final. O candidato foi considerado **APROVADO**. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 01 de março de 2018.

Prof. Dr. Flávio Guimarães da Fonseca

Profa. Dr. Danielle da Glória de Souza

Profa. Dr. Jane Megid

Profa. Dr. Cíntia Lopes de Brito Magalhães

Profa. Giliane de Souza Trindade (Orientadora)

Prof. Flávio Guimarães da Fonseca
Coordenador



UFMG
Microbiologia

**Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia**

ALUNO: GALILEU BARBOSA COSTA

Nº matrícula: 2014699547

Programa de Pós-graduação em Microbiologia - NÍVEL DOUTORADO

Defesa de Tese: 01 de março de 2018

Título: "Ecoepidemiologia do Vaccinia virus: conectando patógeno, hospedeiros e o ambiente"

Suplente externo: Prof. Dr. Danilo Bretas

A Tese foi submetida à apreciação da Profa. Dr. Zélia Inês Portela Lobato que emitiu parecer favorável.

Prof. Dr. Flávio Guimarães da Fonseca
Examinador

Aprovado: *Sim*

Profa. Dr. Danielle da Glória de Souza
Examinadora

Aprovado: *SIM*

Profa. Dr. Jane Megid
Examinadora

Aprovado: *Sim*

Profa. Dr. Cintia Lopes de Brito Magalhães
Examinadora

Aprovado: *SIM*

Prof. Giliane de Souza Trindade
Orientadora

Aprovado: *Sim*

Flávio
Prof. Flávio Guimarães da Fonseca
Coordenador

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Antônia e Edgar que sempre batalharam e se sacrificaram para que eu pudesse chegar aonde eu cheguei. À minha irmã Elizene pela compreensão, apoio e confiança em todos os meus passos. À minha tia Sinhá (em memória), pois sempre me incentivou no meu sonho de ser Doutor (tia eu não sou médico, mas a trajetória que eu segui foi a melhor escolha).

AGRADECIMENTOS

Primeiramente ao meu amado Deus! Existem coisas, acontecimentos, que são inexplicáveis. Eu acredito que um deles é Deus. Estar em sua presença é incrível, espero que de alguma forma as pessoas possam sentir e apreciar o que é Deus, é magnífico! Sou muito grato por este presente maravilhoso que é a vida!

Aos meus pais Antônia e Edgar. Não tenho palavras por tudo o que sempre fizeram por mim. Pelo amor incondicional, ensinamentos, lições de vida, oportunidades, pelos melhores presentes que são aqueles que vêm do coração. Vocês me ensinaram e continuam me ensinando muita os valores da vida. E eu sou muito grato a tudo o que tenho! Eu posso dizer que sou um conjunto da obra Antônia+Edgar, somado ainda à minha própria personalidade. EU AMO MUITO VOCÊS.

Às minhas irmãs Laurena, Jacy e Mara que mesmo convivendo de longe sempre me tiveram com amor e carinho. Mas preciso agradecer principalmente à minha irmã Elizene, por toda a encrenca, toda a palhaçada, todas as fofocas, os segredos, a confiança, os ensinamentos, a nossa irmandade e um amor incrível.

A toda minha família: tios, tias, primos, primas, sobrinhos, sobrinhas, pela solidariedade, carinho confiança, apoio e por sempre acreditarem em mim! Mas preciso citar aqueles com quem mais compartilhei da minha trajetória acadêmica: minhas tias Cota, Edna e Clara, meus tios Esmeraldo, Velho Elízio Santos e Gatão (vulgo Everaldo); minhas primas e primos Laura, Fofa, Lucinha, Solange (madrinha), Erica, Valdéria, Girleney, Binho, Aninha.

Aos meus cachorros e gatos, que eram filhotinhos e hoje estão enormes, é incrível como eles me fazem tão bem, demonstram todo o amor e companheirismo.

Aos ex-colegas de trabalho da minha mãe, da Prefeitura de Itabuna, especialmente a Ritinha. Vocês me incentivaram muito ao longo dessa jornada, e me ajudaram com muito material para estudo. Um obrigado especial a vocês.

Aos meus amigos, que são muitos e estão todos no meu coração. Agradeço a todos por todos os momentos. Mas gostaria de citar especialmente Jaíza e Mateus, pela amizade de infância, por estarem sempre ao meu lado, pelas palavras, carinho, amor e pela confiança. Minha turma da graduação que sempre me incentivaram desde que eu decidi seguir a carreira acadêmica, especialmente Raíza, Yeslla, Louise, Tiara, Cibele, Lúcia, Leila, Mário, Elias e Tiago, os 4 anos que vivemos foram incríveis, vocês estarão sempre no meu coração. Meus amigos do Sistema: Aline, Babi, Carol, Cleo, Geovane, Keila, Mari, Marcos. “Não éramos Galileu, nem Fenômeno, nem Darwin, muito menos Einstein, éramos Sistema”.

Ao vôlei, esse esporte vitorioso e que eu sou mega apaixonado! Mesmo depois de ter lesionado o ombro direito, o dedo mindinho da mão esquerda e o joelho direito (2 vezes) não vou deixar de amar esse esporte que vêm trazendo inúmeras alegrias para o Brasil desde a década de 90. E por falar em vôlei, não tem como deixar de agradecer meus amigos do vôlei: 1) na Bahia: Felipe e Rió (com quem mais aprendi), Alberto, Jailton, Duda, Adriano, Tiago, Ruberval, Karina, Michael, Wallace; 2) em BH a segunda família que eu tive: Alexandre, Mônica, Júnior Norberto, Sami, Lizardo, Alejandro, Gregório, Victor, Pedro Aranha.

À família *Labviridae*! Lembro-me da primeira vez que entrei no Labvírus: “Jesus amado que laboratório imenso, e quanta gente”. Foram 6 anos e 6 meses. Não tenho palavras para agradecer tudo o que aprendi com todos: técnicos, ICs, mestrandos, doutorandos, pós-docs e professores. Espero que de alguma forma todos aqueles com quem convivi possam ter aprendido alguma coisa. E dentro do Labvírus, ao nosso grupo GAG, vulgo ECOVIR! Jaque, Polizinha, Paula Luize, Carol, Júlia, Ana Teresa, Fernanda Aranha, Lara, Lara, Pedro e tantos outros que passaram. Obrigado por tudo. Especialmente, gostaria de agradecer a Paulinha pela grande amizade, porque sempre fez com que eu me sentisse em casa, sempre inclusiva e prestativa, não importa o que acontecesse sempre com seu bom humor e sorriso no rosto. Kennedy e Ana P pela amizade sincera e honesta, por nunca terem me julgado quando mais achei que seria e por terem me ajudado numa das decisões mais importantes da minha vida. Jaque, pela parceria incrível, pelos perigos que passamos, pela grande amizade e por ter me ajudado a ficar firme e não peder a cabeça nesses últimos momentos. E a todos os outros Labvirianos que sempre estiveram presentes, não briguem comigo porque não citei nomes é muita gente, mas vocês sabem a importância que tiveram na minha trajetória, serão sempre lembrados.

Aos amigos que fiz na Guiana Francesa: Samantha, Laura, Sarkis, Edouard, Eliane, Edith, até o louco do alemão, e aos chefes Anne, Vincent, e principalmente ao Thoisy (que me ajudou e muito), obrigado por fazerem com que tudo tenha sido leve e tranquilo.

Aos amigos que fiz em Atlanta, em especial: Bel, Camille, David, Fernanda Nascimento, Fumi, Joel, Kim, Maureen, Mary Jay, Mayur, Minami. Mas principalmente aos Brasileiros em Atlanta: Fernanda Leal e Viviane eu tenho um carinho imenso por vocês, uma amizade que vou levar pra vida inteira, obrigado pelo apoio, amizade, pelos momentos de carinho, pelos desabafos. A segunda leva de Brasileiros: Karime, Carol, Flávia, Lourdes, Joelma e Peterson, obrigado por tudo, e principalmente por cuidarem de mim durante a lesão do meu joelho e depois da cirurgia.

Aos meus queridos amigos virtuais do grupo Desconstruídos da CAPES: Milena, Luquinhas, Rodrigo, Tizi, Eloah, Daniboy, Flavinha, Naty, Gi, Cris, Nilson e Anderson (vulgo boy dos 500), não tenho palavras pra agradecer o que vocês fizeram por mim de longe, todo o suporte, a zueira, as histórias, as boas risadas e ensinamentos compartilhados. Vocês me ajudaram a não me sentir sozinho! PS: Mi, minha cúmplice, minha confidente, minha conselheira, quem mais ouviu minhas lágrimas e mais me confortou! Seu coração está aqui guardado e nossa amizade eternizada!

Ao pessoal do CDC: Ginny Emerson, Mary Reynolds e Vicky Olson que abriram as portas pra mim. Ao meu chefe Yosh Nakazawa por todos os ensinamentos, pelo apoio e compreensão, principalmente nesta etapa final; ao meu outro chefe Ryan Wallace, com quem inesperadamente eu mais aprendi epidemiologia e mais um pouco de humanidade. Susan e Jillybeth pela paciência de me ajudarem com a logística dos laboratórios; Kathy Shaw te agradeço pelos lanches e por sempre me alegrar, amenizando a saudade de casa; e aos demais do Branch pelas conversas, ensinamentos e momentos divertidos.

Aos professores que eu tive em toda a minha jornada, em especial Tia Jovita, Tia Tina, Tia Rogéria, Damares, os professores do Sistema. Na graduação: Lena, Ana Paula, Sandra Mara, Lise, Bal, Stenio, Fabrício, Bruno, Paulo Melo, Aline. Aos que permitiram meus primeiros passos na Virologia: Lauro Juliano e Sandra Gadelha. E especialmente a Jane que me mostrou o mundo da Imunologia, sempre me incentivou na carreira acadêmica com os melhores conselhos, e quando eu achava que não encontraria um lugar para fazer um bom mestrado e doutorado, me mostrou o Labvirus.

E finalmente à minha querida orientadora Giliane de Souza Trindade. Você me deu uma oportunidade quando eu achava que nunca conseguiria. Uma vez eu pedi a Deus um(a) orientador(a) que estivesse presente quando eu precisasse, e eu ganhei muito mais do que isso: uma professora, uma orientadora, uma mãe, uma amiga. Nossos anos juntos foram de uma cumplicidade que eu jamais imaginaria. Nós até brigamos, mas nos divertimos muito mais. Não tenho palavras para agradecer tudo o que você fez por mim em todos esses anos. Você estará sempre no meu coração.

E por favor, me perdoem se eu esqueci alguém! :)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	iv
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	v
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
I. INTRODUÇÃO.....	11
1.1. Viroses emergentes.....	11
1.2. A Ecologia das viroses emergentes.....	14
1.3. Zoonoses.....	16
1.4. Família <i>Poxviridae</i>	17
1.4.1. Taxonomia.....	17
1.4.2. Morfologia, genoma e ciclo de multiplicação.....	19
1.4.3. Patogênese e manifestações clínicas associadas aos Poxvírus.....	22
1.4.4. <i>Vaccinia virus</i>	24
1.4.5. Vaccinia Bovina.....	25
1.4.6. Epidemiologia.....	26
1.4.7. Ecologia.....	30
1.4.8. Diagnóstico das Ortopoxviroses.....	34
II. JUSTIFICATIVA.....	36
III. OBJETIVOS.....	38
3.1. Objetivo Geral.....	38
3.2. Objetivos Específicos.....	38
IV. PUBLICAÇÕES.....	29
4.1. Artigo 1: Absence of vaccinia virus detection in a remote region of the Northern Amazon forests, 2005–2015.....	39
4.2. Artigo 2: Detection of Vaccinia Virus in Urban Domestic Cats, Brazil.....	45
4.3. Artigo 3: Vaccinia Virus among Domestic Dogs and Wild Coatis, Brazil, 2013-2015.....	52
V. DISCUSSÃO.....	59
VI. CONCLUSÕES.....	65
VII. PERÍODO SANDUÍCHE E AS CONTRIBUIÇÕES DA EXPERIÊNCIA NO EXTERIOR.....	66
7.1. Artigo 4: The Influence of Poverty and Rabies Knowledge on Healthcare Seeking Behaviors and Dog Ownership, Cameroon.....	68
7.2. Artigo 5: The potential effect of improved provision of rabies post-exposure prophylaxis in Gavi-eligible countries: a modelling study.....	88

7.3. Projeto: Rabies mass dog vaccination and evaluation, Haiti, 2017.....	99
VIII. REFERÊNCIAS.....	103
IX. OUTRAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O DOUTORADO.....	120
9.1. Participação em eventos científicos.....	120
9.2. Organização de eventos científicos.....	121
9.3. Revisor de periódicos científicos internacionais.....	121
9.4. Premiações.....	122
9.5. Artigos em fase de redação.....	123

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição global de risco relativo sobre eventos de doenças infecciosas emergentes.....	11
Figura 2: Introdução e estabelecimento de novos patógenos.....	12
Figura 3: Dinâmica da emergência das doenças infecciosas emergentes.....	15
Figura 4: Impacto do entendimento da ecologia das doenças.....	17
Figura 5: Caracterização da partícula dos Poxvírus.....	19
Figura 6: Esquema do ciclo de multiplicação dos Poxvírus.....	21
Figura 7: Representação esquemática do diagrama de Fenner.....	23
Figura 8: Lesões ulcerativas nos testos de vacas e focinho de bezerros infectados pelo VACV.....	26
Figura 9: Lesões presentes nas mãos de ordenhadores infectados pelo VACV.....	27
Figura 10: Lesões atípicas presentes na face de ordenhadores infectados pelo VACV.....	27
Figura 11: Mapa do Brasil mostrando a distribuição temporal da detecção do VACV.....	28
Figura 12: Modelo hipotético do ciclo de transmissão do VACV entre áreas rurais e silvestres.....	32
Figura 13: Mapa do Brasil evidenciando os surtos de VACV descritos até o ano de 2017.....	33
Figura 14: Mapa evidenciando a distribuição do rebanho bovino no Brasil.....	34
Figura 15: Mapa detalhando os locais de estudo, Saint Marc e Gonaives.....	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação dos Poxvírus.....18

LISTA DE ABREVIATURAS

μL – Microlitro

ATI – Proteína formadora do corpúsculo de inclusão do tipo acidófilo

BSA – (*bovine seric albumine*) Albumina sérica bovina

CDC – *Centers for Diseases Control and Prevention* (Centro de Controle e Prevenção de Doenças)

CEV – Vírus envelopado associado à célula

CHIKV – *Chikungunya virus*

CO₂ – Dióxido de carbono

COEP – Comitê de Ética e Pesquisa

CPXV – *Cowpox virus*

DENV – *Dengue virus*

DIE – Doenças Infecciosas Emergentes

DNA – Ácido desoxirribonucléico

dsDNA – DNA de dupla fita

ECTV – *Ectromelia virus*

EEV – Vírus envelopado extracelular

ELISA – *Enzyme-linked immunosorbent assay*

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

HA – Hemaglutinina

HCPS – Síndrome Cardiopulmonar por Hantavírus

HFRS – Síndrome Hemorrágica com Febre Renal

ICTV – *International Committee on Taxonomy of Viruses* (Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus)

IEV – Vírus envelopado intracelular

Ig – Imunoglobulina

IgG – Imunoglobulina G

IL – Interleucina

IMA – Instituto Mineiro de Agropecuária

IMV – Vírus maduro intracelular

IFN – Interferon

ITR – Regiões terminais invertidas

kb – Quilobase

MARNDR – Ministério da Agricultura do Haiti

MARV – *Mariana virus*

MAYV – *Mayaro virus*

MEM – Meio mínimo essencial

ml – mililitro

MPXV – *Monkeypox virus*

mRNA – RNA mensageiro

NK – *Natural killer*

NYCBH – New York City Board of Health

nm – Nanômetro

nM – Nano molar

OIE – Organização Mundial de Saúde Animal

OMS – Organização Mundial da Saúde

OPAS – Organização Pan-Americana da Saúde

OPV – (*Orthopoxvirus*)

OROV – *Oropouche virus*

PBS – Tampão salina fosfato

PCR – (*polimerase chain reaction*) Reação em cadeia da polimerase

pH – Potencial hidrogeniônico

pb – Pares de bases

PRNT – (*Plaque Reduction Neutralizing Test*) Teste de Neutralização por Redução de Placas

RNA – Ácido ribonucleico

SFB – Soro fetal bovino

SLEV – Vírus da Encefalite de *Saint Louis*

SNC – Sistema nervoso central

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TLR – (*toll like receptor*) Receptor do tipo toll

TNF – Fator de necrose tumoral

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

UN – Unidades neutralizantes

VACV – *Vaccinia virus*

VACV-WR – *Vaccinia virus Western Reserve*

VARV – *Variola virus*

VB – Vaccínia Bovina

VBH – *Belo Horizonte virus*

WNV – *West Nile virus* (vírus do Oeste do Nilo)

YFV – *Yellow Fever virus* (vírus da Febre Amarela)

ZIKV – *Zika virus* (vírus Zika)

RESUMO

A maioria das doenças infecciosas emergentes (DIE) são causadas por patógenos zoonóticos. É sugerido que o aumento na ocorrência das DIE se dê por uma falta de vigilância para prevenir e controlar a disseminação de novos patógenos, o que gera um impacto significativo para a saúde pública, e de um modo geral, para as economias locais e globais. O *Vaccinia virus* (VACV) é o agente causador da Vaccinia Bovina (VB), uma zoonose ocupacional que afeta a economia leiteira do Brasil desde o final da década de 90. Entretanto, aspectos sobre a circulação do VACV para diferentes ambientes, populações de mamíferos susceptíveis e com potencial de distribuição e disseminação para outros hospedeiros, além dos riscos para a saúde pública, permanecem pouco explorados. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a distribuição do VACV em diferentes ambientes, fatores de risco/exposição associados, bem como o potencial de disseminação para populações susceptíveis e os riscos para a saúde pública. Foram avaliadas diferentes coleções de mamíferos amostrados em ambientes diversos, dentre os quais: 1) roedores silvestres e marsupiais capturados numa região extremamente preservada da Floresta Amazônica; 2) felinos domésticos de grandes centros urbanos no Brasil; e 3) canídeos domésticos de uma área urbana em Belo Horizonte e quatis (*Nasua nasua*) provenientes do Parque Municipal das Mangabeiras, uma importante área natural fronteira ao ambiente urbano localizada na zona sul da mesma cidade. Para a detecção de anticorpos neutralizantes anti-*Orthopoxvirus* (OPV), foi realizado o ensaio de neutralização por redução de placa em amostras de soro. Alternativamente, um ensaio de ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) foi realizado para a detecção de anticorpos IgG em amostras de soro de roedores silvestres e marsupiais. Além disso, o DNA viral foi detectado através de técnicas de PCR em tempo real e PCR convencional em amostras de soro e swab retal, tendo como alvos os genes C11R, A56R e A26L, sendo os resultados confirmados por sequenciamento. Após as análises sorológicas e moleculares, não foram observadas amostras de roedores, marsupiais ou morcegos positivas para VACV ou OPV, destacando a ausência de circulação deste importante vírus emergente numa região altamente preservada da Floresta Amazônica entre 2005–2015. Entretanto, os resultados demonstraram a detecção do VACV em quatis de área ambiente silvestre limítrofe ao ambiente urbano, destacando uma soroprevalência de 14.4% de anticorpos neutralizantes anti-OPV. Além disso, também foi observada uma soroprevalência de 19.1% em cães domésticos e 5.8% em felinos domésticos. Adicionalmente, foi confirmada a presença de DNA viral em 4 amostras de quatis, 5 amostras de cães e 6 amostras de felinos domésticos, demonstrando a circulação de duas populações distintas de VACV (amostras do grupo virulento e não virulento). Os resultados que apontam a ausência da circulação do VACV na região Amazônica refletem a possibilidade de efeito diluidor, fruto de um ambiente natural altamente preservado, além da grande diversidade de espécies amostradas. Outro fato curioso a ser destacado é a ausência ou número reduzido de rebanhos bovinos no ambiente estudado quando comparado ao Brasil e outros países da América do Sul. Certamente, a maioria dos

estudos sobre VACV no Brasil é focada em surtos envolvendo bovinos e humanos, e especula-se que esses animais atuem como excelentes hospedeiros amplificadores, visto que os bovinos são os principais hospedeiros impactados pela VB devido à natureza da infecção. Por outro lado, os resultados aqui apresentados sugerem a circulação do VACV em ambientes silvestres e urbanos do Brasil, correlacionados aos riscos para a saúde humana e conseqüentemente um impacto na saúde pública. Nossos dados sugerem que estratégias preventivas devem ser incluídas para melhoria da vigilância em regiões de alta probabilidade para o surgimento de DIE, melhoria na detecção de patógenos para um melhor entendimento dos seus reservatórios, bem como a avaliação de alguns fatores de exposição que favorecem o surgimento de patógenos emergentes. Uma melhor compreensão da dinâmica entre patógenos, ambiente e hospedeiros é de grande validade e auxilia na diminuição do impacto para a saúde pública.

Palavras-chave: Doenças infecciosas emergentes, *Orthopoxvirus*, *Vaccinia virus*, ambiente urbano, ambiente silvestre, ecologia, epidemiologia, saúde pública.

ABSTRACT

The majority of emerging infectious diseases (EID) are caused by zoonotic pathogens. It is suggested that the increasing occurrence of EIDs is due to the lack of surveillance to prevent and control the spread of new pathogens, which has a significant impact on public health and, overall, on local and global economies. Vaccinia virus (VACV) is the causative agent of Bovine Vaccinia (BV), an occupational zoonosis that affects the dairy economy in Brazil since the late of 90s. However, aspects regarding VACV circulation in different environments, susceptibility of mammalian populations, and potentially distribution and dissemination to other hosts, in addition to the risks for public health, remain poorly explored. Thus, the goal of this study was to evaluate the distribution of VACV in different environments, associated risk/exposure factors, as well as the potential for dissemination to susceptible populations and the risks for public health. We evaluated different collections of mammals sampled in several environments, among them: 1) wild rodents and marsupials captured in an extremely preserved region of Amazon Forest; 2) domestic cats of large urban centers in Brazil; and 3) domestic dogs from an urban area in Belo Horizonte City and coatis (*Nasua nasua*) from Mangabeiras Municipal Park, an important natural area bordering the urban environment located in the South of Belo Horizonte City. To detect anti-Orthopoxvirus (OPV) neutralizing antibodies, a plaque reduction neutralization assay was performed on serum samples. Alternatively, an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was performed to detect IgG antibodies in serum samples from wild rodents and marsupial. In addition, VACV DNA was detected by real-time and conventional PCR in serum and anal swab samples, targeting C11R, A56R and A26L genes. Molecular results were confirmed by sequencing. After serological and molecular analyzes, no rodent, marsupial or bats samples tested positive for VACV or OPV, highlighting the absence of VACV circulation in a highly preserved region of Amazon Forest between 2005-2015. However, our results demonstrated the detection of VACV in coatis from wild environments bordering an urban area, with a seroprevalence of 14.4% of anti-OPV neutralizing antibodies. In addition, a seroprevalence of 19.1% was also observed in domestic dogs and 5.8% in domestic cats. Viral DNA was detected in 4 coatis, 5 domestic dogs and 6 domestic cats, demonstrating the circulation of two distinct VACV populations (virulent and non-virulent strains). The results indicate the absence of VACV circulation in the Amazon region, highlighting the possibility of a dilution effect, probably due to the highly preserved natural environment studied, although a great diversity of species were sampled. Another curious fact to be highlighted is the absence or reduced number of cattle herds in the studied environment when compared to Brazil and other South American countries. Certainly, most studies regarding VACV in Brazil were focused on outbreaks involving bovines and humans, and it is speculated that these animals could act as an excellent amplifying hosts, since the cattle are the main impacted hosts during BV due to the nature of infection. On the other hand, the results presented here suggest the circulation of VACV in wild and urban environments in Brazil, correlating with the risks for human health and consequently impact on

public health. Our data also suggests that preventive strategies should be included to improve the surveillance in regions of high probability for the occurrence of EID such as VACV. Furthermore, the improvement of pathogens detection to the better understanding of their reservoirs, as well as the evaluation of some exposure factors that could favor emerging pathogens should be also considered. A further investigation of the dynamics between pathogens, environment, and hosts will be of great validity and could help reduce the impact on public health.

Key-words: Emerging infectious diseases, *Orthopoxvirus*, *Vaccinia virus*, urban environment, wild environment, ecology, epidemiology, public health.

I. INTRODUÇÃO

1.1. Vírus emergentes

As doenças infecciosas emergentes são geralmente caracterizadas como doenças que recentemente apareceram numa determinada população, ou como doenças já existentes, mas que estão aumentando gradativamente em incidência e/ou distribuição geográfica (Figura 1). Por outro lado, as doenças infecciosas re-emergentes são aquelas que reaparecem em novas localidades ou populações após terem sua incidência diminuída drasticamente ou mesmo após aparente controle ou eliminação, tornando-se um novo desafio para saúde pública. De forma geral, essas doenças ocorrem quando, por diferentes razões, o equilíbrio natural é alterado. (DOMINGO, 2010; JANES *et al.*, 2012; MORENS & FAUCI, 2013). A presença das doenças emergentes e re-emergentes impõe uma série de desafios para a saúde pública em geral e para a ciência epidemiologia em particular.

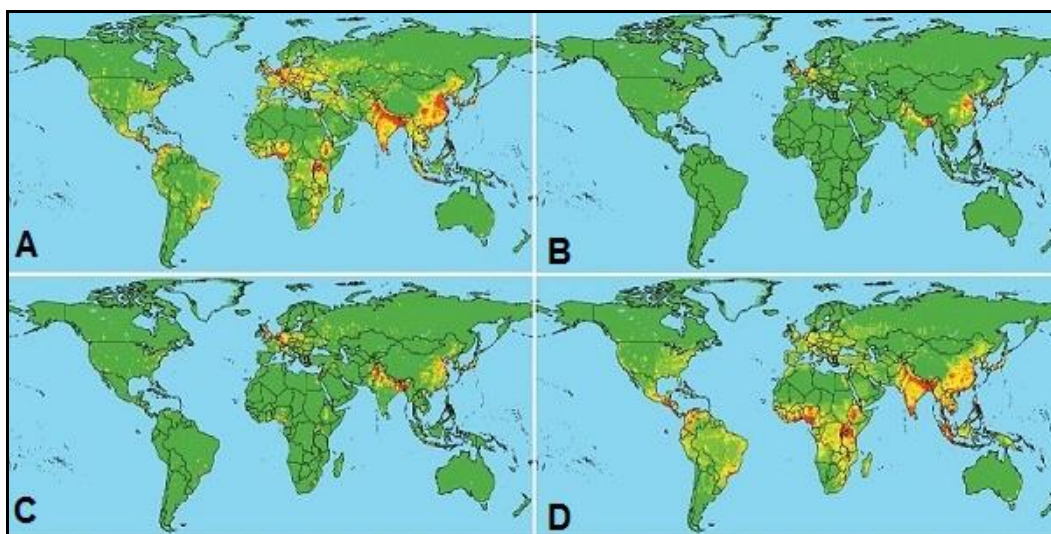


FIGURA 1: DISTRIBUIÇÃO GLOBAL DE RISCO RELATIVO SOBRE EVENTOS DE DOENÇAS INFECCIOSAS EMERGENTES (DIE). (A) DIE causadas por patógenos zoonóticos de animais silvestres; (B) DIE causadas por patógenos zoonóticos de animais não silvestres; (C) DIE causadas por patógenos resistentes a medicamentos; (D) DIE causadas por patógenos transmitidos por vetores (JONES *et al.*, 2008).

No Brasil, há uma variedade considerável de ecossistemas, com gigantesca diversidade, que se encontram cada vez mais sujeitos à ação antrópica devido à exploração rápida e fácil de recursos naturais. O avanço da agricultura e da pecuária nas áreas naturais vem proporcionando contato entre as populações humanas e seus animais domésticos com as populações de animais silvestres no seu habitat natural. Esse contato facilita a disseminação de agentes infecciosos que antes viviam em equilíbrio para novos hospedeiros e ambientes. Como consequência direta dessas interações, esses agentes infecciosos passam a explorar

novos nichos (tanto em nível de ambiente quanto de hospedeiros), podendo causar um grande impacto na saúde pública (Figura 2) (KILPATRICK, 2011; KARESH *et al.*, 2012).

A maioria das infecções emergentes parece ser causada por patógenos já presentes no ambiente. A introdução de um determinado agente em uma nova população hospedeira, seguida pelo seu estabelecimento e disseminação, além de uma vantagem seletiva em níveis genéticos associada à patogenicidade e transmissão, favorece a infecção de novas populações e o aparecimento de novas doenças. Em muitos casos, os agentes são zoonóticos e transpõem as barreiras de seus hospedeiros naturais para a população humana (JONES *et al.*, 2008; KARESH *et al.*, 2012).

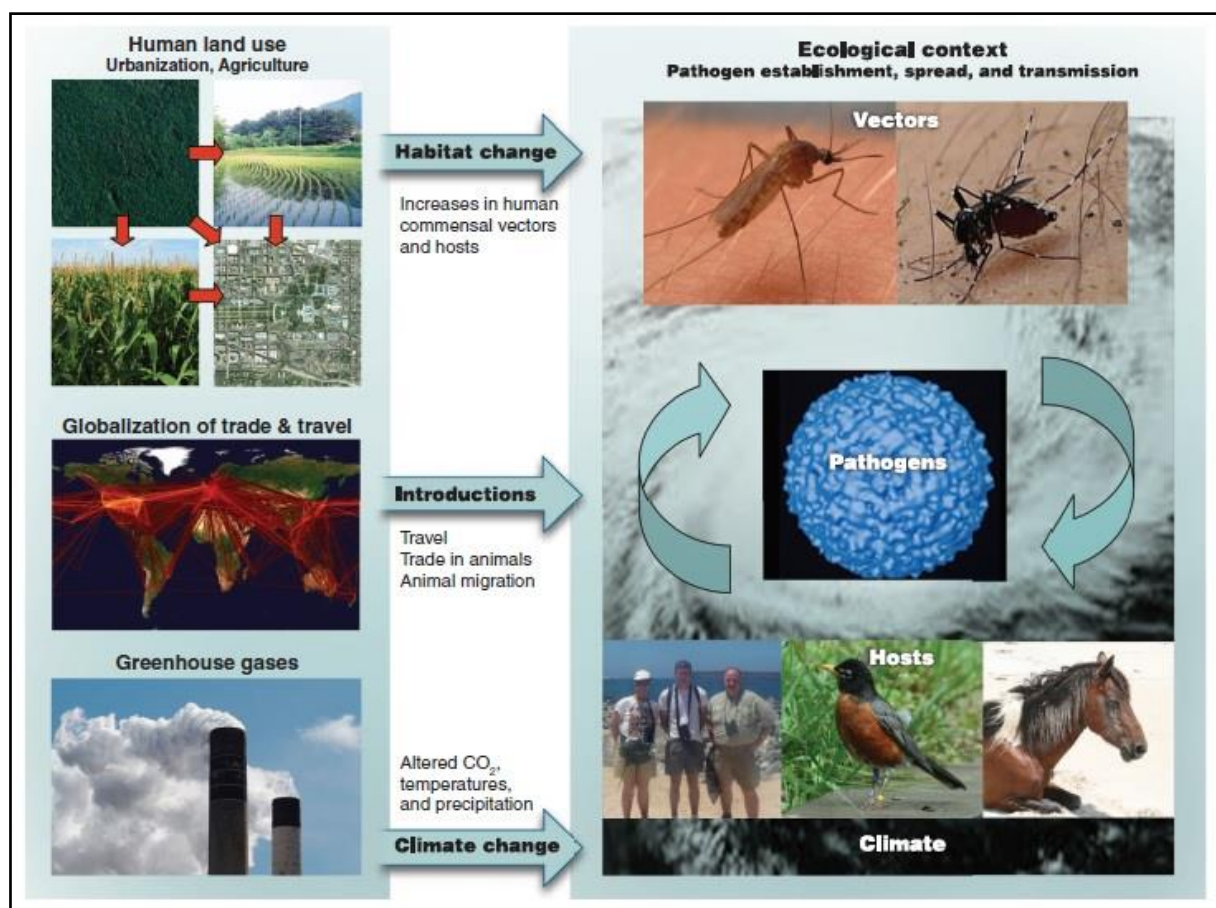


FIGURA 2: INTRODUÇÃO E ESTABELECIMENTO DE NOVOS PATÓGENOS. Processos antropogênicos que facilitam a introdução e estabelecimento de novos patógenos e aumentam a sua transmissão: comércio, viagens e circulação de animais contribuem para a introdução de novos patógenos. O clima e a abundância e ecologia alimentar de vetores determinam o estabelecimento e intensidade de transmissão. O uso da terra modifica comunidades animais que servem como hospedeiros e vetores de patógenos, e a mudança climática altera o aumento da circulação de patógenos e vetores (KILPATRICK, 2011).

Diversos fatores podem estar envolvidos na determinação da emergência e reemergência de doenças infecciosas, dentre os quais podemos destacar fatores demográficos, ambientais, políticos, relacionados à saúde pública e à plasticidade genética dos próprios micro-organismos, em relação a sua adaptação a novos hospedeiros (DOMINGO, 2010; KARESH *et al.*, 2012).

Ainda, a rapidez dos meios de transporte tem proporcionado o deslocamento de pessoas e vetores de um continente para outro, bem como o contato direto do homem com áreas remotas, nas quais existe a possibilidade de haver agentes infecciosos até então desconhecidos (Figura 2). Igualmente, a importação de animais pode proporcionar o contato de novos agentes causadores de doença até então desconhecidos para o convívio humano (PAVLIN *et al.*, 2009; KILPATRICK & RANDOLPH *et al.*, 2012). Entre as viroses emergentes, as que guardam especial preocupação são aquelas de fácil transmissão, devido à possibilidade de rápida disseminação.

Dentre exemplos de viroses emergentes podemos citar as febres hemorrágicas virais causadas por filovírus (Ebola e Marburg) e a febre de Lassa, causada por um vírus de RNA pertencente à família *Arenavirus*, que são circulam na África e nas Américas, (FTIKA & MALTEZOU, 2013). Alguns vírus da família *Paramyxoviridae* também merecem destaque, como o Hendra, identificado na Austrália em 1994 afetando equídeos e humanos; e o Nipah, identificado na Malásia em 1999 como agente causador de encefalite em humanos, com altas taxas de letalidade (ALJOFAN, 2013). Podemos ainda citar os hantavírus, que possuem ampla distribuição geográfica e são mantidos na natureza pela infecção crônica de roedores. As manifestações clínicas variam, a depender da espécie do vírus, em Febre Hemorrágica com Síndrome Renal (HFRS), que ocorre principalmente na Europa, ou Síndrome Cardiopulmonar por Hantavírus (HPCS), cujos casos são descritos com mais frequência nas Américas, em especial no Brasil (BI *et al.*, 2008; JONSSON *et al.*, 2010; MACNEIL *et al.*, 2011).

Outros agentes importantes são os arbovírus, que são mantidos na natureza em ciclos complexos envolvendo vetores artrópodes (principalmente mosquitos e carrapatos). Nesse grupo estão inclusos vírus da família *Flaviviridae*: *Yellow Fever virus* (YFV), *Dengue virus* (DENV), *Saint Louis Encephalitis virus* (SLEV), e os mais recentes introduzidos no Brasil, *West Nile virus* (WNV) e *Zika virus* (ZIKV), dentre outros; vírus da família *Togaviridae*, gênero *Alphavirus*: *Mayaro virus* (MAYV) e *Chikungunya virus* (CHIKV), responsáveis por doença febril aguda em países da América do Sul, África e Europa respectivamente; e da família *Bunyaviridae*: *Oropouche virus* (OROV), que causa surtos semelhantes à dengue (COFFEY *et al.*, 2013; LONDONO-RENTERIA *et al.*, 2016; TABACHNICK, 2016).

A emergência dos poxvírus anos após a erradicação da varíola também vem ganhando importância na medicina humana e veterinária. Os vírus do gênero *Orthopoxvirus* (OPV) possuem atualmente uma distribuição global devido principalmente à grande expansão demográfica, que coloca humanos e animais domésticos em contato com o ambiente silvestre. Dentre eles podemos destacar o *Cowpox virus*, amplamente distribuído pela Europa (ESSBAUER *et al.*, 2010), o *Monkeypox virus*, que ocorre naturalmente na África (REYNOLDS *et al.*, 2012), o *Buffalopox virus*, que circula na Índia (SINGH *et al.*, 2012) e o *Vaccinia virus*, encontrado na América do Sul, principalmente no Brasil (KROON *et al.*, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2017).

1.2. A Ecologia das Víroses Emergentes

O surgimento das viroses emergentes, tanto recentes quanto históricas, pode ser considerado como uma consequência lógica da ecologia do agente viral de explorar novos nichos e adaptar-se a novos hospedeiros (Figura 3). O acesso a novos nichos parece ser mediado por ações antropogênicas que incluem, na maioria dos casos, a exploração do solo, desmatamento, extração de recursos naturais e sistemas intensos de produção pecuária (KARESH *et al.*, 2012). Esses fatores levam a alterações na dinâmica de animais silvestres com significativa perda de habitats, o que sugere o aumento da interação entre esses animais e os seres humanos, juntamente com animais domésticos e animais de produção. Esses fatores justapostos contribuem significativamente para o aparecimento de novas viroses emergentes (Figura 2) (DASZAK *et al.*, 2004; PATZ *et al.*, 2004). A emergência das doenças infecciosas atua, portanto, através de marcadores de processos ecológicos nos quais participam ao menos duas populações, a do hospedeiro e a do agente infeccioso e, frequentemente, várias outras, entre vetores e reservatórios (Figuras 2 e 3). O fato de um hospedeiro em potencial adquirir uma infecção também depende do seu estado geral de saúde, assim como da sua predisposição genética (KARESH *et al.*, 2012).

Praticamente todos os patógenos vistos como novos existiram previamente na natureza e o surgimento de novas doenças tem sido auxiliado pela degradação ambiental. Entretanto, a importação para novos locais não garante a sobrevivência do agente infeccioso no novo nicho a ser explorado. Para garantir o sucesso e estabelecimento da infecção em novas populações, o agente deve encontrar um ambiente adequado e uma população hospedeira susceptível e permissiva. Geralmente, habitats que foram alterados pela atividade antrópica ou por desastres naturais são mais vulneráveis, pois espera-se que predadores e competidores sejam eliminados e, assim, criadas oportunidades para novas espécies serem introduzidas (CASCIO *et al.*, 2011; KILPATRICK *et al.*, 2012). Além disso, é importante destacar que a própria interação entre espécies (através da competição por território ou alimentos, por exemplo) pode contribuir para a introdução e estabelecimento de novos patógenos em novas populações.

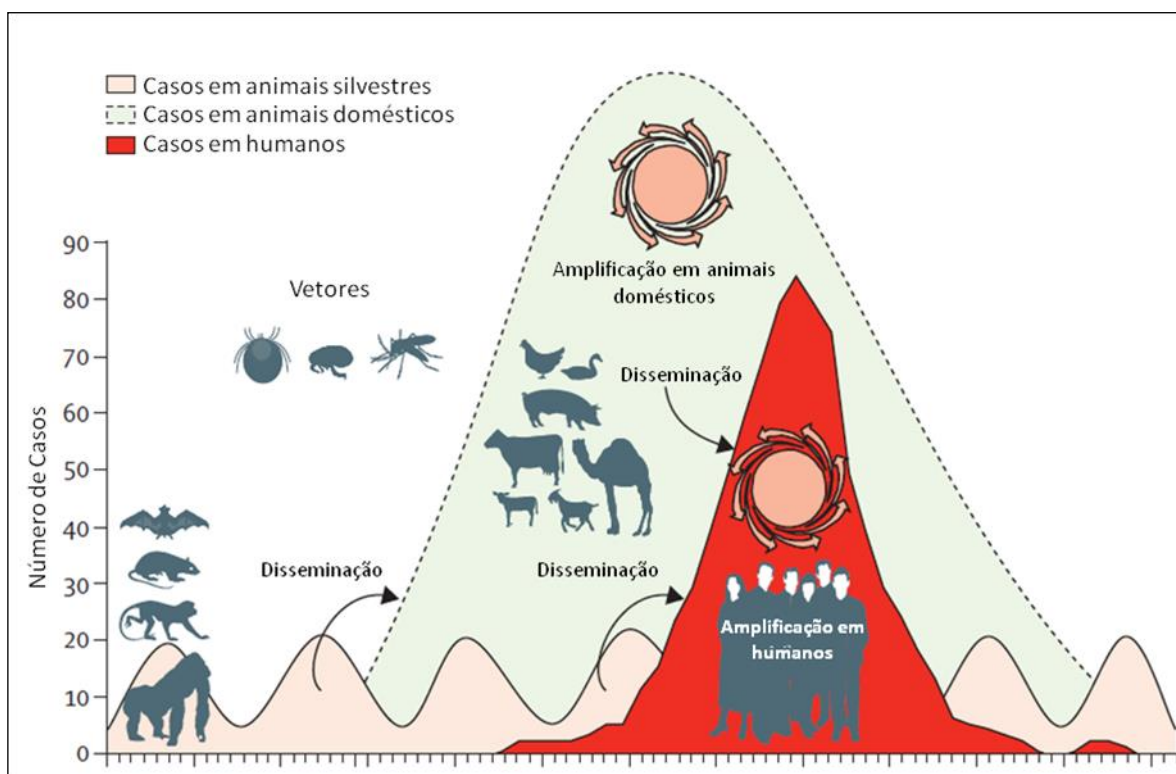


FIGURA 3: DINÂMICA DE EMERGÊNCIA DAS DOENÇAS INFECCIOSAS EMERGENTES. A figura destaca a transmissão e disseminação de um agente infeccioso para a população humana. Após a introdução do agente, proveniente de animais silvestres (rosa), o mesmo se move entre populações de animais domésticos (verde claro), o que amplia a capacidade de transmissão de patógenos para a população humana (vermelho) (KARESH *et al.*, 2012 modificado).

Além disso, a disseminação de um agente infeccioso requer a vulnerabilidade da população alvo, o que dependerá não somente de sua virulência e velocidade de transmissão, mas, também, da imunidade da população. Cada um desses passos é complexo e combina fatores biológicos e sociais que não são constantes. Estes fatores vão desde as condições de habitação até a disponibilidade de alimentos e grau de exposição a outros eventos que não agentes infecciosos (MORSE *et al.*, 2012; WARGO & KURATH, 2012).

É importante ressaltar que o processo de adaptação faz parte da evolução das espécies. Análises recentes demonstram que os patógenos virais emergentes se destacam entre a segunda maior causa de DIE no planeta e dentre estes, os vírus com genomas RNAs são os mais frequentes (JONES *et al.*, 2008). Os vírus de RNA se destacam pelo fato de apresentarem grande plasticidade genética que culmina em sua maior capacidade de se adaptar a novos hospedeiros, incluindo os seres humanos (JONES *et al.*, 2008). Esta elevada plasticidade genética se deve ao fato das enzimas virais RNA polimerase e transcriptase reversa não serem capazes de corrigir erros que ocorrem durante a replicação do RNA. Além disso, alguns vírus RNA possuem genomas segmentados, o que proporciona a estes agentes a possibilidade de sofrerem

rearranjos genéticos; portanto, estes vírus apresentam maior capacidade de se adaptar a novos hospedeiros, incluindo os seres humanos (JONES *et al.*, 2008). Dentre as viroses zoonóticas emergentes, JONES e colaboradores (2008) também destacam que 71,8% dos eventos DIE zoonóticos foram causados por patógenos relacionados originalmente com a vida silvestre, como, por exemplo, o vírus Ebola, que reemergiu na região Oeste da África em 2013 com grande potencial de disseminação mundial, podendo consequentemente gerar um vasto impacto na saúde pública (ALEXANDER *et al.*, 2015).

1.3. Zoonoses

A maioria das doenças emergentes que acometem a população humana tem como fonte de infecção os animais. Acredita-se que mais de 60% das doenças emergentes que têm afetado a população humana nas últimas décadas são provenientes de patógenos animais, classificados como zoonóticos (KARESH *et al.*, 2012; MCCLOSKEY *et al.*, 2014). As zoonoses podem ser classificadas em quatro categorias: 1) Zoonose direta, as quais são transmitidas de um hospedeiro vertebrado infectado a um hospedeiro susceptível, por contato direto, fômites ou por um vetor mecânico, como, por exemplo, a Raiva e a Hantavirose; 2) Ciclozoonoses, que requerem mais de uma espécie de hospedeiro vertebrado para conclusão do ciclo de vida do agente infeccioso, como a Toxoplasmose e a Hidatidose, parasitose intestinal que completa seu ciclo em cães e ovinos, podendo ser transmitida ao homem; 3) Metazoonoses, que são transmitidas por vetores invertebrados, nas quais o agente infeccioso se multiplica e apresenta um período de incubação antes que ocorra a transmissão para outros hospedeiros vertebrados, como os arbovírus, por exemplo; 4) Saprozoonoses, as quais requerem um hospedeiro vertebrado e um ambiente fora do hospedeiro, como esquistossomose (causada pelo *Schistosoma mansoni*) (HUBÁLEK, 2003).

As entidades internacionais relacionadas à saúde animal e à humana, como a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), a Organização das Nações Unidas para Agricultura e a Alimentação (FAO) e a Organização Mundial de Saúde (OMS), têm monitorado o perfil de saúde das populações animais e humanas e detectado novas doenças, assim como mudanças nas taxas de incidência das doenças já conhecidas, através da melhoria das técnicas diagnósticas e epidemiológicas que têm resultado na detecção de agentes etiológicos novos ou reemergentes (Figura 4) (KARESH *et al.*, 2012; KILPATRICK *et al.*, 2012; MORSE *et al.*, 2012). O cruzamento de dados epidemiológicos em relação às doenças humanas, bem como os dados que avaliam o comportamento da vida silvestre e de animais domésticos e a compreensão da dinâmica populacional, podem ser úteis para modelar o risco de novas doenças para seres humanos (Figura 4).

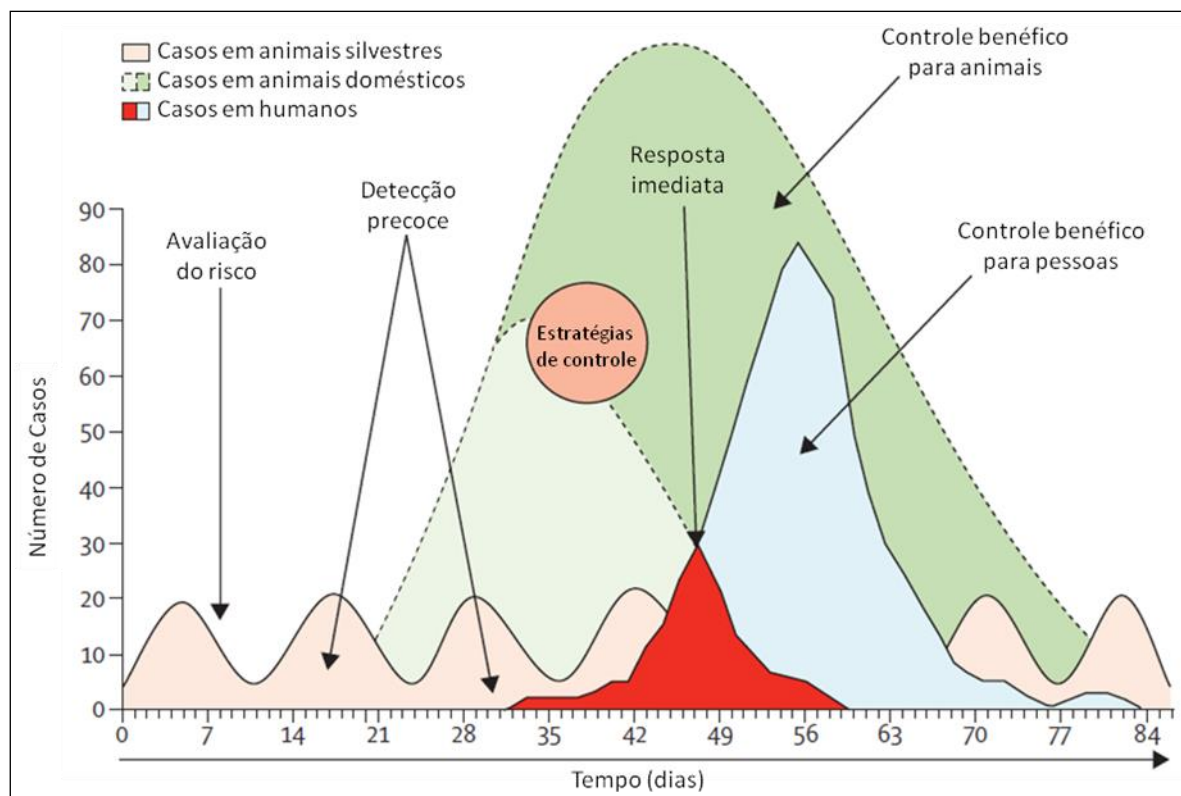


FIGURA 4: IMPACTO DA VIGILÂNCIA SOBRE A RESPOSTA RÁPIDA ÀS DIE. Os esforços para detecção e controle precoce das doenças infecciosas emergentes e/ou reemergentes diminuem a incidência da doença na população humana (azul claro) e na população animal (verde escuro). As setas mostram a transmissão inter-espécies (KARESH et al., 2012 modificado).

A Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) considera as condições demográficas e socioeconômicas como um grande desafio relacionado à interface de saúde humana e animal. Além disso, a grande biodiversidade presente nas Américas, como a região amazônica, por exemplo, interage de forma sinérgica com a população humana, o que pode representar uma ameaça potencial através da formação de um ambiente no qual os patógenos podem emergir e se disseminar através da interface do humano/animal, afetando o turismo, o comércio e outros setores econômicos importantes para a região (OPAS, 2014).

1.4. Família *Poxviridae*

1.4.1. Taxonomia

Os poxvírus, membros da família *Poxviridae*, constituem um grupo de patógenos virais conhecidos por infectarem uma variedade de organismos, incluindo insetos, répteis, aves e mamíferos, sendo divididos em duas subfamílias: *Entomopoxvirinae*, que infectam invertebrados, e *Chordopoxvirinae*, que infectam

vertebrados (FENNER *et al.*, 1988; MCFADDEN, 2005; DAMON, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2017A). Nesta última, encontram-se o *Variola virus* (VARV) e o *Molluscum contagiosum virus*, que são patógenos humanos estritos, e outros agentes virais que podem ser transmitidos de animais para os seres humanos, caracterizando-se como agentes virais zoonóticos, como o *Monkeypox virus* (MPXV), *Cowpox virus* (CPXV) e o *Vaccinia virus* (VACV).

A subfamília *Chordopoxvirinae* é dividida em doze gêneros (Tabela 1), dos quais quatro possuem espécies capazes de infectar o homem, que são *Orthopoxvirus*, *Parapoxvirus*, *Yatapoxvirus* e *Molluscipoxvirus* (ICTV, 2017). É importante destacar o gênero *Orthopoxvirus* (OPV) pois este abriga patógenos de importância em medicina humana e veterinária, dentre os quais merecem destaque: 1) o VARV, que encontra-se erradicado desde 1980, mas que causou grande impacto na população humana causando a morte de aproximadamente 500 milhões de pessoas no século passado; 2) o VACV, um dos vírus mais estudados e que foi usado como vacina para erradicação da varíola; 3) o MPXV, de origem africana, com características clínicas e modo de transmissão semelhante à varíola e que causou um surto acidental nos Estados Unidos em 2003 pela importação de animais de estimação; e 4) o CPXV, que circula em roedores na Europa e Oriente Médio, vindo a infectar felinos e outros mamíferos e, eventualmente, o homem (FENNER *et al.*, 1989; SHCHELKUNOV, *et al.*, 2005; ICTV, 2017).

Tabela 1 – Classificação dos Poxvírus.

Família	Subfamília	Gênero	Nº de espécies	Protótipo
		<i>Avipoxvirus</i>	10	<i>Fowlpox virus</i>
		<i>Capripoxvirus</i>	3	<i>Sheeppox virus</i>
		<i>Centapoxvirus</i>	1	<i>Yokapox virus</i>
		<i>Cervidpoxvirus</i>	1	<i>Mule deerpox virus</i>
		<i>Crocodylidpoxvirus</i>	1	<i>Nile crocodilepox virus</i>
<i>Poxviridae</i>	<i>Chordopoxvirinae</i>	<i>Leporipoxvirus</i>	4	<i>Myxoma virus</i>
		<i>Molluscipoxvirus</i>	1	<i>Molluscum contagiosum virus</i>
		<i>Orthopoxvirus</i>	10	<i>Vaccinia virus</i>
		<i>Parapoxvirus</i>	4	<i>Orf virus</i>
		<i>Suipoxvirus</i>	1	<i>Swinepox virus</i>
		Não classificado	2	<i>Squirrelpox virus</i>
		<i>Yatapoxvirus</i>	2	<i>Yaba monkey tumor virus</i>

Fonte: International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), 2018; disponível em: www.ictvonline.org/.

Recentemente, novas espécies de OPV implicadas em surtos zoonóticos vêm sendo descritas. Em 2015, o vírus Akhmeta foi isolado e caracterizado durante um surto que acometeu criadores de gado com suspeita de infecção por CPXV, na Geórgia (VORA *et al.*, 2015). No entanto, a nova espécie ainda não consta na classificação estabelecida pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV). Também em 2015, foi relatado um caso de um indivíduo com infecção por OPV na região do Alaska (SPRINGER *et al.*, 2015). Algumas hipóteses para explicar o caso seriam: 1) infecção através do contato direto com algum indivíduo previamente infectado ou através de fômites; ou 2) exposição a um animal silvestre. Ainda no mesmo ano, um surto causado por uma espécie de OPV (identificada como vírus Abatino) foi descrito na Itália, levando a óbito 12 primatas da espécie *Macaca tonkeana* (família *Cercopithecidae*) (CARDETI *et al.*, 2017).

1.4.2. Morfologia, genoma e ciclo de multiplicação

As partículas virais dos poxvírus são grandes e complexas em comparação com a maioria de outros vírus animais (Figura 5), com um tamanho que pode chegar a aproximadamente 450nm (MOSS, 2013). São pleomórficas, apresentando-se na forma oval ou semelhante a um tijolo, com uma membrana externa de natureza lipídica tendo aproximadamente 5-6 nm de espessura (Figura 5) (MOSS, 2013). A partícula contém em seu cerne elementos importantes para a replicação do seu genoma, como a poli A polimerase, a RNA polimerase dependente de DNA, enzima de metilação e fatores transcricionais (FENNER, 1988; MOSS, 2013). O interior da partícula é complexo, constituído pelo genoma de DNA dupla fita localizado na parte interna do nucleocapsídeo, um cerne em forma de haltere e corpúsculos laterais ancorados entre as duas concavidades e a membrana externa (Figura 5) (DAMON, 2013).

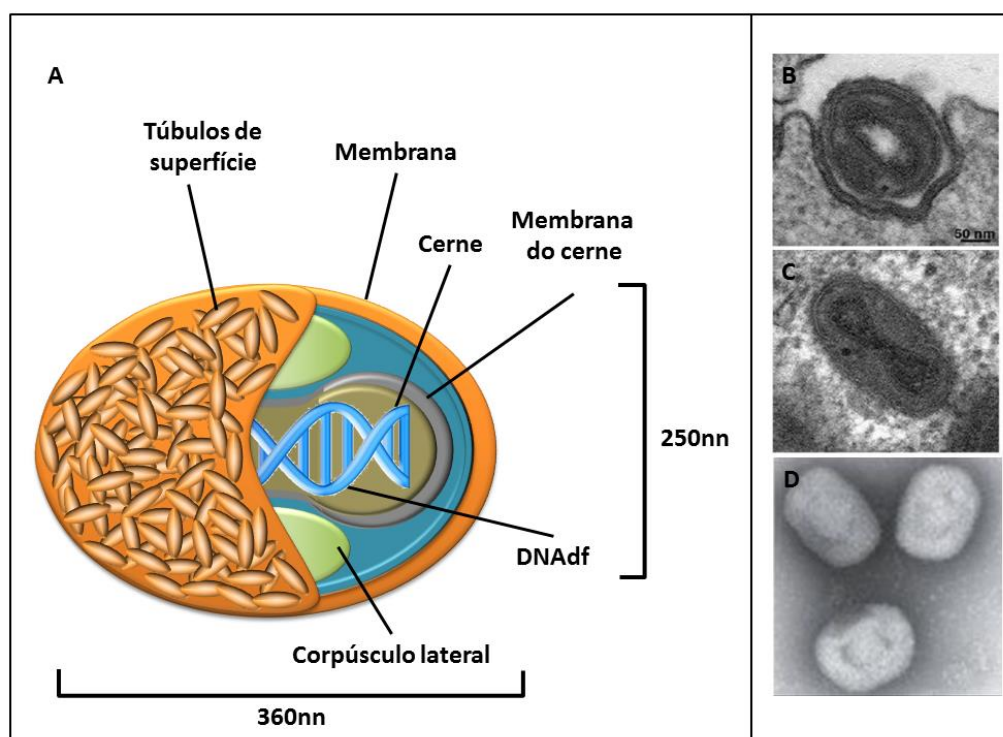


FIGURA 5: MORFOLOGIA E ESTRUTURA DOS POXVÍRUS. A: Representação esquemática da partícula de poxvírus. B: Microscopia eletrônica do vírus envelopado extracelular (EV). C: Microscopia eletrônica do vírus maduro intracelular (IMV). D: Microscopia eletrônica mostra partículas em forma de tijolo. Fonte: MOSS, 2001 – modificado por Laboratório do Vírus/ UFMG; MOSS, 2013 – com modificações; VORA *et al.*, 2015.

O genoma dos poxvírus (uma molécula de DNA linear de fita dupla – dsDNA) possui um tamanho de 130–375kb, que pode variar de uma amostra viral para outra. O genoma apresenta uma região central altamente conservada e regiões terminais invertidas (ITRs), que consistem em sequências repetidas idênticas, com um conteúdo rico em ligações A–T e orientadas em direções opostas no genoma. As ITRs têm importante função na formação de concatâmeros durante a replicação do genoma (GUBSER *et al.*, 2004; MOSS, 2013).

Diferentemente da maioria dos vírus de DNA, a multiplicação dos vírus da família *Poxviridae* ocorre inteiramente no citoplasma da célula hospedeira (assim como observado para Mimivirus e Iridovirus) (Figura 6), sendo esta uma das características marcantes dessa família (compartilhada apenas com a família *Asfaviridae*) (DAMON, 2013). A partícula viral possui quase todos os elementos necessários para a sua multiplicação, incluindo RNA polimerase dependente de DNA, enzima de metilação, poli A polimerase e fatores de transcrição de genes precoces (MOSS, 2006; 2013).

Após a penetração na célula e liberação do nucleocapsídeo no citoplasma, a expressão gênica ocorre de forma temporal, de modo que a maquinaria transcricional do vírus é ativada pelos fatores de transcrição de genes precoces presentes no nucleocapsídeo (BROYLES, 2003; GUBSER *et al.*, 2004; DOWER *et al.*, 2011; YANG *et al.*, 2011). Proteínas moduladoras da resposta imune e fatores de crescimento celular são então traduzidos e, em seguida, ocorre o desnudamento secundário, no qual o DNA começa a ser replicado, formando concatâmeros. Logo após, os genes intermediários são transcritos e traduzidos em proteínas que atuam na replicação do DNA viral e outras proteínas que funcionarão como fatores de transcrição para os genes tardios, que por sua vez codificam fatores de transcrição precoces que são empacotados com a RNA polimerase nas novas partículas, além de outros elementos (BROYLES, 2003; MCFADDEN, 2005; MOSS, 2006; MCLENNAN, 2007). Este tipo de programação genética é conhecido como um mecanismo de cascata porque os produtos de cada fase regulam a fase seguinte.

A morfogênese ocorre nas fábricas virais, que consiste em regiões citoplasmáticas desprovidas de organelas celulares (YODER *et al.*, 2004; MCFADDEN, 2005). As primeiras estruturas morfológicamente distintas são as crescentes virais constituídas pela membrana do retículo endoplasmático que é rompida por proteínas

virais, originando uma membrana aberta sendo estabilizada pelas proteínas de arcabouço (scaffolds) D13 (MOSS, 2013; LIU *et al.*, 2014). Estas estruturas dão origem a partículas esféricas, chamadas de vírus imaturos (IVs). Após clivagens proteolíticas de elementos do capsídeo e condensação do cerne viral, os IVs dão origem aos vírus maduros intracelulares (IMVs) (SMITH *et al.*, 2002; ROBERTS & SMITH, 2008; MOSS, 2013).

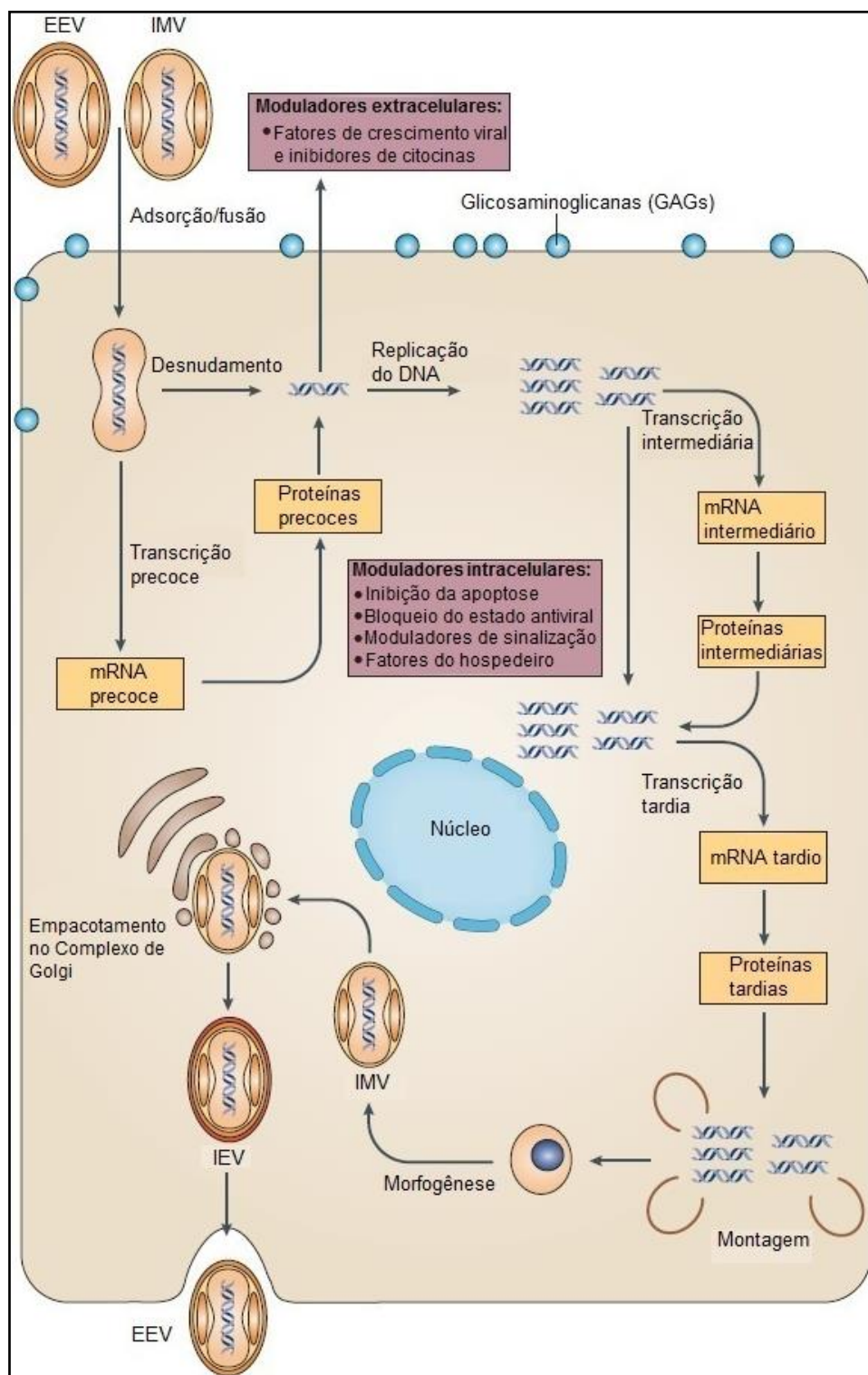


FIGURA 6: ESQUEMA DO CICLO DE MULTIPLICAÇÃO DOS POXVÍRUS: As duas formas infecciosas dos poxvírus, o vírus envelopado extracelular/vírus envelopado associado à célula (EEV/CEV) e o vírus maduro intracelular (IMV), iniciam seu ciclo com a adsorção e penetração na célula hospedeira. Em seguida liberam o cerne no citoplasma, processo denominado desnudamento primário. Ainda no cerne, ocorre a transcrição de genes precoces e após a síntese das proteínas precoces ocorre a liberação do genoma viral no citoplasma, desnudamento secundário. Enzimas sintetizadas na etapa inicial da infecção atuam na replicação do DNA viral. Após o início da replicação deste DNA, ocorre a transcrição dos genes intermediários e tardios. Finalmente, ocorre a montagem dos IMV, que se acumulam no citoplasma e são liberados através da lise celular. Uma parte dos IMV adquire duas camadas de membrana adicionais, nas cisternas trans-Golgi e, posteriormente, são propulidos por meio de processos dependentes das caudas de actina para as células vizinhas (CEV) ou liberadas no meio extracelular (EEV) (Fonte: Adaptado de MCFADDEN, 2005).

1.4.3. Patogênese e manifestações clínicas associadas aos Poxvírus

A infecção por poxvírus varia desde lesões pustulares localizadas e auto limitantes a doença sistêmica generalizada (Figura 7). Uma única espécie da família pode estar associada a diferentes níveis de patogenicidade, dependendo da virulência da amostra, da via de infecção e do tipo de hospedeiro (MCFADDEN, 2005; MOSS, 2007; DAMON, 2013). As infecções causadas por VACV e CPXV ocorrem através de microabrasões na pele, associadas a lesões ulcerativas. Outros vírus como VARV, MPXV e *Camelpox virus* utilizam como via de entrada o trato respiratório ocasionando infecções sistêmicas (MCFADDEN, 2005; MOSS, 2013; DAMON, 2011; 2013).

Outra via natural de infecção para os OPV é a mucosa oral. Bezerros que se alimentam das vacas infectadas por VACV desenvolvem lesões na cavidade oral e também no focinho. Além disso, a transmissão de MPXV entre populações de esquilos pode ocorrer quando sementes de palmeiras são contaminadas através de um animal infectado e esse alimento é consumido por outros (FENNER *et al.*, 1988). Outro fato semelhante é observado para CPXV, em que felinos domésticos e selvagens são infectados através da via oral ao predarem roedores que são reservatórios do vírus (CORAS *et al.*, 2005).

Os sintomas e a patogênese resultantes da infecção por OPV são influenciados pelo tropismo viral e pelas respostas imune e inflamatória do hospedeiro. As manifestações dependem de alguns fatores, como espécie de OPV envolvida na infecção, rota de entrada do patógeno, gênero/espécie do hospedeiro e estado imunológico do mesmo (MCFADDEN, 2005; DAMON, 2013). A doença desenvolvida pode ser classificada em sistêmica, decorrente da infecção por VARV, MPXV e Ectromelia virus (ECTV), ou localizada, como ocorre com *Molluscum contagiosum virus*. O CPXV manifesta-se de forma localizada em humanos e bovinos, enquanto que em felinos resulta em infecção sistêmica (FENNER, 1988; ESTEBAN & BULLER, 2005).

Recentemente, RIVETTI JR e colaboradores sugeriram que a infecção pelo VACV em bovinos experimentalmente infectados poderia ocorrer de forma sistêmica (com curso crônico) devido a detecção de DNA de VACV nas fezes por um longo período (67 dias após a infecção), e devido a detecção de DNA nos órgãos linfáticos (RIVETTI JR *et al.*, 2013). Os resultados deste estudo experimental também sugerem que infecção por VACV em bovinos não está apenas limitada à resolução das lesões porque a presença do vírus foi observada em fezes por um período mais longo após a cicatrização das lesões, o que ocorreu em 18 ppp em média. Segundo os autores, após a penetração e replicação no local de entrada, as partículas virais poderiam se espalhar através dos vasos linfáticos, atingindo os linfonodos regionais, permitindo que o vírus se dissemine pelo órgão do hospedeiro. Posteriormente, o vírus chegaria ao intestino onde seria eliminado através das fezes, corroborando a detecção de DNA viral nas fezes dos animais infectados (RIVETTI JR *et al.*, 2013).

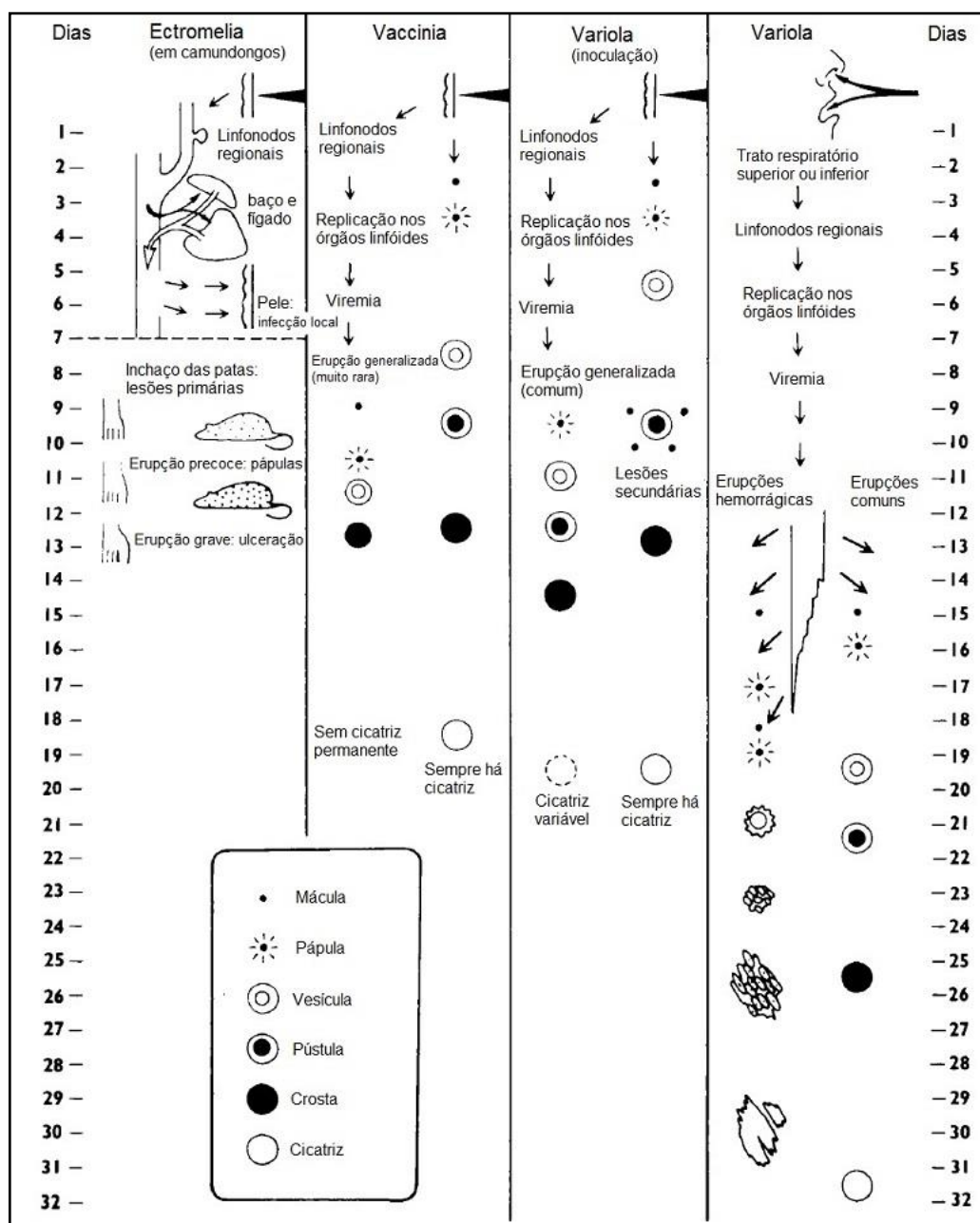


Figura 7: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO DIAGRAMA DE FENNER: A figura evidencia a propagação do vírus ao redor do corpo e a evolução e cura de lesões de pele em um sistema modelo murino para o *Ectromelia virus*, *Vaccinia virus* e *Variola virus*. A coluna da direita representa lesões no local da inoculação e a coluna da esquerda representa lesões generalizadas (FENNER, 1988 com modificações).

1.4.4. *Vaccinia virus*

O VACV foi o vírus utilizado como vacina contra a varíola, substituindo o CPXV. Vale destacar que a similaridade antigênica entre os OPVs permitiu o sucesso da campanha de vacinação contra a varíola na qual o VACV foi utilizado como vacina (FENNER, 1988; JACOBS *et al.*, 2009), induzindo uma forte resposta de anticorpos neutralizantes que parecem ser o principal mecanismo efetor responsável pela proteção contra a infecção secundária (AMANNA *et al.*, 2006; KENNEDY *et al.*, 2009; MOSS, 2011; GILCHUK *et al.*, 2016).

Até o presente momento, não se sabe ainda qual é a origem e o reservatório do VACV, e no passado várias hipóteses eram levantadas para explicar essa lacuna da ciência (TRINDADE *et al.*, 2007B; DRUMOND *et al.*, 2008). Especula-se que o VACV poderia ser um CPXV atenuado ou até mesmo um híbrido entre o CPXV e VARV (FENNER, 1988). No entanto, com a evolução da biologia molecular e obtenção de sequências genômicas completas de várias amostras de VACV, tornou-se claro se tratar de uma espécie viral distinta dos outros OPV, como o VARV e o CPXV (GUBSER *et al.*, 2004). Recentemente, muitos resultados têm sido apresentados em torno da origem do VACV. MEDAGLIA e colaboradores propuseram uma nova relação evolutiva entre os isolados brasileiros e amostras vacinais com base na análise molecular do vírus Serro 2 (S2V) e do vírus Cantagalo (CTGV), isolados durante os surtos de VB (DAMASO *et al.*, 2000; TRINDADE *et al.*, 2009; MEDAGLIA *et al.*, 2015). Nesse estudo, o S2V e o CTGV estariam geneticamente relacionados com a amostra vacinal VACV-IOC (Instituto Oswaldo Cruz) (MEDAGLIA *et al.*, 2015), ao lado do vírus Horsepox, que se acredita ser o ancestral das amostras de VACV (DAMASO, 2017; ESPARZA *et al.*, 2017). No entanto, a ausência de um número consistente de sequências de genoma completo de isolados de VACV brasileiros poderia nos contar apenas a metade de toda a história sobre a origem e percursos evolutivos das amostras silvestres que circulam na América do Sul.

Por outro lado, outros estudos têm mostrado que algumas amostras de VACV circulantes no Brasil podem apresentar uma história evolutiva distinta daquelas possivelmente derivadas de amostras vacinais, como Ankara, Dryvax e Lister, por exemplo (TRINDADE *et al.*, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2017B). Esses dados são corroborados com análises fenotípicas e genômicas, que apresentam perfis diferentes tanto do protótipo

VACV-Western Reserve (VACV-WR), quanto de amostras vacinais utilizadas em todo o mundo (TRINDADE *et al.*, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2017A; 2017B). Entretanto, é importante salientar novamente que a obtenção de sequências genômicas de outros isolados e até mesmo de outros clones vacinais é fundamental para a compreensão das origens do VACV circulante no Brasil e em outros países da América do Sul.

Além disso, é importante mencionar a existência de outra amostra de VACV, conhecida como *Buffalopox virus* (BPXV) (SINGH *et al.*, 2012). O BPXV tem sido apontado como responsável por surtos de doença exantemática que acometem bovinos e humanos, mas principalmente bubalinos (búfalos) (SINGH *et al.*, 2012). O primeiro caso de infecção por BPXV em búfalos foi registrado em 1934 (BAXBY & HILL, 1971; CHANDRA *et al.*, 1986; NEDUNCHELLYIAN *et al.*, 1992; KOLHAPURE *et al.*, 1997). Desde então, vários surtos foram descritos na Índia, mas também em outros países como Paquistão, Rússia, Bangladesh, Indonésia, Itália e Egito (VENKATESAN *et al.*, 2010; YADAV *et al.*, 2010; DAMLE *et al.*, 2011; GURAV *et al.*, 2011; SINGH *et al.*, 2012). Assim como a VB no Brasil, a zoonose é transmitida ao ser humano após contato com búfalos infectados (SINGH *et al.*, 2012).

1.4.5. Vaccínia Bovina

No Brasil, o VACV é responsável pela Vaccínia Bovina (VB), doença exantemática de caráter zoonótico cujas lesões apresentam-se nas formas proliferativas, ulceradas ou em crostas. Quando as partículas virais atingem a derme, observa-se o desenvolvimento de eritema cutâneo característico, que se inicia com o aparecimento de pápulas, as quais evoluem para vesículas, pústulas, úlceras e crostas, que no final cicatrizam (TRINDADE *et al.*, 2003; LEITE *et al.*, 2005; SCHATZMAYR *et al.*, 2005; SIMONETTI *et al.*, 2007; TRINDADE *et al.*, 2007A; MEGID *et al.*, 2008; SILVA-FERNANDES *et al.*, 2009; FONSECA *et al.*, 2011; KROON *et al.*, 2011).

O processo infeccioso se inicia pela formação de vesículas no úbere e teto de vacas lactantes, que evoluem para a forma de pústulas com conteúdo purulento e, posteriormente, para crostas (Figura 8). O quadro clínico do animal infectado evolui por cerca de três semanas, favorecendo ainda o surgimento de mastites que podem evoluir para a perda definitiva de parte das glândulas mamárias. Devido à dor ocasionada pelo processo infeccioso, há uma grande dificuldade em praticar a ordenha nas vacas doentes, ocasionando assim uma queda na produção de leite e conseqüentemente um impacto econômico significativo (TRINDADE *et al.*, 2003; LEITE *et al.*, 2005; SCHATZMAYR *et al.*, 2005; SIMONETTI *et al.*, 2007; TRINDADE *et al.*, 2007A; MEGID *et al.*, 2008; SILVA-FERNANDES *et al.*, 2009; FONSECA *et al.*, 2011; KROON *et al.*, 2011). A manipulação continuada da ordenha dos animais em produção pode causar a liberação das crostas,

formando extensões hemorrágicas com certa facilidade (TRINDADE *et al.*, 2003; LEITE *et al.*, 2005; LOBATO *et al.*, 2005; SCHATZMAYR *et al.*, 2005; SIMONETTI *et al.*, 2007; FONSECA *et al.*, 2011; KROON *et al.*, 2011).



Figura 8: LESÕES ULCERATIVAS NOS TETOS DE VACAS E FOCINHO DE BEZERROS INFECTADOS PELO VACV. Fonte: LEITE *et al.*, 2005; MEGID *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2008.

Em seres humanos a evolução clínica ocorre igualmente em três semanas, com a formação e evolução de vesículas a crostas, sendo as lesões distribuídas nas mãos principalmente, nos braços e na face (forma mais rara) (Figuras 9 e 10). Além das lesões características, o quadro clínico pode variar, apresentando febre (às vezes elevada), linfadenopatia, dor nas regiões lesionadas, prostração, sudorese, calafrios e quadros de incapacidade temporária (TRINDADE *et al.*, 2003; LEITE *et al.*, 2005; LOBATO *et al.*, 2005; TRINDADE *et al.*, 2007; SILVA-FERNANDES *et al.*, 2009; TRINDADE *et al.*, 2009; ABRAHÃO *et al.*, 2010A; MEDEIROS-SILVA *et al.*, 2010). Os indivíduos, geralmente ordenhadores, apresentam histórico de contato direto com lesões de animais infectados.

1.4.6. Epidemiologia do VACV

A circulação natural do VACV vem sendo descrita desde a década de 60 (Material suplementar, sessão 9.8 artigo número 6) com os isolamentos do vírus SPAn232 (SAV) de camundongos sentinelas na estação de Cotia em São Paulo; e com o isolamento do BeAn58058 (BAV) a partir de um roedor silvestre do gênero *Oryzomys*, capturado na floresta de Utinga, na cidade de Belém (LOPES *et al.*, 1965; FONSECA *et al.*, 1998; MARQUES *et al.*, 2001; FONSECA *et al.*, 2002). Entretanto, poucas são as informações sobre os hospedeiros naturais do VACV no Brasil e no mundo. A partir de 1999, os relatos da ocorrência natural de VACV se tornaram ainda mais frequentes, relacionados principalmente aos surtos de VB. Os surtos inicialmente foram detectados na região Sudeste do Brasil, mais especificamente nos estados de Rio de Janeiro e São Paulo, e logo foram detectados por todas as regiões do país (Figura 11) (KROON *et al.*, 2011; FONSECA *et al.*, 2011).



FIGURA 9: LESÕES PRESENTES NAS MÃOS DE ORDENHADORES INFECTADOS PELO VACV: (A) e (B) Lesões ulcerativas; (C) e (D) parte inferior: lesões em forma de crostas (TRINDADE *et al.*, 2007a; MEGID *et al.*, 2008).



FIGURA 10: LESÕES PRESENTES NA REGIÃO FACIAL DE ORDENHADORES INFECTADOS PELO VACV: Lesões ulcerativas faciais causadas pelo VACV em ordenhadores (da SILVA *et al.*, 2008).

Ao longo dos últimos 17 anos muito se tem avançado na pesquisa sobre a circulação e dinâmica do VACV no país. A emergência do VACV tem possibilitado a caracterização de populações virais geneticamente distintas e evidenciado a co-circulação de genótipos distintos num mesmo hospedeiro ou nicho, possibilitando uma expansão no entendimento da história natural do vírus. Além de bovinos e humanos, a descrição do vírus em ambientes naturais, infectando outros animais domésticos e silvestres, tem sido amplamente estudada. Após a descrição do primeiro surto de VACV afetando equídeos (BRUM *et al.*, 2010; CAMPOS *et al.*, 2011), acredita-se que esse animal doméstico de grande importância para meio rural possa estar envolvido na dinâmica de dispersão do vírus nesse ambiente, mesmo em regiões onde não há relatos ou há poucos casos de VB (ABRAHÃO *et al.*, 2016; BORGES, I.A., em revisão).

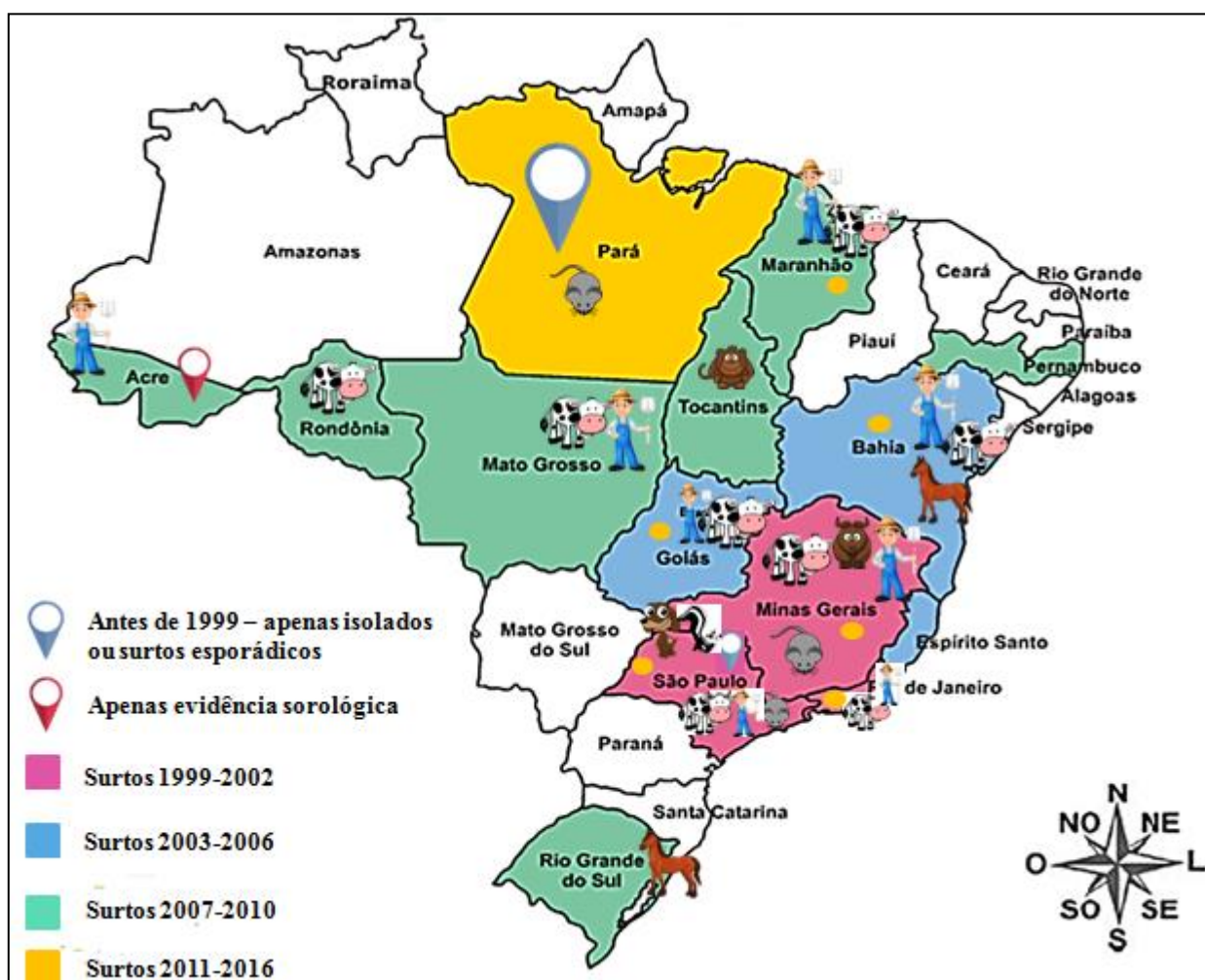


FIGURA 11: MAPA DO BRASIL EVIDENCIANDO A DETECÇÃO DO VACV AO LONGO DO TEMPO. O mapa mostra a disseminação do VACV por todo o território Brasileiro, desde os primeiros isolados na década de 60, passando pelos primeiros surtos de vaccínia bovina a partir de 1999, até o ano atual. Também fica claro o amplo espectro de hospedeiros do VACV (OLIVEIRA, 2016).

O entendimento da circulação natural em ambiente silvestre também tem sido amplamente estudado após a detecção do VACV em roedores peridomésticos, como é o caso do *Mariana virus* (MARV), isolado a partir de espécimes clínicos de bovinos, humanos e *Mus musculus* (ABRAHÃO *et al.*, 2009). Dessa forma, foi proposto um modelo hipotético de transmissão no qual o roedor é capaz de se infectar tanto com o vírus proveniente do ambiente silvestre como com aquele proveniente de surtos em ambientes rurais, atuando como uma ponte para a transmissão do vírus entre esses dois ambientes (ABRAHÃO *et al.*, 2009). Corroborando esses achados, MIRANDA e colaboradores demonstraram que, de fato, pequenos mamíferos (roedores e marsupiais) desempenham um importante papel na cadeia epidemiológica do VACV (MIRANDA *et al.*, 2017). Nesse estudo, foi demonstrada uma prevalência de anticorpos neutralizantes anti-OPV de 10.5% na população de pequenos mamíferos, e uma prevalência de anticorpos IgG de 10%. Ainda, as análises moleculares demonstraram 6.4% dos animais positivos para VACV (MIRANDA *et al.*, 2017).

A partir de então, outros estudos relacionados à circulação do VACV na vida silvestre vêm sendo desenvolvidos. ABRAHÃO e colaboradores (2010) detectaram anticorpos anti-OPV no soro de 81 macacos das espécies *Cebus lapela* e *Alouatta caraya*, capturados durante um programa de resgate de fauna na Floresta Amazônica, no estado do Tocantins, além de DNAemia em 18 destes animais. Outros estudos também têm demonstrado a circulação de VACV na região amazônica, sugerindo uma ampla disseminação viral e riscos para a população humana (MEDAGLIA *et al.*, 2009; MOTA *et al.*, 2010; QUIXABEIRA-SANTOS *et al.*, 2011; SANT'ANA *et al.*, 2013). Além disso, evidências sorológicas de circulação do VACV têm sido detectadas em animais domésticos e silvestres, dentre eles roedores, porcos, gambás, cães e gatos (PERES *et al.*, 2013; 2016; 2018A; 2018B). Nosso grupo tem detectado circulação do vírus em capivaras, gatos, cães e quatis em Minas Gerais (DUTRA *et al.*, 2016; COSTA *et al.*, 2017; COSTA *et al.*, em revisão).

Nos últimos anos tem-se observado a distribuição de VACV em várias regiões brasileiras, sendo detectados surtos de VB na região Centro-Oeste, mais especificamente no estado de Goiás (SANT'ANA *et al.*, 2013a); e ainda na região Norte e Nordeste, nos estados do Pará (ASSIS *et al.*, 2013), Maranhão (OLIVEIRA *et al.*, 2013) e Bahia (ASSIS *et al.*, 2015; ABRAHÃO *et al.*, 2016).

Outro ponto importante a ser destacado é a escassez de estudos que avaliem a disseminação do VACV para outros ambientes, como, por exemplo, para o ambiente urbano. Alguns inquéritos sorológicos têm sido conduzidos em populações rurais para avaliação da susceptibilidade dos indivíduos, bem como identificação de fatores de exposição associados (MOTA *et al.*, 2010; FIGUEIREDO *et al.*, 2015; COSTA *et al.*, 2016). Entretanto, pouco se sabe sobre a disseminação do vírus para ambientes urbanos, assim como o grau de proteção e/ou exposição da população humana. Alguns estudos demonstraram uma alta taxa de soropositividade de OPV em cães de áreas rurais (PERES *et al.*, 2013), bem como DNAemia para VACV em cães durante surtos de VB (PERES *et al.*, 2016). Com esses achados, reforça-se a necessidade de investigação do papel de animais domésticos mais próximos ao homem, como cães e gatos, na cadeia epidemiológica do VACV.

A circulação do VACV tem sido descrita para além do território brasileiro. O vírus já foi detectado em outros países da América do Sul, sendo estes: Argentina (FRANCO-LUIZ *et al.*, 2014), Uruguai (FRANCO-LUIZ *et al.*, 2016) e Colômbia (USME-CIRO *et al.*, 2017). Especialmente na Colômbia, na região de Caquetá, um surto de doença exantemática afetando 11 trabalhadores rurais foi detectado durante dezembro de 2012 a abril de 2013. Após investigação sorológica e molecular, VACV foi implicada como agente etiológico, sendo esta uma amostra semelhante a amostras de VACV isoladas no Brasil (USME-CIRO *et al.*, 2017).

1.6.7. Ecologia do VACV

Poucas são as informações a respeito dos hospedeiros naturais do VACV, bem como sobre sua ecologia. Mas sabe-se que muitos OPV são capazes de infectar uma ampla gama de espécies de animais (MCFADDEN, 2005; REYNOLDS *et al.*, 2018). De fato, estudos relacionados aos hospedeiros naturais de outras espécies de OPV fundamentam, de maneira comparativa, especulações sobre a manutenção do VACV na natureza (REYNOLDS *et al.*, 2018).

Em relação ao CPXV, sua circulação natural é frequentemente associada à infecção de roedores silvestres, na qual várias espécies podem atuar como seu reservatório (ESSBAUER *et al.*, 2010; FRANKE *et al.*, 2017). Alguns estudos já demonstram que o CPXV pode estabelecer infecções persistentes ou agudas em espécies como *Apodemus sylvaticus*, *Clethrionomys glareolus* e *Microtus agrestis*, assim como em roedores urbanos, como *Mus musculus*, *Rattus norvegicus* e *Rattus rattus* (CHANTREY *et al.*, 1999; LAAKONEN *et al.*, 2006). Estudos sorológicos realizados com roedores silvestres revelam que a presença de anticorpos anti-CPXV aumenta no final do verão e começo do outono, período em que populações de roedores crescem na Europa (CHANTREY, 1999). A frequente infecção de felinos no continente (CORAS *et al.*, 2005) também

indica a participação efetiva dos roedores no ciclo de transmissão e manutenção natural do CPXV, sendo de grande importância para a cadeia de transmissão do vírus, principalmente em ambientes urbanos, que envolvem também humanos que entram em contato com os felinos, que por sua vez se alimentam de roedores infectados (ZIJLSTRA *et al.*, 2009). Uma vez que a maioria dos casos humanos é notificada em ambientes urbanos, é notável que o vírus, apesar de possuir reservatório silvestre, se adaptou a estes locais (DUCOURNAU *et al.*, 2013; GLATZ *et al.*, 2010).

De maneira semelhante, especula-se que roedores endêmicos na África Central e Ocidental sejam considerados hospedeiros naturais do MPXV, que tem primatas humanos e não humanos como seus hospedeiros zoonóticos (MCFADDEN, 2005; ESSBAUER *et al.*, 2010; REYNOLDS *et al.*, 2012; 2018). Apesar de grandes mamíferos terem sido identificados como potenciais fontes de infecção para humanos na África Central, a associação entre roedores e o vírus através de análises filogenéticas sugere fortemente que roedores silvestres seriam mais apropriados como reservatórios para MPXV (REYNOLDS *et al.*, 2012B). Estudos filogenéticos indicam a existência de dois clados distintos de MPXV, classificados como África Ocidental/EUA e Congo Basin (NAKAZAWA *et al.*, 2015).

Em relação ao VACV, o vírus BeAn 58058 (BAV) foi isolado a partir de um roedor silvestre, caracterizado como uma espécie do gênero *Oryzomys* (FONSECA *et al.*, 1998). Este gênero agrupa pouco mais de 40 espécies cujos habitats são os mais variados, desde ecossistemas dominados por savanas (Cerrado, Caatinga) até áreas de floresta ombrófila densa (Floresta Amazônica, Mata Atlântica) ou mista (Mata de Araucária), incluindo as regiões de interface entre diferentes padrões fito-ecológicos (SOUZA, 2006; PEREIRA, 2007). Outras amostras de VACV também já foram isoladas de roedores, como os vírus SPAn232 (SAV) e Cotia, isolados de camundongos sentinelas; o vírus Belo Horizonte (VBH), isolado de camundongos suíços; e o vírus Mariana (MARV), isolado de um *Mus musculus*, cuja distribuição é ampla no Brasil, incluindo os estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo (PEREIRA, 2007; DE OLIVEIRA *et al.*, 2013; 2014). PERES e colaboradores (2013) demonstraram que roedores silvestres capturados em uma área agrícola no estado de São Paulo apresentavam baixa soropositividade para OPV, sugerindo que esses animais não representariam os reservatórios para os VACV nessa região (PERES *et al.*, 2013). De fato, um recente estudo de PERES demonstrou através de análises moleculares a circulação do VACV em animais domésticos e silvestres provenientes de regiões sem histórico de surto de VB; contudo, não foram detectadas amostras de sangue ou soro de roedores silvestres positivas para o VACV (PERES *et al.*, 2018A).

Por outro lado, como descrito anteriormente, outras espécies de roedores também merecem destaque como potenciais candidatas a reservatórios naturais do VACV. Além do gênero *Oryzomys* e da espécie *Mus*

musculus, as espécies *Rattus rattus* e *Rattus norvegicus* devem ser consideradas, sobretudo porque são reservatórios de CPXV (BENNETT *et al.*, 1996; CHANTREY *et al.*, 1999; LAAKONEN *et al.*, 2006; FRANKE *et al.*, 2017). Esses roedores apresentam distribuição cosmopolita, hábitos peridomiciliares e representam uma fonte constante para a disseminação de outras zoonoses virais (SOUZA, 2006).

Levando em consideração o potencial dos roedores como fortes candidatos a reservatório natural do VACV, foi proposto um modelo hipotético de transmissão (Figura 12) no qual o roedor é capaz de se infectar tanto com o vírus proveniente do ambiente silvestre quanto com aquele proveniente de surtos em ambientes rurais, atuando como uma ponte para a transmissão entre os dois ambientes (ABRAHÃO, 2009A). Dessa forma, os roedores peridomésticos seriam capazes de se infectar através do contato com possíveis reservatórios silvestres e transportar o vírus para fazendas, nas quais poderiam infectar humanos e bovinos. Por outro lado, um roedor peridoméstico não infectado, poderia adquirir o vírus nas fazendas durante surtos de BV e levar o vírus para o ambiente silvestre, podendo assim infectar outros animais e gerar um ciclo silvestre da doença (ABRAHÃO *et al.*, 2009A).

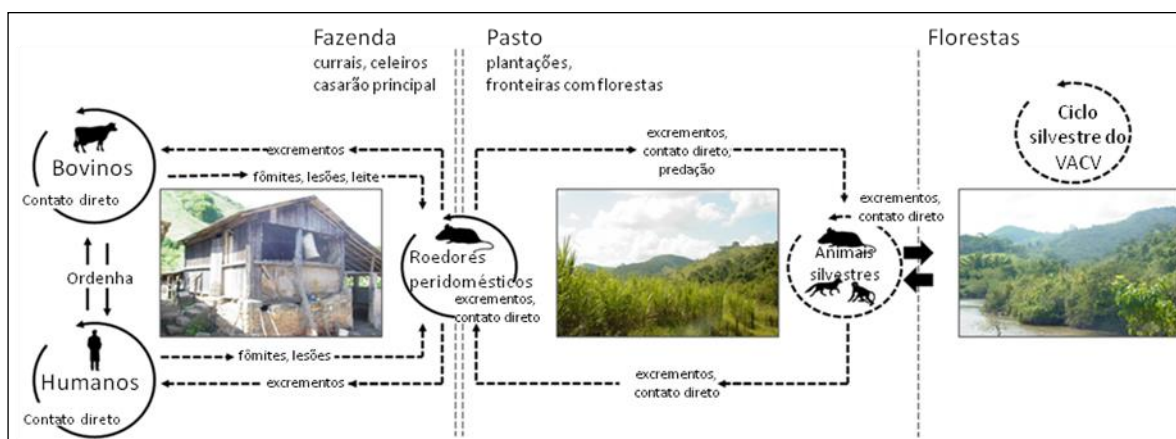


FIGURA 12: MODELO HIPOTÉTICO DO CICLO DE TRANSMISSÃO DO VACV ENTRE ÁREAS RURAIS E SILVESTRES. Os roedores peridomésticos (*Mus musculus*, por exemplo) poderiam promover a transmissão do VACV entre animais selvagens e bovinos ou humanos, uma vez que esses roedores peridomésticos podem circular tanto em áreas agrícolas quanto nas áreas de floresta que circundam as propriedades rurais. Este diagrama foi proposto com base em dados epidemiológicos e laboratoriais publicados sobre VACV e as características comportamentais de roedores e animais silvestres brasileiros. Linhas sólidas indicam dados determinados experimentalmente, e linhas tracejadas representam proposições hipotéticas ainda sob investigação. (ABRAHÃO *et al.*, 2009).

Corroborando o modelo proposto por ABRAHÃO, MIRANDA e colaboradores demonstraram através de um amplo estudo ecoepidemiológico que pequenos mamíferos poderiam sim atuar como reservatórios do

VACV (MIRANDA et al., 2017). O estudo demonstrou que espécies de roedores tais como *Necromys lasiurus*, *Trinomys setosus*, *Calomys tener* e *Akodon sp.*, e o marsupial *Caluromys philander* desempenham um importante papel na cadeia epidemiológica do VACV, mantendo a circulação do vírus pelos ambientes rurais e silvestre (MIRANDA et al., 2017). PERES e colaboradores demonstraram a presença de DNA viral em amostras de fezes e urina de pequenos roedores silvestres capturados em São Paulo, sendo estes *Oligoryzomys flavescens*, *Oligoryzomys nigripes* e *Sooretamys angouya*, fortalecendo a hipótese de que esses animais contribuem de maneira significativa para o ciclo silvestre do VACV em áreas com ou sem relatos de surtos de VB (PERES et al., 2018).

Recentemente, QUINER e NAKAZAWA identificaram condições ambientais e locais suscetíveis à transmissão e ocorrência dos surtos de VACV (Figura 13) (QUINER e NAKAZAWA, 2017). Através de modelagem de nicho ecológico, foi demonstrado que a circulação do VACV em determinadas áreas depende de vários fatores ambientais, dentre os quais se destacam precipitação do trimestre mais úmido, a precipitação anual, a temperatura média do quarto mais frio e o intervalo médio diurno. Além disso, os autores também mapearam a densidade do rebanho bovino no Brasil (Figura 14) e observaram que muitos surtos de VB são descritos em regiões que possuem alta densidade de bovinos, como, por exemplo Goiás, Rio de Janeiro, São Paulo e Minas Gerais (principalmente). Baseado nessa informação, é possível inferir outras áreas suscetíveis aos surtos de VB, como Mato Grosso do Sul e Paraná (QUINER e NAKAZAWA, 2017).



FIGURA 13: MAPA DO BRASIL EVIDENCIANDO OS SURTOS DE VACV DESCRITOS ATÉ O ANO DE 2017. Os pontos vermelhos no mapa indicam os municípios com surtos de VACV confirmados, sendo o epicentro das infecções localizado na região Sudeste, especialmente no estado de Minas Gerais. Os círculos em cinza destacam um raio de 300 km dos surtos, o que indica uma extensão geográfica do vírus a partir daquele ponto (QUINER & NAKAZAWA, 2017).

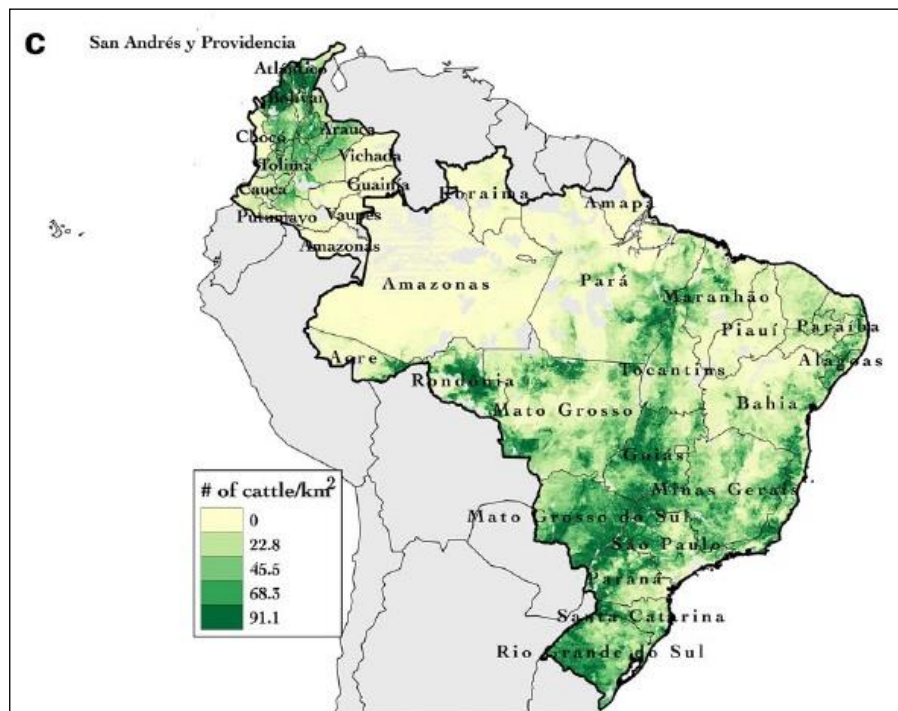


FIGURA 14: MAPA EVIDENCIANDO A DISTRIBUIÇÃO DO REBANHO BOVINO NO BRASIL. Os números representam a densidade do rebanho bovino (cabeças de gado) por Km². As regiões Centro-Oeste e Sudeste aparecem com maior número de rebanho bovino, seguidas da região Sudeste. (QUINER & NAKAZAWA, 2017).

1.6.8. Diagnóstico das Ortopoxviroses

O diagnóstico conclusivo da Vaccinia Bovina é sempre laboratorial, uma vez que o tipo de lesão e os sinais clínicos presentes em animais e humanos podem ser confundidos com outras doenças vesiculares de bovinos como febre aftosa, estomatite vesicular, pseudovariola, mamilite herpética, bem como a presença de infecção bacteriana secundária pode confundir o diagnóstico da VB (ABRAHÃO *et al.*, 2010A; SANT'ANA *et al.*, 2013B; OLIVEIRA *et al.*, 2017B).

O diagnóstico laboratorial pode ser sorológico, através da pesquisa de anticorpos IgG, IgM ou neutralizantes; molecular, através das técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR) e PCR em tempo real; ou por detecção direta do vírus, através do isolamento em cultivo celular ou em fibroblastos de embrião de galinha (ovos embrionados); ou ainda por microscopia eletrônica, podendo ser visualizadas as partículas virais (KROON *et al.*, 2016).

Através da pesquisa de anticorpos neutralizantes é possível estimar infecções passadas, entretanto não se pode distinguir o tipo de OPV, pois existe uma proteção cruzada contra os vírus deste gênero devido à conservação das proteínas estruturais, fruto da conservação do genoma. Assim, os anticorpos capazes de neutralizar a infecção pelo VACV, também podem neutralizar a infecção por VARV, MPXV e CPXV (JACOBS *et al.*, 2009; MOSS; MILLER *et al.*, 2011; KROON *et al.*, 2016).

A detecção molecular é de importante valia para o diagnóstico da VB, pois, além de detectar uma infecção aguda pelo VACV, permite ainda que seja realizada a caracterização do vírus através da identificação de mutações, deleções ou inserções nos principais genes pesquisados, que são o C11R (fator de crescimento viral), o A56R (gene da hemaglutinina) e o A26L (proteína do corpúsculo de inclusão) (ROPP *et al.*, 1995; MEYER *et al.*, 1997; LEITE *et al.*, 2007; DRUMOND *et al.*, 2008; TRINDADE *et al.*, 2008; ABRAHÃO *et al.*, 2010C; KROON *et al.*, 2016). Além disso, outros genes também podem ser utilizados para aumentar o potencial de detecção e caracterização, como K2L e C23L (DRUMOND *et al.*, 2008; ASSIS *et al.*, 2013). O material genético viral pode ser detectado diretamente de amostras de lesões (ricas em partículas virais), amostras de sangue ou até mesmo do soro dos pacientes e animais infectados, sem a necessidade de extração de DNA (ABRAHÃO *et al.*, 2010C). Além disso, alguns estudos indicam que o DNA viral pode ser detectado em fezes e leite de animais infectados (ABRAHÃO *et al.*, 2009C; 2009D; OLIVEIRA *et al.*, 2010; D'ANUNCIAÇÃO *et al.*, 2012; RIVETTI JR *et al.*, 2013; KROON *et al.*, 2016).

O isolamento viral também se constitui como uma importante ferramenta de diagnóstico, em que é possível a recuperação da partícula viral envolvida na infecção (LOBATO *et al.*, 2005; MEGID *et al.*, 2008; ABRAHÃO *et al.*, 2009A; KROON *et al.*, 2016). Entretanto, esse tipo de diagnóstico é restrito a laboratórios de pesquisa, pois são necessários insumos e equipamentos de alto custo, além de profissionais especializados. Posteriormente ao isolamento é possível realizar outros estudos para melhor compreensão do vírus com seus hospedeiros (FERREIRA *et al.*, 2008; ABRAHÃO *et al.*, 2009C; CAMPOS *et al.*, 2011; KROON *et al.*, 2016). Do mesmo modo, o diagnóstico por microscopia eletrônica é de difícil execução, além de ser uma tecnologia de alto custo (FONSECA *et al.*, 1998; DAMASO *et al.*, 2000; SANT'ANA *et al.*, 2013B).

II. JUSTIFICATIVA

As viroses emergentes têm preocupado as autoridades sanitárias em todo o mundo. Fruto de alterações no ecossistema e dos comportamentos econômicos, sociais e culturais do homem, essas viroses surgem como importante problema de saúde pública tanto nas zonas rurais como nas zonas urbanas. Em termos econômicos, estima-se que as DIE têm causado um dano na ordem de centenas de bilhões de dólares nos últimos 20 anos, devido ao fato de que as ações ainda estão focadas na detecção e resposta, não na prevenção. Assim, as estimativas são de que os custos para o controle de surtos de DIE continuarão a aumentar. No entanto, os maiores ganhos estão relacionados às ações de prevenção em vez do tratamento dos riscos já estabelecidos. Dessa forma, tornam-se necessárias estratégias de prevenção e controle das DIE.

Vários são os fatores que favorecem a emergência e re-emergência de vírus com potencial emergente, que vão desde alterações ecológicas envolvendo clima e ecossistema, até o comportamento migratório humano, facilitado pelos transportes rápidos e processo de globalização, o que permite a rápida disseminação de vetores anteriormente contidos em áreas restritas e de mais fácil controle. Outros mecanismos estão diretamente ligados aos agentes etiológicos em questão, como recombinações genéticas, alterando a virulência e conseqüentemente as manifestações clínicas e da letalidade da patologia relacionada.

No Brasil, o *Vaccinia virus* (VACV) destaca-se como um vírus zoonótico re-emergente, afetando principalmente o gado leiteiro e ordenhadores que têm contato direto com os animais infectados. Os surtos de VACV causam danos à economia leiteira nacional e também à saúde pública, uma vez que, estabelecido um quadro de infecção numa determinada localidade rural, há uma queda na produção de leite pelos animais doentes e possível perda dos mesmos. Além disso, por ser também caracterizada como uma zoonose ocupacional há uma variação no quadro de funcionários, acarretando em prejuízos para o dono da propriedade e para o próprio trabalhador que pode perder o seu emprego, caracterizando também um estigma social devido à natureza da infecção.

A circulação do VACV no ambiente rural é bem descrita na literatura, e sabe-se que o vírus também circula no ambiente silvestre em espécies de pequenos mamíferos que podem atuar como disseminadores ou ainda servir como seu reservatório. Entretanto, são escassas as evidências de circulação do vírus em áreas urbanas e os fatores associados à sua emergência nestes locais. Além disso, aspectos relacionados à sua distribuição espacial e diversidade de hospedeiros que podem atuar como disseminadores permanecem pouco explorados.

Considerando-se a re-emergência do VACV no Brasil, aliada à carência de estudos que abordem a ecoepidemiologia e a caracterização de populações de mamíferos susceptíveis que podem atuar como possíveis reservatórios e/ou hospedeiros naturais, além da escassez de dados sobre fatores de risco/exposição diretamente associados ao VACV, este trabalho buscou avaliar a distribuição do VACV em diferentes ambientes, sua relação com possíveis hospedeiros e os riscos para a saúde pública.

III. OBJETIVOS

3.1. Geral

Avaliar a dinâmica da circulação do *Vaccinia virus* (VACV) em ambientes silvestres, rurais e urbanos, em diferentes populações de animais domésticos e silvestres, e os riscos para saúde pública.

3.2. Específicos

- 1) Avaliar a soroprevalência de anticorpos neutralizantes anti-*Orthopoxvirus* em populações de animais domésticos e silvestres;
- 2) Avaliar a possível circulação silenciosa do VACV através da avaliação de animais domésticos com ausência de doença clínica;
- 3) Identificar fatores de risco/exposição associados à circulação do VACV;
- 4) Avaliar a dinâmica da circulação do VACV entre ambientes silvestres e urbanos;
- 5) Avaliar os riscos de disseminação do VACV para populações suscetíveis;
- 6) Desenvolver um modelo ecológico hipotético para auxiliar na compreensão da circulação do VACV entre ambientes silvestres e urbanos.

IV. PUBLICAÇÕES

4.1. ARTIGO 1: Absence of vaccinia virus detection in a remote region of the Northern Amazon forests, 2005–2015

Este artigo foi publicado em Abril de 2017 no periódico Archives of Virology.

DESCRIÇÃO DO ESTUDO: O hospedeiro natural, a manutenção e a circulação do VACV no ambiente silvestre permanecem ainda pouco conhecidos devido à escassez de dados. Apesar de infectar uma vasta gama de hospedeiros, ainda não se sabe qual o reservatório do VACV, e especula-se que os roedores silvestres possam exercer essa função. O objetivo deste trabalho foi avaliar a circulação do VACV em amostras de pequenos mamíferos de uma região extremamente preservada no norte da Floresta Amazônica. Nossos resultados apontaram para a ausência de circulação do VACV num período de 10 anos (2005–2015). No Brasil, a circulação do VACV é bem documentada, através da descrição de surtos acometendo humanos e bovinos, além da detecção em animais silvestres. Há alguns fatores que podem contribuir com a ausência de circulação do VACV na região Amazônica entre 2005–2015, dentre os quais: 1) barreiras geográficas naturais, por ser uma região Amazônica altamente preservada; 2) ausência de bovinos, que atuam como excelentes hospedeiros amplificadores eliminando no ambiente grandes quantidades de partículas infecciosas quando infectados; 3) grande diversidade de espécies de pequenos mamíferos e pouca amostragem de espécies já conhecidas nas quais o VACV foi detectado; 4) possibilidade de haver um efeito diluidor, visto que o ambiente é altamente preservado mantendo uma grande diversidade de espécies. Contudo, nossos achados não excluem a possibilidade de pequenos mamíferos atuarem como reservatório para o VACV, sendo mais estudos necessários para elucidar essa situação ecológica.

Absence of vaccinia virus detection in a remote region of the Northern Amazon forests, 2005–2015

Galileu Barbosa Costa¹ · Anne Lavergne² · Edith Darcissac² · Vincent Lacoste² ·
Betânia Paiva Drumond¹ · Jônatas Santos Abrahão¹ · Erna Geessien Kroon¹ ·
Benoît de Thoisy² · Giliane de Souza Trindade¹

Received: 30 December 2016 / Accepted: 18 March 2017 / Published online: 7 April 2017
© Springer-Verlag Wien 2017

Abstract Vaccinia virus (VACV) circulates in Brazil and other South America countries and is responsible for a zoonotic disease that usually affects dairy cattle and humans, causing economic losses and impacting animal and human health. Furthermore, it has been detected in wild areas in the Brazilian Amazon. To better understand the natural history of VACV, we investigated its circulation in wildlife from French Guiana, a remote region in the Northern Amazon forest. ELISA and plaque reduction neutralization tests were performed to detect anti-orthopoxvirus antibodies. Real-time and standard PCR targeting C11R, A56R and A26L were applied to detect VACV DNA in serum, saliva and tissue samples. No evidence of VACV infection was found in any of the samples tested. These findings provide additional information on the VACV epidemiological puzzle. The virus could nevertheless be circulating at low levels that were not detected in areas where no humans or cattle are present.

Vaccinia virus (VACV) is the prototype of the genus *Orthopoxvirus*, family *Poxviridae*, and was used as a live vaccine around the world to eradicate smallpox. VACV

circulates in zoonotic cycles involving bovine herds and dairy workers in rural areas of Brazil, causing a disease called bovine vaccinia (BV), which results in economic losses and has increasingly caused public health concerns [1].

In the last seventeen years, VACV has spread throughout all Brazilian territory [1], though its occurrence varies among the different regions. Furthermore, VACV has been detected in countries bordering Brazil, such as Argentina [2], Uruguay [3], and Colombia [4]. Although, several BV outbreaks affecting mainly dairy cattle and humans have been reported since 1999 [1], natural VACV circulation had already been described in a rodent of the genus *Oryzomys* captured in the 1960s in the Amazon region [5].

During recent years in which reports of BV outbreaks have been observed, VACV circulation has been described in the Amazon region in mammal species such as bovines, primates, and coatis, and also in humans [6–12]. Nevertheless, there is little information on a possible VACV sylvatic cycle and on its natural reservoirs, since the origin of VACV is still unknown and its natural reservoir is still unidentified [13–16]. Given that VACV has a broad host range and that wild animals might be implicated in its transmission chain, we decided to search for VACV circulation in wildlife animals (rodents, marsupials, and bats) captured in pristine forest areas where the anthropogenic impact on the Northern Amazon forest is absent or limited.

We analyzed a total of 2,365 wild mammals from French Guiana, captured between 2005 and 2015 in tropical upland rain forest in the Amazon region [17, 18]. Capture sites were located in remote forests, slightly disturbed forests (facing selective logging, hunting pressure, and low fragmentation level), secondary forests, and the edge between forest and open habitats (Fig. 1). Wild mammals included rodents (n = 420), marsupials (n = 606) and chiropterans (n = 1339) (Table 1). All

✉ Galileu Barbosa Costa
galileuk1@gmail.com

✉ Giliane de Souza Trindade
gitrindade@yahoo.com.br; giliane@icb.ufmg.br

¹ Laboratório de Vírus, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Presidente Antônio Carlos, 6627, Pampulha, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brazil

² Laboratoire des Interactions Virus-Hôtes, Institut Pasteur de la Guyane, 23 Avenue Pasteur, BP 6010, 97306 Cayenne, French Guiana

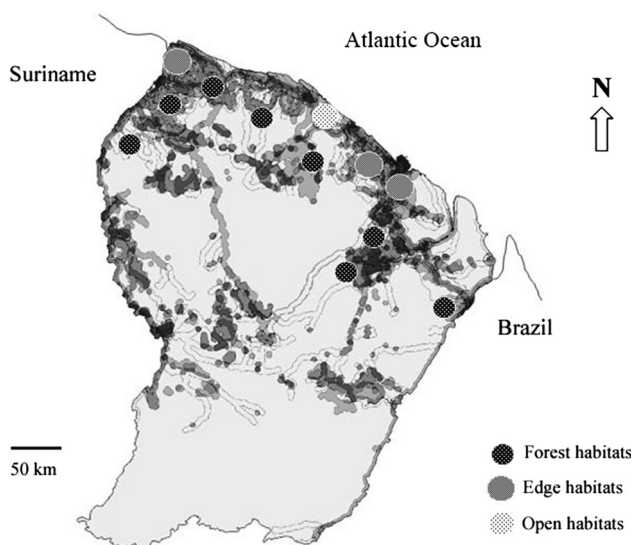


Fig. 1 Map of French Guiana showing the regions where several trapping sites were located. The background of the map highlights the human footprint index, which summarizes expected anthropic threats to biodiversity. This index summarizes threats including accessibility, land use, and human density, with light shading representing lower pressure strength and dark shading representing higher pressures. For each studied region, the dominant habitat is given

samples underwent molecular testing for VACV. To detect VACV DNA, we used real-time PCR targeting the C11R and A56R genes and semi-nested PCR targeting the C11R and A26L genes [19]. Molecular testing was performed on serum and tissue samples from rodents and marsupials and on DNA extracted from saliva and blood clots of bats. The positive controls used for molecular assays were DNA extracted from serum and liver of BALB/c mice experimentally infected with the vaccinia virus Western Reserve (VACV-WR) strain and Brazilian vaccinia (Br-VACV) group 1 and 2 viruses [20]. In cases where we were not able to have an experimental infected animal (marsupials and bats), we used experimentally contaminated serum and liver samples as described previously by Dutra and co-authors [21]. Briefly, different concentrations of VACV-WR and Br-VACV strains were added with a range from 10^4 pfu/ μ L to 1 pfu/ μ L. The experimentally contaminated samples were tested by PCR, compared to the BALB/c controls, and then used as positive controls for marsupials and bats.

In addition, serum samples from rodents and marsupials were screened for anti-OPV IgG by ELISA and neutralizing antibodies by $\geq 50\%$ plaque reduction neutralization test (PRNT₅₀) [19]. Sera were grouped into pools of 2–5 serum samples from animals belonging to the same species that were from the same collection area. No serum samples from bats were available for serological tests. For serological assays, sera from mice experimentally infected with VACV-WR and Br-VACV strains were used as positive

controls [20]. For the ELISA assay particularly, we used a purified recombinant A/G protein peroxidase conjugate as secondary antibody. Rodent and marsupial samples were included together in the same plate (for ELISA and PRNT), and the results were compared with those obtained using known positive and negative rodent serum samples.

Most of the rodents captured belonged to the species *Proechimys guyannensis* (46.4%), followed by *Proechimys cuvieri* (11.2%) and *Zygodontomys brevicauda* (9.5%). The main marsupials studied were *Didelphis marsupialis* (34.1%) and *Marmosa murina* (26.2%). For bat species, most of them were *Desmodus rotundus* (32.3%), *Carollia perspicillata* (17.2%) and *Pteronotus* spp. (14.0%). All animals tested by both serological and molecular techniques were negative for VACV.

In this study, we examined numerous forest mammal species and found no serological or molecular evidence for VACV circulation among them. Increasing efforts have been made regarding VACV ecology in South America, and some studies have highlighted the importance of wild animals and peridomestic rodents as VACV carriers ([7, 22, 23], Miranda JB, personal communication). Our negative results contrast with the above-mentioned ones, and some hypotheses can be considered in explaining the lack of evidence for VACV circulation in wild animals in French Guiana during the 2005–2015 period. One hypothesis is that wildlife was investigated in a highly preserved Northern Amazon region where natural geographic barriers of unfavorable forest habitats exist, preventing VACV dissemination from Brazil to French Guiana. This could also be emphasized by the “dilution effect” hypothesis, taking into account that in a highly preserved environment, the maintenance of a highly diverse mammal community may prevent infection of putatively more sensitive species. A great variety of mammal species were studied, but with only a small sampling of species from which VACV has been detected in Brazil, such as *Mus musculus* [20], *Oryzomys* sp. [5], and *Caluromys philander* [Miranda JB, personal communication]. Furthermore, the species *Didelphis albiventris*, in which VACV was recently detected in São Paulo State, in the Southeast region of Brazil [24], is not present in French Guiana. Nevertheless, two closely related species *Didelphis imperfecta* ($n = 2$) and *D. marsupialis* ($n = 207$) were tested.

Another explanation for the absence of VACV detection in this study could be the extremely small number of bovines in French Guiana. One hypothesis for the broad circulation of VACV in Brazil is that bovines act as VACV amplifiers, excreting large numbers of viable particles that can serve as a source of infection for themselves and other animals [25]. VACV can be detected in animals without clinical disease, since it has been detected in blood samples and feces from animals without lesions that nevertheless

Table 1 Complete list of small mammals (Rodentia, Marsupialia, and Chiroptera) analyzed for the presence of vaccinia virus in Northern Amazon forests in 2005-2015

Order	Species	Number of animals tested	%	
Rodentia	<i>Coendou prehensilis</i>	1	0.24	
	<i>Dasyprocta agouti</i>	1	0.24	
	<i>Holochilus sciureus</i>	5	1.19	
	<i>Makalata didelphoides</i>	18	4.28	
	<i>Mesomys hispidus</i>	11	2.62	
	<i>Mus musculus</i>	24	5.71	
	<i>Neacomys paracou</i>	1	0.24	
	<i>Nectomys rattus</i>	5	1.19	
	<i>Oecomys auyantepui</i>	15	3.57	
	<i>Oecomys bicolor</i>	13	3.10	
	<i>Oecomys rex</i>	1	0.24	
	<i>Oecomys rutilus</i>	1	0.24	
	<i>Oligoryzomys fulvecens</i>	3	0.70	
	<i>Oryzomys megacephalus</i>	7	1.67	
	<i>Oryzomys yunganus</i>	7	1.67	
	<i>Oryzomys macconnelli</i>	3	0.70	
	<i>Proechimys cayennensis</i>	194	46.2	
	<i>Proechimys cuvieri</i>	47	11.2	
	<i>Proechimys</i> sp	6	1.42	
	<i>Rattus rattus</i>	10	2.38	
	<i>Rhipidomys nitella</i>	7	1.67	
	<i>Zygodontomys brevicaudata</i>	40	9.50	
	Total of Rodentia	420	100.0	
	Marsupialia	<i>Caluromys philander</i>	8	1.32
		<i>Cryptonanus</i> sp	2	0.33
		<i>Didelphis imperfecta</i>	2	0.33
		<i>Didelphis marsupialis</i>	207	34.1
<i>Gracilinanus emiliae</i>		1	0.16	
<i>Marmosa lepida</i>		1	0.16	
<i>Marmosa murina</i>		159	26.2	
<i>Marmosa</i> sp		4	0.66	
<i>Marmosops</i> sp		2	0.33	
<i>Marmosops parvidens</i>		2	0.33	
<i>Metachirus nudicaudatus</i>		6	0.99	
<i>Micoureus demerarae</i>		62	10.2	
<i>Philander opossum</i>		148	24.4	
Total of Marsupialia		606	100.0	
Chiroptera		<i>Anoura geoffroyi</i>	117	8.75
		<i>Ardops nichollsi</i>	2	0.14
	<i>Artibeus concolor</i>	1	0.07	
	<i>Artibeus gnomos</i>	1	0.07	
	<i>Artibeus jamaicensis</i>	5	0.37	
	<i>Artibeus lituratus</i>	3	0.22	
	<i>Artibeus obscurus</i>	15	1.12	
	<i>Artibeus planirostris</i>	31	2.32	
	<i>Artibeus</i> sp	3	0.22	

Table 1 continued

Order	Species	Number of animals tested	%
	<i>Carollia brevicaudata</i>	1	0.07
	<i>Carollia perspicillata</i>	232	17.2
	<i>Chiroderma villosum</i>	1	0.07
	<i>Desmodus roduntus</i>	431	32.3
	<i>Diaemus youngi</i>	8	0.60
	<i>Eptesicus furinalis</i>	3	0.22
	<i>Glossophaga soricina</i>	3	0.22
	<i>Lophostoma silvicolum</i>	3	0.22
	<i>Mimon crenumatum</i>	2	0.14
	<i>Molossus barnesi</i>	9	0.67
	<i>Molossus molossus</i>	67	5.01
	<i>Molossus rufus</i>	2	0.14
	<i>Molossus</i> sp	24	1.79
	<i>Monophylus plethodon</i>	1	0.07
	<i>Myotis</i> sp	1	0.07
	<i>Phylloderma stenops</i>	2	0.14
	<i>Phyllostomus discolor</i>	4	0.30
	<i>Phyllostomus elongatus</i>	4	0.30
	<i>Phyllostomus hastatus</i>	2	0.14
	<i>Phyllostomus latifolius</i>	5	0.37
	<i>Platyrrhinus helleri</i>	1	0.07
	<i>Pteronotus rubiginosus</i>	14	1.04
	<i>Pteronotus paranellii</i>	187	14.0
	<i>Sturnira lilium</i>	18	1.34
	<i>Sturnira</i> sp	6	0.44
	<i>Sturnira tildae</i>	17	1.27
	<i>Tadarida brasiliensis</i>	2	0.14
	<i>Tonatia saurophila</i>	4	0.30
	<i>Tonatia</i> sp	1	0.07
	<i>Trachops cirrhosus</i>	5	0.37
	<i>Uroderma bilobatum</i>	13	0.97
	<i>Uroderma</i> sp	1	0.07
	<i>Vampiroides carriacolli</i>	1	0.07
	<i>Xophostoma sylvicola</i>	1	0.07
	Total of Chiroptera	1339	100.0

had neutralizing antibodies [25]. Due to the potential role of cattle as a viral amplifier, the presence of bovines could facilitate VACV persistence and dissemination into the environment.

VACV has recently been identified at the borders of Brazil, in countries such as Argentina [2], Uruguay [3], and Colombia [4]. Even though the circumstances of VACV detection in South American countries are still uncertain, the cattle trade and translocation have to be considered, as highlighted in Amazon region (Mato Grosso and Rondônia states) [9]. Furthermore, some authors have hypothesized that the seroprevalence of OPV antibodies in human

populations from the Amazon basin (Acre state) could be linked to agriculture and livestock practices, reinforcing the role of cattle in VACV maintenance [8].

Compared to other South American countries where VACV has been detected, a different situation is observed in French Guiana, where a lower deforestation rate is observed and where only a few cattle or horses are present [26] (<http://www.globalforestwatch.org/>) (Fig. 1). Nevertheless, our findings do not definitively establish that VACV is not circulating, and they also do not exclude the possibility that small mammals can act as its reservoir in nature. However, the data presented here strongly suggest the absence of circulation of VACV, or presence at low levels that were not detected, in remote Amazonian areas with no human impact over a long period of time. The monitoring and surveillance of VACV circulation is important to ensure early warning of zoonotic outbreaks for vulnerable human populations.

Acknowledgements We thank colleagues from the Laboratoire des Interactions Virus-Hôtes, Institut Pasteur de la Guyane for their excellent technical support. We also thank Pró-Reitoria de Pesquisa from Universidade Federal de Minas Gerais (PRPq/UFGM), CAPES, FAPEMIG and CNPq. JS Abrahão, EG Kroon, and G de Souza Trindade are researchers from CNPq.

Compliance with ethical standards

Funding This study was funded by two European projects, CAROLIA and RESERVOIRS, through ERDF funds and a European Commission “REGPOT-CT-2011-285837-STRonGer” grant within the FP7. This work also benefited from an “Investissements d’Avenir” grant managed by Agence Nationale de la Recherche, France (CEBA, ref. ANR-10-LABX-25-01).

Conflict of interest The authors declare no conflict of interest.

Ethical approval Capture of rodents, bats and marsupials does not require an ethics committee in French Guiana.

References

- Kroon EG, Mota BE, Abrahão JS, da Fonseca FG, de Souza Trindade G (2011) Zoonotic Brazilian Vaccinia virus: from field to therapy. *Antiviral Res* 92:150–163
- Franco-Luiz AP, Fagundes-Pereira A, Costa GB, Alves PA, Oliveira DB, Bonjardim CA, Ferreira PC, Trindade GS, Panei CJ, Galosi CM, Abrahão JS, Kroon EG (2014) Spread of vaccinia virus to cattle herds, Argentina, 2011. *Emerg Infect Dis* 20:1576–1578
- Franco-Luiz AP, Oliveira DB, Pereira AF, Gasparini MC, Bonjardim CA, Ferreira PC, Trindade GS, Puentes R, Furtado A, Abrahão JS, Kroon EG (2016) Detection of Vaccinia virus in dairy cattle serum samples from 2009, Uruguay. *Emerg Infect Dis* 22:2174–2177
- Usme-Ciro JA, Paredes A, Walteros DM, Tolosa-Pérez EN, Laiton-Donato K, Pinzón MD, Petersen BW, Gallardo-Romero NF, Li Y, Wilkins K, Davidson W, Gao J, Nishi Patel, Nakazawa Y, Reynolds MG, Satheshkumar PS, Emerson GL, Páez-Martínez A (2017) Detection and molecular characterization of zoonotic poxviruses circulating in the Amazon Region of Colombia, 2014. *Emerg Infect Dis* 23:649–653. doi:10.3201/eid2304.161041
- Fonseca FG, Lanna MCS, Campos MAS, Kitajima EW, Peres JN, Golgher RR, Ferreira PC, Kroon EG (1998) Morphological and molecular characterization of the poxvirus BeAn 58058. *Arch Virol* 143:1171–1186
- Medaglia ML, Pessoa LC, Sales ER, Freitas TR, Damaso CR (2009) Spread of cantagalo virus to northern Brazil. *Emerg Infect Dis* 15:1142–1143
- Abrahão JS, Silva-Fernandes AT, Lima LS, Campos RK, Guedes MI, Cota MM, Assis FL, Borges IA, Souza-Júnior MF, Lobato ZI, Bonjardim CA, Ferreira PC, Trindade GS, Kroon EG (2010) Vaccinia virus infection in Monkeys, Brazilian Amazon. *Emerg Infect Dis* 16:976–979
- Mota BEF, Trindade GS, Diniz TC, da Silva-Nunes M, Braga EM, Urbano-Ferreira M, Rodrigues GO, Bonjardim CA, Ferreira PC, Kroon EG (2010) Seroprevalence of orthopoxvirus in an Amazonian rural village, Acre, Brazil. *Arch Virol* 155:1139–1144
- Quixabeira-Santos JC, Medaglia MLG, Pescador CA, Damaso CR (2011) Animal Movement and Establishment of Vaccinia Virus Cantagalo Strain in Amazon Biome, Brazil. *Emerg Infect Dis* 17:726–729
- de Assis FL, Vinhote WM, Barbosa JD, de Oliveira CH, Campos KF, Silva NS, Trindade GS, Abrahão JS, Kroon EG (2013) Reemergence of Vaccinia Virus during zoonotic outbreak, Pará State, Brazil. *Emerg Infect Dis* 19:2017–2020
- Oliveira DB, Assis FL, Ferreira PC, Bonjardim CA, de Souza Trindade G, Kroon EG, Abrahão JS (2013) Group 1 Vaccinia virus Zoonotic outbreak in Maranhão State, Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 89:1142–1145
- Franco-Luiz AP, Fagundes-Pereira A, de Oliveira CH, Barbosa JD, Oliveira DB, Bonjardim CA, Ferreira PC, de Souza Trindade G, Abrahão JS, Kroon EG (2016) The detection of Vaccinia virus confirms the high circulation of Orthopoxvirus in Buffaloes living in geographical isolation, Marajó Island, Brazilian Amazon. *Comp Immunol Microb Infect Dis* 46:16–19
- Trindade GS, Emerson GL, Carroll DS, Kroon EG, Damon IK (2007) Brazilian vaccinia viruses and their origins. *Emerg Infect Dis* 13:965–972
- Drumond BP, Leite JA, da Fonseca FG, Bonjardim CA, Ferreira PC, Kroon EG (2008) Brazilian Vaccinia virus strains are genetically divergent and differ from the Lister vaccine strain. *Microbes Infect* 10:185–197
- Medaglia ML, Moussatché N, Nitsche A, Dabrowski PW, Li Y, Damon IK, Lucas CG, Arruda LB, Damaso CR (2015) Genomic analysis, phenotype, and virulence of the historical Brazilian smallpox vaccine strain IOC: implications for the origins and evolutionary relationships of vaccinia virus. *J Virol* 89:11909–11925
- Trindade GS, Emerson GL, Sammons S, Frace M, Govil D, Fernandes Mota BE, Abrahão JS, de Assis FL, Olsen-Rasmussen M, Goldsmith CS, Li Y, Carroll D, Guimarães da Fonseca F, Kroon E, Damon IK (2016) Serro 2 virus highlights the fundamental genomic and biological features of a natural vaccinia virus infecting humans. *Viruses* 8:328
- de Thoisy B, Bourhy H, Delaval M, Pontier D, Dacheux L, Darcissac E, Donato D, Guidez A, Larrous F, Lavenir R, Salmier A, Lacoste V, Lavergne A (2016) Bioecological drivers of rabies virus circulation in a neotropical bat community. *PLoS Negl Trop Dis* 10:e0004378
- de Thoisy B, Lacoste V, Germain A, Muñoz-Jordán J, Colón C, Mauffrey JF, Delaval M, Catzeffis F, Kazanji M, Matheus S, Dussart P, Morvan J, Setién AA, Deparis X, Lavergne A (2009)

- Dengue infection in neotropical forest mammals. *Vector Borne Zoonotic Dis* 9:157–170
19. Geessien Kroon E, Santos Abrahão J, de Souza Trindade G, Pereira Oliveira G, Moreira Franco Luiz AP, Barbosa Costa G, Teixeira Lima M, Silva Calixto R, de Oliveira DB, Drumond BP (2016) Natural Vaccinia virus infection: diagnosis, isolation, and characterization. *Curr Protoc Microbiol* 42:14A.5.1–14A.5.43
 20. Oliveira G, Assis F, Almeida G, Albarnaz J, Lima M, Andrade AC, Calixto R, Oliveira C, Diomedes Neto J, Trindade G, Ferreira PC, Erna G, Abrahão J (2015) From lesions to viral clones: biological and molecular diversity amongst autochthonous Brazilian vaccinia virus. *Viruses* 7:1218–1237
 21. Dutra LA, de Freitas Almeida GM, Oliveira GP, Abrahão JS, Kroon EG, Trindade GS (2017) Molecular evidence of Orthopoxvirus DNA in capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) stool samples. *Arch Virol* 162:439–448
 22. Abrahão JS, Guedes MI, Trindade GS, Fonseca FG, Campos RK, Mota BF, Lobato ZI, Silva-Fernandes AT, Rodrigues GO, Lima LS, Ferreira PC, Bonjardim CA, Kroon EG (2009) One more piece in the VACV ecological puzzle: could peridomestic rodents be the link between wildlife and bovine vaccinia outbreaks in Brazil? *PLoS One* 4:e7428
 23. Peres MG, Bacchiega TS, Appolinário CM, Vicente AF, Allendorf SD, Antunes JM, Moreira SA, Legatti E, Fonseca CR, Pituco EM, Okuda LH, Pantoja JC, Ferreira F, Megid J (2013) Serological study of vaccinia virus reservoirs in areas with and without official reports of outbreaks in cattle and humans in São Paulo, Brazil. *Arch Virol* 158:2433–2441
 24. Peres MG, Barros CB, Appolinário CM, Antunes JM, Mioni MS, Bacchiega TS, Allendorf SD, Vincent AF, Fonseca CR, Megid J (2016) Dogs and opossums positive for vaccinia virus during outbreak affecting cattle and humans, São Paulo State, Brazil. *Emerg Infect Dis* 22:271–273
 25. Guedes MI, Rehfeld IS, de Oliveira TM, Assis FL, Matos AC, Abrahão JS, Kroon EG, Lobato ZI (2013) Detection of *Vaccinia virus* in blood and faeces of experimentally infected cows. *Transbound Emerg Dis* 60:552–555
 26. Hansen MC, Potapov PV, Moore R, Hancher M, Turubanova SA, Tyukavina A, Thau D, Stehman SV, Goetz SJ, Loveland TR, Kommareddy A, Egorov A, Chini L, Justice CO, Townshend JR (2013) High-resolution global maps of 21st-century forest cover change. *Science* 342:850–853

4.2. ARTIGO 2: Detection of Vaccinia Virus in Urban Domestic Cats, Brazil

Este artigo foi publicado em Fevereiro de 2017 no periódico Emerging Infectious Diseases.

DESCRIÇÃO DO ESTUDO: Após a erradicação da varíola há 36 anos, a campanha de vacinação global foi interrompida. Devido a esse fato, surtos envolvendo outros ortopoxvirus têm sido registrados em todo o mundo, como o *Vaccinia virus* que é prevalente no Brasil, afetando o gado leiteiro e ordenhadores, e o *Cowpox virus* na Europa, afetando especialmente gatos e roedores, além de humanos. Entretanto, diferentemente do *Cowpox virus*, que já foi relatado circular e causar surtos em áreas urbanas de vários países Europeus, não há relatos sobre a circulação do VACV em áreas urbanas do Brasil. Portanto, o objetivo deste estudo foi investigar a circulação do VACV entre felinos de diferentes centros urbanos no Brasil, suas implicações para a cadeia epidemiológica do VACV e os riscos para a saúde pública. Nossos resultados apontaram uma soroprevalência de 5.8%, com títulos de anticorpos variando de 100 a 1600 unidades neutralizantes/ml. O sequenciamento de um pequenos fragmento do gene A56R confirmou a infecção pelo VACV. Embora no Brasil a ocorrência do VACV esteja até o momento relacionada ao ambiente rural e silvestre, investigações conduzidas em áreas urbanas são de grande importância para a compreensão da cadeia epidemiológica desse vírus emergente. Com a erradicação da varíola, a vacinação foi interrompida em todo o mundo, aumentando o número de pessoas imunologicamente desprotegidas; portanto, esses achados reforçam o impacto da disseminação viral para ambientes urbanos, podendo afetar populações vulneráveis e causar um grande desafio para a saúde pública.

References

1. Zhao G, Gu X, Lu X, Pan J, Duan Z, Zhao K, et al. Novel reassortant highly pathogenic H5N2 avian influenza viruses in poultry in China. *PLoS One*. 2012;7:e46183. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0046183>
2. Lee YJ, Kang HM, Lee EK, Song BM, Jeong J, Kwon YK, et al. Novel reassortant influenza A(H5N8) viruses, South Korea, 2014. *Emerg Infect Dis*. 2014;20:1087–9. <http://dx.doi.org/10.3201/eid2006.140233>
3. Zhou LC, Liu J, Pei EL, Xue WJ, Lyu JM, Cai YT, et al. Novel avian influenza A(H5N8) viruses in migratory birds, China, 2013–2014. *Emerg Infect Dis*. 2016;22:1121–3. <http://dx.doi.org/10.3201/eid2206.151754>
4. Wu H, Peng X, Xu L, Jin C, Cheng L, Lu X, et al. Novel reassortant influenza A(H5N8) viruses in domestic ducks, eastern China. *Emerg Infect Dis*. 2014;20:1315–8. <http://dx.doi.org/10.3201/eid2008.140339>
5. Jeong J, Kang HM, Lee EK, Song BM, Kwon YK, Kim HR, et al. Highly pathogenic avian influenza virus (H5N8) in domestic poultry and its relationship with migratory birds in South Korea during 2014. *Vet Microbiol*. 2014;173:249–57. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.08.002>
6. Marchenko VY, Susloparov IM, Kolosova NP, Goncharova NI, Shipovalov AV, Durymanov AG, et al. Influenza A(H5N8) virus isolation in Russia, 2014. *Arch Virol*. 2015;160:2857–60. <http://dx.doi.org/10.1007/s00705-015-2570-4>
7. Lee DH, Torchetti MK, Winker K, Ip HS, Song CS, Swayne DE. Intercontinental spread of Asian-origin H5N8 to North America through Beringia by migratory birds. *J Virol*. 2015;89:6521–4. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.00728-15>
8. Olsen B, Munster VJ, Wallensten A, Waldenström J, Osterhaus AD, Fouchier RA. Global patterns of influenza a virus in wild birds. *Science*. 2006;312:384–8. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1122438>
9. Florin Beltran M. Uvs Nuur Lake. In: *Biomes and ecosystems*. Amenia (NY): Salem Press; 2013. p. 1260–1
10. Sharshov K, Silko N, Sousloparov I, Zaykovskaya A, Shestopalov A, Drozdov I. Avian influenza (H5N1) outbreak among wild birds, Russia, 2009. *Emerg Infect Dis*. 2010;16:349–51. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1602.090974>

Address for correspondence: Alexander Shestopalov, 630117, Timakova St., Bldg. 2, Room 9-155, Novosibirsk, Russia; email: shestopalov2@ngs.ru

Detection of Vaccinia Virus in Urban Domestic Cats, Brazil

Galileu Barbosa Costa, Júlia Bahia Miranda, Gregório Guilherme Almeida, Jaqueline Silva de Oliveira, Mariana Siqueira Pinheiro, Stefanne Aparecida Gonçalves, Jenner Karlisson Pimenta dos Reis, Ricardo Gonçalves, Paulo César Peregrino Ferreira, Cláudio Antônio Bonjardim, Jônatas Santos Abrahão, Erna Geessien Kroon, Giliane de Souza Trindade

Author affiliation: Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

DOI: <http://dx.doi.org/10.3201/eid2302.161341>

We investigated possible vaccinia virus (VACV) in urban house cats in Brazil. Serum samples from 6 cats were positive for VACV by PCR, indicating likely VACV circulation among house cats in urban areas of Brazil. This finding highlights the importance of epidemiologic surveillance to avoid outbreaks among urban human populations.

Vaccinia virus (VACV) outbreaks, first reported in Brazil in 1999, affect dairy cattle and humans in rural areas (1). Although studies have shown evidence of VACV circulation among several mammal species (1–3), no consensus exists regarding the role of these animals in the VACV transmission chain or which animal is the natural reservoir. In fact, domestic or wild mammals could be asymptomatic hosts and also contribute to VACV transmission (3).

In contrast to VACV, cowpox virus (CPXV) circulates in urban environments in Europe but also in surrounding wild and rural areas (4). CPXV is transmitted to humans mainly by cats, which play a link between the natural reservoirs and humans in the urban environment (4,5). In cats, the clinical course of CPXV infection varies from no symptoms to widespread skin necrotic lesions and can ultimately lead to death (6). Some studies have shown serologic evidence of orthopoxvirus infection in cats from Europe and have addressed the role of these animals in orthopoxvirus transmission to humans (7,8).

Because VACV and CPXV share some epidemiologic features and cats have a prominent role in the urban CPXV transmission chain, we decided to investigate whether urban domestic cats have evidence of exposure to VACV in Brazil. This study was approved by the Animal Experiments Committee of the Universidade Federal de Minas Gerais (registration protocol 315/2014).

We performed a retrospective study of serum samples from 277 house cats, collected during September 2012–December 2014 in 5 states in Brazil (online Technical Appendix Figure 1, <https://wwwnc.cdc.gov/EID/article/23/2/16-1341-Techapp1.pdf>). The states in this study were those whose veterinary clinics agreed to submit samples. We screened serum samples for neutralizing antibodies by using a $\geq 70\%$ plaque-reduction neutralization test (9). To detect VACV DNA in serum samples, we performed real-time PCR targeting the C11R and A56R genes (9). We directly sequenced A56R fragments in both orientations and in triplicate by using the Mega-BACE sequencer (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). We used ClustalW (<http://www.genome.jp/tools/clustalw>) and MEGA7 soft-

ware (<http://www.megasoftware.net>) to align nucleotide sequences and construct a phylogenetic tree (neighbor-joining method with 1,000 bootstraps).

The cats' ages ranged from 3 months to 15 years; 150 (54.2%) of the cats were female. Thirteen cats (4.7%) had outdoor access, and 37 (13.4%) were admitted to the veterinary clinic for ≥ 1 night. Some cats had clinical illness inconsistent with orthopoxvirus infection, which can overlap with other common dermatologic diseases affecting cats (online Technical Appendix Table). Most (8/53 [15.1%]) seropositive cats were from the Pampulha region of the city of Belo Horizonte (Minas Gerais State) (online Technical Appendix Figure 1), followed by the eastern region of

the city. We detected neutralizing antibodies in 16 animals (5.8%), with titers ranging from 100 to 1,600 neutralizing units/mL; of these, 13 (4.7%) were positive for C11R gene and 6 for A56R gene (online Technical Appendix Table). Alignment of the A56R fragments showed high similarity to the homologous gene of VACV isolates from Brazil (online Technical Appendix Figure 1). For the phylogenetic tree, we grouped sequences with VACV group 1 and 2 isolates (Figure).

We describe evidence of VACV circulation in cats in an urban environment in Brazil. Many studies have attempted to elucidate VACV outbreaks and risk factors in rural and wild areas (1–3). Our findings reveal a seropositivity rate of

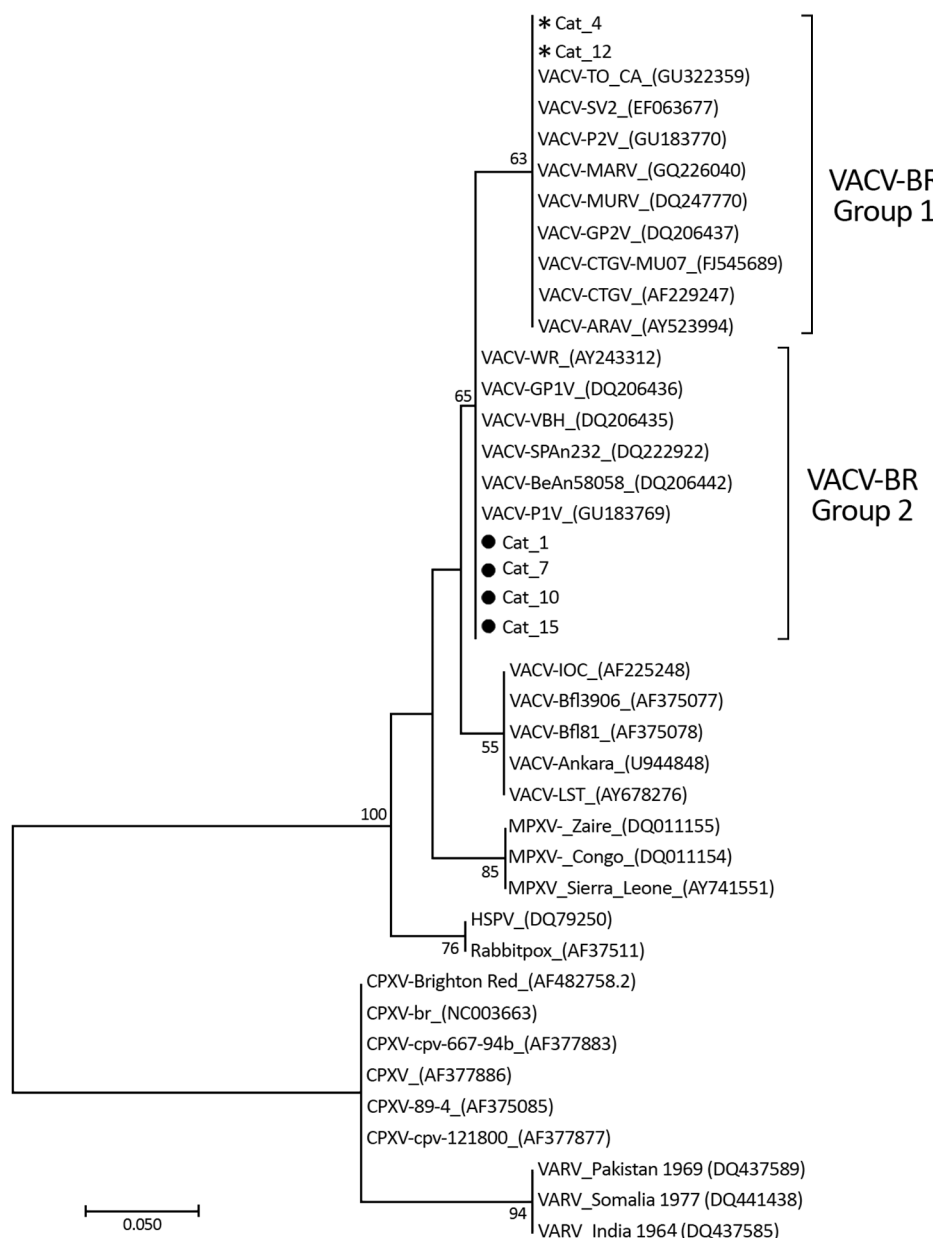


Figure. Phylogenetic tree constructed based on nucleotide sequences of orthopoxvirus A56R (hemagglutinin) genes detected in serum samples of 6 house cats house cats with neutralizing antibodies for vaccinia virus, Belo Horizonte, Brazil, September 2012–December 2014. The tree was constructed with A56R gene sequences by using the neighbor-joining method with 1,000 bootstrap replicates and the Tamura 3-parameter model in MEGA7 (<http://www.megasoftware.net>). Asterisks indicate group 1 vaccinia virus isolates (nonvirulent strains) detected in 2 cats. Black circles indicate group 2 vaccinia virus isolates (virulent strains) detected in 4 cats. Numbers along branches are bootstrap values. GenBank accession numbers are shown for reference isolates. Scale bar indicates nucleotide substitutions per site.

RESEARCH LETTERS

5.8%, which is lower than the rate observed in a previous study from Norway (8) and higher than the rate observed in a study of cats in Austria (7). Notably, the Pampulha region, where most seropositive animals were detected, corresponded to areas of relatively low elevation that feature houses with green areas, cottage houses, and ecologic parks, with forested areas making up the remaining portion of the land (online Technical Appendix Figure 1).

Recent data from our research group revealed that capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) from the Pampulha region tested positive for VACV (10). These data, corroborated by molecular detection of VACV groups 1 and 2 in house cats from Belo Horizonte, further indicate the presence of VACV in an urban environment (online Technical Appendix Figure 2). In this study, PCR-positive cats showed no clinical signs that would indicate orthopoxvirus infection at the time of sample collection (online Technical Appendix Table), unlike what was observed among cats infected with CPXV in Europe (4,5). Furthermore, cats 4, 10, and 15 (online Technical Appendix Table), in which we detected ongoing VACV DNA, had no clinical signs. Although we detected group 2 VACV (virulent strains) in 4 samples, our findings corroborate the results of Bennett et al. (6), which showed that cats infected with VACV had asymptomatic infection.

Limitations of our study include selection bias of animals; it was not possible to use a convenience sample from the 5 Brazilian states. We were also unable to obtain detailed clinical information of all animals and unable to collect additional clinical samples to better understand the clinical course of VACV infection in cats. In Brazil, no records of VACV-like detection in urban populations are available, despite the fact that VACV was recently found in urban areas (10). In fact, potential sources of infection for cat populations (e.g., small rodents) should be considered. Cats could possibly seroconvert without the onset of classical illness. Hence, VACV could be circulating in cats from urban environments. The potential role of cats in infecting humans should be investigated further to determine whether VACV can emerge in urban human populations and pose a threat to public health.

Acknowledgments

We thank Associação Bichos Gerais, who provided some cat serum samples from Belo Horizonte. We also thank colleagues from the Laboratório de Vírus (ICB-UFMG) for their excellent technical support.

Financial support was provided by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq),

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), and Pró-Reitoria de Pesquisa/UFMG (PRPq). C.A. Bonjardim, J.S. Abrahão, E.G. Kroon, J.K.P. Reis, and G.S. Trindade are researchers from CNPq.

Mr. Costa is a PhD candidate in biomedicine at the Laboratório de Vírus, Microbiology Department, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. His research is focused on the diagnosis, epidemiology, control, and prevention of orthopoxviruses and other emerging viruses.

References

1. Kroon EG, Mota BE, Abrahão JS, da Fonseca FG, de Souza Trindade G. Zoonotic Brazilian vaccinia virus: from field to therapy. *Antiviral Res.* 2011;92:150–63. <http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2011.08.018>
2. Peres MG, Bacchiega TS, Appolinário CM, Vicente AF, Allendorf SD, Antunes JM, 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. *Arch Virol.* 2013;158:2433–41. <http://dx.doi.org/10.1007/s00705-013-1740-5>
3. Peres MG, Barros CB, Appolinário CM, Antunes JM, Mioni MS, Bacchiega TS, et al. Dogs and opossums positive for vaccinia virus during outbreak affecting cattle and humans, São Paulo State, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2016;22:271–3. <http://dx.doi.org/10.3201/eid2202.140747>
4. Essbauer S, Pfeffer M, Meyer H. Zoonotic poxviruses. *Vet Microbiol.* 2010;140:229–36. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.08.026>
5. Carletti F, Bordin L, Castilletti C, Di Caro A, Falasca L, Gioia C, et al. Cat-to-human orthopoxvirus transmission, northeastern Italy. *Emerg Infect Dis.* 2009;15:499–500. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1503.080813>
6. Bennett M, Gaskell RM, Gaskell CJ, Baxby D, Kelly DF. Studies on poxvirus infection in cats. *Arch Virol.* 1989;104:19–33. <http://dx.doi.org/10.1007/BF01313805>
7. Nowotny N. Serologic studies of domestic cats for potential human pathogenic virus infections from wild rodents [in German]. *Zentralbl Hyg Umweltmed.* 1996;198:452–61.
8. Tryland M, Sandvik T, Holtet L, Nilsen H, Olsvik O, Traavik T. Antibodies to orthopoxvirus in domestic cats in Norway. *Vet Rec.* 1998;143:105–9. <http://dx.doi.org/10.1136/vr.143.4.105>
9. Geessien Kroon E, Santos Abrahão J, de Souza Trindade GS, Pereira Oliveira G, Moreira Franco-Luiz AP, Barbosa Costa G, et al. Natural vaccinia virus infection: diagnosis, isolation, and characterization. *Curr Protoc Microbiol.* 2016;42:14A.5.1–14A.5.43. <http://dx.doi.org/10.1002/cpmc.13>
10. Dutra LA, de Freitas Almeida GM, Oliveira GP, Abrahão JS, Kroon EG, Trindade GS. Molecular evidence of Orthopoxvirus DNA in capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) stool samples. *Arch Virol.* 2016. <http://dx.doi.org/10.1007/s00705-016-3121-3>

Address for correspondence: Giliane de Souza Trindade, 6627 Avenida Presidente Antônio Carlos, Pampulha, Belo Horizonte – MG, 31270-901, Brazil; email: giliane@icb.ufmg.br

Article DOI: <http://dx.doi.org/10.3201/eid2302.161341>

Detection of Vaccinia Virus in Urban Domestic Cats, Brazil

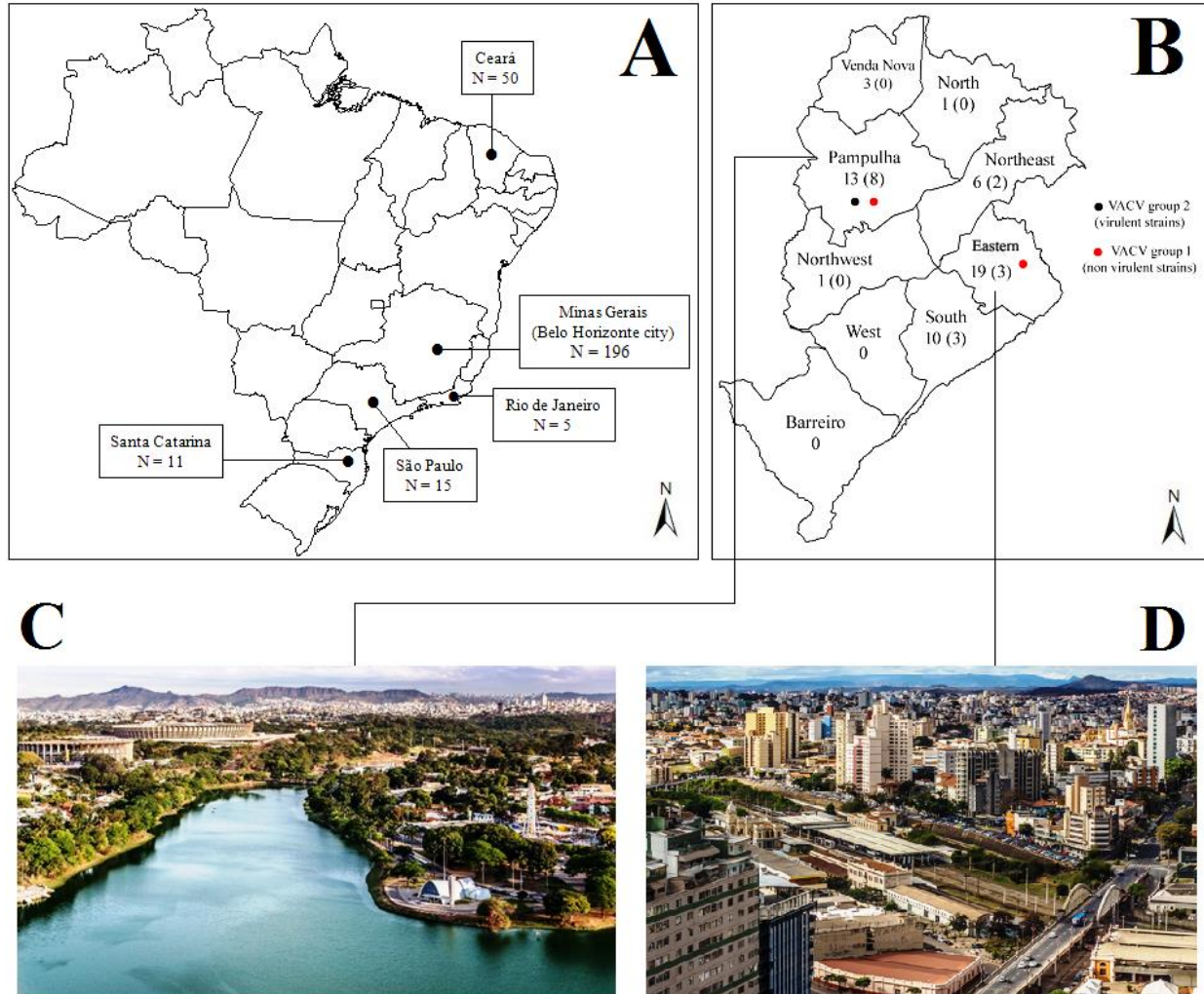
Technical Appendix.

Technical Appendix Table. Diagnostic results for 16 house cats with neutralizing antibodies for vaccinia virus, Belo Horizonte, Brazil, September 2012–December 2014*

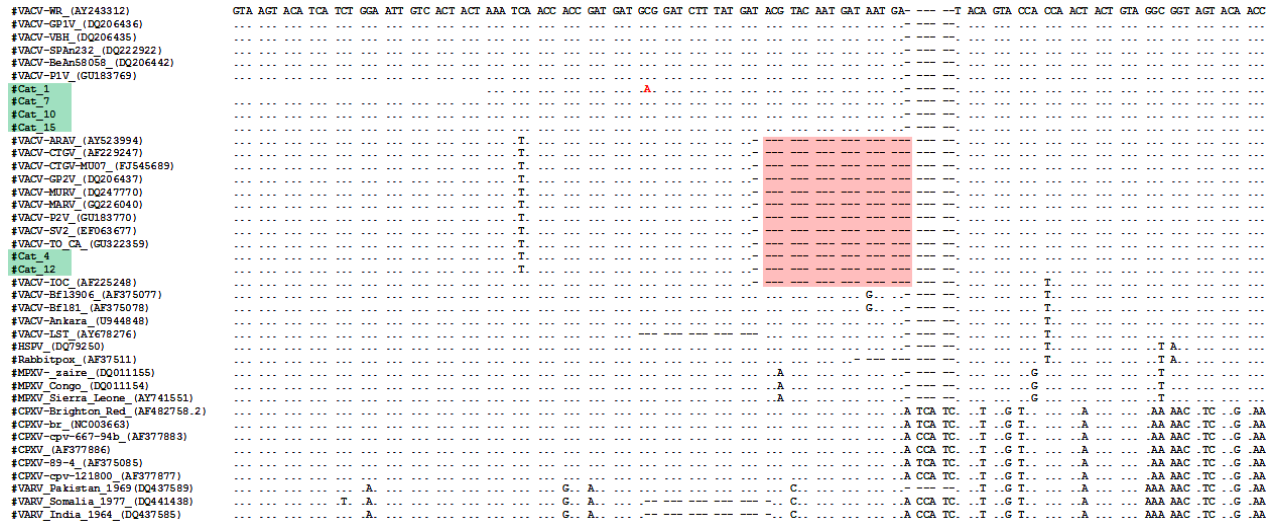
Cat	PRNT ₇₀ titer (NU/mL)	qPCR C11R	qPCR A56R†	VACV strain	Clinical signs
1	1:320 (800)	+	+	VACV-BR group 2	Urethral obstruction
2	1:40 (100)	+	–	–	FeLV+
3	1:40 (100)	+	–	–	Hepatic lipidosis
4	1:160 (400)	+	+	VACV-BR group 1	None
5	1:320 (800)	–	–	–	Hepatic lipidosis
6	1:160 (400)	+	–	–	None
7	1:320 (800)	+	+	VACV-BR group 2	Urethral obstruction
8	1:40 (100)	–	–	–	FIV+
9	1:160 (400)	+	–	–	None
10	1:640 (1,600)	+	+	VACV-BR group 2	None
11	1:80 (200)	–	–	–	Sporotrichosis
12	1:80 (200)	+	+	VACV-BR group 1	<i>Mycoplasma haemofelis</i>
13	1:40 (100)	+	–	–	None
14	1:640 (1,600)	+	–	–	<i>Dipylidium caninum</i>
15	1:640 (1,600)	+	+	VACV-BR group 2	None
16	1:40 (100)	+	–	–	Uncharacterized skin lesions

*BR, Brazil; FeLV, feline leukemia virus; FIV, feline immunodeficiency virus; NU, neutralizing units; qPCR, real-time PCR; PRNT₇₀, ≥70% plaque-reduction neutralization test; VACV, vaccinia virus; +, positive; –, negative.

†Fragment sequenced.



Technical Appendix Figure 1. Map of Brazil highlighting studied areas in black. A) The 5 states in which house cats were sampled. N indicates the number of sampled house cats. B) Map of Belo Horizonte city (located in Minas Gerais State), where most of the house cats were sampled. The map shows the regions in Belo Horizonte including Pampulha and eastern regions. The numbers indicate the number of house cats sampled. Seropositive cats indicated with parentheses. C) Characteristics of Pampulha region. D) Characteristics of eastern regions, respectively.



Technical Appendix Figure 2. Nucleotide sequence of the vaccinia virus (VACV)–positive domestic cats A56R (hemagglutinin) genes (green) compared with homologous sequences of several other orthopoxviruses, Belo Horizonte, Brazil, September 2012–December 2014. Strains had the deletion region (red) conserved and were grouped with other VACVs (group 1 and 2) isolated in Brazil. The sample from Cat_1 showed 1 polymorphism (C–A) compared with other VACV isolates.

4.3. ARTIGO 3: Vaccinia Virus among Domestic Dogs and Wild Coatis, Brazil, 2013-2015

Este artigo foi publicado em Dezembro de 2018 no periódico *Emerging Infectious Diseases*.

DESCRIÇÃO DO ESTUDO: Os vírus do gênero *Orthopoxvirus* (OPV) possuem espécies zoonóticas como o *Monkeypox virus*, presente na África, e o *Cowpox virus*, presente na Europa. No Brasil, o *Vaccinia virus* (VACV) tem sido amplamente descrito e caracterizado por causar uma doença conhecida como Vaccinia Bovina, afetando principalmente o gado leiteiro e ordenhadores. Sabe-se que o VACV circula principalmente em áreas rurais, mas também no ambiente silvestre. Estudos já mostraram a circulação do VACV entre várias espécies de mamíferos como búfalos, macacos, cavalos e roedores. Evidências sorológicas apontaram a circulação de OPV em Procionídeos no México. Entretanto, não se sabe ainda o papel desses animais na cadeia de transmissão do VACV ou qual deles poderia ser de fato o seu reservatório. Além disso, estudos recentes têm demonstrado a presença do VACV em ambientes urbanos e possíveis ameaças para a saúde pública. O objetivo deste trabalho foi verificar a participação de cães domésticos e quatis silvestres na cadeia epidemiológica do VACV no Brasil, bem como o risco de disseminação para áreas urbanas e desafios para a saúde pública. O presente estudo investigou 90 amostras de soro e swab de quatis e 182 amostras de soro e swab de cães provenientes de área silvestre e urbana, respectivamente, em Belo Horizonte. Foram encontrados 13 quatis (14,4%) e 30 cães (19,5%) soropositivos, com títulos variando entre 100 a 800 unidades neutralizantes/ml. Embora a ocorrência do VACV no Brasil seja, até o momento, restrita ao ambiente rural, alguns estudos indicam que o VACV circula em animais de ambientes silvestres e urbanos. Entender a eco-epidemiologia do VACV é fundamental para compreensão de mais um ponto na história da biologia deste OPV. Além disso, o estudo da circulação do VACV entre animais domésticos e silvestres também agrega importantes informações sobre a sua cadeia epidemiológica, possíveis reservatórios e desafios para a saúde pública. Como os animais estudados aparentemente não possuem sinais clínicos da doença, esses poderiam ser hospedeiros que contribuem para a manutenção do VACV em diferentes ambientes. Nossos achados levantam questões sobre a emergência do VACV e o risco da disseminação para o ambiente urbano, refletindo a importância desses animais para a cadeia epidemiológica do VACV e os riscos de surtos em áreas urbanas, que podem gerar graves danos para a saúde pública.

Vaccinia Virus among Domestic Dogs and Wild Coatis, Brazil, 2013–2015

Galileu Barbosa Costa, Lara Ribeiro de Almeida, Aline Gabriele Ribeiro Cerqueira, Wander Ulisses Mesquita, Jaqueline Silva de Oliveira, Júlia Bahia Miranda, Ana Teresa Saraiva-Silva, Jônatas Santos Abrahão, Betânia Paiva Drumond, Erna Geessien Kroon, Pedro Lúcio Lithg Pereira, Danielle Ferreira de Magalhães Soares, Giliane de Souza Trindade

To determine their potential role as a source of human infection, we tested domestic dogs (urban) and wild coatis (wild) in Brazil for vaccinia virus. Our findings of positive neutralizing antibodies and quantitative PCR results for 35/184 dogs and 13/90 coatis highlight a potential public health risk.

Since smallpox was declared eradicated in 1980, after a massive effort led by the World Health Organization, other orthopoxviruses have gained notoriety as zoonotic agents worldwide (1). Over the past 17 years in Brazil, many zoonotic outbreaks of vaccinia virus (VACV) infection have been recorded throughout the country, becoming a burden for the dairy industry and public health (2). The most affected hosts during outbreaks are dairy cattle and humans (2). Recent studies assessing the role of wildlife in the maintenance cycle of VACV in nature have corroborated previous findings that rodents and marsupials serve as links between natural and anthropic environments (2–4).

Indeed, the increased frequency of reported VACV detection in several species of mammals points toward new insights into the circulation and maintenance of VACV in wild (forest) and rural (farm) environments (2,5–8). Studies conducted in Latin America suggest that wildlife, especially small and medium-sized mammals, plays a role in virus transmission and maintenance of orthopoxviruses in nature (9). Furthermore, some studies have shown the presence of VACV in urban environments, emphasizing the risks for humans (especially those not vaccinated against smallpox) (10,11).

Author affiliations: Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil (G.B. Costa, L.R. de Almeida, A.G.R. Cerqueira, J.S. de Oliveira, J.B. Miranda, A.T. Saraiva-Silva, J.S. Abrahão, B.P. Drumond, E.G. Kroon, P.L.L. Pereira, D.F. de Magalhães Soares, G. de Souza Trindade); Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Brazil (W.U. Mesquita)

DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2412.171584>

To determine the potential role of domestic and wild animals as a source of VACV infection for humans, we investigated VACV circulation among domestic dogs and wild coatis, animals that live at the intersection of urban and wild environments in Brazil. The capture of wild animals was authorized by the Brazilian Institute of Environment and Renewable Natural Resources, and the study was approved by the Ethics Committee in Animal Experimentation of Universidade Federal de Minas Gerais.

The Study

We analyzed serum and anal swab samples collected during 2013–2015 from 184 domestic dogs and 90 wild coatis in the city of Belo Horizonte (19°55'15"S, 43°56'16"W) in the state of Minas Gerais, Brazil (Figure 1). Swab samples of lesions, if present, were also collected. To determine the presence of neutralizing antibodies in serum, we used an orthopoxvirus plaque reduction neutralization test as previously described (12). Serum titers were defined as the highest dilutions that inhibited $\geq 70\%$ of virus plaques compared with negative controls.

To detect VACV DNA from serum and anal swab samples, we performed real-time PCR targeting the C11R or A56R gene (12). We directly sequenced A56R fragments in both orientations and in triplicate by using the ABI3130 platform (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA). Sequences were aligned with other reference sequences from GenBank by using MEGA 7.0 (<http://www.megasoftware.net>). Statistical analyses were conducted by using Epi Info software version 7.2.1.0 (<https://www.cdc.gov/epiinfo/>); χ^2 and Fisher exact tests were applied with significance set at 5%. We also calculated relative odds ratios (ORs) and 95% CIs.

We detected orthopoxvirus neutralizing antibodies in 35 dogs (prevalence rate 19.0%, 95% CI 14.0%–25.5%; titers 100–400 neutralizing units/mL) and in 13 coatis (prevalence rate 14.4%, 95% CI 8.5%–23.3%; titers 100–800 neutralizing units/mL) (Table 1). Univariate analyses indicated significant associations between presence of neutralizing antibodies and the following: male dogs (OR 2.6; $p = 0.02$), dogs 6–10 years of age (OR 5.2; $p = 0.04$), coatis captured in 2013 (OR 11.2; $p = 0.002$), juvenile coatis (<1 y of age) (OR 35; $p = 0.001$), and adult coatis (>2 y of age) (OR 5.1; $p = 0.04$).

Samples from all seropositive animals were submitted for quantitative PCR (qPCR) to detect VACV DNA (Table

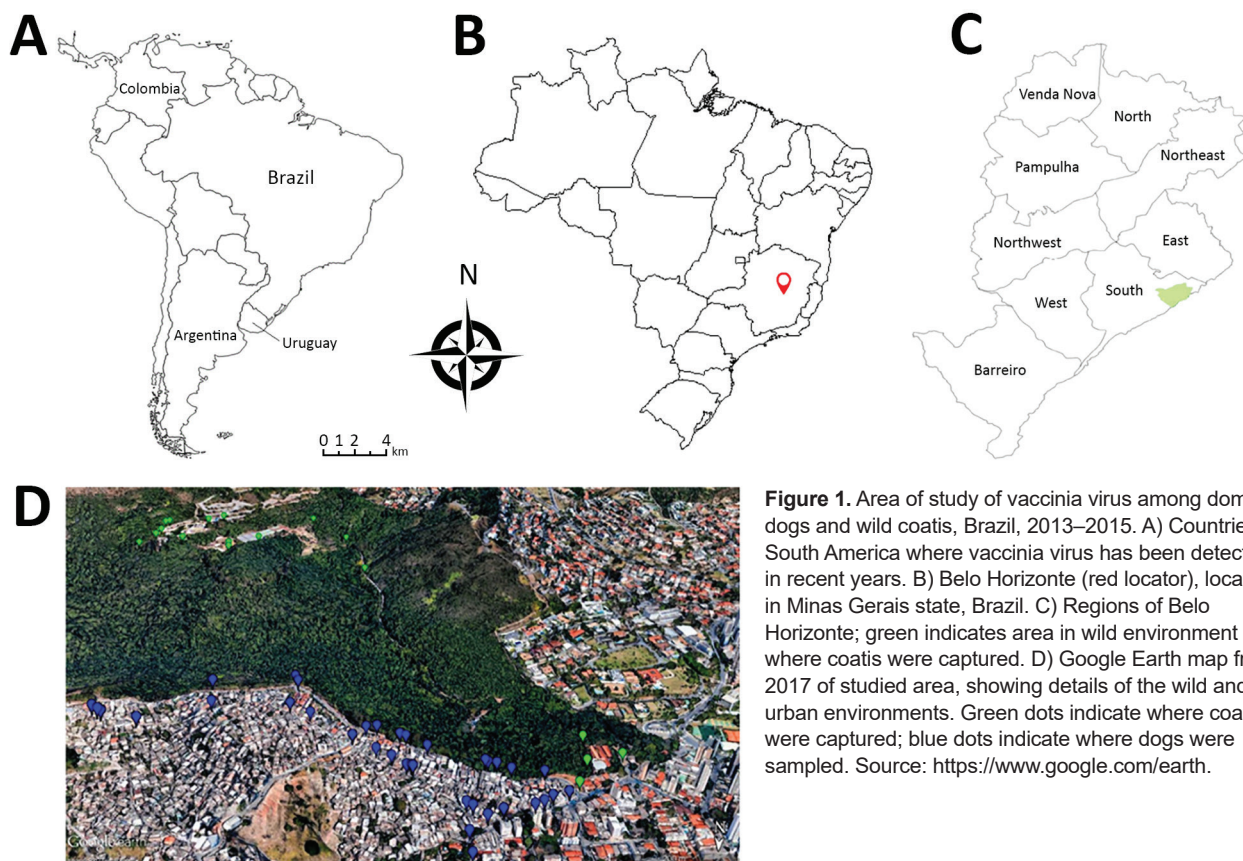


Figure 1. Area of study of vaccinia virus among domestic dogs and wild coatis, Brazil, 2013–2015. A) Countries in South America where vaccinia virus has been detected in recent years. B) Belo Horizonte (red locator), located in Minas Gerais state, Brazil. C) Regions of Belo Horizonte; green indicates area in wild environment where coatis were captured. D) Google Earth map from 2017 of studied area, showing details of the wild and urban environments. Green dots indicate where coatis were captured; blue dots indicate where dogs were sampled. Source: <https://www.google.com/earth>.

2). Overall, serum samples from 7 dogs and 6 coatis were positive for the C11R gene; of these, anal swab samples were positive for this gene for 3 dogs and 4 coatis. Samples from the C11R-positive animals were submitted for another qPCR targeting the A56R gene. Serum samples were positive for the A56R gene for 5 dogs and 4 coatis; of these, anal swab samples were positive for A56R for 1 dog and 3 coatis. No lesion swab samples were positive by qPCR for both C11R and A56R genes.

Alignment of the amplified A56R fragments showed high similarity to the homologous gene of VACV isolates from Brazil (online Technical Appendix Figure, <https://wwwnc.cdc.gov/EID/article/24/12/17-1584-Techapp1.pdf>). Furthermore, 5 sequenced samples (from 4 dogs and 1 coatis) showed an 18-nt signature deletion, which is present in sequences of mouse nonvirulent VACV strains from Brazil (group 1 VACV). This deletion was not present in samples from 4 animals (1 dog and 3 coatis), grouping with mouse virulent VACV strains from Brazil (group 2 VACV).

Conclusions

We assessed VACV exposure of 2 interacting species of animal: domestic dogs from an urban area and coatis from a bordering wild area. In contrast to VACV infections,

human cowpox virus infections have mostly occurred in urban areas of Europe. Cowpox virus is transmitted to humans mainly by domestic cats that are in contact with rodents, the natural cowpox virus reservoirs (13). However, some authors have hypothesized that domestic dogs could be implicated in the transmission cycle of VACV, acting as a link between the natural reservoirs and humans in urban environments (14,15). Indeed, our molecular findings support exposure and possible VACV infection of these animals, thereby indicating that they are a potential source of VACV exposure for humans in urban areas.

The seroprevalence of orthopoxvirus neutralizing antibodies in dogs in Brazil has been described. Peres et al. found that, along with other farm animals, 22.8% of 114 dogs tested were seropositive for orthopoxviruses (7); this seroprevalence differs from that observed in our study, which was 3.8% lower. In addition, most animals tested by Peres et al. were from rural areas where no bovine vaccinia outbreaks had been officially reported, and 96% of farmers declared that their domestic animals have contact with wild animals (9). These findings indicate that dogs could be exposed to VACV through contact with wild animals, corroborating our hypothesis.

We also detected orthopoxvirus neutralizing antibodies in wild coatis, which is consistent with results of a

DISPATCHES

Table 1. Associations between neutralizing antibodies against *Orthopoxvirus* and demographic characteristics of domestic dogs and wild coatis, Belo Horizonte, Brazil, 2013–2015*

Variable	No. (%)†	No. (%) positive‡	No. (%) negative‡	p value	Odds ratio (95% CI)
Domestic dogs					
Year of sampling					
2014	123 (66.8)	24 (19.5)	99 (80.5)	1.00	
2015	61 (33.2)	11 (18.0)	50 (82.0)		
Sex					
F	85 (46.4)	23 (27.1)	62 (72.9)	Reference	2.6 (1.2–5.6)
M	96 (52.5)	12 (12.5)	84 (87.5)	0.02	
Age, y					
≤1	24 (13.1)	7 (29.2)	17 (70.8)	Reference	5.2 (1.2–22.6)
2–5	82 (44.8)	16 (19.5)	66 (80.5)	0.4	
6–10	41 (22.4)	3 (7.3)	38 (92.7)	0.04	
>10	18 (9.8)	4 (22.2)	14 (87.8)	0.9	
Size					
Small	75 (41.0)	13 (18.8)	56 (81.2)	Reference	1.00
Medium	69 (37.7)	11 (20.0)	44 (80.0)	1.00	
Large	30 (16.4)	4 (14.3)	24 (85.7)	0.8	
Confinement status					
Always inside home	41 (22.4)	8 (19.5)	33 (80.5)	Reference	0.7
Always in backyard	115 (62.8)	18 (15.6)	97 (84.3)	0.7	
Home and backyard	25 (13.7)	9 (36.0)	16 (64.0)	0.2	
Outdoors access†					
Yes	83 (45.3)	19 (22.9)	64 (77.1)	0.3	Reference
No	98 (53.6)	16 (16.3)	82 (83.7)	Reference	
Access to MMP					
Yes	18 (9.8)	6 (33.3)	12 (66.7)	0.2	Reference
No	101 (55.2)	18 (17.8)	83 (82.2)	Reference	
Wild coatis					
Year of capture					
2013	57 (52.8)	12 (21.0)	34 (59.6)	0.002	14.8 (1.8–119.8)
2014	51 (47.2)	1 (1.9)	42 (82.3)	Reference	
Sex					
F	64 (59.3)	10 (15.6)	44 (68.7)	Reference	0.3
M	44 (40.7)	3 (6.8)	32 (72.7)	0.3	
Age group					
Juvenile, ≤1 y	44 (40.7)	1 (2.3)	35 (79.5)	Reference	0.05 (0.006–0.5)
Subadult, 1–2 y	18 (16.7)	5 (27.8)	10 (55.6)	0.01	
Adult, >2 y	46 (42.6)	7 (15.2)	31 (67.4)	0.04	

*Totals may not add up to 100% because of missing information. Boldface indicates significance; odds ratios are shown only for significant results. MMP, Mangabeiras Municipal Park.

†Includes access beyond backyard.

‡By plaque reduction neutralization test.

previous study that described the seroprevalence of orthopoxviruses in procyonids from Mexico (9). Our detection of VACV DNA in anal swab samples from coatis indicate that these animals could act as a source of virus

for domestic dogs and humans and serve as a link between wild and urban environments. However, future studies to determine if viable virus is shed are needed to confirm this possibility.

Table 2. Diagnostic results for 7 domestic dogs and 6 wild coatis with neutralizing antibodies for vaccinia virus, Belo Horizonte, Brazil, 2031–2015*

Animal	PRNT ₇₀ titer (NU/mL)	qPCR C11R		qPCR A56R		Strain
		Serum sample	Anal swab sample	Serum sample	Anal swab sample	
Dog 2	1:40 (100)	+	–	+	–	Group 1
Dog 58	1:80 (200)	+	+	+	–	Group 1
Dog 41	1:40 (100)	+	–	–	–	
Dog 77	1:80 (200)	+	+	+	–	Group 1
Dog 86	1:40 (100)	+	–	–	–	
Dog 121	1:160 (400)	+	–	+	–	Group 1
Dog 128	1:160 (400)	+	+	+	+	Group 2
Coati 5	1:40 (100)	+	+	+	+	Group 2
Coatis 17	1:40 (100)	+	–	–	–	
Coatis 27	1:80 (200)	+	–	–	–	
Coatis 39	1:160 (400)	+	+	+	+	Group 2
Coatis 48	1:40 (100)	+	+	+	–	Group 1
Coatis 50	1:80 (200)	+	+	+	+	Group 2

*NU, neutralizing units; PRNT₇₀, 70% plaque reduction neutralization test; qPCR, quantitative PCR.

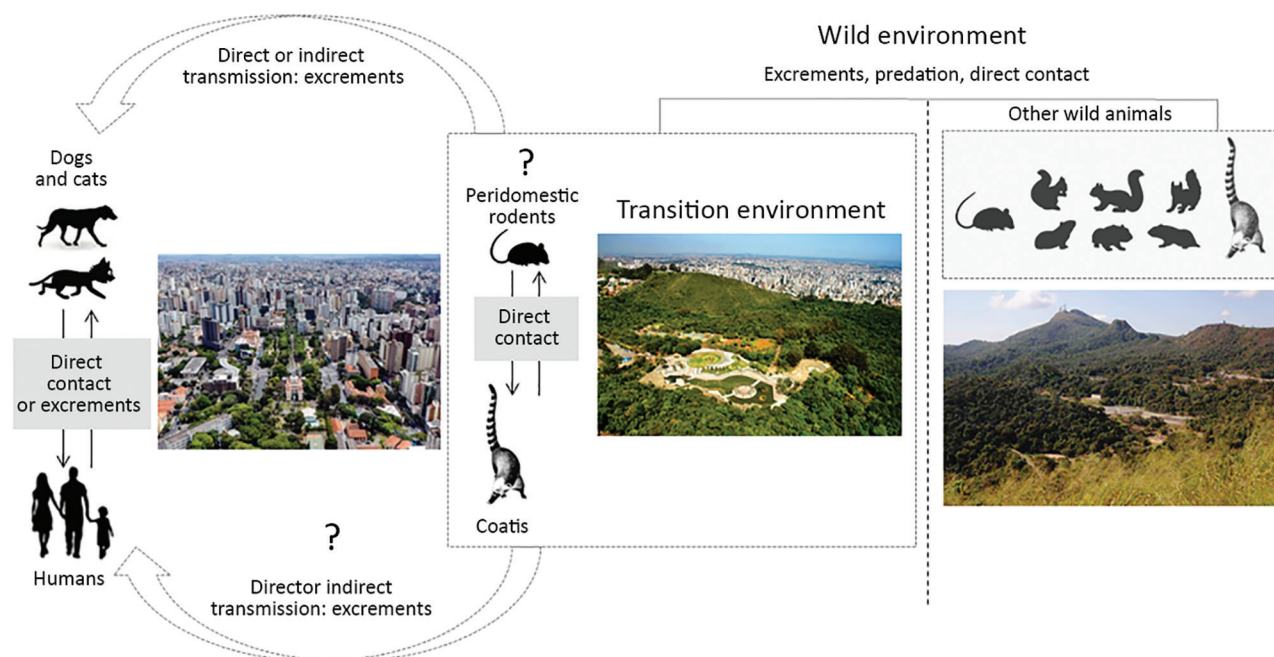


Figure 2. A hypothetical model developed to visualize the role of domestic animals and wildlife in the natural cycle of vaccinia virus (VACV). The model illustrates the dynamics of VACV circulation in urban and wild areas of Brazil. In urban areas, wild coatis could promote the transmission of VACV between domestic animals or humans because they are in direct contact with domestic dogs and circulate among urban residences. Domestic dogs could also promote the transmission of VACV to humans because of direct contact or possibly indirect contact through contaminated feces. In the wild environment, coatis can interact with other mammals such as wild rodents, which are believed to be VACV reservoirs, and acquire the infection (this potential interaction is still under investigation).

To impart information about the role of domestic animals and wildlife in the natural cycle of VACV, we developed a hypothetical model based on previous studies (2,3,5), which could illustrate the dynamics of VACV circulation in urban areas (Figure 2). Because coatis can circulate in wild environments and surrounding urban areas, they could act as a bridge promoting the transmission of VACV between wild animals (mainly rodents) and dogs or humans. Domestic dogs could transmit VACV directly to humans through close contact or indirectly through contaminated feces (Figure 2). These data raise questions about VACV circulation in Brazil and open discussions about the role of dogs and coatis in the VACV epidemiologic cycle.

Acknowledgments

We thank the Grupo de Epidemiologia e Conservação de Animais Silvestres and Residência Multiprofissional em Saúde, from Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais. We are thankful to the Gerência de Controle de Zoonoses team and Regional Centro Sul da Prefeitura Municipal de Belo Horizonte, members from Projeto Quatis, do Parque das Mangabeiras, and all the staff and partners for their support during sample collection. We also thank colleagues from the Laboratório de Vírus for their excellent technical support.

Financial support was provided by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, and Pró-Reitoria de Pesquisa/ Universidade Federal de Minas Gerais. J.S.A., E.G.K., and G.S.T. are researchers from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

About the Author

Mr. Costa is a PhD candidate in microbiology at the Laboratório de Vírus, Microbiology Department, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. His research is focused on the diagnosis, epidemiology, control, and prevention of infection with orthopoxviruses and other emerging viruses.

References

1. Shchelkunov SN. An increasing danger of zoonotic orthopoxvirus infections. *PLoS Pathog.* 2013;9:e1003756. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1003756>
2. Oliveira JS, Figueiredo PO, Costa GB, Assis FL, Drumond BP, da Fonseca FG, et al. Vaccinia virus natural infections in Brazil: the good, the bad, and the ugly. *Viruses.* 2017;9:E340. <http://dx.doi.org/10.3390/v9110340>

3. Miranda JB, Borges IA, Campos SPS, Vieira FN, de Ázara TMF, Marques FA, et al. Serologic and molecular evidence of vaccinia virus circulation among small mammals from different biomes, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2017;23:931–8. <http://dx.doi.org/10.3201/eid2306.161643>
4. Peres MG, Bacchiaga TS, Appolinário CM, Vicente AF, Mioni MSR, Ribeiro BLD, et al. Vaccinia virus in feces and urine of wild rodents from São Paulo state, Brazil. *Viruses.* 2018;10:E51. <http://dx.doi.org/10.3390/v10020051>
5. Abrahão JS, Guedes MIM, Trindade GS, Fonseca FG, Campos RK, Mota BF, 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.* 2009;4:e7428. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0007428>
6. Abrahão JS, Silva-Fernandes AT, Lima LS, Campos RK, Guedes MI, Cota MM, et al. Vaccinia virus infection in monkeys, Brazilian Amazon. *Emerg Infect Dis.* 2010;16:976–9. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1606.091187>
7. Peres MG, Bacchiaga TS, Appolinário CM, Vicente AF, Allendorf SD, Antunes JM, 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. *Arch Virol.* 2013;158:2433–41. <http://dx.doi.org/10.1007/s00705-013-1740-5>
8. Peres MG, Barros CB, Appolinário CM, Antunes JM, Mioni MS, Bacchiaga TS, et al. Dogs and opossums positive for vaccinia virus during outbreak affecting cattle and humans, São Paulo state, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2016;22:271–3. <http://dx.doi.org/10.3201/eid2202.140747>
9. Gallardo-Romero NF, Aréchiga-Ceballos N, Emerson GL, Martínez-Martínez FO, Doty JB, Nakazawa YJ, et al. Endemic orthopoxvirus circulating in procyonids in Mexico. *J Wildl Dis.* 2016;52:609–15. <http://dx.doi.org/10.7589/2015-10-291>
10. Dutra LA, de Freitas Almeida GM, Oliveira GP, Abrahão JS, Kroon EG, Trindade GS. Molecular evidence of orthopoxvirus DNA in capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) stool samples. *Arch Virol.* 2017;162:439–48. <http://dx.doi.org/10.1007/s00705-016-3121-3>
11. Costa GB, Miranda JB, Almeida GG, Silva de Oliveira J, Pinheiro MS, Gonçalves SA, et al. Detection of vaccinia virus in urban domestic cats, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2017;23:360–2. <http://dx.doi.org/10.3201/eid2302.161341>
12. Geessien Kroon E, Santos Abrahão J, de Souza Trindade GS, Pereira Oliveira G, Moreira Franco-Luiz AP, Barbosa Costa G, et al. Natural vaccinia virus infection: diagnosis, isolation, and characterization. *Curr Protoc Microbiol.* 2016;42:14A.5.1–14A.5.43. <http://dx.doi.org/10.1002/cpmc.13>
13. Essbauer S, Pfeffer M, Meyer H. Zoonotic poxviruses. *Vet Microbiol.* 2010;140:229–36. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.08.026>
14. Smith KC, Bennett M, Garrett DC. Skin lesions caused by orthopoxvirus infection in a dog. *J Small Anim Pract.* 1999;40:495–7. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1748-5827.1999.tb03003.x>
15. von Bomhard W, Mauldin EA, Breuer W, Pfliegerhaer S, Nitsche A. Localized cowpox infection in a 5-month-old Rottweiler. *Vet Dermatol.* 2011;22:111–4. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3164.2010.00923.x>

Address for correspondence: Galileu Barbosa Costa or Giliane de Souza Trindade, Universidade Federal de Minas Gerais, Microbiologia, Avenida Presidente Antônio Carlos 6627, Campus Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil 31270-90; email: galileuk1@gmail.com or giliane@icb.ufmg.br

Spotlight: HIV-AIDS



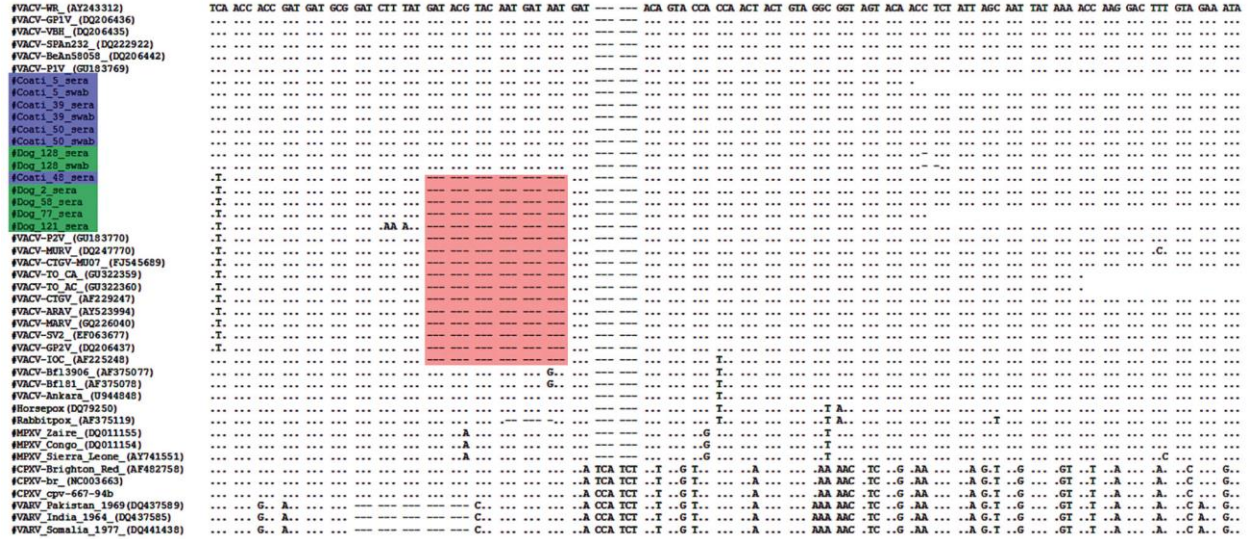
World AIDS Day is held on December 1 of each year and is an opportunity for people worldwide to unite in the fight against HIV, show their support for people living with HIV, and commemorate people who have died. World AIDS Day was the first ever global health day, held for the first time in 1988.

<https://wwwnc.cdc.gov/eid/spotlight/hiv>

**EMERGING
INFECTIOUS DISEASES®**

Article DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2412.171584>

Vaccinia Virus among Domestic Dogs and Wild Coatis, Brazil, 2013–2015



Technical Appendix Figure. Nucleotide sequence of the vaccinia virus A56R (hemagglutinin) gene found in domestic dogs (green) and wild coatis (purple) compared with homologous sequences of several other orthopoxviruses. Strains containing the conserved deletion region (red) were grouped with other vaccinia viruses (groups 1 and 2) isolated in Brazil.

V. DISCUSSÃO GERAL

No presente trabalho foi avaliada a presença do *Vaccinia virus* (VACV) através de métodos sorológicos e moleculares em populações de animais domésticos e silvestres provenientes de ambientes urbanos e silvestres respectivamente, sem histórico de surtos de VACV. Adicionalmente, foi proposto um modelo ecológico hipotético que pode ajudar na compreensão da cadeia epidemiológica do VACV, bem como contribuir com informações pertinentes relacionadas à emergência do VACV para populações humanas e o impacto na saúde pública.

Os resultados referentes à ausência de circulação do VACV numa região altamente preservada da Floresta Amazônica são contrários aos registros que demonstram a circulação do VACV na vida silvestre no Brasil. Os primeiros estudos da detecção do VACV em roedores datam da década de 60, como é o caso do vírus SAV, que foi isolado de camundongos sentinelas na estação de Cotia em São Paulo (LOPES et al., 1965; FONSECA et al., 1998). O BeAn58058 (BAV) foi o único isolado a partir de um roedor silvestre do gênero *Oryzomys*, na floresta de Utinga, em Belém do Pará (FONSECA et al., 1998), que embora não faça fronteira diretamente com a região estudada, representa uma grande porção de floresta Amazônica preservada.

Outros estudos têm demonstrado a circulação de VACV em animais silvestres na presença de surtos de VB, como o *Mariana virus*, detectado em *Mus musculus* durante um surto de VB em Minas Gerais (ABRAHÃO et al., 2009). Neste trabalho, os autores propuseram um modelo hipotético que estabelece uma conexão entre amostras de VACV que poderiam circular na natureza sem necessariamente causar infecções agudas, no qual os roedores infectados eliminariam partículas virais viáveis através das fezes por um longo período, vindo a infectar outros animais silvestres e também animais domésticos (ABRAHÃO et al., 2009). Dessa forma, um hospedeiro assintomático pode ser de grande importância epidemiológica, uma vez que circula ativamente entre sua população, eliminando partículas e auxiliando na manutenção e circulação viral na natureza. De fato, esses achados foram corroborados por PERES e colaboradores, que demonstraram a presença do DNA do VACV em amostras de fezes de roedores das seguintes espécies *Oligoryzomys flavescens*, *Oligoryzomys nigripes* e *Sooretamys angouya*, bem como em amostra de urina de *Oligoryzomys flavescens* (PERES et al., 2018B). Adicionalmente, foi demonstrado o importante papel de roedores silvestres e marsupiais na cadeia epidemiológica do VACV (MIRANDA et al., 2017). Embora não tenha sido possível o isolamento viral a partir de diferentes amostras de vísceras de roedores, a detecção genômica fornece sólidas evidências da participação de roedores silvestres e marsupiais na cadeia epidemiológica do VACV. Embora sejam necessários mais estudos para elucidar a dinâmica da transmissão do VACV entre diversos hospedeiros em diferentes ambientes, os resultados propostos neste importante estudo

ecoepidemiológico reforçam a hipótese de que roedores silvestres possam funcionar como uma ponte entre ambientes naturais e antrópicos (MIRANDA et al., 2017).

Poucos anos após a reemergência do VACV e os surtos de VB, o vírus foi detectado em primatas da região Amazônica no estado do Tocantins (ABRAHÃO et al., 2010). Apesar de outras espécies de mamíferos investigadas neste estudo, como marsupiais (*Didelphis albiventris*), tatus (*Euphractus sexcinctus*), tamanduás (*Tamandua tetradactyla*) e raposas (*Cerdocyon thous*), não apresentarem evidências de contato com OPV, outras espécies merecem atenção, como as espécies *Cebus apella* e *Allouata caraya* em que foram detectados anticorpos e DNAemia, além de quatis (*Nasua nasua*) e cutias (*Dasyprocta sp.*) apenas com evidências sorológicas. A este fato, reforça-se a grande diversidade de espécies de pequenos mamíferos avaliadas neste capítulo, além da pouca amostragem de mamíferos silvestres conhecidas nas quais o VACV foi detectado no Brasil. Isto reflete a possibilidade de haver um efeito diluidor, fruto de um ambiente natural altamente preservado, além da grande diversidade de espécies.

Um fato curioso a ser destacado é a ausência de rebanhos bovinos ou pouquíssimos animais presentes na Guiana Francesa quando comparada ao Brasil. Certamente, a maioria dos estudos sobre VACV no Brasil é focada em surtos envolvendo bovinos e humanos, e especula-se que esses animais atuem como excelentes hospedeiros amplificadores, visto que os bovinos são os principais hospedeiros impactados pela VB devido à natureza da infecção. DNAemia pode ser detectada desde o segundo dia após a infecção até o 15º dia, enquanto que o DNA viral pode ser encontrado nas fezes até o 67º dia após a infecção. Esse fato indica que mesmo com a resolução de doença clínica, os bovinos continuam a excretar partículas virais no ambiente (RIVETTI et al., 2013). Dessa forma, os bovinos podem agir disseminando o VACV ao longo da propriedade rural, e outros animais domésticos, e até mesmo animais silvestres, podem se infectar.

Um estudo desenvolvido por MOTA e colaboradores avaliou a soroprevalência para OPV na região Amazônica, onde na época não haviam registros oficiais de BV. Embora autores tenham levantado a hipótese de rotas alternativas para infecção dos indivíduos, a área analisada apresenta focos de desmatamento devido à agricultura e pecuária, o que destaca mais uma vez o papel dos bovinos na circulação e provável manutenção do VACV (MOTA et al., 2010). Também é importante destacar outros casos da circulação do VACV na região Amazônica além dos descritos (FONSECA et al., 1998; ABRAHÃO et al., 2010). MEDAGLIA e colaboradores descreveram um surto envolvendo bovinos e trabalhadores rurais na região Norte do estado do Tocantins (MEDAGLIA et al., 2009), sugerindo uma disseminação interestadual do VACV através do trânsito de animais por essa região, provavelmente advindos do estado de Goiás onde são registrados surtos de VB (NAGASSE-SUGAHARA et al., 2004; SANT'ANA et al., 2013).

De fato, um estudo conduzido pelo mesmo grupo confirma a disseminação do VACV pela região Amazônica através do transporte de bovinos (QUIXABEIRA-SANTOS et al., 2011). Outro ponto importante a ser destacado é a detecção do VACV em bovinos e humanos em países fronteiriços com o Brasil, como é o caso da Argentina (FRANCO-LUIZ et al., 2014), Uruguai (FRANCO-LUIZ et al., 2014) e Colômbia (USME-CIRO et al., 2017). Dentro dessa perspectiva, é importante destacar os bovinos na disseminação do VACV, realçando o seu papel como hospedeiro amplificador devido à eliminação de grandes quantidades de partículas infecciosas quando infectados. A ausência parcial desse importante hospedeiro na Guiana Francesa reforça a falta ou a escassez de circulação do VACV nessa região. Contudo, nossos achados não excluem a possibilidade de pequenos mamíferos atuarem como reservatório para o VACV, sendo mais estudos necessários para elucidar essa situação ecológica.

De fato, QUINER E NAKAZAWA propuseram um modelo ecológico para a ocorrência de novos locais susceptíveis aos surtos de VB e circulação do VACV com base em diversos fatores ambientais, tais como precipitação por trimestre, precipitação anual e temperatura média, além da densidade e distribuição do rebanho bovino no país. Os autores propuseram que a maioria dos locais identificados como susceptíveis para transmissão do VACV apresentam alta densidade de rebanho bovino. Dessa forma, o risco para a circulação do VACV e conseqüentemente ocorrência de surtos de VB é diretamente proporcional às regiões com maior número de bovinos, novamente destacando o papel desse hospedeiro (QUINER E NAKAZAWA, 2017).

Outro dado importante a ser mencionado é a ausência de detecção do VACV também em quirópteros. Diversas espécies de morcegos em todo o mundo têm sido implicadas como reservatórios para viroses emergentes devido às suas características fisiológicas, celular e natural, tornando-os particularmente susceptíveis como hospedeiros reservatórios (CALISHER et al., 2006). Estudos de metagenômica têm sido conduzidos para avaliar a ocorrência de determinadas zoonoses na vida silvestre. BAKER e colaboradores (2013) identificaram na espécie *Eidolon helvum* 38 seqüências altamente relacionadas a *Molluscum contagiosum virus*. Além disso, os achados de MCLLELAND e colaboradores (2013) identificaram que o agente causador de um surto de lesões nodulares em morcegos da espécie *Miniopterus schreibersii* no Sul da Austrália era um Poxvírus. Da mesma forma, um novo Poxvírus denominado *Eptesipoxvirus* foi identificado em morcegos da espécie *Eptesicus fuscus* em Lynnwood, Washington, Estados Unidos, durante um surto de osteomielite necrosupurativa nesses animais. Essa nova espécie não pode ser agrupada em nenhum dos gêneros da subfamília *Chordopoxvirinae*, e os autores propuseram a criação de um novo gênero, *Chiropoxvirus* (EMERSON et al., 2013). Embora os resultados aqui apresentados destaquem a ausência de circulação do VACV em morcegos da Guiana Francesa, não podemos descartar a possibilidade de circulação de outro poxvírus nesses animais como já descrito na literatura (BAKER et al.,

2013; EMERSON et al., 2013; MCLLELAND et al., 2013). Além disso, levando em consideração o papel de quirópteros como potenciais reservatórios de agentes virais zoonóticos, a circulação de poxvírus e especificamente de VACV nesses animais deve ser melhor investigada, inclusive em outras áreas geográficas na presença de um hospedeiro amplificador como os bovinos.

A detecção do VACV em animais domésticos no Brasil, outros que não bovinos e equídeos, tem sido relatada recentemente. PERES e colaboradores (2013) descreveram em seu estudo 26 cães soropositivos de um total de 114. Além disso, a recente detecção de DNA do VACV em cães e gambás (*Didelphis albiventris*) durante um surto de VB em São Paulo também foi relatada (PERES et al., 2016). Entretanto, os animais avaliados por PERES são provenientes de áreas com registros de surtos de VB, diferente dos cães incluídos neste estudo que são provenientes de áreas urbanas, onde a detecção do VACV têm sido pobremente explorada. Em relação à vida silvestre, ABRAHÃO e colaboradores (2010) avaliaram a circulação do VACV na Amazônia Brasileira. Nesse importante trabalho, apenas 12 amostras de quatis foram analisadas, com 2 animais soropositivos.

Por outro lado, um estudo conduzido numa reserva natural do México detectou, através de ELISA e Western Blot, uma soroprevalência de 28,1% em procionídeos, os quais compreenderam 22 quatis soropositivos (n=113), 16 guaxinins (n=60) e 19 bassicuros (*Bassariscus sumichrasti*) (n=30) (GALLARDO-ROMERO et al., 2016). Apesar da população de quatis envolvidos neste estudo ser menor do que a população estudada no México, deve-se salientar que a área total do Parque das Mangabeiras não foi explorada, o que pode subestimar os dados de soroprevalência quando comparado ao estudo Mexicano.

É importante destacar que este é o primeiro trabalho que avalia a circulação do VACV numa área de interseção entre ambiente silvestre e urbano, e um fato merece destaque: muitos moradores da Vila Marçola depositam lixo inadequadamente nas regiões fronteiriças do Parque, o que serve de atrativo alimentar aos quatis. Desta forma, invasões desses animais às residências da Vila são relatadas, possibilitando contato com os moradores e seus animais de estimação. Essa proximidade e a interação entre os quatis, seres humanos e animais domésticos pode aumentar o risco de transmissão de doenças infecciosas e parasitárias e a possibilidade de transmissão de agentes etiológicos com potencial zoonótico.

Neste estudo, os gatos soropositivos não apresentaram sinais clínicos característicos de infecção por OPV, como evidenciado em gatos infectados por CPXV na Europa. A infecção por CPXV em felinos europeus leva ao desenvolvimento de lesões cutâneas generalizadas, surgindo inicialmente uma lesão única, geralmente na cabeça, pescoço ou um membro anterior. Essa lesão pode ser descrita como uma pequena ferida, como uma mordida. Entretanto, devido à infecções bacterianas secundárias, a lesão evolui para um grande

abscesso. Devido a essa variação clínica das lesões, a infecção por CPXV geralmente não é suspeitada. Após 10 dias do aparecimento da primeira lesão, outras lesões secundárias generalizadas começam a surgir sobre a pele, como pequenas máculas eritematosas que aumentam gradualmente de tamanho, podendo ser encontradas na mucosa oral, focinho ou orelhas. Posteriormente, evoluem para úlceras até tornarem-se crostas e por fim cicatrizarem (BENNETT et al., 1989; 1990). É importante destacar que as lesões geralmente são pruriginosas, o que pode causar seu agravamento e disseminação da infecção para novos locais; inclusive nessa etapa é clara a transmissão para proprietários dos animais, bem como para veterinários (CORAS et al., 2005; SCHULZE et al., 2007; CARLETTI et al., 2009).

Aproximadamente 20% dos gatos apresentam infecção do trato respiratório superior, coriza serosa e mucopurulenta, conjuntivite e diarreia transitória. Alguns gatos na fase de viremia, podem apresentar um quadro febril, de inapetência e prostração. A maioria dos animais se recupera com poucos sinais de doença sistêmica; entretanto, sinais mais graves da infecção incluem pneumonia, cicatrização retardada e morte, frequentemente associados com infecção bacteriana secundária, ou casos de imunossupressão que podem ser causados pelo Vírus da Imunodeficiência Felina (FIV) ou Vírus da Leucemia Felina (FeLV) (BENNETT et al., 1989; 1990).

Embora tenham sido detectadas amostras de VACV pertencentes ao grupo virulento, os nossos resultados corroboram os dados da literatura (BENNETT et al., 1989), em que os gatos experimentalmente infectados com VACV desenvolvem infecção assintomática, ao contrário daqueles infectados com CPXV. Além disso, não podemos assumir que a admissão na clínica veterinária está diretamente relacionada à infecção por OPV, uma vez que os sinais clínicos apresentados pelos animais não são específicos, podendo ser confundidos com outras doenças comuns que afetam gatos. Algumas doenças dermatológicas são muito comuns em gatos e os profissionais veterinários não são adequadamente preparados para o diagnóstico clínico/laboratorial de OPV em sua rotina.

Diferentemente da cadeia epidemiológica do CPXV que envolve a sua circulação no ambiente urbano, tendo principalmente os gatos domésticos como conexão entre os reservatórios do vírus (roedores silvestres e periurbanos) e a população humana e outros animais domésticos (ESSBAUER et al., 2010), não há registros oficiais da detecção de VACV em gatos domésticos de zonas urbanas. Logo, é importante considerar potenciais fontes de infecção para as populações de felinos (roedores), assim como acontece para CPXV na Europa, e o potencial de disseminação principalmente para os proprietários dos animais, bem como para veterinários. Esse fato pode gerar um grande impacto em relação à dinâmica de circulação do VACV, uma vez que o vírus pode se estabelecer no ambiente urbano em outros hospedeiros, causar graves infecções em humanos (PELKONEM et al., 2003), especialmente em indivíduos imunocomprometidos,

como já descrito na literatura (FASSBENDER et al., 2016), além da possibilidade de disseminação para ambientes hospitalares, sejam veterinários ou humanos, representando uma ameaça para a saúde pública.

De forma geral, a identificação prévia de áreas onde uma determinada doença ou patógeno é susceptível a aparecer poderia ser usada em saúde pública como um método precoce de intervenção, evitando futuros surtos e reduzindo o impacto não somente na saúde pública, mas também na economia leiteira (como é o caso do VACV e da VB). A VB se consolidou como zoonose emergente brasileira nos últimos anos e a elucidação de aspectos biológicos dos VACV circulantes no país, bem como de seus hospedeiros naturais e mecanismos de circulação, alicerça a busca por métodos mais robustos de controle e prevenção da doença.

VI. CONCLUSÕES

O VACV circula amplamente no Brasil e possui um amplo espectro de hospedeiros. Foram observadas evidências sorológica e molecular do contato de felinos, caninos e quatis com o VACV, corroborando o amplo espectro já proposto para o patógeno. Entretanto, não foi observado o contato entre roedores e outros pequenos mamíferos com o VACV na região Amazônica. Apesar disso, os resultados deste trabalho não excluem a possibilidade de que pequenos mamíferos possam agir como reservatório para o VACV na natureza.

Outro aspecto importante é que no Brasil não há registros de detecção do VACV em populações urbanas. Entretanto, O monitoramento e a vigilância da circulação do VACV são importantes para garantir o alerta precoce de surtos zoonóticos para populações humanas vulneráveis. Como mostrado Fontes potenciais de infecção para populações de gatos (por exemplo, pequenos roedores) devem ser consideradas. Os gatos poderiam seroconverter sem o aparecimento da doença clássica. Assim, o VACV poderia estar circulando em gatos de ambientes urbanos. O potencial papel dos gatos em infectar seres humanos deve ser investigado para determinar se o VACV pode emergir em populações humanas urbanas e representar uma ameaça à saúde pública.

Os quatis podem circular em áreas silvestres e urbanas, atuando como uma ponte para promover a transmissão do VACV entre animais silvestres (principalmente roedores) e animais domésticos como cães. Os cães domésticos por sua vez podem transmitir o VACV diretamente aos seres humanos através de contato íntimo ou indiretamente contaminados por fezes. Esses dados levantam questões sobre a circulação do VACV no Brasil e abrem discussões sobre o papel dos cães e coatis no ciclo epidemiológico do VACV.

VII. PERÍODO SANDUÍCHE E AS CONTRIBUIÇÕES DA EXPERIÊNCIA NO EXTERIOR

O doutorado sanduíche é o período no qual o estudante de pós-graduação possui a chance de desenvolver parte do seu curso de doutorado em outra instituição brasileira ou internacional. O período do doutorado sanduíche geralmente varia de três meses a um ano, podendo em alguns casos ser realizada a co-tutela, na qual o estudante desenvolve metade das suas atividades em outra instituição (dois anos). A bolsa concedida pelas principais agências de fomento brasileiras (CAPES ou CNPq) possibilita a oportunidade de um intercâmbio de estudos para aprofundar o conhecimento em relação à sua área de pesquisa e conseguir novos recursos e informações para a sua tese, que deverá ser defendida no Brasil. O doutorado sanduíche configura-se como uma oportunidade ímpar para o estudante de expandir os seus horizontes teóricos e práticos em outro país a fim de enriquecer a sua pesquisa acadêmica.

Durante a minha formação acadêmica em nível de mestrado e doutorado, pude atuar em expedições de campo no estado de Minas Gerais, onde participei de projetos com o objetivo de elucidar a soroprevalência e fatores de risco/exposição relacionados ao VACV em populações humanas de regiões rurais e urbanas desse estado. Além disso, pude colaborar em projetos relacionados ao estudo da cadeia epidemiológica do VACV, cujo objetivo foi identificar fatores de risco através da investigação do manejo de propriedades leiteiras, seus aspectos ecológicos e geográficos, e as possíveis influências desses fatores sobre o status sorológico anti-OPV em rebanhos bovinos e de equídeos. Colaborei ainda na busca por hospedeiros e possíveis reservatórios naturais do VACV. Dessa forma, a candidatura à bolsa de doutorado sanduíche visava não somente a continuidade dos meus estudos acerca da eco-epidemiologia do VACV, mas também de uma extensa e consolidada linha de pesquisa associada à família *Poxviridae* iniciada há mais de duas décadas pelo Laboratório de Vírus, ICB/UFMG.

Tendo em vista a escassez de recursos e o atual cenário político e econômico no Brasil, é evidente o descaso com ciência, tecnologia e educação no país. Publicações recentes na *Nature* e *Science*, dois dos mais importantes periódicos científicos mundiais, explicam o cenário sombrio no Brasil, no qual os investimentos para ciência, tecnologia e educação vem diminuindo a cada ano (Gibney, 2015; Escobar, 2017). Dessa forma, optamos por concorrer a uma bolsa científica concedida pelo governo americano, através da *Oak Ridge Institute for Science and Education* (ORISE). A aprovação ocorreu em outubro de 2016, com início das atividades em dezembro do mesmo ano no Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) localizado em Atlanta, Geórgia, EUA.

O CDC é a maior agência de saúde pública no mundo, com uma forte tradição nos estudos em epidemiologia e saúde pública. A instituição possui profissionais com experiência comprovada para geração

dos modelos matemáticos e eco-epidemiológicos e dos softwares adequados para tanto. Além disso, o CDC mantém uma colaboração com o nosso grupo de pesquisa em Vaccinia Bovina desde 2006, sendo de fundamental importância a minha passagem por esse centro de pesquisa/ensino para a aquisição de conhecimento de ponta, importação das metodologias e treinamentos epidemiológicos mais avançados e para o desenvolvimento de projetos relacionados a essa área de pesquisa, dos quais os pesquisadores do CDC já são colaboradores oficiais.

Ainda, é importante mencionar as diversas publicações científicas do grupo do CDC as quais apresentam modelos de nicho ecológico para *Monkeypox virus* na África, mostrando diferenças significativas na ocorrência e distribuição dos casos naquela região. A combinação de modelos e obtenção de mapas com a distribuição potencial de casos possibilita a identificação da presença do *Monkeypox virus* em cada área estudada. Os pesquisadores utilizam técnicas avançadas e abordagens automatizadas que fornecem evidências adicionais e fortalecem a capacidade de vigilância em saúde pública.

Dentro dessa proposta de intercâmbio, sob orientação do Doutor Yoshinori Nakazawa, líder do grupo de Ecologia e Evolução de Poxvírus, o foco foi direcionado para a detecção sorológica e molecular do VACV em amostras oriundas de animais domésticos e, posteriormente, análises de predição do risco de circulação do VACV no território brasileiro. Adicionalmente, como o recurso obtido para intercâmbio é proveniente do governo americano, a proposta estendeu-se à minha participação em projetos específicos do próprio grupo do CDC (que serão descritos neste capítulo), cujo objetivo era aprofundar o conhecimento em epidemiologia. Dentre os projetos dos quais participei encontram-se: 1) Conhecimento, Atitudes e Práticas entre Pessoas Expostas a Lesões de Mordida Animal em Áreas Rurais de Camarões, África Central; e 2) Vacinação em Massa de Cães e posterior Avaliação no Haiti, 2017; ambos orientados pelo Doutor Ryan Wallace, líder do grupo de Epidemiologia da Raiva e Operações em Campo.

7.1. ARTIGO 4: The Influence of Poverty and Rabies Knowledge on Healthcare Seeking Behaviors and Dog Ownership, Cameroon

Este artigo foi publicado em Junho de 2018 no periódico PLoS One.

DESCRIÇÃO DO ESTUDO: A raiva é uma doença fatal que acomete animais e pessoas. Os cães são o principal reservatório do vírus e a principal fonte de transmissão para seres humanos, contribuindo para quase 99% dos casos de raiva em todo o mundo. A raiva causa dezenas de milhares de mortes por ano, principalmente na Ásia e na África. Neste estudo foram compilados os resultados de uma pesquisa comunitária sobre conhecimento, atitudes e práticas relacionadas às características dos indivíduos que possuem cães, taxas de mordidas de cães e comportamentos de indivíduos na busca de cuidados médicos pós-mordida na região Norte dos Camarões, África Central. Os resultados apresentaram baixa cobertura vacinal entre a população de cães domésticos avaliada. Ainda, foi encontrada uma associação significativa entre os indivíduos que possuíam cães em seu domicílio e o *status* econômico nas comunidades estudadas. Embora não tenham sido relatadas mortes humanas, apenas uma pessoa recebeu profilaxia pós-exposição contra a raiva dentre aqueles que relataram terem sido mordidos. As vítimas de mordida tiveram menor probabilidade de lavar a ferida, chamar um médico e procurar cuidados médicos em comparação àqueles indivíduos que relataram que fariam as ações preventivas mencionadas. Essas descobertas indicam a necessidade de aumentar a conscientização pública sobre o risco potencial de raiva e os meios para evitar a doença.

RESEARCH ARTICLE

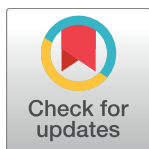
The influence of poverty and rabies knowledge on healthcare seeking behaviors and dog ownership, Cameroon

Galileu Barbosa Costa^{1,2,3*}, Amy Gilbert^{1,4}, Benjamin Monroe¹, Jesse Blanton¹, Sali Ngam Ngam^{5‡}, Sergio Recuenco^{1,6}, Ryan Wallace¹

1 Poxvirus and Rabies Branch, Division of High-Consequence Pathogens and Pathology, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, United States of America, **2** ORISE Fellow, Poxvirus and Rabies Branch, Division of High-Consequence Pathogens and Pathology, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, United States of America, **3** Laboratório de Vírus, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **4** National Wildlife Research Center, US Department of Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Service, Wildlife Services, Fort Collins, Colorado, United States of America, **5** Laboratoire National Vétérinaire (LANAVET), Garoua, Cameroon, **6** National Centre for Public Health, Instituto Nacional de Salud, Lima, Peru

‡ In memoriam.

* nfe8@cdc.gov, galileuk1@gmail.com



OPEN ACCESS

Citation: Barbosa Costa G, Gilbert A, Monroe B, Blanton J, Ngam Ngam S, Recuenco S, et al. (2018) The influence of poverty and rabies knowledge on healthcare seeking behaviors and dog ownership, Cameroon. PLoS ONE 13(6): e0197330. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197330>

Editor: Charles E. Rupprecht, Wistar Institute, UNITED STATES

Received: November 7, 2017

Accepted: April 30, 2018

Published: June 21, 2018

Copyright: This is an open access article, free of all copyright, and may be freely reproduced, distributed, transmitted, modified, built upon, or otherwise used by anyone for any lawful purpose. The work is made available under the [Creative Commons CC0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) public domain dedication.

Data Availability Statement: This data was collected on behalf a U.S. federal agency, the Centers for Disease Control, and as such the authors are not permitted to make the data set publicly available. Requests for data may be sent to Rabies@cdc.gov.

Funding: Funding for fieldwork was provided by USAID Emerging Pandemic Threats program, as part of an award to the CDC Center for Global Health. The funder had no role in study design,

Abstract

Background

Rabies is a fatal encephalitis caused by lyssaviruses, with most human cases worldwide resulting from rabid dog bites. Although effective animal and human vaccines have been available for over 100 years, control efforts have not been adequately implemented on the global scale and rabies remains one of the greatest global zoonotic threats to human health. We conducted a knowledge, attitudes and practices survey in Northern Cameroon to describe dog ownership characteristics, rates of dog bites, and post-bite healthcare seeking behaviors.

Methods

The survey was performed in four rural Cameroonian communities. A structured community-based questionnaire was conducted over a 20-day period in April 2010, and focused on socio-economic factors correlated with gaps in rabies knowledge. Information pertaining to socio-demographics, as well as attitudes and practices with regard to animal bites and bite treatment practices were recorded. Characteristics of dog ownership such as dog confinement, resources provided to dogs, and dog vaccination status were examined. Human to dog ratios were compared on a linear scale to poverty scores by community. When applicable, 2-tailed Chi-square tests or Fisher's exact tests were calculated to determine relationships between variables. We also used One-way Analysis of Variance (ANOVA) to identify associations between rabies knowledge and wealth with dog ownership, dog vaccination, and human healthcare seeking behaviors. Independent variables were evaluated using multivariate logistic regression analysis.

data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors declare that they have no conflict of interest. The findings and conclusions in this report are those of the authors and do not necessarily represent the views of the Centers for Disease Control and Prevention.

Results

A total of 208 households were enrolled. Respondents were predominantly male (68.3%), with a median age of 43.6 years. Eighty-four households (39.9%) reported owning a total of 141 dogs (human dog ratio 10.4:1). The majority of dogs (61%) were allowed to roam freely. A history of rabies vaccination was reported for 30.8% of owned dogs. Respondents reported 11 bites during the two years preceding the survey (annual bite incidence was 2.6% [95% CI 1.4%–4.6%]). Only one person (9.1%) received rabies post-exposure prophylaxis (PEP), and none described symptoms of clinical illness consistent with rabies. Respondents who indicated that they would seek medical care and PEP after a dog bite had higher average wealth and rabies knowledge index scores ($p = 0.01$ and 0.04 , respectively). Respondents who indicated that they would seek care from a traditional healer had significantly lower wealth scores, but not significantly different knowledge scores ($p < 0.01$ and $p = 0.49$, respectively).

Conclusions

In the communities evaluated, the majority of dogs were allowed to roam freely and had no history of rabies vaccination; factors that favor enzootic transmission of canine rabies virus. We also identified a strong relationship between poverty and dog ownership. Bite events were relatively common among respondents, and very few victims reported utilizing health services to treat wounds. Increased wealth and knowledge were significantly associated with increased likelihood that a respondent would seek medical care and post-exposure prophylaxis. These findings indicate the need for educational outreach to raise awareness of dog rabies and proper prevention measures.

Background

Rabies is an acute encephalitis caused by the rabies virus, which is a single stranded negative sense RNA virus in the *Lyssavirus* genus (*Rhabdoviridae* family). The fatality rate of rabies approaches 100%, making it one of the most lethal of all infectious diseases [1,2]. Rabies is estimated to be responsible for 59,000 human deaths annually, in which >98% are attributed to bites from domestic dogs [2]. Most cases occur in low income countries [2,3]. The African continent accounts for 43% of the global rabies burden [2].

An estimated 200,000 persons receive post-exposure prophylaxis (PEP) for rabies each year in Africa. The number of annual human rabies deaths would be substantially higher in the absence of prophylaxis [1,2,4]. An estimated 76% of human rabies deaths in Africa occur in rural areas, and may result from a higher dog to human ratio, frequent lack of PEP, and/or reduced vaccination coverage in these areas as compared to urban settings [5]. The economic burden of human rabies in Africa is estimated to be \$20 million per year, and the cost of PEP for the average person in Africa (\$40) is likely to exceed their monthly gross income [2,5,6]. Major obstacles currently exist for assessing the risk of rabies in Africa. In general, lack of accurate data, financial investment, and adequate infrastructure are challenges that can contribute to inadequate disease surveillance [7]. To date, there has been inadequate surveillance of rabies throughout most of Africa, despite human rabies being notifiable in most countries [7–9]. It has been estimated that 95% of human rabies cases are likely unreported in eastern

and southern Africa [9], again highlighting that the human rabies burden is substantially higher than currently recognized, making the estimation of rabies burden in Africa uncertain.

In the Central African nation of Cameroon, dogs are known to be the primary reservoir for rabies, but less is known about potential sylvatic endemic cycles [10,11]. The Laboratoire National Veterinaire (LANAVET) have reported more than 5,000 human rabies related exposures to animals of which 95% were related to dogs during the time period 2003–2008. Further evidence of the impact of rabies in Cameroon was reported by Awah-Ndukum et al reported 421 human rabies deaths and 330 laboratory confirmed rabid dogs during 1990–1999 [12]. Annual mass vaccination campaigns based on central-point methodology have been implemented in many parts of the country, supported by government officials since 2009 and are provided at a cost of 2 USD per dog vaccinated [10]. However, no post-vaccination monitoring to establish population immunity has been reported [10].

Enhanced surveillance activities to areas where human populations may be at the highest risk of rabies are recommended in order to assess risk and to evaluate effective strategies for control. Knowledge, attitudes, and practices (KAP) surveys are a useful way to assess owned dog population parameters, such as dog densities, animal bite injuries, and the health-seeking practices of the community with regard to animal bites injuries [13,14]. To better understand these factors in Cameroon, a KAP survey was conducted in four communities in northern Cameroon in areas of suspected high rabies incidence. In addition, we queried the population regarding control practices that may exist in these communities in response to suspected rabid animals.

Methods

Study design and population

Sanguéré-Paul Sanguéré-Paul A knowledge, attitudes and practices (KAP) survey was conducted in northern Cameroon, over a 20-day period in April 2010. Cameroon has an estimated population of 24,432,834 inhabitants, with 54.4% of residents located in urban areas (according to the CIA World Factbook [15]). Surveys were conducted in four communities in northern Cameroon: Mayo-Oulo, Gaschiga, Sanguéré-Paul, and Ngong (Figs 1 and 2). The communities surveyed constituted a convenience sample selected based on proximity to Garoua City, with qualifying communities being less than 4 hour drive. Households in individual communities were selected to represent a cross-section of income levels, i.e., presumed low, middle and high income, based on World Bank classifications of the income levels. All survey responses were recorded on handheld personal digital assistant (PDAs) devices, and GPS coordinates were taken for mapping purposes. Survey respondents consisted of consenting adult head of households (equal to or greater than 21 years of age). Respondents were not offered payment for their participation. Fingerprints or written informed consent was obtained for all respondents.

Questionnaire

A structured questionnaire was developed in English, translated into French and reviewed by native Cameroonian people (S1 Appendix). The questionnaire consisted of 54 questions and was divided into four sections: socio-demographic, rabies knowledge, attitudes and practices towards animal bites, and bite treatment practices. The questionnaire was administered via face-to-face interviews, with responses entered in PDAs using GeoAge FAST software. Respondents were read questions, but were not provided answers from which to choose.

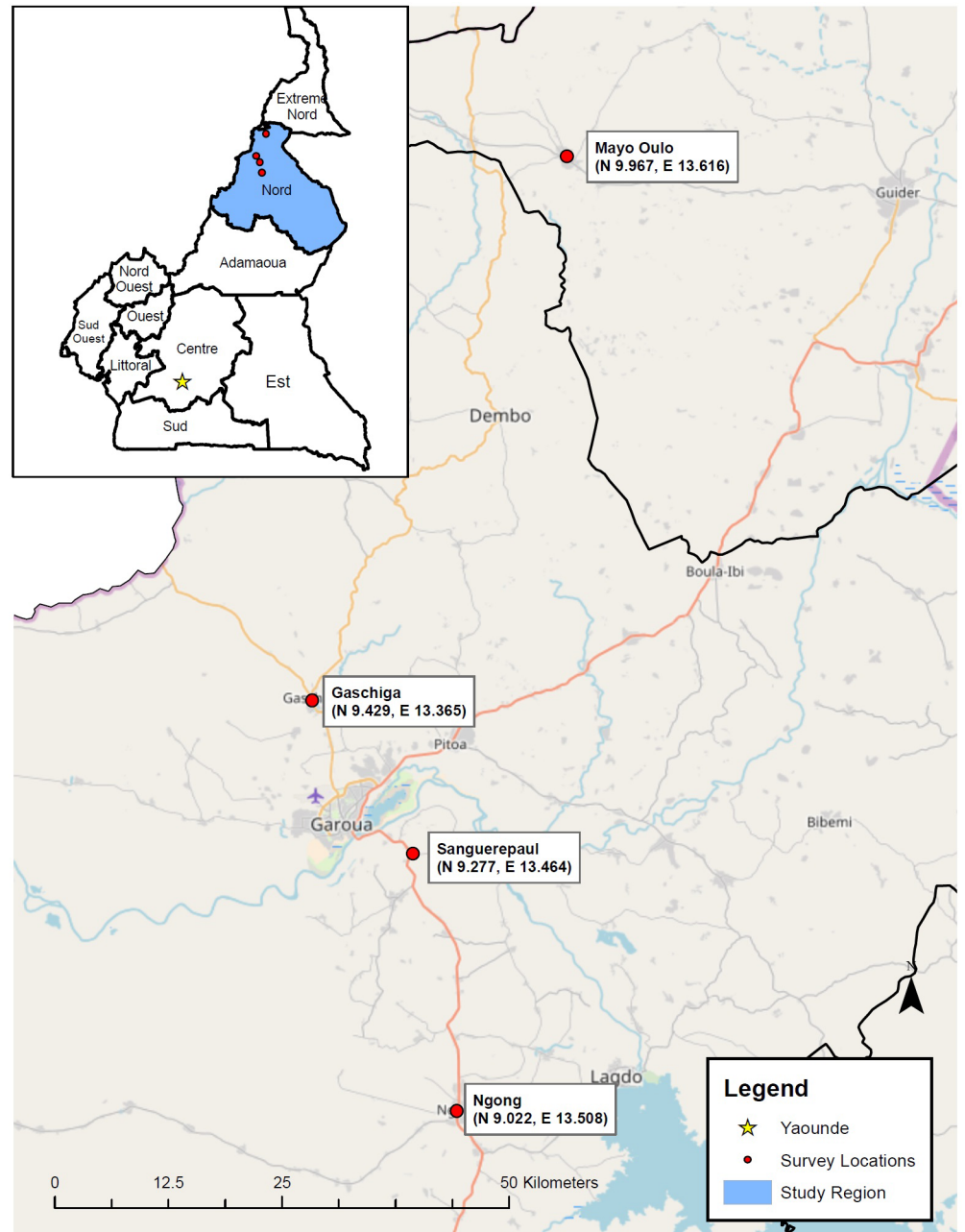


Fig 1. The study areas of northern Central African nation of Cameroon. The black outline identifies departments within the country. The Northern department, where the study was performed, is highlighted in blue in the inset. Locations of the surveyed communities are marked with red dots.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197330.g001>

Knowledge and wealth scores

A knowledge score was assigned following the model previously described by Tack et al. [16]. Four knowledge questions were assessed (Table 1). Each question had a maximum value of 10 points if correct responses were selected, and a minimum value of -10 points if only incorrect responses were selected. Positive and negative point values for individual responses were based upon the total number of possible responses (Table 1). The total values for each question were

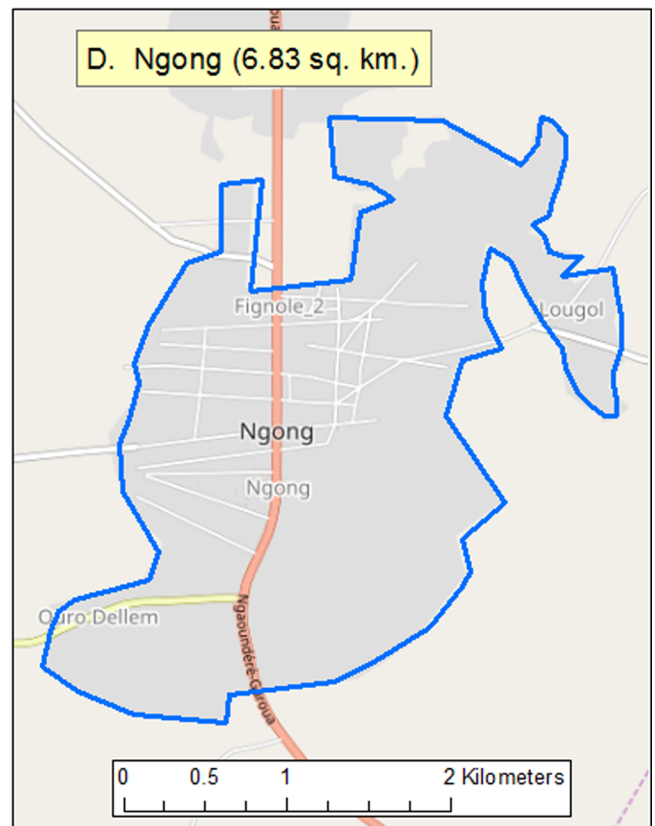
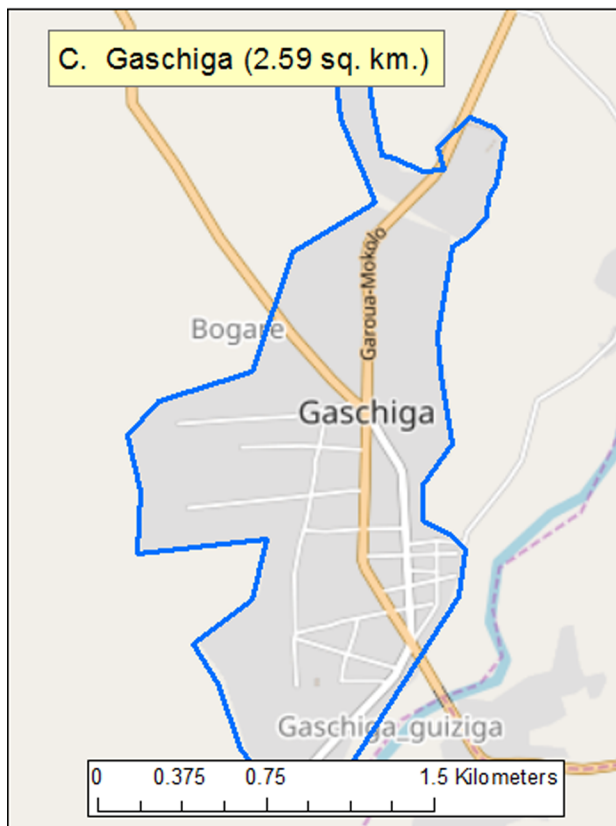
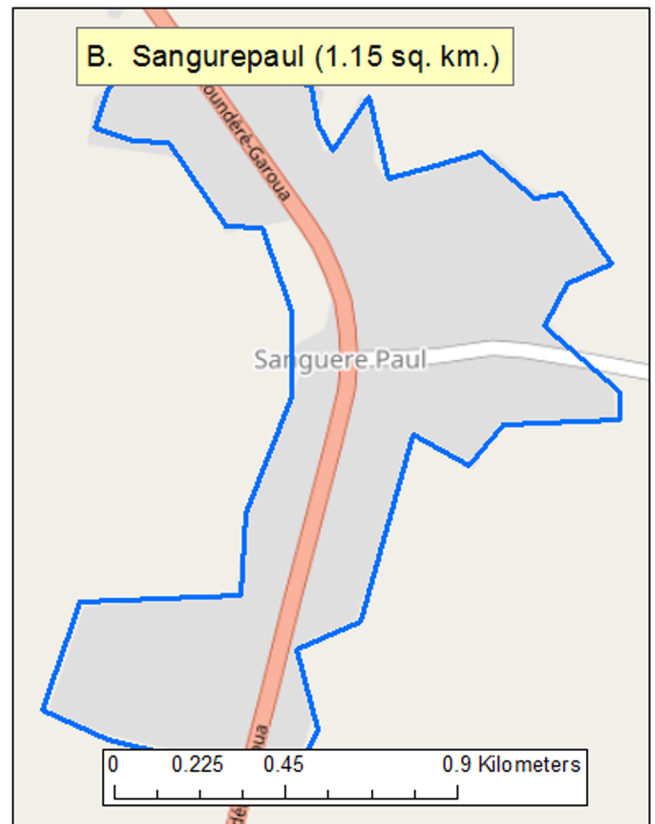
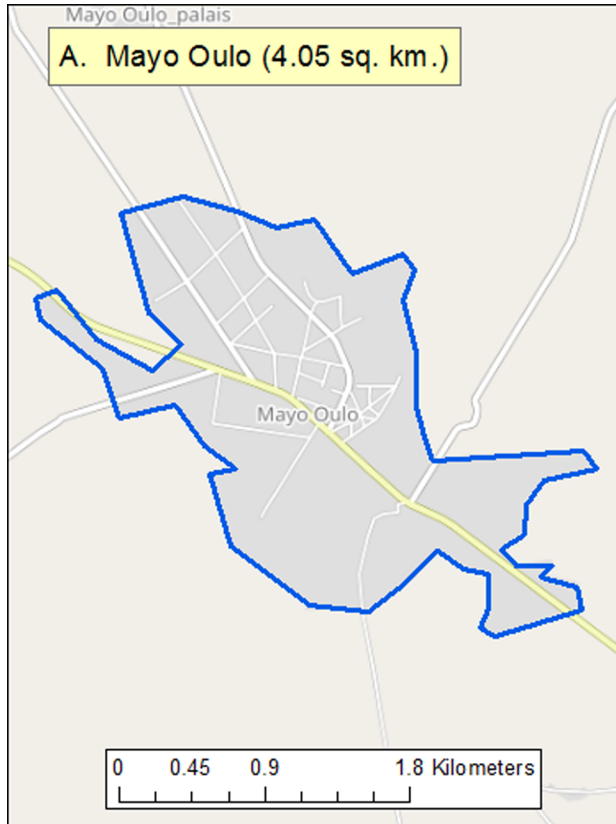


Fig 2. An open street map overview of imagery detailing the four communities surveyed in this study. Approximate population for the communities are: Mayo-Oulo 1,031 inhabitants, Sanguéré-Paul 377 inhabitants, Gaschiga 3,066 inhabitants, and Ngong 9,037 inhabitants.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197330.g002>

normalized, thereby negating the need to weight questions based on number of responses. When combined for a total knowledge score, these four equally weighted questions had a maximum of 40 points and a minimum of -40 points.

A wealth score was developed based on the socio-demographic variables collected: education level, house construction materials, and livestock (Table 2). Each variable had a maximum value of 10 points, distributed by high education level, high house building material quality, and maximum value for number of owned livestock. A minimum value of -10 points were attributed for illiteracy, lower house building material quality, and no owned livestock. The aggregate of these combined values was used to derive and estimated wealth score for the studied population. Descriptive parametric statistics such as mean scores, standard deviation, and 95% confidence intervals regarding knowledge and wealth scores were calculated. Wealth and knowledge scores were compared to the healthcare seeking behaviors.

Table 1. Construction of the knowledge score. As indicated on the table below, all respondents were assigned a total of 10 points for correct answers in each of the 4 questions used to assess the knowledge about rabies. The knowledge questions were focused on: 1) severity of the disease; 2) transmission and reservoirs; and 3) attitudes regarding rabies exposure. For all questions, respondents were also deducted a total of -10 points for incorrect answers.

Questions	First preferred answer (points assigned)	Second preferred answer (points assigned)	Incorrect answers (points assigned)
1) How severe is the disease called rabies? [*]	Very severe (10 points)	NA	Mild (-10 points) Somewhat severe (-10 points)
2) How do humans get rabies from an infected animal? ^{**}	Bite (4 points) Contact with saliva (4 points)	Scratch (2 points)	Contact with blood (-2.5 points) Contact with urine or feces (-2.5 points) Observing the animal (-2.5 points) Touching the animal (-2.5 points)
3) What animals can be infected with rabies? ^{**}	Dogs (1.5 points) Bats (1.5 points) Jackals (1.5 points)	Cats (0.8 points) Livestock [†] (0.8 points) Horses (0.8 points) Hyenas (0.8 points) Mongoose (0.8 points) Monkeys or other primates (0.8 points) Fox (0.8 points)	Poultry [†] (-5 points) Wild birds (-5 points) I don't know (0 points)
4) If you thought that you had an exposure to an animal with rabies, what would you do? ^{**}	Wash the wound (2.3 points) Actively seek medical treatment at a pharmacy, hospital, clinic or outpost (2.3 points) Receive rabies post-exposure prophylaxis (2.3 points)	Call a doctor (1.04 points) Confine the animal for observation (1.04 points) Submit the animal for disease testing (1.04 points)	Nothing (-10 points) Consult a traditional healer (0 points) Kill the animal (0 points)
Total points assigned	Maximum + 40 points		Minimum- 40 points

* Only one response allowed

** Multiple responses allowed

† Livestock includes cattle, sheep, and goats. Poultry includes chickens, ducks, and geese.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197330.t001>

Table 2. Education level, house construction, and livestock values used to construct the wealth score. The livestock values used to construct the wealth score are available at <http://africafarming.info/how-much-does-an-animal-cost/>.

Variables used to assess the wealth score		
Years of schooling completed	Education level	Points assigned
None	None	-10
≤ 6	Low	-3.3
7 to 12	Medium	+3.3
> 12	High	+10
Domicile feature*	House building material quality	Points assigned***
None**	Poor	-10
Soil, straw, palm fronds, curtain	Low	-3.3
Wood, brick, mud, sealed	Medium	+3.3
Cement, tile, metal, iron, glass	High	+10
Livestock farming	Commercial value/head (in USD)	Points assigned†
Cattle	\$ 500,00	-10 (\$ 0)
Horses	\$ 300,00	-3.3 (\$ 40,00–2.980,00)
Donkeys	\$ 300,00	+3.3 (\$ 3.100,00–5.400,00)
Sheep	\$ 120,00	+10 (\$ 7.100,00–12.580,00)
Goat	\$ 80,00	
Chickens	\$ 8,00	
Ducks	\$ 8,00	

* For each house we evaluated the doors, windows, floor, walls and roof.

** Absence of doors and/or windows

*** There is no -10 points assigned for any household building material quality

† Points in livestock farming category were assigned based on the summary of all livestock owned

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197330.t002>

Dog ownership

Characteristics of dog ownership, such as dog confinement, resources provided to dogs, vaccination status, and frequency of dog bites were examined. Respondents were asked to classify the confinement status of their dogs as: dogs which always stay at home, dogs which roam unsupervised at least part of the time or dogs which always roam unsupervised. Owners were asked about resources they provide to their dogs as well as resources provided to dogs they do not own, including food, water, shelter and veterinary care. When applicable, a 2-tailed Fisher’s exact test was calculated to determine the relationship between variables. Information on human household size and dog bite events in the past year were recorded to calculate the annual dog bite incidence among surveyed households. Wealth and knowledge scores were compared between dog owners and non-dog owners as well as owners of vaccinated dogs compared to owners of non-vaccinated dogs. Human to dog ratios were compared on a linear scale to poverty scores by community (n = 4). Correlations were calculated by the Pearson product-moment correlation coefficient (r), coefficient of determination (r²), and 1-tailed p-value (alpha = 0.05).

Data analysis

For statistical analysis, categorical variables (age, sex, education level, household size, socioeconomic status, and bite action) were dichotomized (i.e., yes or no), and identified using a 2-tailed Fisher’s exact test with significance level of 5% (p ≤ 0.05) by using EPI-INFO software version 7.2 (<http://www.cdc.gov/epiinfo/>). The odds ratio and 95% confidence intervals were

calculated when applicable. Extent of rabies knowledge and wealth score were analyzed for associations with attitudes and practices towards bite events via Student's *t* test. We also used One-way Analysis of Variance (ANOVA) to compare differences for knowledge and wealth among communities. Values of $p \leq 0.05$ were considered significant. To evaluate the independent association between the factors, a multivariate logistical regression model was applied, with *p*-values < 0.1 considered to represent a significant association.

The total number of owned dogs reported by respondents was used as the denominator to obtain ratios of dogs per person and dogs per household. Furthermore, annual dog bite incidence was estimated using Person-Time Rate test (available in Open Epi software at <http://www.openepi.com/>), in which the bite event was the numerator and the total households the denominator. Vaccination coverage rates were assessed by the number of vaccinated dogs out of the number of owned dogs.

Ethical considerations

The study was approved by the Centers for Disease Control and Prevention's Human Research Office under the registration protocol #5891. All study participants were aged 21 years or older. An informed consent about the risks of participation in the study was provided from all participants. This data was collected on behalf a U.S. federal agency, and as such non-identifiable data is available upon request from the corresponding author with an appropriate data sharing agreement.

Results

Demographic profile of study population

Four rural districts were chosen for inclusion into this study: Mayo-Oulo, Gaschiga, Sanguéré-Paul, and Ngong (Figs 1 and 2). Two hundred-eight households were enrolled; one respondent per household—typically the head of household—was asked to complete the survey. The 208 households encompassed 1474 total persons (7.1 people per household). Demographic characteristics of the respondents are presented in Table 3. The median age of respondents was 43.6 years (ranging from 21 to 75 years). Men represented 68.3% of participants whereas women were 31.7%, and 64 individuals (30.9%) had completed ≤ 6 years of schooling. Within the communities, illiteracy rates were highest in Mayo-Oulo (60.0%).

Community dog-ownership and rabies vaccination status

Dogs were owned by 39.9% of the households. Survey respondents reported owning 146 dogs at the time the survey was conducted (1.8 dogs per dog-owning household) (Table 4). The dog ownership ratio, when considering the 1,474 persons represented in this survey was 10.1:1 (95% CI 8.6–12.6). Participants in Ngong community had the highest rate of dog ownership (6.8:1 humans to dogs) and individuals from Mayo-Oulo had the lowest (24.4:1 humans to dogs) ($p < 0.0001$).

Overall, there was a negative linear correlation between poverty and dog populations, with increased community poverty resulting in fewer owned dogs ($r = -0.875$, $r^2 = 0.76$, slope = -3.4 , *p*-value 0.062) (Table 2).

Only 1.4% of dog owners reported their dogs were allowed to roam freely at all times, whereas 61% of dogs were reported to roam freely part of the time, and 37.7% of dogs were reportedly always confined (Table 4). Eleven respondents indicated that they had been bitten by a dog in the past two years, representing an annual bite incidence of 2.6% (95% CI 1.4%–4.6%). Gaschiga accounted for the highest bite incidence which was 4.3% (95% CI 1.3%–

Table 3. Characteristics of the 208 surveyed households within four communities surveyed, Cameroon, 2010.

Demographics	National average*	Community					χ^2
	Population	All households	Mayo-Oulo	Gaschiga	Sanguéré-Paul	Ngong	
	n = 24,360,803	n = 208 (%)	n = 66 (%)	n = 46 (%)	n = 26 (%)	n = 70 (%)	
Age (years)							
21–30	18.5 years	46 (22.1)	14 (21.2)	10 (21.7)	7 (26.9)	15 (21.4)	0.69
31–40		45 (21.6)	13 (19.7)	11 (23.9)	7 (26.9)	14 (20.0)	
41–50		53 (25.5)	14 (21.2)	14 (30.4)	8 (30.8)	17 (24.3)	
51–60		30 (14.4)	9 (13.6)	5 (10.8)	2 (7.7)	14 (20.0)	
> 60		34 (16.4)	16 (24.2)	6 (13.0)	2 (7.7)	10 (14.3)	
Gender							
Male	50.1%	142 (68.3)	51 (77.3)	32 (69.6)	13 (50.0)	46 (65.7)	0.08
Female	49.9%	66 (31.7)	15 (22.7)	14 (30.4)	13 (50.0)	24 (34.3)	
Years of schooling completed*							
None	54.1%	97 (46.9)	39 (60.0)	18 (39.1)	8 (30.8)	32 (45.7)	<0.01 [†]
≤ 6	21.4%	64 (30.9)	20 (30.8)	14 (30.4)	15 (57.7)	15 (21.4)	
7 to 12	15.3%	35 (16.9)	4 (6.1)	13 (28.3)	2 (7.7)	16 (22.9)	
> 12	9.2%	11 (5.3)	2 (3.1)	1 (2.2)	1 (3.8)	7 (10.0)	
No. of people per household							
1–3	7	10 (4.8)	1 (1.5)	5 (10.9)	1 (3.8)	3 (4.3)	0.05 [†]
4–6		46 (22.1)	11 (16.7)	14 (30.4)	9 (34.6)	12 (17.1)	
> 6		152 (73.1)	54 (81.8)	27 (58.7)	16 (61.7)	55 (78.6)	
Years lived in community							
≤ 5	NA	21 (10.1)	8 (12.1)	3 (6.5)	5 (19.2)	5 (7.1)	0.44
6–10		25 (12.0)	7 (10.6)	4 (8.7)	2 (7.7)	12 (17.1)	
11–15		19 (9.1)	6 (9.1)	2 (4.4)	3 (11.5)	8 (11.4)	
16–20		36 (17.3)	9 (13.6)	7 (15.2)	5 (19.2)	15 (21.4)	
> 20		107 (51.4)	36 (54.6)	30 (65.2)	11 (42.3)	30 (42.9)	
Wealth score	29.3% [‡]	23.4	19.0	22.1	20.4	23.6	0.01 ^{**}
		(22.2–24.5)	(17.3–20.7)	(19.5–24.7)	(17.7–23.1)	(21.5–25.7)	
Knowledge score	NA	15.8	15.1	14.8	15.6	17.2	0.23
		(14.8–16.8)	(13.4–16.9)	(12.6–16.9)	(13.3–17.9)	(15.6–18.9)	

* Cameroon national average for the presented variables were extracted from CIA factbook at: <https://www.cia.gov/library/publications/the-world-factbook/geos/cm.html>

† Exact p-value was estimated using Monte Carlo simulation.

‡ Average poverty level was measured as percent of people living below the international poverty line of US \$1.90 per day

** Exact p-value was estimated using ANOVA.

*** poverty score was based on a scale of -20 to +20, with higher scores indicating a higher household net worth.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197330.t003>

11.1%), compared to the lowest observed in Sanguéré-Paul which was 0.55% (95% CI 0.15%–1.6%). Forty-five dogs were reported to have received rabies vaccine at some point prior to the survey (vaccination coverage of 30.8%). The highest rates of rabies vaccination coverage was seen in Ngong (66.7%) and Mayo-Oulo (59.1%). Gaschiga had a coverage of 6.9%, whereas the lowest coverage was observed in Sanguéré-Paul (0%) (Table 4).

The majority of respondents reported that they provided their dogs with food (97.6%) and water (90.4%) (Table 5). However, only 8.4% provided any level of veterinary care to their dogs. Few dog owners (2.4%) reported that they do not provide their dogs with any of the resources assessed. In addition to care for owned dogs, 9.1% (n = 19) of respondents provided

Table 4. Demographics of dog-owning households in community members from Cameroon, 2010.

Demographics	All Households	Mayo-Oulo	Gaschiga	Sanguéré-Paul	Ngong
	N = 208 (%) [*]	N = 66 (%) [*]	N = 46 (%) ^{v*}	N = 26 (%) [*]	N = 70 (%) [*]
Household Surveys Completed	208	66	46	26	70
Owned Dogs ^{**}	141	20	29	16	76
Dog-owning households[‡]					
Yes	83 (39.9)	11 (16.7)	19 (41.3)	8 (30.7)	45 (64.3)
No	125 (60.1)	55 (83.3)	27 (58.7)	18 (69.2)	25 (35.7)
Dogs per Dog Owing Household	1.7	1.8	1.5	2.0	1.7
Total People ^{***}	1474	487	299	175	513
Human to dog ratio	10.4:1	24.4:1	10.3:1	10.9:1	6.8:1
Dog-confinement status[†]					
Always home	55 (37.7)	10 (45.4)	3 (10.3)	5 (29.4)	37 (47.4)
Home and roam	89 (61.0)	12 (54.5)	26 (89.7)	12 (70.6)	39 (50.0)
Always roam	2 (1.4)	0	0	0	2 (2.6)
Dogs vaccination status[†]					
All dogs vaccinated	37 (26.2)	11 (55.0)	2 (6.9)	0	24 (31.6)
Some dogs vaccinated	4 (2.8)	0	0	0	4 (5.3)
No dogs vaccinated	100 (71.0)	9 (45.0)	27 (93.1)	16 (100.0)	48 (63.1)
Dog vaccination coverage	30.8%	59.1%	6.9%	0	66.7%
Poverty score^{##}	23.4	19.0	22.1	20.4	23.6
CI 95%	(22.2–24.5)	(17.3–20.7)	(19.5–24.7)	(17.7–23.1)	(21.5–25.7)
Knowledge score	15.8	15.1	14.8	15.6	17.2
CI 95%	(14.8–16.8)	(13.4–16.9)	(12.6–16.9)	(13.3–17.9)	(15.6–18.9)

* Percent in this category are indicated by column

** Owned dogs calculated from imputed survey values, rounded up to nearest whole number

*** Total people represented in the survey

‡ Exact p-value (< 0.0001) was estimated using Monte Carlo simulation

† Total of dogs in this category = 141

linear regression analysis of poverty score and HDR showed high correlation with $r^2 = 0.76$ and slope of -3.4 (p = 0.06)

poverty score was based on a scale of -20 to +20, with higher scores indicating a higher household net worth.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197330.t004>

some form of care to dogs in the community that they did not own (community dogs); the most frequently reported resource was water (9.1%). No respondents reported that they provided veterinary care to community dogs.

Attitudes towards dog bite events and health seeking behaviors

Table 6 presents attitudes and practices towards bite events. When respondents were asked about their healthcare seeking behaviors if bitten by a dog they did not know/own, only 6% of respondents indicated that they would wash the wound, 36.7% indicated that they would call a doctor, and 52.6% reported that they would seek medical treatment. Only 3.1% of individuals indicated that they would seek PEP, and 9.7% would consult a traditional healer. Few respondents indicated that they would confine the biting dog for observation (2.6%), or would submit the dog for disease testing (8.7%). However, 23% of individuals indicated that would kill the dog. Furthermore, 92.8% of respondents (n = 193) reported that the main barrier for getting medical treatment in their community is the lack of money to pay for the treatment.

Among persons surveyed, 11 people were bitten by a dog in the past two years (2.6% annual bite incidence, 95% CI 1.4%– 4.6%). None of the bites were from animals known by the

Table 5. Care provided to owned and community dogs, Cameroon, 2010.

Type of care	Owned dogs		Community dogs	
	Total respondents = 83		Total respondents = 208	
	Number	%	Number	%
Care combination				
No care provided	2	2.4	189	90.9
Partial care provided	79	95.2	19	9.1
Full care provided	2	2.4	0	0
Type of care provided‡				
Food	81	97.6	13	6.3
Water	75	90.4	19	9.1
Shelter	4	4.8	0	0
Veterinary care	7	8.4	0	0
None	2	2.4	189	90.9

‡ Multiple responses allowed, totals may not add up to 100%

Two respondents who provided full care are also included in any care category

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197330.t005>

respondents. Among these 11 individuals 2 (18.2%) reported that they had washed the wound (Table 6). Eight individuals (72.7%) called a doctor and two (18.2%) individuals consulted a traditional healer. Only one person sought medical care and received PEP (9.1%). Dog confinement for observation was reported by only one individual. No respondents submitted the dog for disease testing or killed the dog. The reported rates of healthcare seeking behaviors for theoretical dog bites were compared to the practices of persons who truly experienced a dog bite. Bite victims were three times more likely to wash the wound than was reported under the theoretical bite scenario (95% CI 0.8–11.7). Bite victims were also twice as likely to call a doctor than was reported under the theoretical scenario (risk ratio 2.0, 95% CI 1.3–3.0, $p = 0.02$). Bite victims were 5.8 times less likely to seek medical care as compared to the theoretical scenario (95% CI 0.9–37.6, $p < 0.01$).

Influence of knowledge and wealth status on community actions towards dog bite events and dog ownership

Wealth scores were higher for those people who indicated that they would seek medical care for a bite compared to those who did not indicate they would seek medical care (averages = -2.8 and -3.7, $p = 0.01$) (Fig 3). Wealth scores were also higher for those individuals who indicated that they would seek PEP compared to those who did not indicate they would seek PEP (averages = 1.5 and -3.4, $p = 0.04$). Likewise, knowledge scores were higher for people who indicated that they would seek medical care for a bite compared to those who did not indicate they would seek medical care (averages = 4.3 and 3.6, $p < 0.01$) (Fig 4). Moreover, knowledge scores were higher for people who indicated that they would seek PEP compared to those who did not indicate they would seek PEP (averages = 5.4 and 3.9, $p = 0.04$).

Wealth scores were lower for those individuals who indicated that they would seek care from a traditional healer (averages = -5.2 and -3.0, $p < 0.01$). Knowledge scores were not different for persons who indicated they would seek care at a traditional healer compared to those who did not report this practice (averages = 3.7 and 4.0, $p = 0.49$). Wealthier households were more likely to own dogs (averages = -2.6 and -3.6, $p = 0.007$), however, dog ownership was not associated with rabies knowledge. Likewise, wealth and knowledge scores did not statistically differ for respondents with vaccinated dogs compared to unvaccinated dogs.

Table 6. Attitudes and practices towards bite events among community members, Cameroon, 2010.

Bite action	Bitten by a dog I do not know/own			
	Total participants N = 208*			
	Attitudes	Practices	Odds Ratio	p value [†]
	total respondents = 196 n (%)**	total respondents = 11 n (%)**	CI 95%	
Wash the wound				
Yes	12 (6.1)	2 (18.2)	3.4	0.2
No	184 (93.9)	9 (81.8)	(0.7–17.5)	
Called a doctor				
Yes	72 (36.7)	8 (72.7)	4.6	0.02
No	124 (63.3)	3 (27.3)	(1.2–17.8)	
Actively sought medical treatment at a pharmacy, hospital, clinic or outpost				
Yes	103 (52.6)	1 (9.1)	0.09	0.004
No	93 (47.4)	10 (90.9)	(0.01–0.7)	
Received rabies PPE				
Yes	6 (3.1)	1 (9.1)	3.2	0.4
No	190 (96.9)	10 (90.9)	(0.3–28.9)	
Consulted a traditional healer				
Yes	19 (9.7)	2 (18.2)	2.1	0.4
No	177 (90.3)	9 (81.8)	(0.4–10.3)	
Confined the dog for observation				
Yes	5 (2.6)	1 (9.1)	3.8	0.3
No	191 (97.4)	10 (90.9)	(0.5–35.8)	
Submitted the dog for disease testing				
Yes	16 (8.2)	0	0.5	0.8
No	180 (91.8)	11 (100.0)	(0.03–9.1)	
Killed the dog				
Yes	45 (23.0)	0	0.2	0.3
No	151 (77.0)	11 (100.0)	(0.009–2.6)	
Respondents who did not indicate a healthcare seeking action				
Yes	192 (98.0)	7 (63.6)	0.03	0.0003
No	4 (2.0)	4 (36.4)	(0.007–0.18)	

* Only one participant declined to answer this question

** Percentage is shown by column

† p value was calculated by using Fischer's exact test

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197330.t006>

Variables independently associated with seeking medical care were knowledge score, poverty score, and gender (Table 7). Individuals with a higher knowledge score were more likely to seek medical care, whilst males and the poorest individuals were less likely to seek medical care. Alternatively, variables independently associated with consulting a traditional healer were knowledge score, age, and gender (Table 8). Individuals with a lower knowledge score were less likely to consult a traditional healer, whilst males and individuals older than 30 years were more likely to consult a traditional healer.

Discussion

Rabies vaccine for humans and dogs have been in existence for over 100 years, and more than 30 countries have eliminated canine rabies through implementation of vaccination programs

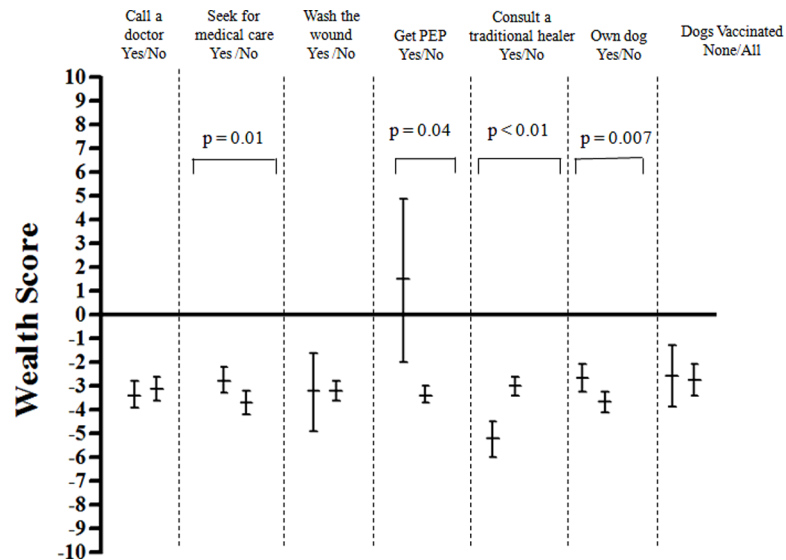


Fig 3. Analysis of wealth score and its association with practices towards bite events among community members, Cameroon, 2010. The horizontal midline of each vertical bar represents the mean index score; upper and lower confidence intervals are depicted respectively at either end. P-value was calculated by using T-test.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197330.g003>

and laws enforcing responsible dog ownership [2,3]. Advances in canine rabies elimination have been steadily improving, and its elimination is a global priority [2,3]. This study assessed dog ownership and healthcare-seeking behaviors among residents of four communities in Cameroon. The results are meant to improve the implementation of canine rabies elimination programs in Cameroon and similarly impacted countries.

Here, we report the first rabies-focused knowledge, attitudes, and practices (KAP) survey conducted in Cameroon. Understanding of the dog population, dog bite injuries, and the health-seeking practices of community members can be used to improve rabies control

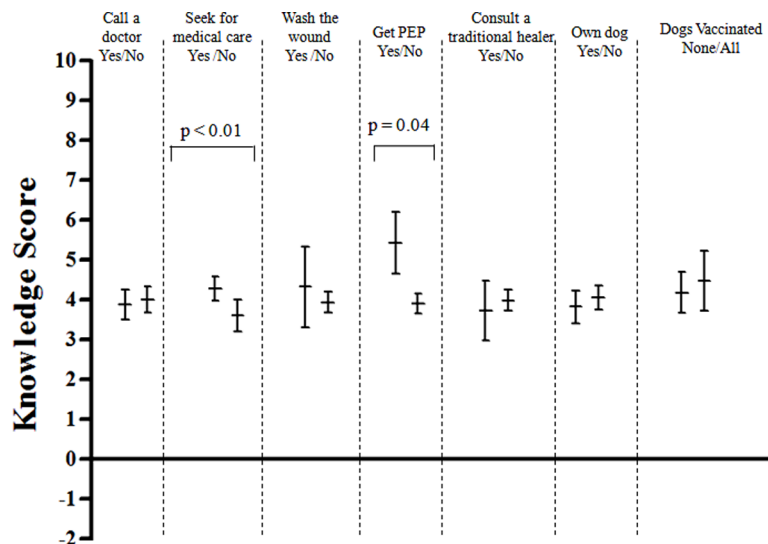


Fig 4. Analysis of knowledge score and its association with practices towards bite events among community members, Cameroon, 2010. The horizontal midline of each vertical bar represents the mean index score; upper and lower confidence intervals are depicted respectively at either end. P-value was calculated by using T-test.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197330.g004>

Table 7. Characteristics associated with individuals who actively sought medical care by multivariate logistic regression, Cameroon, 2010.

Variables	Sought medical care	Unadjusted OR	Adjusted OR**	p value
	(Yes/No)	(95% CI)	(90% CI)	
Knowledge*	15.8/max points	1.21 (1.0–1.4)	1.3 (1.1–1.5)	0.01
Poverty*	23.4/max points	0.9 (0.8–1.4)	1.2 (1.1–1.3)	0.003
Age group (years)				
21–30	25/20	1.03 (0.8–1.2)		
31–40	22/21			
41–50	24/26			
51–60	15/11			
> 60	14/10			
Gender				
Male	64/70	0.5 (0.2–0.9)	0.4 (0.3–0.9)	0.008
Female	39/23			
Years of schooling completed				
None	47/44	0.9 (0.8–1.1)		
≤ 6	28/31			
7–12	21/14			
> 12	7/3			
No. of People per Household				
1–3	5/4	1.14 (0.7–1.1)		
4–6	20/23			
> 6	78/66			
Own dogs				
Yes	41/38	0.5 (0.2–0.9)		
No	61/55			

* Knowledge and poverty were analyzed as continuous variables with average score values displayed in the table with maximum values as (average score/maximum score value)

** Adjusted odds ratios only displayed for variables that remained significant at alpha < 0.1

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197330.t007>

measures. Almost 40% of the surveyed households owned dogs, representing a human to dog (H:D) ratio of 10.1:1, which was consistent with a previous ecologic study from North-West Cameroon (H:D of 8:1) [17]. Several studies have been conducted in Africa, showing similar human to dog ratios such as 10.8:1 in rural coastal Tanzania [18], and 11.1:1 in rural Southern Africa [19]. Previous studies have shown that dog populations are higher–relative to human populations–in rural areas as compared to urban areas [5,14,20–25]. Our findings further support this association, as the H:D ratio in these rural communities is 1.4 times more than that estimated for rural African communities (24.1:1). This finding reinforces the importance of stratified extrapolations of H:D ratios to obtain accurate dog population estimates over large geo-political areas.

Our study showed a significant association between dog ownership and wealth among these rural community members, where poor households were less likely to own dogs. This finding was also reported by Wallace and colleagues in Uganda, where they found that rates of dog ownership were low in impoverished rural areas [13]. Indeed, as reported previously by Wallace et al. [13] we identified a strong relationship between poverty and dog ownership, with impoverished communities claiming ownership of fewer dogs than wealthier communities. This further supports that simplistic extrapolations of dog populations based solely on human density may not be accurate, and other factors such as poverty should be considered

Table 8. Characteristics associated with individuals who consulted a traditional healer by multivariate logistic regression, Cameroon, 2010.

Variables	Consulted traditional healer	Unadjusted OR	Adjusted OR	p value
	(Yes/No)	(95% CI)	(90% CI)	
Knowledge and Poverty interaction*		1.3 (1.2–1.5)	1.3 (1.1–1.4)	0.002
Age group (years)				
21–30	0/45	1.03 (0.8–1.2)	1.8 (1.2–2.8)	0.02
31–40	1/42			
41–50	6/44			
51–60	3/23			
> 60	7/17			
Gender				
Male	17/117	0.5 (0.2–0.9)	15.4 (2.3–101.4)	0.01
Female	2/60			
Years of schooling completed				
None	18/73			
≤ 6	1/58	0.9 (0.8–1.1)		
7–12	0/35			
> 12	0/10			
No. of People per Household				
1–3	3/6	1.14 (0.7–1.1)		
4–6	5/38			
> 6	11/133			
Own dogs				
Yes	4/75	0.5 (0.2–0.9)		
No	15/101			

* Knowledge and poverty were analyzed as continuous variables with average score values displayed in the table with maximum values as (average score/maximum score value). Knowledge and poverty interaction was taken.

** Adjusted odds ratios only displayed for variables that remained significant at alpha < 0.1

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197330.t008>

when attempting to enumerate dog populations through mathematical methods. The findings here do support the suggestion that the impact of poverty on dog ownership may be a more common association than previously considered. While dog ownership was associated with wealth it was not associated with rabies knowledge.

A study from Uganda reported significant associations between poverty and dog vaccination coverage, with wealthier communities reporting higher coverage rates [13]. This association was not seen in the four rural Cameroon communities represented in this study. Similarly, knowledge of rabies had no bearing on dog vaccination. Dog rabies vaccine is often not available outside of government sponsored clinics in Cameroon. Therefore, the lack of association reported here may reflect a barrier in access to the vaccine that cannot necessarily be overcome by wealth or advanced rabies knowledge. This is not to say that if vaccine was available, knowledge and poverty would remain non-significant factors in dog vaccination, rather we propose that access is likely one of several limiting factors in dog vaccination rates. Cost was the main limiting factor for human PEP access among study participants; it should be expected that if access to canine vaccine is addressed, cost would surely be a limiting factor that would need to be considered. Future assessments should attempt to identify explanatory variables for this finding [26].

Of interest, the roaming profile observed for the dog population in this study was different than have been reported by others. While most studies have reported a high proportion of

dogs roaming freely at all times (ranging from 31.4% to 78%) [13,14,27–31], our results demonstrated that only 1.4% of the dogs were allowed to always roam freely. While few dogs roam freely at all times in these communities, the proportion of dogs declared as confined at all times was consistent with prior observations (38%) [17]. It is known that dogs allowed to roam without supervision are more likely to be exposed to rabies virus due to contact with other dogs or wild mammals [31,32], helping on the persistence of domestic dog rabies, and implicating in high vaccination levels to prevent rabies [3, 33].

As previously discussed by Ratsitorahina et al. [34], interactions between owned and unowned dogs should be explored as an important aspect for rabies exposure within dog populations, and to non-reservoir populations (e.g. humans). Our survey showed that 95% of respondents provided partial care to their dogs, and more frequently with food, compared to a 10-fold decrease in partial care for community/non-owned dogs (only 9.1% of respondents). Furthermore, those 9.1% of people that cared for community dogs did not provide veterinary care. This survey only captured dog populations and vaccination coverage among the owned dog population. It is not possible to enumerate the community dog population with the methods used here. However, we can infer from this information that the community dog population may comprise at most 9% of the total dog population, and given that only central-point vaccination is practiced these dogs are unlikely to have a history of vaccination.

Awah-Ndukum et al. showed in their study that the costs associated with dog rabies vaccine in Cameroon are high [17], and even though national campaigns have been conducted, dog-owners are still responsible for part of the costs. This cost is thought to have contributed to low coverage rates during these campaigns [10,12]. However, a lack of access to qualified veterinary care cannot be ruled out in this population. It is likely that cost and access are contributing factors to the low utilization of veterinary care for owned dogs in this study, highlighting the importance of government services to provide essential veterinary services (i.e., rabies vaccination) at an affordable cost.

Attitudes and practices regarding bite events and possible rabies exposures were also addressed in this study (Table 6). Only 18% of bite victims assessed in this survey washed the wound, and even fewer respondents indicated that they would do so if bitten in the future (6%). These findings suggest that most respondents were unaware of this preventive measure, which can reduce the risk of successful rabies virus transmission by up to 40% [35]. Preventive measure of wound washing should be clearly emphasized during future rabies vaccination and education campaigns [10,36].

Over half of survey respondents indicated that they would seek medical care if they were bitten by a dog they did not know. However, in practice, among the 11 respondents with dog bites, only two sought care and only one received PEP. The individual reasons for not seeking medical care among bite victims were not investigated in this study, however cost was identified as a primary reason for not seeking medical care by all respondents and wealth was positively associated with the knowledge that healthcare should be sought if bitten. The same association was observed in regards to increased rabies knowledge. Most human deaths caused by rabies in developing countries are associated with failure to seek medical care [1,2,5], and the cost-barrier for dog rabies vaccination has also been reported in other Cameroonian communities [12] suggesting that poverty may be a barrier to accessing post-bite medical care. Further studies to explore barriers to medical care and associations between perceived risk and healthcare-seeking behaviors should be pursued.

Respondents with lower wealth scores were more likely to seek care from a traditional healer, as well as males and oldest individuals. However, it's important to emphasize that the knowledge of rabies in the respondents' community had a great impact on this association, due to individuals with more knowledge being more likely to seek medical care. Indeed,

knowledge is an important factor for seeking care against rabies, but according to our analysis, knowledge is more helpful when people are wealthier. These findings suggest that improving knowledge about rabies prevention may not impact healthcare-seeking practices if the cost of medical care remains a perceived barrier.

There are important limitations to our findings. First, convenience sampling may not yield a truly representative sample of the entire population. Furthermore, questions focused on individuals' attitudes could have resulted in inherent bias. Only the respondent was interviewed in relation to bite events, though not other members of the household. Consequently, if someone had been bitten, contracted rabies, and died, they were obviously excluded from this survey. Finally, the study population described here represents rural communities, expanding data collection to more communities that represent a continuum of poverty levels and urban status would improve extrapolation of this data to the entirety of Cameroon.

Conclusion

In conclusion, our findings provide useful information focused on dog ownership and associated behaviors, population knowledge, attitudes and practices, and rabies exposures that could be applied to national rabies prevention efforts. This study identified numerous factors that may limit successful dog vaccination efforts in rural Cameroon, including a large proportion of free roaming dogs, access to the vaccine, and ability to pay for veterinary services. These multi-focal barriers will require a comprehensive approach that includes improved access to government services, educational campaigns, and dog population management. These same barriers could also limit human access to PEP, although cost may be much more important in regards to human vaccine decisions. Improving access to human PEP should address both costs and awareness, as this study indicates that despite awareness, if cost is a barrier then traditional medical approaches may still be utilized. The findings reported here are intended to improve rabies control practices in Cameroon and similar areas of Central Africa.

Supporting information

S1 Appendix. Data collection instrument (in English).
(DOCX)

Acknowledgments

We would like to thank Ivan Kuzmin for protocol, travel preparation, and contacted with LANAVET. We also thank Charles Rupprecht for planning and funding search for the program, and review the protocol. We are thankful to the LANAVET staff from Garoua, and also to the Ministry of Health staff from Yaounde. We also thank Ida Sahlu, Akinwande Benda-Coker, and Meseret Birhane for summarized the data and digitized lab records.

Author Contributions

Conceptualization: Amy Gilbert, Sali Ngam Ngam, Sergio Recuenco.

Formal analysis: Galileu Barbosa Costa, Benjamin Monroe, Jesse Blanton, Ryan Wallace.

Funding acquisition: Amy Gilbert, Sergio Recuenco.

Investigation: Amy Gilbert, Sali Ngam Ngam, Sergio Recuenco.

Project administration: Amy Gilbert, Sergio Recuenco.

Supervision: Amy Gilbert, Sergio Recuenco, Ryan Wallace.

Writing – original draft: Galileu Barbosa Costa, Amy Gilbert.

Writing – review & editing: Galileu Barbosa Costa, Amy Gilbert, Benjamin Monroe, Jesse Blanton, Sergio Recuenco, Ryan Wallace.

References

1. Fooks AR, Banyard AC, Horton DL, Johnson N, McElhinney LM, Jackson AC (2014) Current status of rabies and prospects for elimination. *Lancet* 384: 1389–99. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)62707-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)62707-5) PMID: 24828901
2. Hampson K, Coudeville L, Lembo T, Sambo M, Kieffer A, Attlan M, et al. (2015) Estimating the global burden of endemic canine rabies. *PLoS Negl Trop Dis* 9: e0003709. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003709> PMID: 25881058
3. Wallace RM, Undurraga EA, Blanton JD, Cleaton J, Franka R (2017) Elimination of Dog-Mediated Human Rabies Deaths by 2030: Needs Assessment and Alternatives for Process Based on Dog Vaccination. *Front Vet Sci* 4: 9. <https://doi.org/10.3389/fvets.2017.00009> PMID: 28239608
4. Dodet B, Tejiokem MC, Aguemon AR, Bourhy H (2015) Human rabies deaths in Africa: breaking the cycle of indifference. *Int Health* 7: 4–6. <https://doi.org/10.1093/inthealth/ihu071> PMID: 25303941
5. Knobel DL, Cleaveland S, Coleman PG, Fevre EM, Meltzer MI, Miranda ME, et al. (2005) Re-evaluating the burden of rabies in Africa and Asia. *Bull World Health Organ* 83: 360–8. /S0042-96862005000500012 PMID: 15976877
6. World Health Organization. WHO Expert Consultation on Rabies. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs099/en/>. Accessed July 20, 2017.
7. Taylor LH, Hampson K, Fahrion A, Abela-Ridder B, Nel LH (2017) Difficulties in estimating the human burden of canine rabies. *Acta Trop* 165: 133–40. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.12.007> PMID: 26721555
8. Nel LH, Rupprecht CE (2007) Emergence of lyssaviruses in the Old World: the case of Africa. *Current Top Microbiol Immunol* 315: 161–93.
9. Dodet B (2009) The fight against rabies in Africa: From recognition to action. *Vaccine* 27: 5027–32. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.06.030> PMID: 19560430
10. Sadeuh-Mba SA, Besong L, Demanou M, Loul S, Nchare A, Njouom R (2014) Laboratory data of dog rabies in southern Cameroon from 2010 to 2013. *BMC Res Notes* 7: 905. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-7-905> PMID: 25495597
11. Sadeuh-Mba SA, Momo JB, Besong L, Loul S, NjouomR (2017) Molecular characterization and phylogenetic relatedness of dog-derived Rabies Viruses circulating in Cameroon between 2010 and 2016. *PLoS Negl Trop Dis* 11: e0006041. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006041> PMID: 29084223
12. Awah Ndukum J, Tchoumboue J, Tong JC (2002) Canine and Human Rabies in Cameroon. *Trop Vet* 20: 162–8.
13. Wallace RM, Mehal J, Nakazawa Y, Recuenco S, Bakamutumaho B, Osinubi M, et al (2017) The impact of poverty on dog ownership and access to canine rabies vaccination: results from a knowledge, attitudes and practices survey, Uganda 2013. *Infect Dis Poverty* 6: 97. <https://doi.org/10.1186/s40249-017-0306-2> PMID: 28569185
14. Schildecker S, Millien M, Blanton JD, Boone J, Emery A, Ludder F, et al (2016) Dog Ecology and Barriers to Canine Rabies Control in the Republic of Haiti, 2014–2015. *Transbound Emerg Dis* [Epub ahead of print].
15. The CIA Factbook, <https://www.cia.gov/library/publications/the-world-factbook/fields/2172.html>. Accessed July 20, 2017.
16. Tack DM, Blanton JD, Holman RC, Longenberger AH, Petersen BW, Rupprecht CE (2013) Evaluation of knowledge, attitudes, and practices of deer owners following identification of a cluster of captive deer with rabies in Pennsylvania in July 2010. *J Am Vet Med Assoc* 242: 1279–85. <https://doi.org/10.2460/javma.242.9.1279> PMID: 23600787
17. Awah Ndukum J (2003) Ecological aspects of dogs in relation to rabies control and public health significance in North-west Cameroon. *J Cameroon Academy Sciences* 3: 25–31.
18. Knobel DL, Laurenson MK, Kazwala RR, Boden LA, Cleaveland S (2008). A cross-sectional study of factors associated with dog ownership in Tanzania. *BMC Vet Res* 4: 5. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-4-5> PMID: 18230137
19. Rautenbach GH, Boomker J, de Villiers IL (1991). A descriptive study of the canine population in a rural town in southern Africa. *J S Afr Vet Assoc* 62: 158–62. PMID: 1770490

20. De Balogh KK, Wandeler AI, Meslin FX (1993). A dog ecology study in an urban and a semi-rural area of Zambia. *Onderstepoort J Vet Res* 60: 437–43. PMID: [7777333](#)
21. Robinson LE, Miranda ME, Miranda NL, Childs JE (1996). Evaluation of a canine rabies vaccination campaign and characterization of owned-dog populations in the Philippines. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 27: 250–6. PMID: [9279985](#)
22. Kongkaew W, Coleman P, Pfeiffer DU, Antarasena C, Thiptara A. (2004). Vaccination coverage and epidemiological parameters of the owned-dog population in Thungsong District, Thailand. *Prev Vet Med* 65: 105–15. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2004.05.009> PMID: [15454330](#)
23. Flores-Ibarra M, Estrella-Valenzuela G (2004). Canine ecology and socioeconomic factors associated with dogs unvaccinated against rabies in a Mexican city across the US-Mexico border. *Prev Vet Med* 62: 79–87. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2003.10.002> PMID: [15156995](#)
24. Alves MC, Matos MR, Reichmann Mde L, Dominiguez MH (2005). Estimation of the dog and cat population in the State of São Paulo. *Rev Saude Publica* 39: 891–7. /S0034-89102005000600004 PMID: [16341397](#)
25. Suzuki K, Pereira JA, Frías LA, López R, Mutinelli LE, Pons ER (2008). Rabies-vaccination coverage and profiles of the owned-dog population in Santa Cruz de la Sierra, Bolivia. *Zoonoses Public Health* 55: 177–83. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2008.01114.x> PMID: [18387138](#)
26. Birhane MG, Miranda ME, Dyer JL, Blanton JD, Recuenco S (2016). Willingness to pay for dog rabies vaccine and registration in Ilocos Norte, Philippines (2012). *PLoS Negl Trop Dis* 10: e0004486. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004486> PMID: [26999021](#)
27. Wallace RM, Reses H, Franka R, Dilius P, Fenelon N, Orciari L, et al (2015) Establishment of a Canine Rabies Burden in Haiti through the Implementation of a Novel Surveillance Program. *PLoS Negl Trop Dis* 9: e0004245. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004245> PMID: [26600437](#)
28. Sambo M, Lembo T, Cleaveland C, Ferguson HM, Sikana L, Simon C, et al (2014) Knowledge, Attitudes and Practices (KAP) about Rabies Prevention and Control: A Community Survey in Tanzania. *PLoS Negl Trop Dis* 8: e3310. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003310> PMID: [25473834](#)
29. Kisiel LM, Jones-Bitton A, Sargeant JM, Coe JB, Tyler Flockhart DT, Palomar AR, et al (2016) Owned dog ecology and demography in Villa de Tezontepec, Hidalgo, Mexico. *Prev Vet Med* 135: 37–46. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2016.10.021> PMID: [27931927](#)
30. Tenzin T, Namgyal J, Letho S (2017) Community-based survey during rabies outbreaks in Rangjung town, Trashigang, eastern Bhutan, 2016. *BMC Infect Dis* 17: 281. <https://doi.org/10.1186/s12879-017-2393-x> PMID: [28415972](#)
31. Tenzin T, Ahmed R, Debnath NC, Ahmed G, Yamage M (2015) Free-roaming dog population estimation and status of the dog population management and rabies control program in Dhaka City, Bangladesh. *PLoS Negl Trop Dis* 9: e0003784. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003784> PMID: [25978406](#)
32. Rinzin K, Tenzin T, Robertson I (2016) Size and demography pattern of the domestic dog population in Bhutan: Implications for dog population management and disease control. *Prev Vet Med* 126: 39–47. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2016.01.030> PMID: [26873612](#)
33. Leung T, Davis SA (2017) Rabies Vaccination Targets for Stray Dog Populations. *Front Vet Sci* 4: 52. <https://doi.org/10.3389/fvets.2017.00052> PMID: [28451589](#)
34. Ratsitorahina M, Rasambainarivo JH, Raharimanana S, Rakotonandrasana H, Andriamiarisoa MP, Rakalomanana FA, Richard V (2009). Dog ecology and demography in Antananarivo, 2007. *BMC Vet Res* 5: 21. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-5-21> PMID: [19486516](#)
35. Hampson K, Dobson A, Kaare M, Dushoff J, Magoto M, Sindoya E, et al (2008) Rabies exposures, post-exposures prophylaxis and deaths in a region of endemic canine rabies. *PLoS Negl Trop Dis* 2: e339. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000339> PMID: [19030223](#)
36. Frey J, Mindekem R, Kessely H, Doumagoum Moto D, Naissengar S, Zinsstag J, et al (2013) Survey of animal bite injuries and their management for an estimate of human rabies deaths in N'Djaména, Chad. *Trop Med Int Health* 18: 1555–62. <https://doi.org/10.1111/tmi.12202> PMID: [24118491](#)

7.2. ARTIGO 5: The potential effect of improved provision of rabies post-exposure prophylaxis in Gavi-eligible countries: a modeling study

Este artigo foi submetido em Dezembro de 2018 no periódico *The Lancet Infectious Diseases*.

DESCRIÇÃO DO ESTUDO:

A profilaxia pós-exposição (PEP) após uma suspeita de exposição à raiva é uma forma segura e eficaz de prevenir mortes por raiva humana. Apesar disso, o impacto da raiva continua alto em muitos países subdesenvolvidos devido ao limitado acesso à PEP. Estima-se que cerca de 60.000 mortes por raiva acontecem a cada ano. Estudos em países individuais examinaram o efeito de diferentes intervenções em humanos (profilaxia pré-exposição e pós-exposição) e cães (campanhas de vacinação em massa) sobre a incidência de mortes por raiva. A vacinação canina é necessária para a eliminação da raiva, mas o uso de PEP também pode prevenir mortes. Neste estudo foi avaliado o impacto do investimento em PEP sobre a ocorrência de raiva em 67 países que fazem parte da Aliança Global para Vacinas e Imunização (GAVI). A expansão do uso de PEP é uma intervenção altamente eficaz em termos de custos que pode evitar em torno de 587.000 mortes adicionais por raiva entre 2020-2035. Nossas análises sugerem que os investimentos devem priorizar PEP e não a imunoglobulina anti-rábica (RIG), que possui um custo maior. No contexto da expansão dos esforços de vacinação canina ao longo do horizonte temporal 2020-2035, um melhor acesso ao PEP continuaria a ser uma intervenção altamente eficaz em termos de custos, pois salvaria muitas vidas e seria altamente custo-efetivo. Um investimento para melhorar o acesso ao PEP poderia ser transformador para a prevenção da raiva e catalisar a campanha global "Zero by Thirty" para eliminar as mortes humanas por raiva canina, em coordenação com campanhas de vacinação canina.



The potential effect of improved provision of rabies post-exposure prophylaxis in Gavi-eligible countries: a modelling study



WHO Rabies Modelling Consortium*

Summary

Lancet Infect Dis 2019;
19: 102–11

Published Online
November 21, 2018
[http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30512-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30512-7)

See [Comment](#) page 11

*Contributors are listed in the
appendix

Correspondence to:
Dr Katie Hampson, Institute of
Biodiversity, Animal Health and
Comparative Medicine,
University of Glasgow,
Glasgow, G12 8QQ, UK
katie.hampson@glasgow.ac.uk

or
Dr Caroline Trotter,
Disease Dynamics Unit,
Department of Veterinary
Medicine, University of
Cambridge, Cambridge,
CB3 0ES, UK
ct56@cam.ac.uk

See Online for appendix

Background Tens of thousands of people die from dog-mediated rabies annually. Deaths can be prevented through post-exposure prophylaxis for people who have been bitten, and the disease eliminated through dog vaccination. Current post-exposure prophylaxis use saves many lives, but availability remains poor in many rabies-endemic countries due to high costs, poor access, and supply.

Methods We developed epidemiological and economic models to investigate the effect of an investment in post-exposure prophylaxis by Gavi, the Vaccine Alliance. We modelled post-exposure prophylaxis use according to the status quo, with improved access using WHO-recommended intradermal vaccination, with and without rabies immunoglobulin, and with and without dog vaccination. We took the health provider perspective, including only direct costs.

Findings We predict more than 1 million deaths will occur in the 67 rabies-endemic countries considered from 2020 to 2035, under the status quo. Current post-exposure prophylaxis use prevents approximately 56 000 deaths annually. Expanded access to, and free provision of, post-exposure prophylaxis would prevent an additional 489 000 deaths between 2020 and 2035. Under this switch to efficient intradermal post-exposure prophylaxis regimens, total projected vaccine needs remain similar (about 73 million vials) yet 17·4 million more people are vaccinated, making this an extremely cost-effective method, with costs of US\$635 per death averted and \$33 per disability-adjusted life-years averted. Scaling up dog vaccination programmes could eliminate dog-mediated rabies over this time period; improved post-exposure prophylaxis access remains cost-effective under this scenario, especially in combination with patient risk assessments to reduce unnecessary post-exposure prophylaxis use.

Interpretation Investing in post-exposure vaccines would be an extremely cost-effective intervention that could substantially reduce disease burden and catalyse dog vaccination efforts to eliminate dog-mediated rabies.

Funding World Health Organization.

Copyright © This is an Open Access article published under the CC BY 3.0 IGO license which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. In any use of this article, there should be no suggestion that WHO endorses any specific organisation, products or services. The use of the WHO logo is not permitted. This notice should be preserved along with the article's original URL.

Introduction

Timely post-exposure prophylaxis prevents the fatal onset of rabies, which causes an estimated 60 000 human deaths each year, mostly in Africa and Asia and among children.^{1,2} Domestic dogs are responsible for 99% of human cases.³ Although mass dog vaccination is required for elimination of dog-mediated rabies, the disease burden could be substantially reduced through improved access to post-exposure prophylaxis.

WHO recommendations for rabies post-exposure prophylaxis have been updated in line with new evidence.⁴ Procedures depend on the type of contact with the suspect rabid animal, with administration of rabies immunoglobulin recommended for high-risk exposures. Intradermal multisite vaccination regimens have been developed, which are more economical than intra-muscular administration because they use reduced vaccine volumes.⁴ While the use of post-exposure prophylaxis at current levels saves many

lives,² access to post-exposure prophylaxis is poor in many parts of the world, particularly rural areas where most rabies exposures occur. Even if people who have been bitten get to a treatment centre and post-exposure prophylaxis is available, its cost is often unaffordable.

A global framework to reach zero human deaths from dog-mediated rabies by 2030 was developed by WHO and partners in 2015.³ A strategic plan covering human and animal vaccine demand was developed for the implementation of this framework.⁵ In 2016, WHO established a Strategic Advisory Group of Experts Working Group on rabies vaccines and rabies immunoglobulins,⁶ aiming to increase the public health effect of rabies biologics through practical and feasible recommendations. This effort resulted in a recommendation of a dose-sparing abridged 1-week intradermal regimen, requiring only three clinic visits, and guidance for more prudent use of rabies immunoglobulin.⁴

Research in context

Evidence before this study

We searched PubMed for papers published from Jan 1, 1980, to May 31, 2018, with the terms “rabies” AND “burden” AND (“global” OR “Africa” OR “Asia”) and identified two previous modelling studies that suggested around 60 000 deaths from rabies occur each year. Post-exposure prophylaxis after a suspected rabies exposure is a safe and effective way of preventing human deaths from rabies and has long been promoted by WHO. However, human deaths from rabies remain high in many low-income and middle-income countries because access to post-exposure prophylaxis is poor. Although mass dog vaccination is required for elimination of dog-mediated rabies, improved provision and use of post-exposure prophylaxis would also prevent deaths. Dose-sparing intradermal vaccine regimens are known to be much more economical than intramuscular regimens but have not been adopted everywhere.

Added value of this study

This is the first paper to consider the effect of an investment in rabies post-exposure prophylaxis across all 67 countries that are, or have previously been, Gavi-eligible and where rabies is endemic. Although data are still scarce in many areas, we used information from studies supported by the Gavi learning

agenda. Improving provision of rabies vaccines for post-exposure prophylaxis is a highly cost-effective intervention that could prevent an additional 489 000 deaths from rabies from 2020 to 2035. Our analyses suggest that investments should prioritise vaccines for post-exposure prophylaxis rather than rabies immunoglobulin, which is costly and has more marginal health benefits. Even with expanding dog vaccination efforts and associated reductions in the risk of human exposure over the 2020–35 time period, improved access to post-exposure prophylaxis remains a highly cost-effective intervention.

Implications of all the available evidence

Increasing timely access to rabies vaccines for post-exposure prophylaxis, free at point-of-care, would save many lives, is highly cost-effective, and is feasible under the current vaccine production capacity, with the switch to the dose-sparing abridged 1-week intradermal regimen. In combination with scaled-up mass dog vaccination, an investment to improve access to post-exposure prophylaxis could be transformative for rabies prevention and could catalyse the global campaign Zero by 30 to eliminate human deaths from dog-mediated rabies.

Enhancing access to rabies post-exposure prophylaxis was considered by Gavi, the Vaccine Alliance, in their vaccine investment strategy in 2008 and 2013.⁷ In 2013, post-exposure prophylaxis was estimated to avert almost 200 000 future deaths between 2015 and 2030 at a low cost per death averted, and that investment could stimulate the shift to more economical intradermal vaccination.⁷ However, knowledge gaps were recognised and observational studies were recommended to reduce uncertainties about implementation feasibility. Subsequently, Gavi supported field studies on rabies burden, treatment seeking, post-exposure prophylaxis compliance, and vaccine efficacy as part of their learning agenda. Gavi will reconsider the rabies vaccine investment case in December, 2018.

We model the epidemiological and economic effect of changes in policy and practice for the provision of post-exposure prophylaxis, which Gavi investment could support.

Methods

Given inadequate rabies surveillance, studies of human rabies deaths rely upon model-derived estimates.⁸ We use an economic model of post-exposure prophylaxis demand linked to an epidemiological model characterising rabies dynamics in domestic dog populations (the primary reservoir).

We included countries that are currently (n=46), or have ever been, Gavi-eligible (n=67) and are endemic for rabies (appendix), henceforth denoted as Gavi-46 and Gavi-67. We

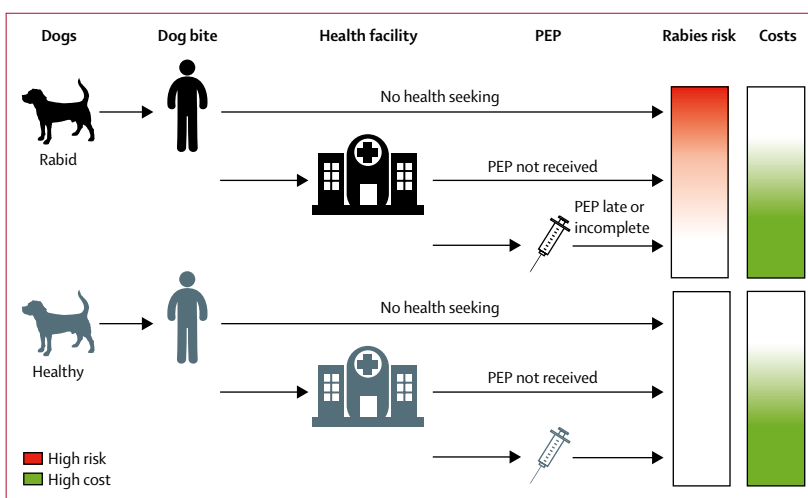


Figure 1: Decision tree covering rabies exposure, health seeking, and health outcomes, including death due to rabies or prevention through PEP

PEP provided to individuals bitten by healthy animals results in costs but does not avert deaths. For the full decision tree, see appendix. PEP=post-exposure prophylaxis.

did all analyses using R version 3.4.1. We used GATHER⁹ and CHEERS¹⁰ checklists to improve reporting quality (appendix).

Economic model

We adopted the static decision tree (characterised in figure 1; appendix), informed by literature-derived parameter estimates and available data.

Panel: Parameters and assumptions for modelling scenarios

We used biologically-defined constants for the probability of developing rabies following exposure, p_{infect} and of post-exposure prophylaxis (PEP) preventing rabies, p_{prevent} (appendix). Under the status quo (scenario 1) we used country-specific data from health facility use and Gavi Learning Agenda studies to inform parameters for health seeking and PEP provision (appendix gives country-specific estimates and gives cluster averages used when no country-specific data were available). In scenarios with improved PEP access (scenarios 2 and 3), we modelled increased health seeking, PEP provision, and compliance, as detailed here, according to timelines from the Global Strategic Plan (appendix). Dog vaccination is modelled in scenario 4, with Integrated Bite Case Management (IBCM) to reduce unnecessary PEP use for persons bitten by healthy dogs included in scenario 4c.

 $P_{\text{seek|rabid}}$

Probability: seeking care when bitten by suspect rabid dog.

Change with improved PEP access: initial increase of 0.1 from status quo in scenario 2a, base case (0.05 increase in scenario 2b low variant, 0.15 in scenario 2c high variant), with 0.03 increase per year thereafter to a cap of 0.9 in the base case (0.85 in scenario 2b, 0.95 in scenario 2c)

 $P_{\text{seek|healthy}}$

Probability: seeking care when bitten by healthy dog.

Change with improved PEP access: initial increase of 0.1 from status quo in scenario 2a, base case (0.05 increase in scenario 2b, 0.15 in scenario 2c), to a cap of 1 in all scenarios; no incremental increases after introduction.

 P_{receive}

Probability: receiving PEP if treatment sought.

Change with improved PEP access: initial increase of 0.1 from status quo in scenario 2a, base case (0.05 examined as a scenario 2b and 0.15 as a scenario 2c), with 0.03 increase per year thereafter to a cap of 0.93 base case (0.88 scenario 2b, 0.98 scenario 2c). Under scenario 4c with IBCM, p_{receive} was reduced to 0.5 for healthy dog bites on implementation of the intervention and was reduced further to 0.1 after elimination (zero dog rabies cases).

 P_{complete}

Probability: completing regimen.

Change with improved PEP access: initial increase of 0.1 in scenario 2a, base case (0.05 in scenario 2b, 0.15 in scenario 2c), with 0.03 increase per year thereafter to a cap of 0.8 base case (0.75 scenario 2b, 0.85 scenario 2c).

We took the perspective of the health provider and considered direct medical costs only. Currently, individuals bear post-exposure prophylaxis costs in many countries (appendix); with investment, post-exposure prophylaxis costs would be borne by Gavi with cofinancing from national governments. Health benefits were measured in terms of deaths and disability-adjusted life-years (DALYs) averted; rabies is universally fatal and we did not consider acute disability so DALYs are equal to years of life lost. Individuals in the model were aged 0–99 years. The time horizon was 2020–35 and our analysis accounts for human population growth over this timescale. We converted all costs to US\$, 2016, using inflation indicators (Consumer Price Index) from the World Bank. All scenarios were run with discounting at

3% (0% as alternative). We calculated the cost per death and per DALYs averted and, as appropriate, incremental costs and benefits.

Epidemiological model

Human rabies exposures depend on dog rabies incidence and rabid dog biting behaviour. We used a stochastic dynamic transmission model to characterise rabies in dog populations accounting for the effect of mass dog vaccination. Coverage achieved wanes between vaccination campaigns because of turnover in the dog population, so we incorporate dog demography. We ignore wildlife, which have a negligible role in maintenance of canine rabies.¹¹ We model an endemic scenario with and without mass dog vaccination to generate typical dog rabies incidence and trajectories to elimination (appendix).

Scenarios

We investigated the following scenarios (assumptions detailed in the panel): (1) status quo, with countries delivering post-exposure prophylaxis according to current provision rates and practices; (2) increased post-exposure pro-phylaxis access, with free vaccination following the dose-sparing abridged 1-week intradermal regimen⁴ and improved health seeking, vaccine provision, and post-exposure prophylaxis completion, considering a base case (2a), low variant (2b), and high variant (2c); (3) as 2, with provision of rabies immunoglobulin, as per the latest recommendations;⁴ (4) declining incidence due to scaling up mass dog vaccination (currently negligible in most Gavi-eligible countries), with post-exposure prophylaxis provided according to the status quo (4a), with improved post-exposure prophylaxis access (4b with base case parameter values), and as with the previous point, with integrated bite case management (IBCM) to reduce unnecessary post-exposure prophylaxis for people bitten by healthy animals (4c).^{12,13}

We simulated staggered implementation as described in the Global Strategic Plan Zero by 30 (appendix), assuming improved post-exposure prophylaxis access from 2020 onwards for phase 1 countries ($n=21$), from 2022 for phase 2 countries ($n=33$), and from 2026 for phase 3 countries ($n=13$). On implementation, we adjusted health seeking and post-exposure prophylaxis provision parameters and modelled incremental changes thereafter (panel).

Data sources

We developed a data template and sought information from multiple sources (appendix). Data from contact tracing and health-care use studies were obtained from partners in Tanzania, Madagascar, Sri Lanka, and Kenya. Partners in Chad, Côte d'Ivoire, Mali, Uganda, Haiti, Cameroon, Cambodia, Bhutan, Vietnam, Thailand, and the Philippines completed data templates. A systematic literature review of papers on the burden of rabies published from Jan 1, 2013, to Feb 28, 2017, was completed,² updating a previous review. Further country-specific

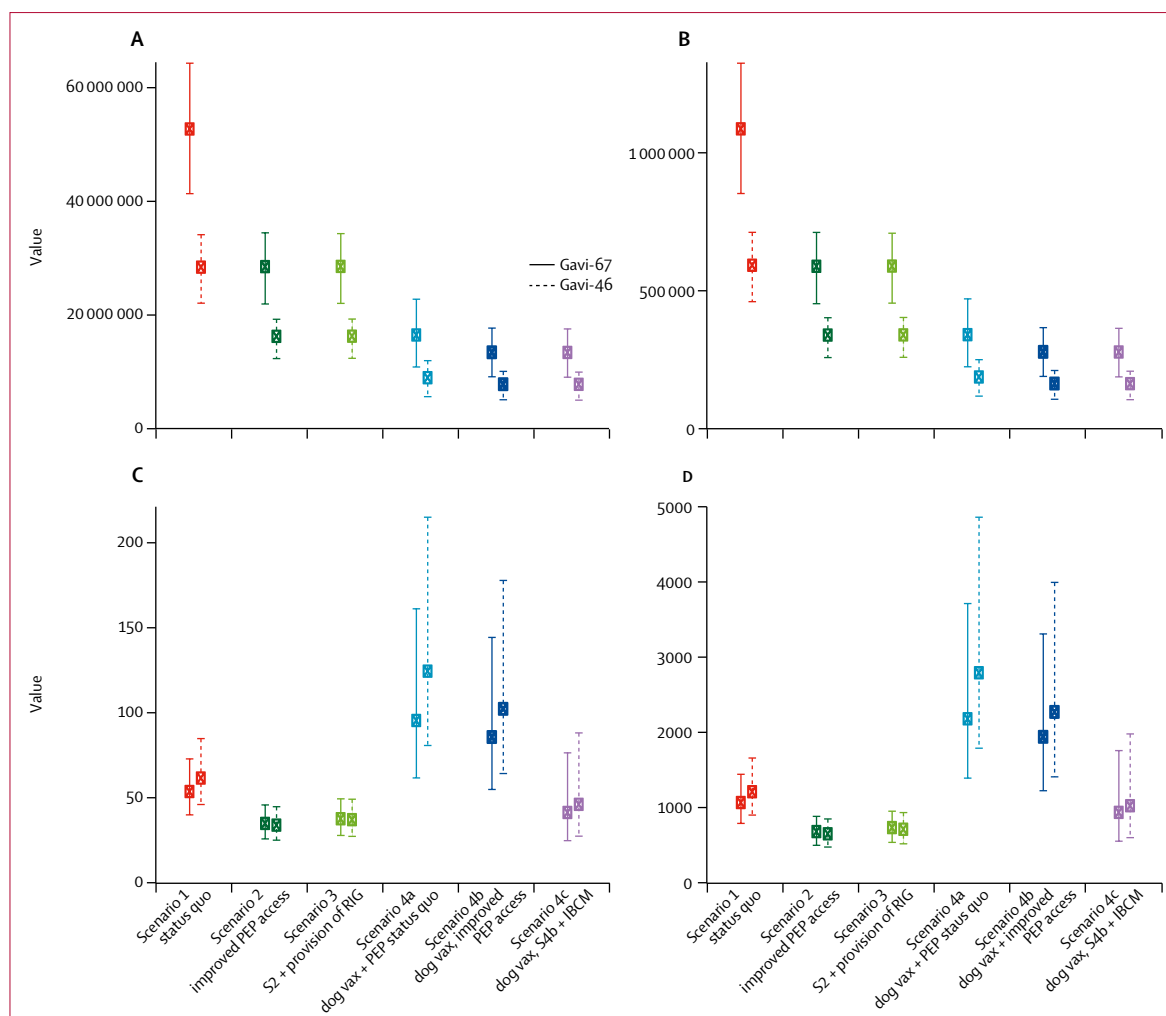


Figure 2: DALYs (undiscounted; A), deaths (undiscounted; B), cost per DALYs averted (discounted; C), and cost per death averted (discounted; D) from 2020 to 2035 under the modelled scenarios

Estimated outcomes presented with 95% PIs. Estimates do not include costs of dog vaccinations and only show the cost-effectiveness of PEP incremental to dog vaccination. Costs of IBCM are assumed to be covered by introductory grants (together with improved PEP access). Modelling assumptions are shown in panel and results in appendix. Only the base case is shown for scenario 2—ie, scenario 2a base case. DALYs=disability-adjusted life-years. IBCM=integrated bite case management. PEP=post-exposure prophylaxis. PI=prediction interval. RIG=rabies immunoglobulin. S=scenario. Vax=vaccination.

searches (“country” AND “rabies”) in PubMed were completed in July 26, 2017. Subsequent relevant publications were also reviewed where identified. Surveys of post-exposure prophylaxis provision were done by WHO and the US Centers for Disease Control and Prevention for 23 countries (15 of which were Gavi-eligible countries in 2018), covering vaccine administration route, regimen, cost, access, procurement, distribution, and monitoring. Follow-up by WHO ascertained whether patients in other countries pay for vaccines or are provided post-exposure prophylaxis free-of-charge from government clinics (appendix). We assumed that countries without information charged patients. Country-specific dog populations were estimated from human-to-dog ratios.¹ Human population estimates and life expectancies for

each country were taken from UN World Population Prospects 2017, medium variant.¹⁴ The proportions of populations in urban and rural environments were taken from the World Bank development indicators.¹⁵ Published age distributions of rabies cases were used.¹ We calculated a less conservative set of DALYs based on WHO frontier life expectancy in 2030.¹⁶ Health-care costs (ie, health worker time for post-exposure prophylaxis delivery) by country were obtained from WHO-CHOICE estimates.¹⁷

Model parameters

We assigned countries to a geographical cluster and we calculated cluster parameter values as the mean of country values in the cluster (appendix). Where country-specific parameters were not available or data were

	Scenario 1: status quo (95% PI)	Scenario 2a, base case: improved PEP access (95% PI)	Scenario 2b: low variant (95% PI)	Scenario 2c: high variant (95% PI)
Rabies deaths	1.07 (0.852–1.32)	0.576 (0.453–0.711)	0.720 (0.561–0.885)	0.425 (0.333–0.522)
Rabies deaths averted	0.898 (0.704–1.11)	1.39 (1.09–1.72)	1.25 (0.971–1.54)	1.55 (1.22–1.90)
DALYs	52.1 (41.4–64.3)	27.9 (21.9–34.5)	34.9 (27.2–43.0)	20.5 (16.1–25.2)
DALYs averted	44.2 (34.7–54.6)	68.0 (53.3–84.3)	61.1 (47.6–75.5)	75.7 (59.7–93.0)
Vaccine vials used	73.5 (65.7–81.4)	73.8 (66.1–81.6)	62.2 (55.9–68.8)	86.8 (77.7–96.2)
PEP courses initiated	27.8 (24.6–31.0)	45.2 (40.5–50.0)	38.2 (34.4–42.3)	52.8 (47.2–58.5)
PEP courses completed	19.8 (17.3–22.2)	35.1 (31.4–38.9)	28.2 (25.3–31.2)	43.4 (38.7–48.1)
Total cost (US\$)	1140 (1100–1260)	1110 (1070–1220)	935 (902–1030)	1300 (1250–1430)

Data are outcome in millions (95% PI), unless otherwise specified. Equivalent information on other scenarios (3 and 4a–c) is presented in the appendix. PI=prediction interval. PEP=post-exposure prophylaxis. DALYs=disability-adjusted life-years.

Table: Model results across all Gavi-67 countries projected over 2020–35 for the different scenarios

judged to be poor quality or inappropriate (eg, small numbers, biased sampling), we used cluster values.

Several parameters were considered biologically determined and were not expected to vary (appendix). We used reported estimates of the probability of infection following exposure (p_{infect}), of complete and timely post-exposure prophylaxis (p_{prevent1}), or incomplete or late post-exposure prophylaxis (p_{prevent2}) preventing infection.¹⁸ For Ethiopia, where less effective nerve tissue vaccines are used, we used published data to estimate the probability that complete (p_{prevent3}) or incomplete nerve tissue vaccine use (p_{prevent4}) prevents infection.¹⁹

To capture rabies exposures, we multiplied dog rabies incidence by a per-capita transmission probability and national dog population estimates (appendix). This calculation assumes only a fraction of rabid dogs bite people (on average 0.38 people are bitten per rabid dog;²⁰ appendix). Using incidence data from multiple countries of patients who have been bitten, we estimated the proportion of rabid versus healthy animals and baseline health-seeking probabilities following rabid and healthy dog bites ($p_{\text{seek|rabid}}$, $p_{\text{seek|healthy}}$; appendix).

Post-exposure prophylaxis delivery

We estimated post-exposure prophylaxis use for each scenario. Vials of rabies immunoglobulin and vaccines for intradermal use contain multiple doses but opened vials must be discarded at the end of the day. A modelling analysis informed our assumptions for projected vial sharing under different clinic throughputs.²¹ We assumed use of 1 mL vials with an average of 2.2 vials per complete 1-week intradermal post-exposure prophylaxis in rural settings, 0.67 vials per complete post-exposure prophylaxis in urban settings, and 1.47 vials per incomplete post-exposure prophylaxis in rural settings and 0.45 vials in urban settings (ie, <three visits; appendix).

Immunoglobulin use in virtually all Gavi-eligible countries is negligible (with some notable exceptions—eg, Sri Lanka, India, and Bhutan); therefore, it was not included in the status quo. In scenario 3, we assume administration of rabies immunoglobulin only in urban

clinics, and then only to high-risk patients—ie, with multiple or deep bites, bites to the head or hands, bites by confirmed rabid dogs, or to immunocompromised patients. Around 15% of patients fit these criteria from reviews of clinic data from different countries. We modelled 0.32 rabies immunoglobulin vials per patient on average (appendix).²¹

We used reported costs of post-exposure prophylaxis (appendix) to model the status quo and assumed that upon Gavi investment, rabies vaccine would be purchased for \$5 per vial and rabies immunoglobulin at \$45 per vial (similar to current prices of equine-derived immunoglobulin from the Pan American Health Organization revolving fund). We assumed fixed introductory costs of \$100 000 per country to facilitate training and implementation of improved post-exposure prophylaxis access.

Sensitivity analysis

We examined the effect of different parameters with one-way sensitivity analyses. For the principal model outputs, we ran a probabilistic sensitivity analysis taking 1000 draws from the parameter distributions (based on 95% CIs) to generate a 95% prediction interval (PI) and mean central estimate. We examined the sensitivity of results to uncertainty in parameters in the epidemiological model separately (appendix). Because the future price of post-exposure prophylaxis is unknown, we did not include it in the probabilistic sensitivity analysis, but we investigated vaccine costs of \$10 and \$2.5 per vial and rabies immunoglobulin costs of \$20 per vial. We increased the introductory costs to \$500 000 given the uncertain costs of scaling up post-exposure prophylaxis, since studies on vaccine introduction indicate that such grants might underestimate true costs.²²

Role of the funding source

The sponsor of the study (WHO) supported a meeting of the Rabies Modelling Consortium and WHO employees (BA-R and LK) contributed to study design, data collection, interpretation, and writing. The corresponding

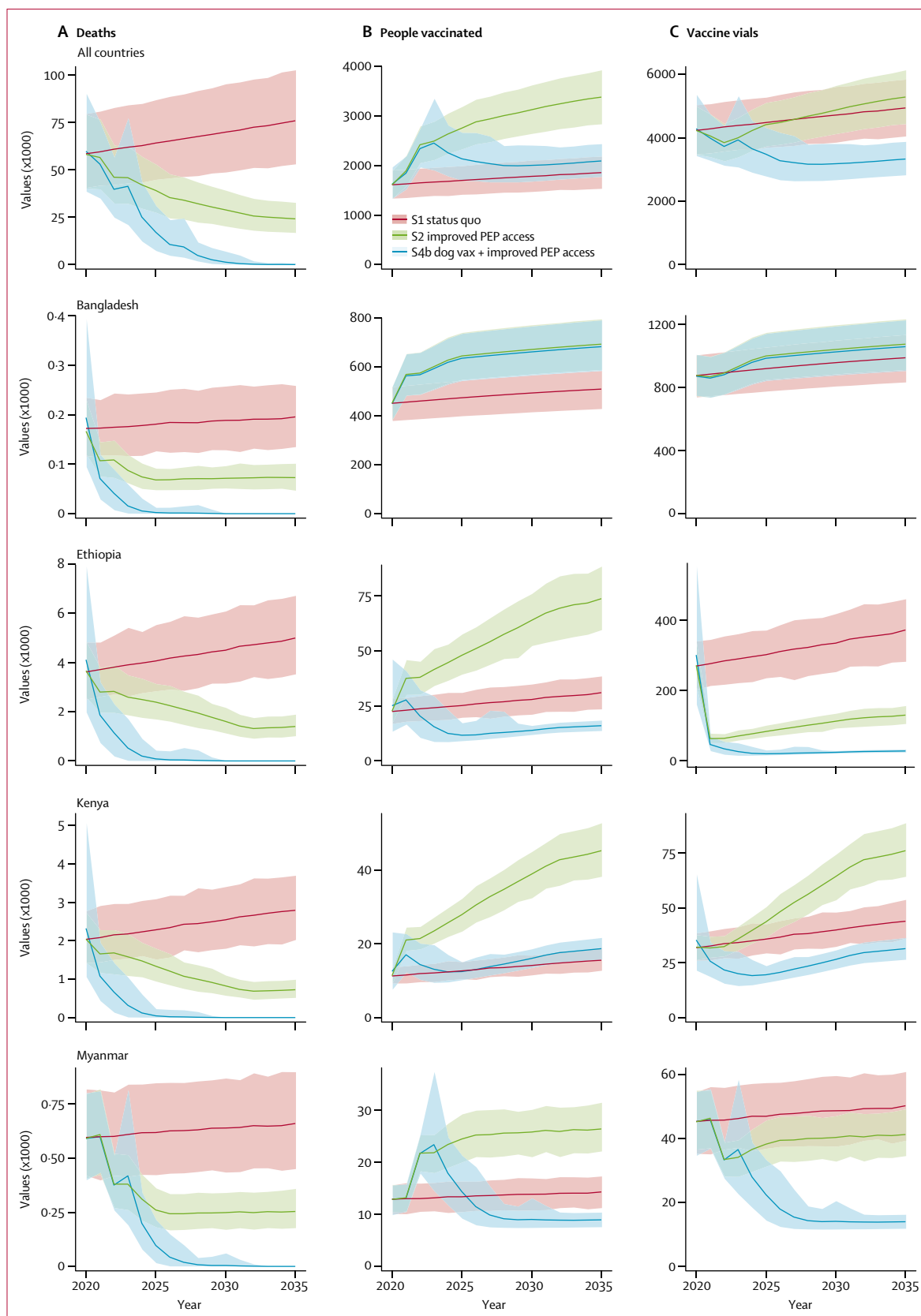


Figure 3: Projected outcomes under different scenarios over the 2020–35 time period

Estimated outcomes per year presented with 95% PIs. (A) Human deaths from rabies ($\times 1000$); (B) people initiating courses of PEP ($\times 1000$); (C) vials of vaccine ($\times 1000$) required for all 67 countries (top) and for selected countries (Bangladesh, Ethiopia, Kenya, and Myanmar) according to the status quo (scenario 1), under improved PEP access (scenario 2, base case), and with improved access to PEP vaccines concomitant with mass dog vaccination (scenario 4b). The step changes correspond to the timing of improvements in access to PEP and introduction of dog vaccination programmes. Bangladesh, Ethiopia, and Kenya are all phase 1 countries (implementation in 2020) in the Global Strategic Plan (appendix), whereas Myanmar is a phase 2 country (implementation in 2022). PEP=post-exposure prophylaxis. PI=prediction interval. S=scenario. Vax=vaccination.

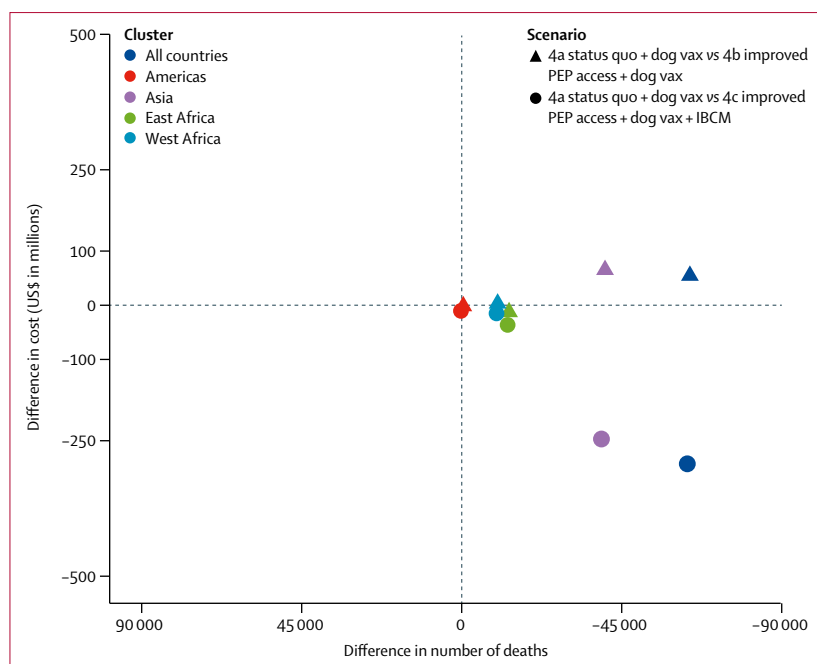


Figure 4: The cost-effectiveness plane showing the ICERs for dog vaccination scenarios. Under dog vaccination (scenarios 4a–c) improved PEP access (scenarios 4b and 4c) all have greater health benefits and similar or lower costs. The differences between clusters relate to the size of the populations at risk. ICER=incremental cost-effectiveness ratio. IBCM=integrated bite case management. PEP=post-exposure prophylaxis. Vax=vaccination.

authors had full access to all the data in the study and final responsibility for the decision to submit for publication.

Results

From 2020 to 2035, we estimate that under the status quo 1 074 000 dog-mediated rabies deaths (95% PI 852 000–1 325 000) in humans will occur in the 67 endemic countries considered (figure 2; 580 000 deaths in Gavi-46 countries)—around 67 000 deaths per year. Approximately 106 000 (10%) of 1 074 000 deaths (84 200–131 000) are children younger than 5 years. Most deaths are in sub-Saharan Africa (347 000 in the east Africa cluster and 231 000 in the west Africa cluster) and Asia (464 000), with much fewer in the Americas (33 000). Country-specific burden estimates are provided in the appendix. After standardising for population growth, our estimates of deaths are similar to previous estimates² in most countries (appendix). Current levels of post-exposure prophylaxis prevent approximately 56 000 deaths or 2 764 000 DALYs per year.

With improved post-exposure prophylaxis access (scenario 2; base case) projected annual deaths and DALYs more than halved from 2020 to 2035 (table), equating to a total of 1 388 000 deaths averted or 6 801 000 DALYs averted over this period. Bite victims initiating post-exposure prophylaxis from 2020 to 2035 increase from 27.8 million under the status quo to 45.2 million (figure 3) with improved post-exposure prophylaxis access. Switching to

the dose-sparing abridged 1-week intradermal regimen means that overall vaccine demand does not change very much (stays around 73 million vials at a [undiscounted] cost of about \$11.1 billion). Annual costs with improved access (scenario 2; base case) would be \$69.2 million in Gavi-67 or \$29.3 million in Gavi-46 countries (appendix). Under the status quo, costs of post-exposure prophylaxis are mainly borne by patients (48 of 67 countries). From 2020 to 2035, assuming Gavi investment displaces personal but not government expenditure (appendix), \$975.1 million (undiscounted costs) would be required to deliver improved access in all Gavi-67 countries and \$403.7 million to Gavi-46 countries.

Projected vaccine requirements vary (figure 3 shows overall vaccine use, with four country-specific examples). Under improved post-exposure prophylaxis access, for example in Bangladesh, where intradermal regimens are used, vaccine demand incrementally increases, whereas in Kenya, where intramuscular regimens are used, vaccine requirements decrease because the same vaccine volume treats many more patients with intradermal vaccination. In Ethiopia, where nerve tissue vaccines are used, even larger reductions in vial use are expected.

Post-exposure prophylaxis prevents rabies at an average cost of \$1021 per death averted and \$52 per DALYs averted under the status quo (figure 2). With improved access, cost-effectiveness improves to \$635 per death averted and \$33 per DALYs averted in Gavi-67 countries and \$605 per death averted and \$32 per DALYs averted in Gavi-46 countries. Cost-effectiveness (appendix) varied geographically, and was lowest in Asia (\$874 for deaths and \$44 for DALYs) and highest in the Americas (\$266 and \$13). Incremental to the status quo, investment to improve post-exposure prophylaxis access would be highly cost-effective, averting 494 700 additional deaths, while reducing expenditure by \$32.5 million (incremental cost-effectiveness ratio [ICER] -\$66 per death averted or -\$7 per DALYs averted).

Conversely, improving access to rabies immunoglobulin (scenario 3), in addition to vaccination is costly, requiring an additional \$76.2 million (95% PI \$73.0–85.0 million) between 2020 and 2035. Only marginal health gains are achieved, with about 100 additional deaths prevented and high uncertainty, resulting in a high ICER of almost \$666 000 per death averted.

Under scenario 4, we assumed scaled-up dog vaccination programmes reduces the incidence of rabies exposures and deaths (figures 2, 3) to 328 000 deaths and 15 892 000 DALYs from 2020 to 2035. Improved access to post-exposure prophylaxis reduces the number of deaths to 266 000 and 12 847 000 DALYs, requiring 55.4 million vaccine vials from 2020 to 2035 (appendix) and remains cost-effective, albeit at a higher cost per death averted (\$2307) and DALYs averted (\$47; figure 2). Incremental to dog vaccination, investment in post-exposure prophylaxis results in lower mean costs and greater mean benefits (figure 4). In the third part of scenario 4 (4c), IBCM

targets post-exposure prophylaxis to cases identified as bitten by suspect rabid dogs, rather than indiscriminately (panel), thereby controlling post-exposure prophylaxis demand as rabies incidence declines. IBCM should therefore be encouraged under all scenarios. Post-exposure prophylaxis requirements reduce to fewer than 21·3 million vials during 2020–35 and cost-effectiveness increases even as elimination is approached (figure 2; appendix).

Estimates of the rabies burden and cost-effectiveness of interventions are most affected by uncertainty in the incidence of rabid dog bites and the probability that exposure results in infection (appendix). Uncertainty in transmission affects rabies incidence and burden, whereas demographic uncertainty has a negligible effect. Improved dog vaccination coverage coordinated across regions more rapidly controls rabies, reducing the burden (appendix). Refined dog population estimates would change the magnitude of estimates of rabies burden and post-exposure prophylaxis use, but conclusions remain consistent across a plausible range of parameter values.

DALYs based on WHO frontier life expectancy in 2030 improved the overall cost per DALYs averted for scenario 2 from \$33 to \$30. Similar changes were observed for other scenarios.

Increasing vaccine vial costs from \$5 to \$10 increases the cost per death averted to \$853, but post-exposure prophylaxis remains highly cost-effective. The ICER of rabies immunoglobulin exceeded \$302 000 per death averted when vial costs were reduced from \$45 to \$20. Increasing the introductory grants to \$500 000 did not affect our conclusions.

Discussion

The burden of dog-mediated rabies is considerable; from 2020 to 2035 under the status quo, we estimate over 1 million deaths will occur in the 67 countries considered. Although post-exposure prophylaxis saves many lives, improved access, free of cost at point-of-care, and following the latest WHO recommendations for intradermal vaccination,⁴ would avert 1 388 000 deaths (ie, an additional 489 000 deaths) and 68 010 000 DALYs over this time period. This improvement in access is highly cost-effective at only \$635 per death averted and \$33 per DALYs averted and is feasible under current vaccine production with a switch to economical intradermal regimens through a Gavi investment. Interventions that avert one DALY for less than the national average annual per-capita income are considered highly cost-effective.²³

Improving access to rabies immunoglobulin (mostly unavailable in rabies-endemic countries), in addition to vaccines, was not cost-effective. Benefits of rabies immunoglobulin were shown when used with nerve tissue vaccines,²⁴ but this benefit is likely to be much less with the highly immunogenic purified cell culture and embryonated egg-based rabies vaccines recommended nowadays.⁴ Reported deaths among patients who initiate

post-exposure prophylaxis appear to be related to treatment delays and poor compliance,^{18,25} rather than a lack of rabies immunoglobulin availability.²⁶ Investments to improve timely vaccine access are therefore likely to save many more lives than investment in rabies immunoglobulin.

WHO and partners launched the global strategic plan to end human deaths from dog-mediated rabies (Zero by 30) to eliminate human deaths from dog-mediated rabies through both mass dog vaccination and improved access to post-exposure prophylaxis.⁵ Cost-effectiveness of post-exposure prophylaxis decreases as elimination of canine rabies approaches, because genuine exposures become increasingly rare, whereas precautionary post-exposure prophylaxis provision continues. Nonetheless, our models suggest that in this context, improved access to post-exposure prophylaxis remains cost-effective (with a cost per DALYs averted less than gross domestic product per capita), particularly if implemented in conjunction with IBCM.¹² Operational research on IBCM is warranted since it is a compelling strategy to curtail post-exposure prophylaxis demand while enhancing surveillance during the endgame.²⁷

A major challenge for this study was the paucity of data available. Studies carried out in several rabies-endemic countries through the Gavi learning agenda allowed us to divide post-exposure prophylaxis demand by people bitten by healthy versus rabid animals, accounting for higher health seeking in wealthier settings, and variability driven by the size of dog populations. Because few dog population estimates were available, the accuracy of our projections are constrained, and results are notably sensitive to changes in health-seeking parameters. However, sensitivity analyses indicated that our conclusions regarding cost-effectiveness were robust even under uncertainties.

We made several simplifying assumptions. We assumed no country-specific variation in vaccine wastage from discarding opened vials, only rural–urban variation (appendix). Vaccine used per post-exposure prophylaxis course plateaus at throughputs exceeding 30 new patients per month;²¹ therefore, cost-effectiveness is unlikely to be greatly underestimated in the most populated settings, nor substantially overestimated in rural populations, because we do not account for patient clustering from bites by the same animal. Our assumptions regarding improved post-exposure prophylaxis access are supported by increased health seeking, access, and compliance observed with the introduction of free post-exposure prophylaxis in several countries (appendix).¹⁸ We also assumed incremental improvements in health seeking by victims of rabid bites over time, consistent with Gavi projections (and as used in models of other vaccine programmes)²⁸ and data from countries that have invested in post-exposure prophylaxis access and free provision (Bhutan, Philippines, Sri Lanka). We did not model sustained increases in health seeking by people bitten by healthy dogs (potentially expected with

heightened awareness associated with dog vaccination), thereby favouring the cost-effectiveness of improved post-exposure prophylaxis access. However, IBCM could reduce unnecessary post-exposure prophylaxis use and improve cost-effectiveness under all scenarios (we only modelled IBCM under dog vaccination, scenario 4c).^{12,13,20,29} The effect and cost-effectiveness of post-exposure prophylaxis depends on current national strategies for provision (figure 3). We modelled these factors according to data gathered by WHO on post-exposure prophylaxis provision with timing aligned with the Global Strategic Plan. Although post-exposure prophylaxis access might be affected by spatial factors (eg, travel to clinics), we did not explicitly model this scenario, and instead assumed average improvements to access and provision (panel).

We applied our simulated trajectories of rabies incidence under dog vaccination irrespective of country, assuming 1% rabies incidence in unvaccinated dog populations. Dog vaccination has repeatedly been shown to rapidly reduce incidence,^{30,31} although rabies often persists at low levels with incursions and localised wildlife reservoirs (not modelled here) hindering elimination.³² Moreover, socioeconomic factors influence progress by affecting the delivery of mass dog vaccination programmes.³³ We assume coordinated implementation minimises incursions, thereby generating optimistic timelines for elimination. However, estimates of post-exposure prophylaxis requirements should not be greatly affected by this assumption given the considerable use of post-exposure prophylaxis for people bitten by non-rabid animals.²⁰ While we considered the cost-effectiveness of post-exposure prophylaxis in the context of dog vaccination, we did not model dog vaccination costs; previous studies have shown dog vaccination to be very cost-effective.^{29,34}

In 2013, Gavi considered that rabies post-exposure vaccines could avert almost 200 000 future deaths between 2015 and 2030.⁷ We believe this outcome was an underestimate and our results suggest 489 000 additional deaths could be averted from an investment in improved post-exposure prophylaxis access. We have taken a more detailed approach using a decision tree informed by recent and relevant data, and we assume improvements in access, health seeking, and compliance.

Key barriers to rabies prevention are the limited supply and high costs of post-exposure prophylaxis, which are largely borne by patients. A Gavi investment in post-exposure prophylaxis should displace personal, but not government expenditure. Free post-exposure prophylaxis provision, with cofinancing between Gavi and national governments, would support the drive for universal health coverage to achieve the Sustainable Development Goals,³⁵ and the consensus that rabies prevention should be a free public commodity.⁵ Gavi support would promote use of WHO prequalified vaccines and the 1-week intradermal regimen, standardise vaccine prices, and improve forecasting, procurement, and accountability. Stockouts, which are chronic in many rabies-endemic countries,

could be prevented. Although post-exposure prophylaxis is outside the Expanded Programme on Immunization, efforts to strengthen this programme (particularly cold chain) greatly benefit post-exposure prophylaxis delivery. Thus, the potential of Gavi to shape the market, ensuring the availability or supply of WHO prequalified vaccines at affordable prices could be transformative for rabies prevention and would require a modest investment in the context of an annual budget in excess of \$1 billion for vaccine programme disbursements.³⁶

An investment in rabies vaccine in Gavi-eligible countries is likely to save many lives at a very low cost per death averted. Improving access to post-exposure prophylaxis alongside a switch to the newly recommended intradermal 1-week regimen is feasible because vaccine vial requirements do not increase. Moreover, shifting costs from bite victims to donors and governments overcomes the primary barrier limiting access to life-saving vaccines and enables more efficient dose-sparing practices. To reduce an indefinite and escalating requirement for post-exposure prophylaxis, mass dog vaccination is essential to control and eliminate rabies in the reservoir population.

Contributors

GTE, MRa, CJEM, LB, SFA, SMT, AM, GW, MM, ATr, AO, RMo, BB, KH, JC, ZM, AL, KL, AG, JZ, JH, MLa, MLe, RW, JB, NS, GBC, OY, ATa, SL, TT, NTTH, IT, SJ, MKS, DHAN, and LK collected and contributed to data. CT, KH, FV, RS, MRi, and LK reviewed the literature. CT, KH, BA-R, and LK designed the study. KH, FV, RS, RMa, LC, and CT developed and implemented the model. NC checked the models. KH and CT wrote the first draft of the manuscript. All authors critically reviewed the manuscript and interpretation of results. Contributors are listed in the appendix.

Declaration of interests

CT reports consulting payments from GlaxoSmithKline in 2013 and an honorarium from Sanofi-Pasteur in 2015. IT and SJ are employed by the Global Alliance for Rabies Control (GARC), an international non-profit organisation aiming to end rabies in every country. DB is the founder and former executive director of GARC. JK is employed by Merck Sharpe and Dohme Animal Health, a manufacturer of dog rabies vaccines. ATa declares that the Institut Pasteur in Cambodia received non-nominative grants from Sanofi to develop rabies prevention materials for dog bite patients and World Rabies Day information campaigns for the general public. JZ, NC, MLa, JH, and MLe were partly supported by WHO, Gavi, the Vaccine Alliance, and the Swiss National Science Foundation for this work. LB was employed by GlaxoSmithKline Vaccines until May, 2016. All other authors declare no competing interests. The authors alone are responsible for the views expressed in this Article, which do not necessarily represent the views, decisions, or policies of the institutions with which the authors are affiliated.

Acknowledgments

This work is supported by a grant from WHO to the Universities of Glasgow and Cambridge. KH and RMa were supported by the Wellcome Trust (207569/Z/17/Z), with additional funding for RMa from Stuart H Leckie. The Wellcome Trust through Afrique One ASPIRE also supported MLe and several unpublished studies and the UBS Optimus Foundation supported IT and SJ. The Gavi learning agenda on rabies supported many of the unpublished studies that contributed data. The Swiss National Science Foundation supported MLa. The Institut Pasteur financed studies in Cambodia.

References

- 1 Knobel DL, Cleaveland S, Coleman PG, et al. Re-evaluating the burden of rabies in Africa and Asia. *Bull World Health Organ* 2005; 83: 360–68.

- 2 Hampson K, Coudeville L, Lembo T, et al. Estimating the global burden of endemic canine rabies. *PLoS Negl Trop Dis* 2015; **9**: e0003786.
- 3 WHO. Zero by 30: the global strategic plan to end human deaths from dog-mediated rabies by 2030. <http://www.who.int/rabies/resources/9789241513838/en/> (accessed Nov 9, 2018).
- 4 WHO. Rabies vaccines: WHO position paper. *Wkly Epidemiol Rec* 2018; **16**: 201–20.
- 5 WHO, Food and Agriculture Organization, World Organization for Animal Health, Global Alliance for Rabies Control. Zero by 30: the global strategic plan to end human deaths from dog-mediated rabies by 2030. http://www.who.int/rabies/United_against_Rabies/en/ (accessed Oct 29, 2018).
- 6 WHO Strategic Advisory Group of Experts Working Group on rabies vaccines and rabies immunoglobulins (July 2016 to April 2018). Immunizations, vaccines and biologicals. http://www.who.int/immunization/policy/sage/sage_wg_rabies_jul2016/en/ (accessed Oct 30, 2018).
- 7 Gavi—The Vaccine Alliance. Rabies vaccine investment strategy. <http://www.gavi.org/about/strategy/vaccine-investment-strategy/> (accessed Oct 30, 2018).
- 8 Taylor L, Abela-Ridder B, Fahrion A, Hampson K, Nel LH. Difficulties in estimating the human burden of canine rabies. *Acta Trop* 2017; **165**: 133–40.
- 9 Stevens GA, Alkema L, Black RE, et al. Guidelines for accurate and transparent health estimates reporting: the GATHER statement. *PLoS Med* 2016; **13**: e1002056.
- 10 Husereau D, Drummond M, Petrou S, et al. Consolidated Health Economic Evaluation Reporting Standards (CHEERS) statement. *Int J Technol Assess Health Care* 2013; **29**: 117–22.
- 11 Lembo T, Hampson K, Kaare MT, et al. The feasibility of canine rabies elimination in Africa: dispelling doubts with data. *Plos Neglected Tropical Diseases* 2010; **4**: e626.
- 12 Undurraga EA, Meltzer MI, Tran CH, et al. Cost-effectiveness evaluation of a novel integrated bite case management program for the control of human rabies, Haiti 2014–2015. *Am J Trop Med Hyg* 2017; **96**: 1307–17.
- 13 Etheart MD, Kligerman M, Augustin PD, et al. Effect of counselling on health-care-seeking behaviours and rabies vaccination adherence after dog bites in Haiti, 2014–15: a retrospective follow-up survey. *Lancet Glob Health* 2017; **5**: e1017–25.
- 14 UN World Population Prospects. 2017 <https://esa.un.org/unpd/wpp/Download/Standard/Population/> (accessed Oct 30, 2018).
- 15 World Bank Development Indicators. <http://wdi.worldbank.org/table/3.12> (accessed Oct 30, 2018).
- 16 Department of Information, Evidence and Research. WHO methods and data sources for global burden of disease estimates 2000–2015. Geneva: World Health Organization, 2017.
- 17 WHO. Health economics. Health delivery costs. http://www.who.int/choice/cost-effectiveness/inputs/health_service/en/ (accessed Oct 30, 2018).
- 18 Chantalucha J, Grieve E, Lushasi K, et al. The need to improve access to rabies post-exposure vaccines: lessons from Tanzania. *Vaccine* 2018; published online Oct 8. DOI:10.1016/j.vaccine.2018.08.086.
- 19 Beyene TJ, Mourits MCM, Kidane AH, Hogeveen H. Estimating the burden of rabies in Ethiopia by tracing dog bite victims. *PLoS One* 2018; **13**: e0192313.
- 20 Hampson K, Abela-Ridder B, Bruncker K, et al. Surveillance to establish elimination of transmission and freedom from dog-mediated rabies. *BioRxiv* 2016; published online Dec 31. DOI:<https://doi.org/10.1101/096883>.
- 21 Hampson K, Abela-Ridder B, Bharti OK, et al. Modelling to inform prophylaxis regimens to prevent human rabies. *Vaccine* (in press).
- 22 Griffiths UK, Korczak VS, Ayalew D, Yigzaw A. Incremental system costs of introducing combined DTwP-hepatitis B-Hib vaccine into national immunization services in Ethiopia. *Vaccine* 2009; **27**: 1426–32.
- 23 Hutubessy R, Chisholm D, Edejer TT. Generalized cost-effectiveness analysis for national-level priority-setting in the health sector. *Cost Eff Resour Alloc* 2003; **1**: 8.
- 24 Baltazard M, Ghodssi M. Prevention of human rabies; treatment of persons bitten by rabid wolves in Iran. *Bull World Health Organ* 1954; **10**: 797–803.
- 25 Tarantola A, Ly S, Chan M, et al. Intradermal rabies post-exposure prophylaxis can be abridged with no measurable impact on clinical outcome in Cambodia, 2003–2014. *Vaccine* (in press).
- 26 Wilde H. Failures of post-exposure rabies prophylaxis. *Vaccine* 2007; **25**: 7605–09.
- 27 WHO. WHO expert consultation on rabies, third report. *World Health Organ Tech Rep Ser* 2018; **1021**: 1–195.
- 28 Jit M, Brisson M, Portnoy A, Hutubessy R. Cost-effectiveness of female human papillomavirus vaccination in 179 countries: a PRIME modelling study. *Lancet Glob Health* 2014; **2**: e406–14.
- 29 Mindekem R, Lechenne MS, Naissengar KS, et al. Cost description and comparative cost efficiency of post-exposure prophylaxis and canine mass vaccination against rabies in N'Djamena, Chad. *Front Vet Sci* 2017; **4**: 38.
- 30 Cleaveland S, Kaare M, Tiringa P, Mlengeya T, Barrat J. A dog rabies vaccination campaign in rural Africa: impact on the incidence of dog rabies and human dog-bite injuries. *Vaccine* 2003; **21**: 1965–73.
- 31 Townsend SE, Sumantra IP, Pudjiatmoko, et al. Designing programs for eliminating canine rabies from islands: Bali, Indonesia as a case study. *PLoS Negl Trop Dis* 2013; **7**: e2372.
- 32 Zinsstag J, Lechenne M, Laager M, et al. Vaccination of dogs in an African city interrupts rabies transmission and reduces human exposure. *Sci Transl Med* 2017; **9**: eaaf6984.
- 33 Del Rio Vilas VJ, Freire de Carvalho MJ, Vigilato MAN, et al. Tribulations of the last mile: sides from a regional program. *Front Vet Sci* 2017; **4**: 4.
- 34 Fitzpatrick MC, Hampson K, Cleaveland S, et al. Cost-effectiveness of canine vaccination to prevent human rabies in rural Tanzania. *Ann Intern Med* 2014; **160**: 91–100.
- 35 Halliday JEB, Hampson K, Hanley N, et al. Driving improvements in emerging disease surveillance through locally-relevant capacity strengthening. *Science* 2017; **357**: 146–48.
- 36 Gavi, the Vaccine Alliance. Financial reports. <http://www.gavi.org/funding/financial-reports/> (accessed Oct 30, 2018).

7.3. PARTICIPAÇÃO EM PROJETO: Rabies mass dog vaccination and evaluation, Haiti, 2017

Introdução: A raiva é uma doença negligenciada que causa mortes em humanos em mais de 150 países em todo o mundo, sendo propagada principalmente através da mordida de um cão raivoso (HAMPSON et al., 2015). Estima-se que ocorram cerca de 59.000 mortes por raiva a cada ano, sendo que os indivíduos mais pobres e as crianças representam os grupos de maior risco (OMS, 2017). Apesar da notoriedade da raiva como a doença infecciosa mais mortal do mundo, a falta de vigilância e as campanhas de vacinação de cães mal implementadas impedem esforços de controle a nível global (TAYLOR et al., 2015). Recentemente, tem sido relatado o sucesso de programas de vacinação contra a raiva na Guatemala, Haiti, Índia e Malawi, com a assistência do Centro para Controle e Prevenção de Doenças (CDC), Mission Rabies e Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) (VIGILATO et al., 2013; GIBSON et al., 2015; 2016; WALLACE et al., 2017A). No entanto, o sucesso das campanhas de vacinação envolvem treinamento importante de pessoal e incorporação de tecnologia, e restrições logísticas que não podem ser facilmente replicadas em todos os 122 países endêmicos de raiva canina.

O Haiti possui os índices mais conhecidos e estimados de casos de óbito por raiva humana no hemisfério ocidental (HAMPSON et al., 2015), com uma taxa de mortalidade que compete com a de alguns dos países mais afetados do mundo, como Tanzânia, Quênia, Chade. De 2013 a 2015, o CDC, o Ministério da Agricultura do Haiti (MARNDR), Ministério da Saúde e parceiros não-governamentais desenvolveram um sistema integrado de gerenciamento de casos de mordida que confirmou a alta taxa de raiva em cães haitianos (ETHEART et al., 2017). Este programa foi creditado com a redução do risco de morte por raiva no Haiti em até 32%, através de aconselhamento pós-mordida e remoção de cães suspeitos de raiva por eutanásia ou quarentena. No entanto, a cessação das mortes na raiva humana no Haiti não será realizada até que a doença seja eliminada na população reservatório (ETHEART et al., 2017). O MARNDR realizou uma vacinação em massa de 100.000 a 300.000 cães por ano, sob o pressuposto de que a população de cães no Haiti seria em torno de 500.000 cães. Apesar desse tremendo esforço, os casos de raiva humana e canina persistiram. Em 2015, o CDC avaliou o programa de vacinação em massa do MARNDR em 18 locais ao redor do país. Os resultados indicaram que a população de cães é de aproximadamente 1,1 milhão e a cobertura vacinal variou de 35% a 50% (menos que o objetivo estabelecido pela OPAS, que é de 80%).

Ao expandir suas campanhas anuais, o Haiti lutou para melhorar a cobertura de vacinação acima de 45%, e o CDC, a Missão Veterinária Cristã, o MARNDR, Mission Rabies e a OPAS estão colaborando para desenvolver novos métodos para melhorar a cobertura de vacinação (WALLACE et al., 2017). Gerar consciência pública suficiente das campanhas de vacinação em países subdesenvolvidos pode ser difícil, pois o acesso à TV, rádio e mídia impressa não está rotineiramente disponível. Isso também é verdade no

Haiti, onde o principal método de conscientização das campanhas de vacinação envolve anúncios de megafones vários dias antes da campanha, bem como anúncios de megafone de mão por vacinadores no dia da vacinação.

Em 2016, o CDC e parceiros não-governamentais capacitaram 55 vacinadores em métodos alternativos de vacinação: 1) captura-vacinação-liberação e 2) vacinação porta à porta, e realizaram uma campanha de vacinação de 10.000 cães para avaliar a capacidade de condução desses métodos. Os resultados foram encorajadores, com cobertura vacinal média de 65%–80%. Além disso, os dados coletados durante essa avaliação foram usados para desenvolver uma ferramenta de planejamento de programas baseada em Excel que está sendo avaliada em 5 países (UNDURRAGA et al., 2017). Os 3 anos anteriores de avaliação e treinamento prepararam o Haiti para a implementação de campanhas de vacinação em massa eficazes contra a raiva canina. Agora, com uma população de cães confiável (disponível a nível comunitário), foi provado que a cobertura vacinal de >70% é realizável, além da capacidade dos vacinadores do MARNDR, o que permite o planejamento de campanhas econômicas. O CDC realizou uma avaliação de viabilidade global para a eliminação da raiva canina (WALLACE et al., 2017B). Nessa análise, assumindo o progresso contínuo, estima-se que o Haiti consiga a eliminação da raiva canina em menos de 7 anos.

Objetivo: O objetivo da proposta foi conduzir e avaliar uma campanha de vacinação em massa contra a raiva canina no Haiti.

Objetivos específicos:

- 1) Conduzir e avaliar a campanha de vacinação contra a raiva em cães no Haiti;
- 2) Avaliar e comparar a relação custo-benefício das ferramentas baseadas em telefone celular para promoção e logística de campanha;
- 3) Determinar barreiras potenciais à vacinação contra a raiva canina no Haiti.

O projeto foi realizado em duas áreas urbanas no Departamento de Artibonite do Haiti, que são as cidades de Saint Marc e Gonaives (Figura 15). O estudo consistiu em quatro etapas, detalhadas abaixo:

- 1) Campanha de vacinação em massa canina;
- 2) Avaliação de mensagens de telefone celular para aumentar o atendimento em pontos fixos de vacinação contra raivas;
- 3) Avaliação da capacidade de um aplicativo de telefone inteligente para aumentar a cobertura vacinal, eficiência logística e custo-benefício da campanha de vacinação em massa canina;
- 4) Pesquisa transversal de barreiras à vacinação contra a raiva canina.

População canina estudada:

- 1) Qualquer cão de rua de fácil de captura;
- 2) Qualquer cão trazido aos vacinadores por seu dono;

População humana estudada:

Critérios de inclusão:

- 1) Indivíduos acima de 18 anos de idade;
- 2) Indivíduos membros de uma família selecionada, definido como membro do grupo familiar;
- 3) Indivíduos capazes e dispostos a fornecer o consentimento livre e esclarecido.

Critérios de exclusão:

- 1) Indivíduos menores de 18 anos de idade;
- 2) Indivíduos que não fazem parte do grupo familiar selecionado;
- 3) Indivíduos incapazes ou não dispostos a fornecer consentimento livre e esclarecido.

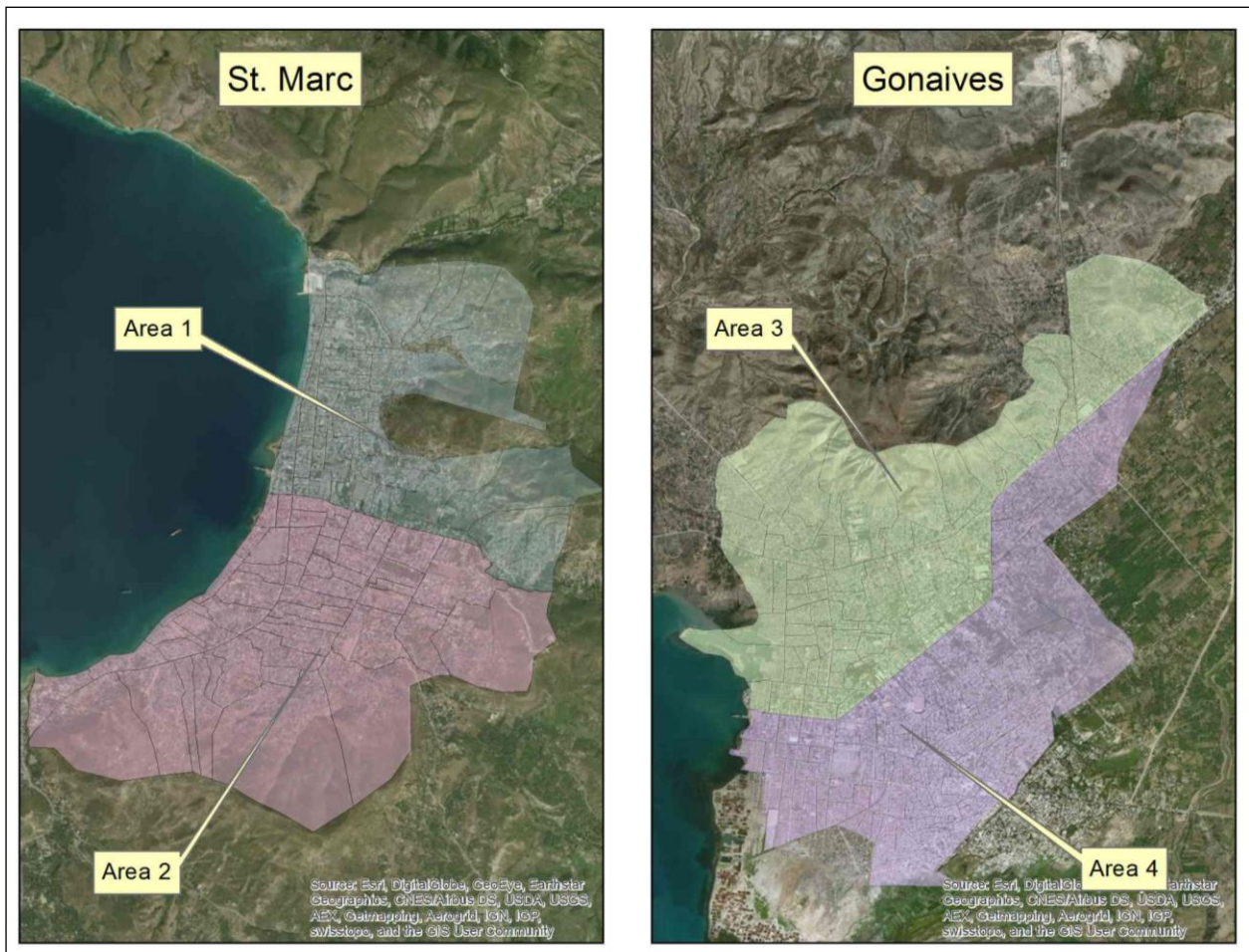


FIGURA 15. MAPA DETALHANDO OS LOCAIS DE ESTUDO, SAINT MARC E GONAIVES. As duas cidades foram divididas pela metade para criar 4 áreas de intervenção geográfica. Em uma área de cada cidade, as equipes de vacinação utilizaram um aplicativo de celular desenvolvido pela Mission Rabies (GIBSON et al., 2015) para registrar informações sobre vacinação diária. O aplicativo também tentou otimizar a cobertura vacinal guiando as equipes para áreas-chave por dia para alcançar a cobertura requerida.

VII. REFERÊNCIAS

ABRAHÃO, J. S.; DRUMOND, B. P.; TRINDADE, G. S.; SILVA-FERNANDES, A. T.; FERREIRA, J. M. S.; ALVES, P. A.; *et al.* Rapid Detection of *Orthopoxvirus* by Semi-Nested PCR Directly From Clinical Specimens: A Useful Alternative for Routine Laboratories. **Journal of Medical Virology**, v.82, p.692-9, 2010C.

ABRAHÃO, J. S.; GUEDES, M. I. M.; TRINDADE, G. S.; FONSECA, F. G.; CAMPOS, R. K.; MOTA, B. F., *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, e7428, 2009A.

ABRAHÃO, J. S.; LIMA, L. S.; ASSIS, F. L.; ALVES, P. A.; SILVA-FERNANDES, A. T.; COTA, M. M. G.; *et al.* Nested-multiplex PCR detection of *Orthopoxvirus* and *Parapoxvirus* directly from exanthematic clinical samples. **Virology Journal**, v.6, n.140, 2009B.

ABRAHÃO, J. S.; OLIVEIRA, T. M. L.; CAMPOS, R. K.; MADUREIRA, M. C.; KROON, E. G.; LOBATO, Z. I. P. Bovine Vaccinia Outbreaks: Detection and Isolation of Vaccinia Virus in Milk Samples. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 13, n.7, p.1141-46, 2009C.

ABRAHÃO, J. S.; SILVA-FERNANDES, A. T.; LIMA, L. S.; CAMPOS, R. K.; GUEDES, M. I. M. C.; COTA, M. M. G.; *et al.* Vaccinia Virus Infection in Monkeys, Brazilian Amazon. **Emerging Infectious Diseases**, v.16, n.6, p.976-79, 2010B.

ABRAHÃO, J. S.; TRINDADE G. S.; FERREIRA, J. M. S.; CAMPOS, R. K.; BONJARDIM, C. A.; FERREIRA, P. C. P.; *et al.* Long-lasting stability of *Vaccinia virus* strains in murine feces: implications for virus circulation and environmental maintenance. **Archives of Virology**, v.154, p.1551-53, 2009D.

ABRAHÃO, J. S.; DE SOUZA TRINDADE, G.; PEREIRA-OLIVEIRA, G.; FIGUEIREDO, P. O.; COSTA, G.; MOREIRA FRANCO-LUIZ, A. P.; *et al.* Detection of Vaccinia virus during an outbreak of exanthemous oral lesions in Brazilian equids. **Equine Veterinary Journal**, v.49, n.2, p.221-4, 2016.

ALEXANDER, K. A.; SANDERSON, C. E.; MARATHE, M.; LEWIS, B. L.; RIVERS, C. M.; SHAMAN, J.; *et al.* What Factors Might Have Lead to the Emergence of Ebola in West Africa? **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.9, n.6, p.e0003652, 2013.

ALJOFAN, M. Hendra e Nipah infection: emerging paramyxoviruses. **Virus Research**, v.177, p.119-126, 2013.

AMANNA, I. J.; SLIFKA, M. K.; CROTTY, S. Immunity and immunological memory following smallpox vaccination. **Immunological Reviews**, v. 211, p.320-337, 2006.

ASSIS, F. L.; FRANCO-LUIZ, A.P.; PAIM, L. M.; OLIVEIRA, G. P.; PEREIRA, A. F.; DE ALMEIDA, G. M.; *et al.* Horizontal study of vaccinia virus infections in an endemic area: epidemiologic, phylogenetic and economic aspects. **Archives of Virology**, v.160, n.11, p.2703-2708, 2015.

ASSIS, F. L.; PEREIRA, G.; OLIVEIRA, C.; RODRIGUÊS, G. O. L.; COTTA, M. M. G.; SILVA-FERNANDES, A. T.; *et al.* Serologic Evidence of *Orthopoxvirus* Infection in Buffaloes, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.18, n.4, p.698-9, 2012A.

ASSIS, F. L.; VINHOTE, W. M.; BARBOSA, J. D.; OLIVEIRA, C. H. S.; OLIVEIRA, C. M. G.; CAMPOS, K. F.; *et al.* Reemergence of Vaccinia Virus during Zoonotic Outbreak, Pará State, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.19, n.12, p. 2017-2020, 2013A.

BARBOSA, A. V.; MEDAGLIA, M. L.; SOARES, H. S.; QUIXABEIRA-SANTOS, J. C.; GENNARI, S. M.; DAMASO, C. R. Presence of neutralizing antibodies to Orthopoxvirus in capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) in Brazil. **Journal of Infection in Developing Countries**, v.8, n.12, p.1646-1649, 2014.

BAKER, K. S.; LEGGETT, R. M.; BEXFIELD, N. H.; ALSTON, M.; DALY, G.; TODDY, S.; *et al.* Metagenomic study of the viruses of African straw-coloured fruit bats: detection of a chiropteran poxvirus and isolation of a novel adenovirus. **Virology**, v.441, n.2, p.95-106, 2013.

BAXBY, D.; HILL, B. J.; Characteristics of a new poxvirus isolated from Indian buffaloes. **Archiv fur dien Gesamte Virusforsch**, v.35, n.1, p.70-9, 1971.

BENNETT, M.; GASKELL, C. J.; BAXBY, D.; GASKELL, R. M.; KELLY, D. F.; NAIDOO, J. Feline cowpox virus infection. **Journal of Small Animal Practice**, v.31, p.167-173, 1990.

BENNETT, M.; GASKELL, R. M.; GASKELL, C. J.; BAXBY, D.; KELLY, D. F. Studies on poxvirus infection in cats. **Archives of Virology**, v.104, p.19-33, 1989.

BI, Z.; FORMENTY, P. B.; ROTH, C. E. Hantavirus infection: a review and global update. **Journal of Infection in Developing Countries**, v.2, n.1, p.3-23, 2008.

BRUM, M. C. S.; dos ANJOS, B. L.; NOGUEIRA, C. E. W.; AMARAL, L. A.; WEIBLEN, R.; FLORES, E. F. An outbreak of orthopoxvirus-associated disease in horses in southern Brazil. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.22, p.143-47, 2010.

CAMPOS R. K.; BRUM, M. C. S.; NOGUEIRA, C. E. W.; DRUMOND, B. P.; ALVES, P. A.; SIQUEIRA-LIMA, L.; *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, 2011.

CARDETI, G.; GRUBER, C. E. M.; ELENI, C.; CARLETTI, F.; CASTILLETI, C.; MANNA, G.; *et al.* Fatal Outbreak in Tonkean Macaques Caused by Possibly Novel Orthopoxvirus, Italy, January 2015. **Emerging Infectious Diseases**, v.23, n.12, p.1941-9, 2017.

CARLETTI, F.; BORDI, L.; CASTILLETI, C.; DI CARO, A.; FALASCA, L.; GIOIA, C.; *et al.* Cat-to-Human Orthopoxvirus Transmission, Northeastern Italy. **Emerging Infectious Diseases**, v.15, n.3, p.499-500, 2009.

CASCIO, A.; BOSILKOVSKI, M.; RODRIGUEZ-MORALES, A. J.; PAPPAS, G. The socio-ecology of zoonotic infections. **Clinical Microbiology and Infection**, v.17, n.3, p.336-42, 2011.

CHANDRA, R.; SINGH, I. P.; GARG, S. K.; VARSHNEY, K. C. Experimental pathogenesis of buffalo pox virus in rabbits: clinico-pathological studies. **Acta Virologica**, v.30, n.5, p.390-6, 1986.

CHANTREY, J.; MEYER, H.; BAXBY, D.; BEGON, M.; BOWN, K. J.; HAZEL, S. M.; *et al.* Cowpox: reservoir hosts and geographic range. **Epidemiology and Infection**, v.122, p.455-60, 1999.

COFFEY, L. L.; FORRESTER, N.; TSETSKARKIN, K.; VASILAKIS, N.; WEAVER, S. C. Factors shaping the adaptative landscape for arboviruses: implications for the emergence of disease. **Future Microbiology**, v.8, n.2, p.155-176, 2013.

CORAS, B.; ESSBAUER, S.; PFEFFER, M.; MEYER, H.; SCHRODER, J.; STOLZ, W.; *et al.* Cowpox and a cat. **The Lancet**, v.365, n.9457, p.446, 2005.

COSTA, G. B.; AUGUSTO, L. T. S.; LEITE, J. A.; FERREIRA, P. C. P.; BONJARDIM, C. A.; ABRAHÃO, J. S.; *et al.* Seroprevalence of Orthopoxvirus in rural Brazil: insights into anti-OPV immunity status and its implications for emergent zoonotic OPV. **Virology Journal**, 13:121, 2016.

COSTA, G. B.; MIRANDA, J. B.; ALMEIDA, G. G.; SILVA DE OLIVEIRA, J.; PINHEIRO, M. S.; GONÇALVES, S. A.; et al. Detection of Vaccinia virus in urban domestic cats, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.23, n.2, p.360-2, 2017.

DA FONSECA, F. G.; TRINDADE, G. S.; SILVA, R. L.; BONJARDIM, C. A.; FERREIRA, P. C. P.; KROON, E. G. Characterization of a vaccinia-like virus isolated in a Brazilian forest. **Journal of General Virology**, v.83, n.1, p.223-8, 2002.

DAMASO C. R. A.; ESPOSITO J. J.; CONDIT, R. C.; MOUSSATCHÉ, N. 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, 2000.

DAMASO, C. R. Revisiting Jenner's mysteries, the role of the Beaugency lymph in the evolutionary path of ancient smallpox vaccines. **The Lancet Infectious Diseases**, 2017.

DAMLE A. S.; GAIKWAD, A. A.; PATWARDHANN. S.; DUTHADE, M. M.; SHEIKH, N. S.; DESHMUKH, D. G. Outbreak of human buffalopox infection. **Journal of Global Infectious Diseases**, v.3, n.2, p.187-8, 2011.

DAMON, I. K. Poxviruses. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. *et al.* (Eds). **Fields Virology**, 6.ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, chapter 67, p.2160-2184, 2013.

DASZAK, P.; TABOR, G. M.; KILPATRICK, A. M.; EPSTEIN, J.; PLOWRIGHT, R. Conservation medicine and a new agenda for emerging diseases. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1026, p.1-11, 2004.

DE OLIVEIRA, S. V.; ESCOBAR, L. E.; PETERSON, A. T.; GURGEL-GONÇALVES, R. Potential geographic distribution of hantavirus reservoirs in Brazil. **PLoS One**, v.8, n.12, p.e85137, 2013.

DE OLIVEIRA, R. C.; GUTERRES, A.; FERNANDES, J.; D'ANDREA, P. S.; BONVICINO, C. R.; DE LEMOS, E. R. Hantavirus reservoirs: current status with an emphasis on data from Brazil. **Viruses**, v.6, n.5, p.1929-73, 2014.

DINIZ, S.; TRINDADE, G. S.; FONSECA, F. G.; KROON, E. G. An outbreak of mousepox in swiss mice in a laboratory animal facility – Case report. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.53, n.2, 2001.

- DOMINGO, E. Mechanisms of viral emergence. **Veterinary Research**, v.41, n.38, p.1-14, 2010.
- DONATELE, D. M.; TRAVASSOS, C. E. P. F.; LEITE, J. A.; KROON, E. G. Epidemiologia da poxvirose bovina no Estado do Espírito Santo, Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.44, n.4, p.275-282, 2007.
- DOTY, J. B.; MALEKANI, J. M.; KALEMBA, L. N.; STANLEY, W. T.; MONROE, B. P.; NAKAZAWA, Y. U.; et al. Assessing Monkeypox Virus Prevalence in Small Mammals at the Human-Animal Interface in the Democratic Republic of the Congo. **Viruses**, v.9, n.10, p.E283, 2017.
- DRUMOND, B. P.; LEITE, J. A.; FONSECA, F. G.; BONJARDIM, C. A.; FERREIRA, P. C. P.; KROON, E. G. Brazilian Vaccinia virus strains are genetically divergent and differ from the Lister vaccine strain. **Microbes and Infection**, v.10, p.185-97, 2008.
- DUCOURNAU, C.; FERRIER-REMBERT, A.; FERRARIS, O.; JOFFRE, A.; FAVIER, A. L.; FLUSIN, O.; et al. Concomitant Human Infections with 2 Cowpox Virus Strains in Related Cases, France, 2011. **Emerging Infectious Diseases**, v.19, n.12, p.1996-9, 2013.
- DUTRA, L. A.; DE FREITAS ALMEIDA G. M.; OLIVEIRA, G. P.; ABRAHÃO, J. S.; KROON, E. G.; TRINDADE, G. S. Molecular evidence of Orthopoxvirus DNA in capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) stool samples. **Archives of Virology**, v.162, n.2, p.439-448, 2017.
- EMERSON, G. L.; NORDHAUSEN, R.; GARNER, M. M.; HUCKABEE, J. R.; JOHNSON, S.; WHORLE, R. D.; et al. Novel poxvirus in big brown bats, northwestern United States. **Emerging Infectious Diseases**, v.19, n.6, p.1002-4, 2013.
- ESPARZA, J.; SCHRICK, L.; DAMASO, C. R.; NITSCHKE, A. Equination (inoculation of horsepox): An early alternative to vaccination (inoculation of cowpox) and the potential role of horsepox virus in the origin of the smallpox vaccine. **Vaccine**, v.35, n.52, p.7222-7230, 2017.
- ESSBAUER, S.; PFEFFER, M.; MEYER, H. Zoonotic poxviruses. **Veterinary Microbiology**, v.140, n.3-4, p.229-236, 2010.
- ESTEBAN, D. J.; BULLER, R. M. Ectromelia virus: the causative agente of mousepox. **Journal of General Virology**, v.86, p.2645-2659, 2005.

ETHEART, M. D.; KLIGERMAN, M.; AUGUSTIN, P. D.; BLANTON, J. D.; MONROE, B.; FLEURINORD, L.; et al. Effect of counselling on health-care-seeking behaviours and rabies vaccination adherence after dog bites in Haiti, 2014–15: a retrospective follow-up survey. **The Lancet Global Health**, v.5, n.10, p.e1017-e1025, 2017.

FASSBENDER, P.; ZANGE, S.; IBRAHIM, S.; ZOELLER, G.; HERBSTREIT, F.; MEYER, H. Generalized Cowpox Virus Infection in a Patient with HIV, German, 2012. **Emerging Infectious Diseases**, v.22, n.3, 553-5, 2016.

FENNER F. Smallpox and Its Eradication. World Health Organization, Geneva, Switzerland, 1988.

FIGUEIREDO, P. O.; SILVA-FERNANDES, A. T.; MOTA, B. E. F.; COSTA, G. B.; BORGES, I. A.; FERREIRA, P. C. P.; et al. Evaluating anti-Orthopoxvirus antibodies in individuals from Brazilian rural areas prior to the bovine vaccinia era. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.110, n.6, p.804-808, 2015.

FTIKA, L.; MALTEZOU, H. C. Viral haemorrhagic fevers in healthcare settings. **The Journal of Hospital Infection**, v.83, n.3, p.185-92, 2013.

FONSECA F. G.; KROON, E. G.; NOGUEIRA, M. L.; TRINDADE, G. S. Zoonotic Vaccinia virus outbreaks in Brazil. **Future Virology**, v.6, n.6, p.697-707, 2011.

FONSECA, F. G.; LANNA, M. C.; CAMPOS, M. A.; KITAJIMA, E. W.; PERES, J. N.; GOLGHER, R. R.; et al. Morphological and molecular characterization of the poxvirus BeAn 58058. **Archives of Virology**, v.143, n.6, p.1171-86, 1998.

FONSECA, F. G.; TRINDADE, G. S.; SILVA, R. L.; BONJARDIM, C. A.; FERREIRA, P. C. P.; KROON, E. G. Characterization of a vaccinia-like virus isolated in a Brazilian forest. **Journal of General Virology**, v.83, p.223-228, 2002.

FRANCO-LUIZ, A. P. M.; FAGUNDES-PEREIRA, A.; COSTA, G. B.; ALVES, P. A.; OLIVEIRA, D. B.; BONJARDIM, C. A.; et al. Spread of vaccinia virus to cattle herds, Argentina, 2011. **Emerging Infectious Diseases**, v.20, n.9, p.1576-8, 2014.

FRANCO-LUIZ, A. P.; FAGUNDES-PEREIRA, A.; DE OLIVEIRA, C. H.; BARBOSA, J. D.; OLIVEIRA, D. B.; BONJARDIM C. A.; 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, 2016.

FRANCO-LUIZ, A. P.; OLIVEIRA, D. B.; PEREIRA, A. F.; GASPARINI, M. C.; BONJARDIM C. A.; FERREIRA, P. C.; *et al.* Detection of Vaccinia virus in dairy cattle serum samples from 2009, Uruguay. **Emerging Infectious Diseases**, v.22, n.12, p.2174-2177, 2016.

FRANKE, A.; PFAFF, F.; JENCKEL, M.; HOFFMANN, B.; HOPER, D.; ANTWERPEN, M.; *et al.* Classification of Cowpox Viruses into Several Distinct Clades and Identification of a Novel Lineage. **Viruses**, v.9, n.6, p.142, 2017.

GALLARDO-ROMERO, N. F.; ARÉCHIGA-CEBALLOS, N.; EMERSON, G. L.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, F. O.; DOTY, J. B.; NAKAZAWA, Y. J.; *et al.* Endemic Orthopoxvirus Circulating in Procyonids in Mexico. **Journal of Wildlife Diseases**, v.52, n.3, p.609-615, 2016.

GIBSON, A. D.; HANDEL, I. G.; SHERVELL, K.; ROUX, T.; MAYER, D.; MUYILA, S.; *et al.* The vaccination of 35,000 dogs in 20 working days using combined static point and door-to-door methods in Blantyre, Malawi. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.10, n.7, p.e0004824, 2016.

GIBSON, A. D.; OHAL, P.; SHERVELL, K.; HANDEL, I. G.; BRONSVOORT, B. M.; MELLANBY, R. J.; GAMBLE, L. Vaccinate-assess-move method of mass canine rabies vaccination utilising mobile technology data collection in Ranchi, India. **BMC Infectious Diseases**, v.15, p.589, 2015.

GILCHUK, I.; GILCHUK, P.; SAPPARAPU, G.; LAMPLEY, R.; SINGH, V.; KOSE, N.; *et al.* Cross-Neutralizing and Protective Human Antibody Specificities to Poxvirus Infections. **Cell**, v.167, n.3, p.684-694, 2016.

GLATZ, M.; RICHTER, S.; GINTER-HANSELMAYER, G.; ABERER, W.; MULLEGGER, R. Human cowpox in a veterinary student. **The Lancet Infectious Diseases**, v.10, n.4, p.288, 2010.

GUBSER, C.; HUÉ, S.; KELLAM, P.; SMITH, G. L. Poxvirus genomes: A phylogenetic analysis. **Journal of General Virology**, v.85, n.1, p.105-117, 2004.

GURAV, Y.; RAUT, C.; YADAV, P.; TANDALE, B.; SIVARAM, A.; PORE, M.; *et al.* Buffalopox outbreak in humans and animals in Western Maharashtra, India. **Preventive Veterinary Medicine**, V. 100, P. 242– 247, 2011.

HAMPSON, K.; COUDEVILLE, L.; LEMBO, T.; SAMBO, M.; KIEFFER, A.; ATTLAN, M.; *et al.* Estimating the global burden of endemic canine rabies. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.9, n.4, p.e0003709, 2015.

HUBÁLEK, Z. Emerging human infectious diseases: Anthroponoses, Zoonoses, and Saproponoses. **Emerging Infectious Diseases**, v.9, n.3, p.403-404, 2003.

Internacional Committee On Taxonomy Of Viruses (ICTV). Master Species List of 2016. Disponível em <<http://www.ictvonline.org>> Acesso em 19/01/2018.

JACOBS, B. L.; LANGLAND, J. O.; KIBLER, K. V.; DENZLER, K. L.; WHITE, S. D.; HOLECHEK, S. A.; *et al.* Vaccinia Virus Vaccines: Past, Present and Future. **Antiviral Research**, v.84, n.1, p.1-13, 2009.

JANES, C. R.; CORBETT, K. K.; JONES, J. H.; TROSTLE, J. Emerging infectious diseases: the role of social sciences. **The Lancet**, v.380, p.1884-1886, 2012.

JONES, K. E.; PATEL, N. G.; LEVY, M. A.; STOREYGARD, A.; BALK, D.; GITTLEMAN, J. L.; *et al.* Global trends in emerging infectious diseases. **Nature**, v.451, n.21, p.990-994, 2008.

JONSSON, C. B.; FIGUEIREDO, L. T.; VAPALAHTI, O. A global perspective on hantavirus ecology, epidemiology, and disease. **Clinical Microbiology Reviews**, v.23, n.2, p.412-41, 2010.

KARESH, W. B.; DOBSON, A.; LLOYD-SMITH, J. O.; LUBROTH, J.; DIXON, M. A.; BENNETT, M.; *et al.* Ecology of zoonoses: natural and unnatural histories. **The Lancet**, v.380, p.1936-1945, 2012.

KENNEDY, R. B.; OVSYANNIKOVA, I. G.; JACOBSON, R. M.; POLAND, G. A. The immunology of smallpox vaccines. **Current Opinion in Immunology**, v.21, n.3, p.314-20, 2009.

KILPATRICK, A. M. Globalization, land use and the invasion of West Nile virus. **Science**, v.334, n.6054, p.323-327, 2011.

KILPATRICK, A. M.; RANDOLPH, S. E. Drivers, dynamics and control of emerging vector-borne zoonotic diseases. **The Lancet**, v.380, p.1946-1955, 2012.

KOLHAPURE, R. M.; DEOLANKAR, R. P.; TUPE, C. D.; RAUT, C. G.; BASU, A.; DAMA, B. M.; *et al.* Investigation of buffalopox outbreaks in Maharashtra State during 1992-1996. **The Indian Journal of Medical Research**, v.106, p.441-6, 1997.

KROON, E. G.; ABRAHÃO, J. S.; TRINDADE, G. S.; PEREIRA-OLIVEIRA, G.; FRANCO-LUIZ, A. P. M.; BARBOSA COSTA, G. B.; et al. Natural Vaccinia Virus Infection: Diagnosis, Isolation, and Characterization. **Current Protocols in Microbiology**, v.12, n.42, p.14A.5.1-14A.5.43, 2016.

KROON, E. G.; MOTA, B. E. F.; ABRAHÃO, J. S.; FONSECA, F. G.; TRINDADE, G. S. Zoonotic Brazilian Vaccinia vírus: From field to therapy. **Antiviral Research**, v.92, p.150-63, 2011.

LEENDERTZ, S. A. J.; STERN, D.; THEOPHIL, D.; ANOH, E.; MOSSOUN, A.; SCHUBERT, G.; et al. A Cross-Sectional Serosurvey of Anti-Orthopoxvirus Antibodies in Central and Western Africa. **Viruses**, v.9, n.10, p.E278, 2017.

LEITE, J. A.; DRUMOND, B. P.; TRINDADE, G. S.; LOBATO, Z. I. P.; FONSECA, F. G.; SANTOS, J. R.; et al. Passatempo virus, a vaccinia virus strain, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.11, n.12, p.1935-38, 2005.

LOBATO, Z. I. P.; TRINDADE, G. S.; FROIS, M. C. M.; RIBEIRO, E. B. T.; DIAS, G. R. C.; TEIXEIRA, B. M.; et al. Outbreak of exantemal disease caused by *Vaccinia virus* in Zona da Mata region, Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, n.4, p.423-29, 2005.

LONDONO-RENTERIA, B.; TROUPIN, A.; COLPITTS, T. M. Arbovirosis and potential transmission blocking vaccines. **Parasites and Vectors**, v.9, p.516, 2016.

LOPES, O. DE S.; LACERDA, J. P.; FONSECA, I. E.; CASTRO, D. P.; FORATTINI, O. P.; RABELO, E. X. Cotia virus: a new agent isolated from sentinel mice in São Paulo, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.14, p.156-7, 1965.

MACNEIL, A.; ABEL, J.; REYNOLDS, M. G.; LASH, R. R.; FONNIE, R.; KANNEH, R. D.; et al. Serologic evidence of human orthopoxvirus infections in Sierra Leone. **BMC Research Notes**, v.4, p.465-70, 2011.

MARQUES, J. T.; TRINDADE, G. S.; FONSECA, F. G.; SANTOS, J. R.; BONJARDIM, C. A.; FERREIRA, P. C. P.; et al. Characterization of ATI, TK and IFN- α/β R genes in the genome of the BeAn 58058 virus, a naturally attenuated wild *Orthopoxvirus*. **Virus Genes**, v.23, n.3, p.291-301, 2001.

MARTÍNEZ-DUQUE, P.; AVILA-FLORES, R.; EMERSON, G. L.; CARROLL, D. S.; SUZÁN, G.; GALLARDO-ROMERO, N. F. Orthopoxvirus antibodies in grey squirrels (*Sciurus aureogaster*) in Mexico City, Mexico. **Journal of Wildlife Diseases**, v.50, n.3, p.696-698, 2014.

MCCLOSKEY, B.; OSMAN, D.; ZUMLA, A.; HEYMANN, D.; Emerging infectious diseases and pandemic potential: status quo and reducing risk of global spread. **The Lancet Infectious Diseases**, v.14, n.10, p.1001-10, 2014.

MCFADDEN, G. Poxvirus Tropism. **Nature Reviews Microbiology**, v.3, n.3, p.201-13, 2005.

MCLELLAND, D. J.; REARDON, T.; BOURNE, S.; DICKASON, C.; KESSELL, A.; BOARDMAN, W. Outbreak of Skin Nodules Associated with *Riouxgolvania beveridgei* (Nematoda: Muspiceida) in the Southern Bentwing Bat (*Miniopterus schreibersii bassanii*), South Australia. **Journal of Wildlife Diseases**, v.49, p.1009–1013, 2013.

MCLENNAN, A. G. Decapitation: poxvirus makes RNA lose its head. **Trends in Biochemical Sciences**, v.32, n.7, p.297-9, 2007.

MEDAGLIA, M. L. G.; PESSOA, L. C. G. D.; SALES, E. R. C.; FREITAS, T. R. P; DAMASO, C. R. Spread of cantagalo virus to northern Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.15, n.7, p.1142-3, 2009.

MEDAGLIA, M. L.; MOUSSATCHÉ, N.; NITSCHKE, A.; DABROWSKI, P. W.; LI, Y.; damon, I. K.; *et al.* Genomic Analysis, Phenotype, and Virulence of the Historical Brazilian Smallpox Vaccine Strain IOC: Implications for the Origins and Evolutionary Relationships of Vaccinia Virus. **Journal of Virology**, v.89, n.23, p.11909-11925, 2015.

MEDEIROS-SILVA, D. C.; MOREIRA-SILVA, E. A. S.; GOMES, J. A. S.; FONSECA, F. G.; CORREA-OLIVEIRA, R. Clinical signs, diagnosis, and case reports of *Vaccinia virus* infections. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.14, n.2, p.129-34, 2010.

MEGID, J.; APPOLINÁRIO, C. M.; LANGONI, H.; PITUCO, E. M.; OKUDA, L. H. Short Report: Vaccinia virus in Humans and Cattle in Southwest Region of Sao Paulo State, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.80, n.1, p.647-651, 2008.

MEGID, J.; BORGES, I. A.; ABRAHÃO, J. S.; TRINDADE, G. S.; APPOLINÁRIO, C. M.; RIBEIRO, M. G.; *et al.* Vaccinia virus Zoonotic Infection, Sao Paulo State, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.18, n.1, p.189-191, 2012.

MEGID, J.; PERES, M. G.; BACHIEGA, T.; APPOLINARIO, C. M.; VICENTE, A. F.; RIBEIRO, B. L. D.; *et al.* Vaccinia virus in feces of wild rodents from São Paulo State, Brazil. **International Journal of Infectious Diseases**, v.53, n.54, p.163, 2016.

MIRANDA, J. B.; BORGES, I. A.; CAMPOS, S. P. S.; VIEIRA, F. N.; DE ÁZARA, T. M. F.; MARQUES F. A.; *et al.* Serologic and molecular evidence of vaccinia virus circulation among small mammals from different biomes, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.23, n.2, p.931-938, 2017.

MORENS, D. M.; FAUCI, A. S.; Emerging Infectious Diseases: Threats to Human Health and Global Stability. *PLoS Pathogens*, v.9, n.7, e1003467, 2013.

MORSE, S. S.; MAZET, J. A.; WOOLHOUSE, M.; PARRISH, C. R.; CARROLL, D.; KARESH, W. B.; *et al.* Prediction and prevention of the next pandemic zoonosis. **The Lancet**, v.380, n.9857, p.1956-65.

MOSS, B. Poxviridae: The Viruses and Their Replication. *In: FIELDS, B. N., et al. (Eds). Virology*. 5.ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 2007. p.2953-2955.

MOSS, B. Poxvirus entry and membrane fusion. **Virology**, v.344, p.48-54, 2006.

MOSS, B. Smallpox vaccines: targets of protective immunity. **Immunology Reviews**, v.239, n.1, p.8-26, 2011.

MOSS, B. Poxviridae. *In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. et al. (Eds). Fields Virology*, 6.ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, chapter 67, p.2129-2159, 2013.

MOTA, B. E. F.; TRINDADE, G. S.; DINIZ, T. C.; SILVA-NUNES, M.; BRAGA, E. M.; URBANO-FERREIRA, M.; *et al.* Seroprevalence of orthopoxvirus in an Amazonian rural village, Acre, Brazil. **Archives of Virology**, v.155, p.1139-44, 2010.

NAGASSE-SUGAHARA, T. K.; KISIELIUS, J. J.; UEDA-ITO, M.; CURTI, S. P.; FIGUEIREDO, C. A.; CRUZ, A. S.; *et al.* Human Vaccinia-Like Virus Outbreaks in São Paulo and Goiás States, Brazil: Virus Detection, Isolation and Identification. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.46, n.6, p.315-22, 2004.

NAKAZAWA, Y.; MAULDIN, M. R.; EMERSON, G. L.; REYNOLDS, M. G.; LASH, R. R.; GAO, J.; *et al.* A Phylogenetic Investigation of African Monkeypox. **Viruses**, v.7, n.4, p.2168-84, 2013.

NEDUNCHELLIYAN, S.; REDDY, D. S.; VENKATARAMAN, K. S. Buffalo pox infection in man. **Indian Journal of Public Health**, v.36, n.2, p.57, 1992.

OLIVEIRA, G. P.; RODRIGUES, R. A. L.; LIMA, M. T.; DRUMOND, B. P.; ABRAHÃO, J. S. Poxvirus Host Range Genes and Virus-Host Spectrum: A Critical Review. **Viruses**, v.9, n.11, p.E331, 2017A.

OLIVEIRA, J. S.; FIGUEIREDO, P. O.; COSTA, G. B.; ASSIS, F. L.; DRUMOND, B. P.; da FONSECA, F. G.; et al. Vaccinia virus natural infections in Brazil: The Good, the Bad and the Ugly. **Viruses**, v.9, n.11, p.E340, 2017B.

Organização Mundial da Saúde (OMS). Rabies Fact Sheet [Internet]. Geneva; Sep 2017 [cited 2017 Oct 18]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs099/en/>.

PATZ, J. A.; DASZAK, P.; TABOR, G. M.; AGUIRRE, A. A.; PERAL, M.; EPSTEIN, J.; et al. Unhealthy landscapes: Policy recommendations on land use change and infectious disease emergence. **Environmental Health Perspectives**, v.112, n.10, p.1092-8, 2004.

PAVLIN, B. I.; SCHLOEGEL, L. M.; DASZAK, P. Risk of importing zoonotic diseases through wildlife trade, United States. **Emerging Infectious Diseases**, v.15, n.11, p.1721-1726, 2009.

PELKONEN, P. M.; TARVAINEN, K.; HYNINEN A.; KALLIO, E. R.; HENTTONEN, K.; PALVA, A.; et al. Cowpox with severe generalized eruption, Finland. **Emerging Infectious Diseases**, v.9, n.11, p.1458-61, 2003.

PEREIRA, L. G. Chapada Diamantina e Vale do Rio Jequitinhonha: composição da mastofauna e estrutura microevolutiva de populações de pequenos mamíferos. Tese de Doutorado, Instituto de Biologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2006.

PERES, M. G.; BACCHIEGA, T. S.; APPOLINÁRIO, C. M.; VICENTE, A. F.; ALLENDORF, S. D.; ANTUNES, J. M.; 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 Virology**, v.158, n.12, 2433-41, 2013.

PERES, M. G.; BACCHIEGA, T. S.; APPOLINÁRIO, C. M.; VICENTE, A. F.; MIONI, M. S. R.; RIBEIRO, B. L. D.; et al. Vaccinia virus in Blood Samples of Humans, Domestic and Wild Mammals in Brazil. **Viruses**, v.10, n.1, p.E42, 2018A.

PERES, M. G.; BACCHIEGA, T. S.; APPOLINÁRIO, C. M.; VICENTE, A. F.; MIONI, M. S. R.; RIBEIRO, B. L. D.; et al. Vaccinia virus in Feces and Urine of Wild Rodents from São Paulo State, Brazil. **Viruses**, v.10, n.2, p.E51, 2018B.

PERES, M. G.; BARROS, C. B.; APPOLINÁRIO, C. M.; ANTUNES, J. M. A. P.; MIONI, M. S. R.; BACCHIEGA, T. S.; et al. Dogs and Opossums Positive for Vaccinia Virus during Outbreak Affecting Cattle and Humans, São Paulo State, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.22, n.2, p.271-273, 2016.

QUINER, C. A.; NAKAZAWA, Y. Ecological niche modeling to determine potential niche of Vaccinia virus: a case only study. **International Journal of Health Geographics**, v.16, n.1, p.28, 2017.

QUIXABEIRA-SANTOS, J. C.; MEDAGLIA, M. L. G.; PESCADOR, C. A.; DAMASO, C. R. Animal Movement and Establishment of Vaccinia Virus Cantagalo Strain in Amazone Biome, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.17, n.4, p.726-29, 2011.

REYNOLDS, M. G.; GUAGLIARDO, S. A. J.; NAKAZAWA, Y. J.; DOTY, J. B.; MAULDIN, M. R. Understanding orthopoxvirus host range and evolution: from the enigmatic to the usual aspects. **Current Opinion in Virology**, v.28, p.108-115, 2018.

REYNOLDS, M. G.; MCCOLLUM, A. M.; NGUETE, B.; SHONGO LUSHIMA, R.; PETERSEN, B. W. Improving the Care and Treatment of Monkeypox Patients in Low-Resource Settings: Applying Evidence from Contemporary Biomedical and Smallpox Biodefense Research. **Viruses**, v.9, n.12, p.E380, 2017.

REYNOLDS, M. G.; DAMON, I. K. Outbreaks of human monkeypox after cessation of smallpox vaccination. **Trends in Microbiology**, v.20, n.2, p.80-7, 2012A.

REYNOLDS, M. G.; CARROLL, D. S.; KAREM, K. L. Factors affecting the likelihood of monkeypox's emergence and spread in the post-smallpox era. **Current Opinion in Virology**, v.2, n.3, p.335-43, 2012B.

RIVETTI JR, A. V.; GUEDES, M. I. M. C.; REHFELD, I. S.; OLIVEIRA, T. M. L.; MATOS, A. C. D.; ABRAHÃO, J. S.; et al. Bovine vaccinia, a systemic infection: Evidence of fecal shedding, viremia and detection in lymphoid organs. **Veterinary Microbiology**, v.162, p.103-11, 2013.

ROBERTS, K. L.; SMITH, G. L. Vaccinia virus morphogenesis and dissemination. **Trends in Microbiology**, v.16, n.10, p.472-9, 2008.

ROPP, S. L.; QUIN, J.; KNIGHT, J. C.; MASSUNG, R. F.; ESPOSITO, J. J. PCR Strategy for Identification and Differentiation of Smallpox and Other Orthopoxviruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, n.8, p.2069-76, 1995.

SANT'ANA, F. J. F.; LEAL, A. A.; RABELO, R. E.; VULCANI, V. A. S.; FERREIRA JUNIOR, J. A.; CARGNELUTTI, J. F.; *et al.* Outbreaks of vesicular diseases caused by *Vaccinia virus* in dairy cattle from Goiás State, Brazil (2010-2012). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.33, n.7, p860-66, 2013A.

SANT'ANA, F. J. F.; LEAL, F. A. A.; RABELO, R. E.; VULCANI, V. A. S.; MOREIRA, C. A.; CARGNELUTTI, J. F.; *et al.* Coinfection by *Vaccinia virus* and *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.276-272, 2013B.

SCHATZMAYR, H. G.; ROMJIN, P. C.; BARRETO, D. F.; SILVA, E. E.; TAVARES, A. F.; BARTH, O. M. An outbreak of vesicopustular disease in humans and dairy cattle in the state of Rio de Janeiro. **Virus Reviews & Research**, v.10, p. 61-63, 2005.

SCHATZMAYR, H. G.; COSTA, R. V. C.; GONÇALVES, M. C. R.; D'ANDRÉA, P. S.; BARTH, O. M. Human and animal infections by vaccinia-like viruses in the state of Rio de Janeiro: a novel expanding zoonosis. **Vaccine**, v.29, Suppl 4, D65–9, 2011.

SCHRICK, L.; TAUSCH, S. H.; DABROWSKI, P. W.; DAMASO, C. R.; ESPARZA, J.; NITSCHKE, A. An Early American Smallpox Vaccine Based on Horsepox. **New England Journal of Medicine**, v.377, n.15, p.1491-1492, 2017.

SCHULZE, C.; ALEX, M.; SCHIRRMIEIER, H.; HLINAK, A.; ENGELHARDT, A.; KOSCHINSKI, B.; *et al.* Generalized Fatal *Cowpox virus* Infection in a Cat with Transmission to a Human Contact Case. **Zoonoses and Public Health**, v.54, p.31-37, 2007.

SILVA A. C.; REIS B. B.; RICCI JUNIOR J. E. R.; FERNANDES F. S.; CORRÊA, J. F.; SCHATZMAYR H. G. Infecção em humanos por varíola bovina na microrregião de Itajubá, Estado de Minas Gerais: relato de caso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.41, n.5, p.507-11, 2008.

SILVA-FERNANDES A. T.; TRAVASSOS, C. E. P. F.; FERREIRA, J. M. S.; ABRAHÃO, J. S.; ROCHA, E. S. O.; VIANA-FERREIRA, F.; *et al.* Natural human infections with *Vaccinia virus* during bovine vaccinia outbreaks. **Journal of Clinical Virology**, v.44, p.308-313, 2009.

SIMONETTI, B. R.; ABREU, D. C.; SIMONETTI, J. P.; GONÇALVES, M. C. R.; SILVA, M. E. V.; BARTH, O. M.; *et al.* Animal infections by vaccinia-like viruses in the State of Rio de Janeiro: 1-northwestern region. **Virus Reviews & Research**, v.12, p.1-12, 2007.

SINGH, R. K.; BALAMURUGAN, V.; BHANUPRAKASH, V.; VENKATESAN, G.; HOSAMANI, M. Emergence and reemergence of vaccinia-like viruses: global scenario and perspectives. **Indian Journal of Virology**, v.23, n.1, p.1-11, 2012.

SMITH, G. L.; VANDERPLASSCHEN, A., LAW M. The formation and function of extracellular enveloped vaccinia virus. **Journal of General Virology**, v.83, p.2915-31, 2002.

SOUZA, R. L. M. Zoonoses virais emergentes associadas a roedores: riscos ocupacionais em Medicina Veterinária. Associação Brasileira de Veterinários de Animais Selvagens (ABRAVAS). 2006. Disponível em: <http://www.abravas.org.br>

SPRINGER, Y. P.; HSU, C. H.; WERLE, Z. R.; OLSON, L. E.; COOPER, M. P.; CASTRODALE, L. J.; *et al.* Novel Orthopoxvirus Infection in an Alaska Resident. **Clinical Infectious Diseases**, v.64, n.12, p.1737-41, 2017.

TAYLOR, L. H.; KNOFF, L. Surveillance of human rabies by national authorities—a global survey. **Zoonoses and Public Health**, v.62, n.7, p.543-52, 2015.

TRINDADE, G S.; FONSECA, F. G.; MARQUES, J. T.; NOGUEIRA, M. L.; MENDES, L. C. N.; BORGES, A. S.; *et al.* Araçatuba Virus: A Vaccinialike Virus Associated with Infection in Humans and Cattle. **Emerging Infectious Diseases**, v.9, n.2, p.155-160, 2003.

TRINDADE, G. S.; da FONSECA, F. G.; MARQUES, J. T.; DINIZ, S.; LEITE, J. A., de BODT, S.; *et al.* Belo Horizonte virus: a vaccinia-like virus lacking the A-type inclusion body gene isolated from infected mice. **Journal of General Virology**, v.85, n.7, p.2015-21, 2004.

TRINDADE, G. S.; DRUMOND, B. P.; GUEDES, M. I. M. C.; LEITE, J. A.; MOTA, B. E. F.; CAMPOS, M. A.; *et al.* Zoonotic Vaccinia virus infection in Brazil: Clinical description and implications for health professionals. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, n.4, p.1370-72, 2007A.

TRINDADE, G. S.; EMERSON, G. L.; CARROLL, D. S.; KROON, E. G.; DAMON, I. K. Brazilian Vaccinia Viruses and Their Origins. **Emerging Infectious Diseases**, v.13, n.7, p.965-72, 2007B.

TRINDADE, G. S.; EMERSON, G. L.; SAMMONS, S.; FRACE, M.; GOVIL, D.; FERNANDES MOTA, B. E.; *et al.* Serro 2 Virus Highlights the Fundamental Genomic and Biological Features of a Natural Vaccinia Virus Infecting Humans. **Viruses**, v.8, n.12, p.E328, 2016.

TRINDADE, G. S.; GUEDES, M. I. C.; DRUMOND, B. P.; MOTA, B. E. F.; ABRAHÃO, J. S.; LOBATO, Z. I. P.; *et al.* Zoonotic Vaccinia Virus: Clinical and Immunological Characteristics in a Naturally Infected Patient. **Clinical Infectious Diseases**, v.48, p.37-40, 2009.

TRINDADE, G. S.; LI, Y.; OLSON, V. A.; EMERSON, G.; REGNERY, R. L.; da FONSECA, F. G.; *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, 2008.

TRINDADE, G. S.; LOBATO, Z. I. P.; DRUMOND, B. P.; LEITE, J. A.; TRIGUEIRO, R. C.; GUEDES, M. I. M. C.; *et al.* Short report: isolation of two vaccinia virus strains from a single bovine vaccinia outbreak in rural area from Brazil: implications on the emergence of zoonotic orthopoxviruses. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.75, n.3, p.486-90, 2006.

UNDURRAGA, E. A.; BLANTON, J. D.; THUMBI, S. M.; MWATONDO, A.; MUTURI, M.; WALLACE, R. M. Tool for Eliminating Dog-Mediated Human Rabies through Mass Dog Vaccination Campaigns. **Emerging Infectious Diseases**, v.23, n.12, p.2114-6, 2017.

USME-CIRO, J. A.; PAREDES, A.; WALTEROS, D. M.; TOLOSA-PÉREZ, E. N.; LAITON-DONATO, K.; DEL CARMEN PINZÓN, M.; *et al.* Detection and molecular characterization of zoonotic poxviruses circulating in the Amazon region of Colombia. **Emerging Infectious Diseases**, v.23, n.4, p.649-653, 2017.

VENKATESAN, G.; BALAMURUGAN, V.; PRABHU, M.; YOGISHARADHYA, R.; BORA, D. P.; GANDHALE, P. N.; *et al.* Emerging and re-emerging zoonotic buffalopox infection: a severe outbreak in Kolhapur (Maharashtra), India. **Veterinaria Italiana**, v.46, n.4, p.439-48, 2010.

VIGILATO, M. A.; CLAVIJO, A.; KNOBEL, T.; SILVA, H. M.; COSIVI, O.; SCHNEIDER, M. C.; *et al.* Progress towards eliminating canine rabies: policies and perspectives from Latin America and the Caribbean. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v.368, n.1623, p.20120143, 2013.

VON BOMHARD, W.; MAULDIN, E. A.; BREUER, W.; PFLEGHAAR, S.; NITSCHKE, A. Localized cowpox infection in a 5-month-old Rottweiler. **Veterinary Dermatology**, v.22, n.1, p.111-114, 2011.

VORA, N. M.; LI, Y.; GELEISHVILI, M.; EMERSON, G. L.; KHMALADZE, E.; MAGHLAKELIDZE, G.; et al. Human infection with a zoonotic poxvirus in the country of Georgia. **The New England Journal of Medicine**, v.372, n.13, p.1223-30, 2015.

WALLACE, R. M.; UNDURRAGA, E. A.; BLANTON, J. D.; CLEATON, J.; FRANKA, R. Elimination of Dog-Mediated Human Rabies Deaths by 2030: Needs Assessments and Alternatives for Progress Based on Dog Vaccination. **Frontiers in Veterinary Science**, v.4, p.9, 2017B.

WARGO, A. R.; KURATH, G. Viral fitness: definitions, measurement, and current insights. **Current Opinion in Virology**, v.2, n.5, p.538-45, 2012.

YADAV, S.; HOSAMANI, M.; BALAMURUGAN, V.; BHANUPRAKASH, V.; SINGH, R.; Partial genetic characterization of viruses isolated from pox-like infection in cattle and buffaloes: evidence of buffalo pox virus circulation in Indian cows. **Archives of Virology**, v.155, p.255–261, 2010.

YANG, Z.; REYNOLDS, S. E.; MARTENS, C. A.; BRUNO, D. P.; PORCELLA, S. F.; MOSS, B. Expression Profiling of the Intermediate and Late Stages of Poxvirus Replication. **Journal of Virology**, v.85, n.19, p.9899-9908, 2011.

YODER, J. D.; CHEN, T.; HRUBY, D. E. Sequence-independent acylation of the vaccinia virus A-type inclusion protein. **Biochemistry**, v.43, n.26, p.8297-8302, 2004.

ZIJLSTRA, M.; OSTERHAUS, A.; HEIDEMA, J. A necrotising ulcer after rescuing a kitten. **BMC Case Reports**, brc2013010398, 2013.

IX. OUTRAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O DOUTORADO

9.1. Participação em eventos científicos

2017:

- 1) 36th American Society for Virology Annual Meeting.
- 2) 66th Annual Epidemic Intelligence Service Conference.
- 3) Encontro do Laboratório de vírus – 55 anos.
- 4) XXVIII Brazilian Congress of Virology & XII Mercosur Meeting of Virology.

2016:

- 1) III Simpósio de Microbiologia da UFMG: Doenças Microbianas Emergentes.

2015:

- 1) XXVI Brazilian Congress of Virology & X Mercosur Meeting of Virology.
- 2) XI Congreso Argentino de Virología e II Congreso Latinoamericano de Virología.
- 3) II Simposio de Virología Veterinaria.
- 4) IV Simposio de Virología Clínica.
- 5) II Simpósio de Microbiologia da UFMG: Microbiologia Translacional - Do Ambiente Natural às Aplicações.
- 6) XI Semana de Ciência e Tecnologia do CEFET Unidade Contagem.
- 7) Simpósio Pós-Graduação e Interface com a Educação Básica: desafios e possibilidades.

2014:

- 1) XXII Congreso Latino Americano de Microbiología & 4º Congreso Colombiano de Microbiología.
- 2) XIV International Course of Molecular Epidemiology.
- 3) 3º Congresso Nacional de Saúde.
- 4) I Simpósio de Microbiologia da UFMG: A Microbiologia e a Sociedade.
- 5) Simpósio Imunidade Antiviral e Dengue.

9.2. Organização de eventos científicos

- 1) III Simpósio de Microbiologia da UFMG: Doenças Microbianas Emergentes, 2016.
- 2) II Simpósio de Microbiologia da UFMG: Microbiologia Translacional - Do Ambiente Natural às Aplicações, 2015
- 3) I Simpósio de Microbiologia da UFMG: A Microbiologia e a Sociedade, 2014.

9.3. Revisor de periódicos científicos internacionais

- 1) Emerging Infectious Diseases: 2017 – atual
- 2) Parasites and Vectors: 2017 – atual
- 3) Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis: 2017 – atual
- 4) Clinical Microbiology: Open Access: 2017 – atual

9.4. Premiações

2017:

1) Trabalho selecionado para apresentação oral – 36th American Society for Virology Annual Meeting: Vaccinia virus free circulation among dogs and coatis from wild and urban environments in Brazil: Insights into VACV emergence and risks for urban human populations.

2016:

1) Foreign scholarship – Oak Ridge Institute for Science and Education (ORISE), Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, USA.

2015:

1) Trabalho selecionado para apresentação oral – XXVI Brazilian Congress of Virology & X Mercosur Meeting of Virology: Seroprevalence of Saint Louis encephalitis virus among humans and horses from Minas Gerais, Brazil

2) Melhor apresentação oral da Sessão de Virologia Humana – XXVI Brazilian Congress of Virology & X Mercosur Meeting of Virology.

3) Special Grant for free publication oferecido pelo periódico Virology Journal, referente à melhor apresentação oral da Sessão de Virologia Humana – XXVI Brazilian Congress of Virology & X Mercosur Meeting of Virology.

4) Travel Scholarship – XI Congreso Argentino de Virología e II Simposio Latinoamericano de Virología, Asociación Argentina de Microbiología.

2014:

1) Melhor pôster selecionado para posterior apresentação oral – XIV International Course of Molecular Epidemiology, Fiocruz-Salvador: Prevalence and clinical aspects of Orthopoxvirus infections in vulnerable rural population: implications for emergence/reemergence in Minas Gerais, Brazil.

2) Trabalho selecionado para apresentação oral – XXV Brazilian Congress of Virology IX Mercosur Meeting of Virology, Brazilian Society for Virology: Evidence of Orthopoxvirus circulation among urban domestic cats, Minas Gerais, Brazil.

9.5. Artigos em fase de redação

1) Retrospective study of handling dairy practices associated with human vaccinia virus infections in a bovine vaccinia endemic area in Brazil. O manuscrito será submetido ao periódico *Frontiers in Microbiology*.

Autores: **Galileu Barbosa Costa**, Jaqueline Silva de Oliveira, Iara Apolinário Borges, Andrea McCollum, Brett Petersen, Ashley Styczynski, Bruno Eduardo Fernandes Mota, Betânia Paiva Drumond, Jônatas Santos Abrahão, Erna Geessien Kroon, Elizabeth Castro Moreno, Mary Reynolds, Yoshinori Nakazawa, Giliane de Souza Trindade.

2) Seroprevalence and risk factors for Orthopoxvirus infection in dogs from Juatuba, Minas Gerais, Brazil. O manuscrito será submetido ao periódico *Emerging Microbes and Infections*.

Autores: **Galileu Barbosa Costa**, Sara Clemente Paulino Ferreira e Silva, Jillybeth Burgado, Clint Morgan, Christine Hughes, Danielle Ferreira de Magalhães Soares, Yoshinori Nakazawa, Giliane de Souza Trindade.

3) Willingness to pay and walk for dog rabies vaccine in Haiti, 2017. O manuscrito será submetido ao periódico *Journal of Epidemiology and Community Health*.

Autores: **Galileu Barbosa Costa**, Benjamin Monroe, Emily Pieracci, Jesse Blanton, Kelly Crowdis, Ludder Fleurinord, Melissa Etheart, Natael Fenelon, Ryan Wallace.

4) Estimation of dog-bite rates and evaluation of healthcare seeking behaviors following dog bite, Haiti, 2016. O manuscrito será submetido ao periódico *PLoS Neglected Tropical Diseases*.

Autores: Gabrielle Johnson, **Galileu Barbosa Costa**, Benjamin Monroe, Jesse Blanton, Kelly Crowdis, Ludder Fleurinord, Melissa Etheart, Natael Fenelon, Ryan Wallace.

5) Knowledge, attitudes, and practices regarding bite events and healthcare seeking behaviors, Uganda, 2013. O manuscrito será submetido ao periódico *PLoS Neglected Tropical Diseases*.

Autores: Sarah Bonaparte, Julie Cleaton, **Galileu Barbosa Costa**, Benjamin Monroe, Emily Pieracci, Jesse Blanton, Ryan Wallace.

6) Serological and molecular detection of *Saint Louis encephalitis virus* among humans and equids from Brazil. O manuscrito será submetido ao periódico *Zoonoses and Public Health*.

Autores: **Galileu Barbosa Costa**, Paula Eillany Silva Marinho, Ana Paula Pessoa Vilela, Ana Teresa Saraiva Silva, Ana Paula Correia Crispim, Zélia Inês Portela Lobato, Jenner Karlison Pimenta dos Reis, Betânia Paiva Drumond, Erna Geessien Kroon, Giliane de Souza Trindade.