

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

GALILEU BARBOSA COSTA

Avaliação dos fatores de exposição ao *Vaccinia virus* (VACV) em  
diferentes populações do Brasil

Orientadora: Profa. Dra. Giliane de Souza Trindade

Co-orientadora: Dra. Erna Geessien Kroon

Co-orientadora: Dra. Elizabeth Castro Moreno

Belo Horizonte, Janeiro de 2014

GALILEU BARBOSA COSTA

Avaliação dos fatores de exposição ao *Vaccinia virus* (VACV) em  
diferentes populações do Brasil

Dissertação de mestrado 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 Mestre em Microbiologia

Orientadora: Profa. Dra. Giliane de Souza Trindade

Co-orientadora: Dra. Erna Geessien Kroon

Co-orientadora: Dra. Elizabeth Castro Moreno

Belo Horizonte, Janeiro de 2014



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

Co-orientador: Profa. Erna Geessien Kroon  
Relator e Suplente: Prof. Dr. Gabriel Magno de Freitas Almeida

Às 13:30 horas do dia 27 de janeiro de 2014, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Erna Geessien Kroon - Co-Orientadora (Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG), Bruno Eduardo Fernandes Mota (Faculdade de Farmácia/UFMG), Fernanda Nobre Amaral Villani (Pós-doc Departamento de Microbiologia) e a Profa. Giliane de Souza Trindade - Orientadora, para julgar o trabalho final "Avaliação dos fatores de exposição ao Vaccinia virus (VACV) em diferentes populações do Brasil", do aluno Galileu Barbosa Costa, requisito final para a obtenção do Grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Cláudio Antônio Bonjardim - 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, 27 de janeiro de 2014:

Profa. Dr. Erna Geessien Kroon

Prof. Dr. Bruno Eduardo Fernandes Mota

Profa. Dr. Fernanda Nobre Amaral Villani

Profa. Giliane de Souza Trindade (Orientadora)

Prof. Cláudio Antônio Bonjardim  
Coordenador

Débora Silva Veloso França  
Secretaria Pós-Graduação em Microbiologia  
UFMG - 31257

# SUMÁRIO

|  |     |
|--|-----|
| LISTA DE FIGURAS.....  | iii |
| LISTA DE TABELAS.....  | iv  |
| LISTA DE ABREVIATURAS.....   | v   |
| RESUMO.....  | vii |
| ABSTRACT.....  | ix  |
| I. INTRODUÇÃO.....   | 1   |
| 1.1. Classificação dos Poxvírus.....   | 1   |
| 1.2. Morfologia.....   | 1   |
| 1.3. Genoma.....   | 3   |
| 1.4. Ciclo de multiplicação.....   | 5   |
| 1.5. Patogênese.....   | 10  |
| 1.6. Aspectos clínicos.....  | 11  |
| 1.7. Diagnóstico.....  | 16  |
| 1.8. Resposta imunológica.....   | 17  |
| 1.9. Vacinas antivariólicas.....   | 22  |
| 1.10. <i>Vaccinia virus</i> .....  | 23  |
| 1.11. Vaccínia Bovina.....   | 24  |
| 1.11.1. Epidemiologia.....   | 26  |
| 1.11.2. Impacto econômico.....   | 30  |
| 1.11.3. Impacto na saúde pública.....  | 31  |
| II. JUSTIFICATIVA.....   | 32  |
| III. OBJETIVOS.....  | 34  |
| 3.1 Objetivo Geral.....  | 34  |
| 3.2 Objetivos Específicos.....   | 34  |
| IV. PUBLICAÇÕES.....   | 35  |
| 4.1. Artigo 1: Neutralizing antibodies associated with wxposure factors to <i>Orthopoxvirus</i> in laboratory workers.....                                 | 35  |
| 4.2. Artigo 2: Alternative Routes of Zoonotic Vaccinia Virus Transmission, Brazil.....   | 40  |
| 4.3. Artigo 3: Seroprevalence of Orthopoxvirus in rural Brazil: insights into anti-OPV immunity status and its implications for emergent zoonotic OPV..... | 44  |
| V. DISCUSSÃO.....  | 49  |
| VI. CONCLUSÕES.....  | 55  |

|  |    |
|--|----|
| VII. REFERÊNCIAS.....                                      | 56 |
| VIII. APÊNDICES.....                                       | 78 |
| IX. Lista de Trabalhos Publicados em Anais de Eventos..... | 84 |

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1 – Representação esquemática da partícula viral.....                             | 3  |
| Figura 2 – Fotografia em microscópio eletrônico das partículas virais.....               | 4  |
| Figura 3 – Fotografia em microscópio de força atômica das partículas virais.....         | 4  |
| Figura 4 – Representação esquemática do genoma.....                                      | 6  |
| Figura 5 – Diferentes vias de penetração do VACV na célula hospedeira.....               | 7  |
| Figura 6 – Representação esquemática do ciclo de multiplicação dos poxvírus.....         | 10 |
| Figura 7 – Morfogênese e liberação das partículas virais.....                            | 11 |
| Figura 8 – Mecanismo de disseminação das partículas virais no hospedeiro.....            | 12 |
| Figura 9 – Representação esquemática do diagrama de Fenner.....                          | 14 |
| Figura 10 – Lesões nodulares e ulcerativas em tetos de vacas infectadas.....             | 15 |
| Figura 11 – Lesões ulcerativas presentes em bezerros infectados.....                     | 16 |
| Figura 12 – Lesões ulcerativas presentes nas mãos de ordenhadores infectados...          | 17 |
| Figura 13 – Lesões em fase de crostas presentes nas mãos de ordenhadores infectados..... | 17 |
| Figura 14 – Lesão em forma de úlcera encontrada no dedo de um ordenhador infectado.....  | 18 |
| Figura 15 – Lesões faciais causadas pelo <i>Vaccinia virus</i> em ordenhadores.....      | 18 |
| Figura 16 – Panorama geral da resposta imune contra poxvírus.....                        | 22 |
| Figura 17 – Distribuição do <i>Vaccinia virus</i> no Brasil.....                         | 33 |

## LISTA DE TABELAS

|  |   |
|--|---|
| Tabela 1 – Classificação dos Poxvírus..... | 2 |
|--|---|

## LISTA DE ABREVIATURAS

µL – microlitro

ADCC – citotoxicidade celular dependente de anticorpo

ARAV – vírus Araçatuba

ATCC – *American Type Culture Collection*

ATI – proteína formadora do corpúsculo de inclusão do tipo acidófilo

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

CEV – vírus envelopado associado à célula

CO<sub>2</sub> – dióxido de carbono

COEP – Comitê de Ética e Pesquisa

CGTV – vírus Cantagalo

CPXV – *Cowpox virus*

DNA – ácido desoxirribonucléico

dsDNA – DNA de dupla fita

EEV – vírus envelopado extracelular

ELISA – *Enzyme-linked immunosorbent assay*

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

GP1V – vírus Guarani propriedade 1

GP2V – vírus Guarani propriedade 2

HA – hemaglutinina

IEV – vírus envelopado intracelular

Ig – imunoglobulina

IL – interleucina

IMA – Instituto Mineiro de Agropecuária

IMV – vírus maduro intracelular

IFN – Interferon

ITR – regiões terminais invertidas

kb – quilobase

MEM – meio mínimo essencial

ml – mililitro

MPXV – *Monkeypox virus*

MURV – vírus Muriaé

mRNA – RNA mensageiro

NK – *natural killer*



NYCBH – New York City Board of Health

nm – nanômetro

nM – nano molar

OR – *Odds Ratio*

OPV – (*Orthopoxvirus*) ortopoxvírus

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

PRR – (*patter recognition receptor*) receptores de reconhecimento de padrões moleculares

PSTV – vírus Passatempo

RNA – ácido ribonucléico

SFB – soro fetal bovino

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 – vírus Belo Horizonte

VGF – *viral growth factor*

## RESUMO

A família *Poxviridae* compreende grandes e complexos vírus de animais com genoma de DNA que possuem a peculiaridade de se multiplicarem no citoplasma das células hospedeiras. *Orthopoxvirus* (OPV) é um dos gêneros da família e entre seus representantes podemos destacar o *Cowpox virus* (CPXV), o *Monkeypox virus* (MPXV), o *Variola virus* (VARV) e o *Vaccinia virus* (VACV). A incidência de infecções zoonóticas por OPV têm aumentado nos últimos anos e esses achados podem estar diretamente relacionados à interrupção da vacinação contra a varíola após sua erradicação. O VACV é o agente causador da vaccínia bovina (VB) no Brasil e está associado à formação de lesões ulcerativas em bovinos e ordenhadores, acarretando em perdas econômicas, impactos sociais e em saúde pública. Desde 1999, vários casos de VB têm sido notificados no país e um grande número de amostras virais foram isoladas e caracterizadas durante esses surtos. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a soroprevalência e fatores de riscos associados ao VACV em duas diferentes populações do Brasil. Durante o período de Agosto de 2012 à Março de 2013, foi realizado um levantamento epidemiológico entre indivíduos residentes em áreas rurais do município do Serro e coletadas 240 amostras de soro. A avaliação da imunidade foi feita através do teste de neutralização viral por redução de placa. A população estudada é composta por 127 homens (52.9%) e 113 mulheres (47.1%), com idade entre 5 e 90 anos. A maioria dos participantes se declarou parda (59.2%) e também possuem renda mensal mínima de um salário (72.4%). Vinte e quatro pessoas (10%) declararam não possuir estudo e 156 (65%) estudaram até durante 8 anos. Quanto à profissão, 127 (52.5%) são trabalhadores do meio rural, 59 mulheres (24.6%) declararam trabalhar apenas no lar e os demais 54 (22.5%) não possuem profissão relacionada diretamente ao meio rural. Após o teste, foi constatado que 74 indivíduos (30.1%) possuíam anticorpos neutralizantes anti-OPV, com títulos variando entre 100 e 12800 unidades neutralizantes por ml. Dos fatores de exposição analisados o contato com bovinos e equídeos, histórico de vacinação, presença da marca vacinal, participação na produção do queijo e a prática da ordenha foram estatisticamente significativos quando comparados com a presença de anticorpos neutralizantes ( $p < 0.05$ ). Além disso, foi detectada lesões semelhantes àsquelas observadas durante os surtos de VB em um dos participantes, e DNA viral em 5 deles. Este achado caracteriza um caso de transmissão intrafamiliar do VACV, que é dificilmente relatado em situações de surtos. Durante a campanha de erradicação da varíola, pensou-se que a imunidade contra OPV seria de longa duração. Entretanto, surtos causados pelo

VACV têm sido relatados no Brasil, inclusive afetando pessoas vacinadas. Como mostrado neste estudo, existe uma prevalência relevante de anticorpos anti-OPV em indivíduos sem evidências de vacinação (sem a marca vacinal). Estes dados são semelhantes a estudos realizados em outros países, onde há ocorrência de outras poxviroses, como CPXV e MPXV. Isto sugere uma ativa circulação de OPV em áreas onde os indivíduos são diretamente expostos devido a suas atividades laborais.

Palavras-chave: *Orthopoxvirus*, *Vaccinia virus*, sorologia, epidemiologia, fatores de risco.

## ABSTRACT

The family Poxviridae comprises large and complex animal viruses with DNA genome which have the peculiarity to multiply in the cytoplasm of host cells. *Orthopoxvirus* (OPV) is one of the genera and among their representatives we can highlight *Cowpox virus* (CPXV), *Monkeypox virus* (MPXV), *Variola virus* (VARV) and *Vaccinia virus* (VACV). The incidence of zoonotic OPV infections have increased in recent years and these findings can be directly related to cessation of smallpox vaccination after its eradication. VACV is the agent of bovine vaccinia (BV) in Brazil, associated with ulcerative lesions in cattle and milkers, resulting in economic losses, and social and public health impacts. Since 1999, several BV outbreaks have been reported in the country and a large number of viral strains were isolated and characterized. The aim of this study was to evaluate the occurrence of previous VACV infections and its dispersion in a vulnerable population of an important dairy region of Minas Gerais State, also identifying exposure factors. During August 2012 to March 2013, an epidemiological survey was conducted among individuals living in rural areas of Serro city and collected 240 serum samples. To assess immunity it was performed plaque reduction neutralizing test. The studied population comprise 127 men (52.9%) and 113 women (47.1%), aged between 5 and 90 years. Most participants have brown skin color (59.2%) and also have a minimum monthly income (72.4%). Twenty-four people (10%) reported not having study and 156 (65%) attended for 8 years. About occupation, 127 (52.5%) are rural workers, 59 women (24.6%) reported working only in home environment and 54 (22.5%) have no profession directly related to rural environment. It was found that 74 participants (30.1%) have anti-OPV neutralizing antibodies with titers ranging from 100 to 12.800 neutralizing units per ml. Exposure factors analyzed, contact with cattle and horses, vaccination history, vaccine take presence, participation in cheese production and milking practice were statistically significant when compared with presence of neutralizing antibodies ( $p < 0,05$ ). Furthermore, it was detected lesions similar those observed during BV outbreaks in one participant, and viral DNA in 5 of them. This finding features a VACV household transmission case, which is hardly reported in outbreaks. During the campaign for smallpox eradication, it was thought that immunity against OPV would be long lasting. However, VACV outbreaks affecting vaccinated people have been reported in Brazil. As shown in this study, there is a significant prevalence of anti-OPV antibodies in no vaccinated individuals (without vaccine take). These data are similar to studies conducted in other countries, where there is occurrence of other poxviruses as CPXV and MPXV.

This suggests an active circulation of OPV in areas where individuals are directly exposed due to their work activities.

Key-words: *Orthopoxvirus*, *Vaccinia virus*, serology, epidemiology, risk factors.

## I. INTRODUÇÃO

### 1.1. Classificação dos Poxvírus

Os poxvírus, membros da família *Poxviridae*, constituem um grupo de patógenos virais conhecidos por infectarem uma variedade de organismos, incluindo insetos, reptéis, aves e mamíferos, sendo divididos em duas subfamílias: *Entomopoxvirinae*, que infectam invertebrados, e *Chordopoxvirinae*, que infectam vertebrados (FENNER *et al.*, 1989; FENNER, 2000; SHCHELKUNOV *et al.*, 2005; ICTV, 2011). A subfamília *Chordopoxvirinae* é dividida em dez gêneros (Tabela 1), dos quais quatro possuem espécies capazes de infectar o homem, que são *Orthopoxvirus*, *Parapoxvirus*, *Yatapoxvirus* e *Moluscipoxvirus* (ICTV, 2011). É importante destacar o gênero *Orthopoxvirus* (OPV) pois este abriga patógenos de importância humana e veterinária, os quais merecem destaque o *Variola virus* (VARV), que foi declarado erradicado em 1980; o *Vaccinia virus* (VACV), usado como vacina para a erradicação da varíola; o *Monkeypox virus* (MPXV), vírus de origem africana e que causou um surto acidental nos Estados Unidos em 2003 pela importação de animais de estimação; e o *Cowpox virus* (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; FENNER, 2000; SHCHELKUNOV *et al.*, 2005; ICTV, 2011).

Os agentes virais classificados nessa família têm em comum a propriedade de causar lesões cutâneas, com presença de sinais clínicos generalizados ou não (LOBATO *et al.*, 2005; SCHATZMAYR *et al.*, 2005; SIMONETTI *et al.*, 2007; TRINDADE *et al.*, 2007a; SILVA-FERNANDES *et al.*, 2009).

### 1.2. Morfologia

As partículas virais dos poxvírus são grandes e complexas em comparação com a maioria de outros vírus animais, com um tamanho que pode chegar a aproximadamente 450nm (MOSS, 2013) (Figura 1). A partícula infecciosa tem forma oval, semelhante a um barril (ou tijolo), e apresenta uma membrana lipoprotéica

externa que envolve o cerne que se apresenta em forma de haltere, tendo em suas duas concavidades a presença de estruturas denominadas corpúsculos laterais (Figura 1) (DAMON, 2013).

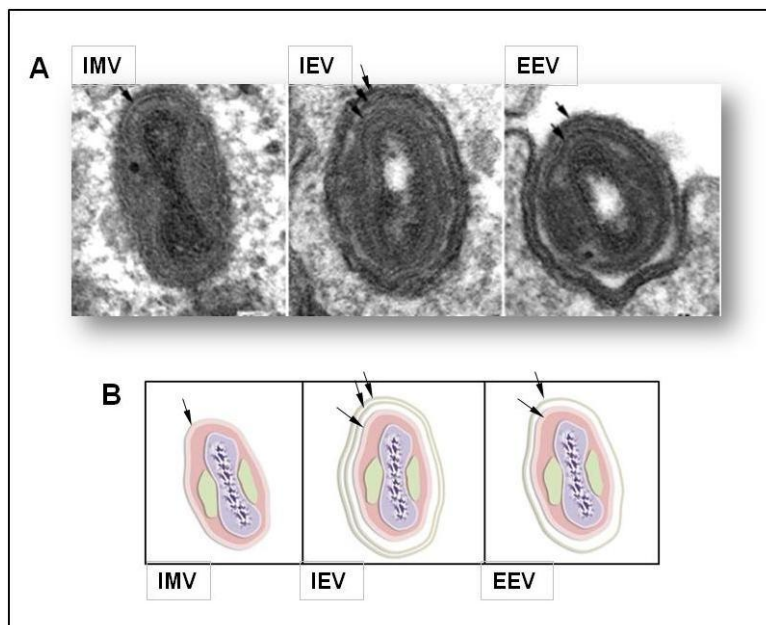
Tabela 1 – Classificação dos Poxvírus.

| Família    | Subfamília       | Gênero                    | Nº de espécies | Protótipo                          |
|------------|------------------|---------------------------|----------------|------------------------------------|
| Poxviridae | Chordopoxvirinae | <i>Avipoxvirus</i>        | 10             | <i>Fowlpox virus</i>               |
|            |                  | <i>Capripoxvirus</i>      | 3              | <i>Sheeppox virus</i>              |
|            |                  | <i>Cervidpoxvirus</i>     | 1              | <i>Mule deerpox virus</i>          |
|            |                  | <i>Crocodylidpoxvirus</i> | 1              | <i>Nile crocodilepox virus</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>              |
|            |                  | Desconhecido              | 1              | <i>Squirrelpox virus</i>           |
|            |                  | <i>Yatapoxvirus</i>       | 2              | <i>Yaba monkey tumor virus</i>     |

Fonte: International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), 2011; disponível em: [www.ictvonline.org/](http://www.ictvonline.org/).

Como mostrado recentemente por SCHMIDT e colaboradores (2013), os corpúsculos laterais possuem em sua composição a fosfoproteína F17; a fosfatase com dupla especificidade VH1, que atua neutralizando a resposta produzida por interferons do tipo II no citoplasma da célula hospedeira; e G4, uma oxirredutase que é expressa tardiamente durante a infecção, sendo essencial para a morfogênese. Há ainda um revestimento lipídico extra, denominado de envelope, composto por proteínas de superfície globulares ou tubulares (Figura 1).

Estudos realizados com o protótipo VACV demonstraram que durante o ciclo replicativo dos poxvírus, partículas virais com diferentes morfologias e composição química são produzidas, que são os vírus maduros intracelulares (IMV), vírus envelopados intracelulares (IEV), vírus envelopados associados à célula (CEV) e vírus envelopados extracelulares (EEV) (MOSS, 2006) (Figura 1).



**FIGURA 1: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS PARTÍCULAS DO *Vaccinia virus*:** Eletromicrografia de transmissão das partículas de IMV, IEV e EEV (A) e suas respectivas representações esquemáticas (B). As setas indicam as membranas presentes em cada uma das partículas. Fonte: MOSS, 2006 (adaptado por BORGES, 2012).

### 1.3. Genoma

O genoma dos poxvírus compreende uma molécula de DNA linear de fita dupla (dsDNA) com um tamanho de 130-375kb, que pode variar de uma amostra viral para outra (Figura 2). O genoma possui grande capacidade codificadora e a partícula madura 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, 1989; MOSS, 2013).

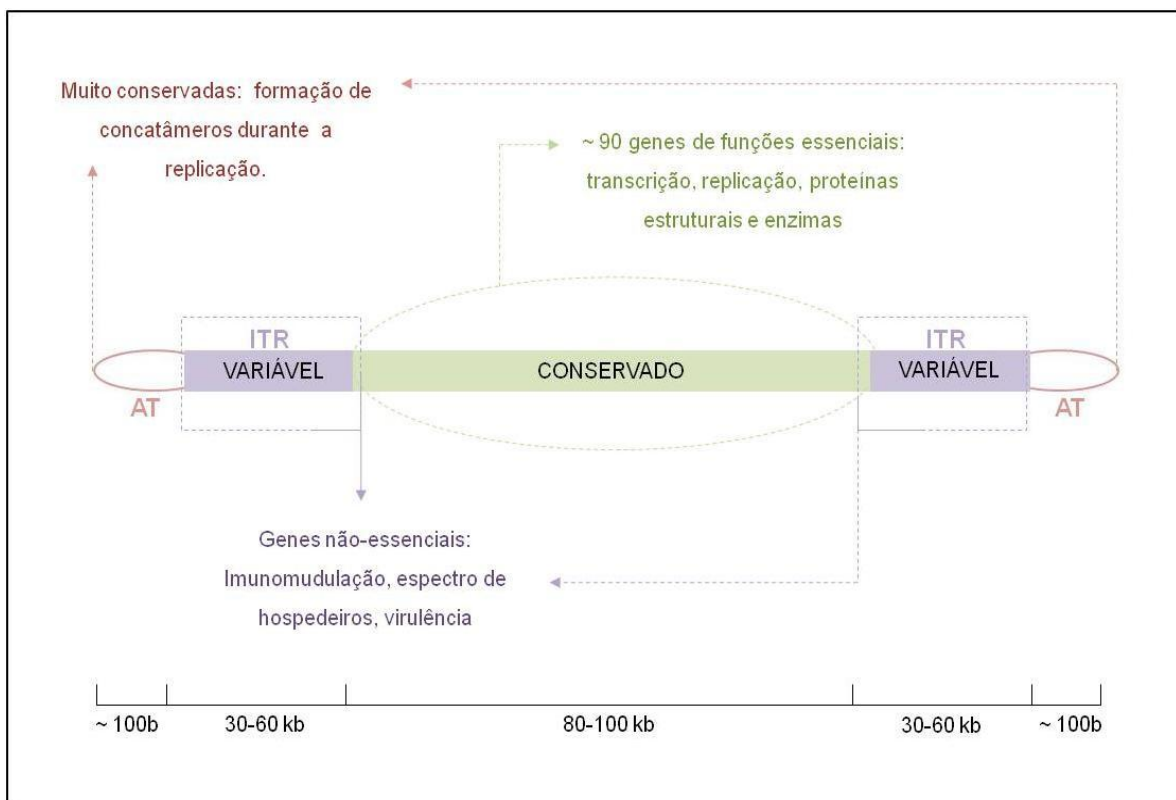
O genoma apresenta uma região central altamente conservada e regiões terminais invertidas (ITR), que consistem em sequências repetidas idênticas, com um conteúdo rico em ligações A-T e orientadas em direções opostas no genoma. As ITR têm importante função na formação de concatâmeros durante a replicação do genoma (GUBSER *et al.*, 2004; MOSS, 2013).

Os genes essenciais responsáveis pela replicação são altamente conservados entre os membros da família *Poxviridae*, e no gênero *Orthopoxvirus*, esses genes se localizam de maneira contínua no centro do genoma linear, tendo essa região



central em torno de 80 e 100 kb, com aproximadamente 90 genes. Nas ITR (com aproximadamente 50 kb) se localizam predominantemente genes relacionados aos processos de interação do vírus com seus hospedeiros, por codificarem muitas proteínas associadas à virulência e imunomodulação. As ITR podem variar de tamanho devido a deleções, repetições e transposições (GUBSER *et al.*, 2004; MCFADDEN, 2005; DRUMOND *et al.*, 2008).

Isoladamente, o DNA dos poxvirus não é infeccioso, pois a RNA polimerase viral, outras enzimas e fatores transcricionais são necessários para expressar o genoma no citoplasma (DIVEN, 2001; GUBSER *et al.*, 2004; MCFADDEN, 2005).

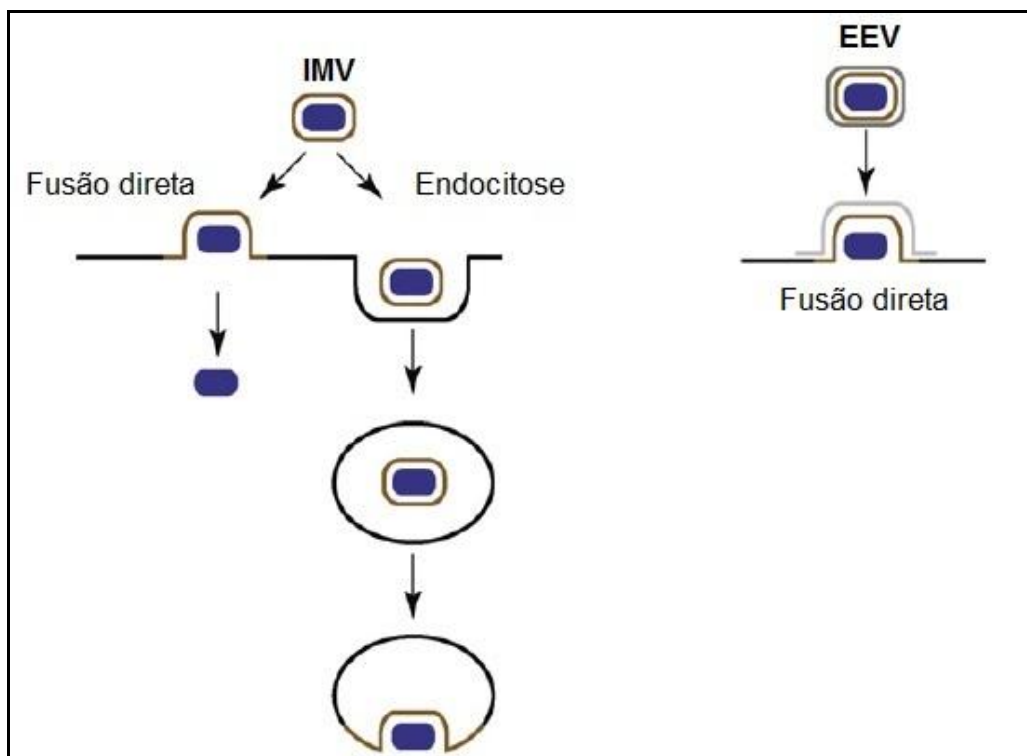


**FIGURA 2: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS E FUNCIONAIS DO GENOMA DOS POXVÍRUS:** O genoma dos poxvírus apresenta de 130 a 300kb de DNA fita dupla com as extremidades covalentemente ligadas através das alças terminais. O genoma pode ser dividido em duas partes: uma porção central, na qual os genes são bastante conservados e que codificam proteínas relacionadas a funções essenciais, tais como transcrição, replicação do genoma e morfogênese e as regiões terminais que são mais variáveis e codificam proteínas relacionadas a funções não essenciais, como espectro de hospedeiro, virulência e imunomodulação. Fonte: SMITH & MCFADDEN, 2002 – adaptado por Borges, 2012.

#### 1.4. Ciclo de multiplicação

Diferentemente da maioria dos vírus de DNA (como Mimivirus e Iridovirus, por exemplo), a multiplicação dos vírus da família *Poxviridae* ocorre inteiramente no citoplasma, sendo esta uma das características marcantes dessa família (compartilhada apenas com a família *Asfaviridae*) (ICTV, 2011). O ciclo prossegue sendo controlado, em grande parte, por fatores que são codificados pelo próprio vírus, conferindo um caráter quase autônomo de multiplicação em relação à célula hospedeira (MOSS, 2013).

Apesar de haver diferenças quanto ao processo de adsorção à célula hospedeira, os membros da família *Poxviridae* possuem a capacidade de penetrar na célula através da fusão do envelope com a membrana citoplasmática celular e ainda por endocitose, sendo que ambos os caminhos podem ser usados dependendo do tipo de partícula viral e do tipo de célula envolvida (SHCHELKUNOV *et al.*, 2005; MOSS, 2006; ROBERTS & SMITH, 2008; MOSS, 2012) (Figura 3).



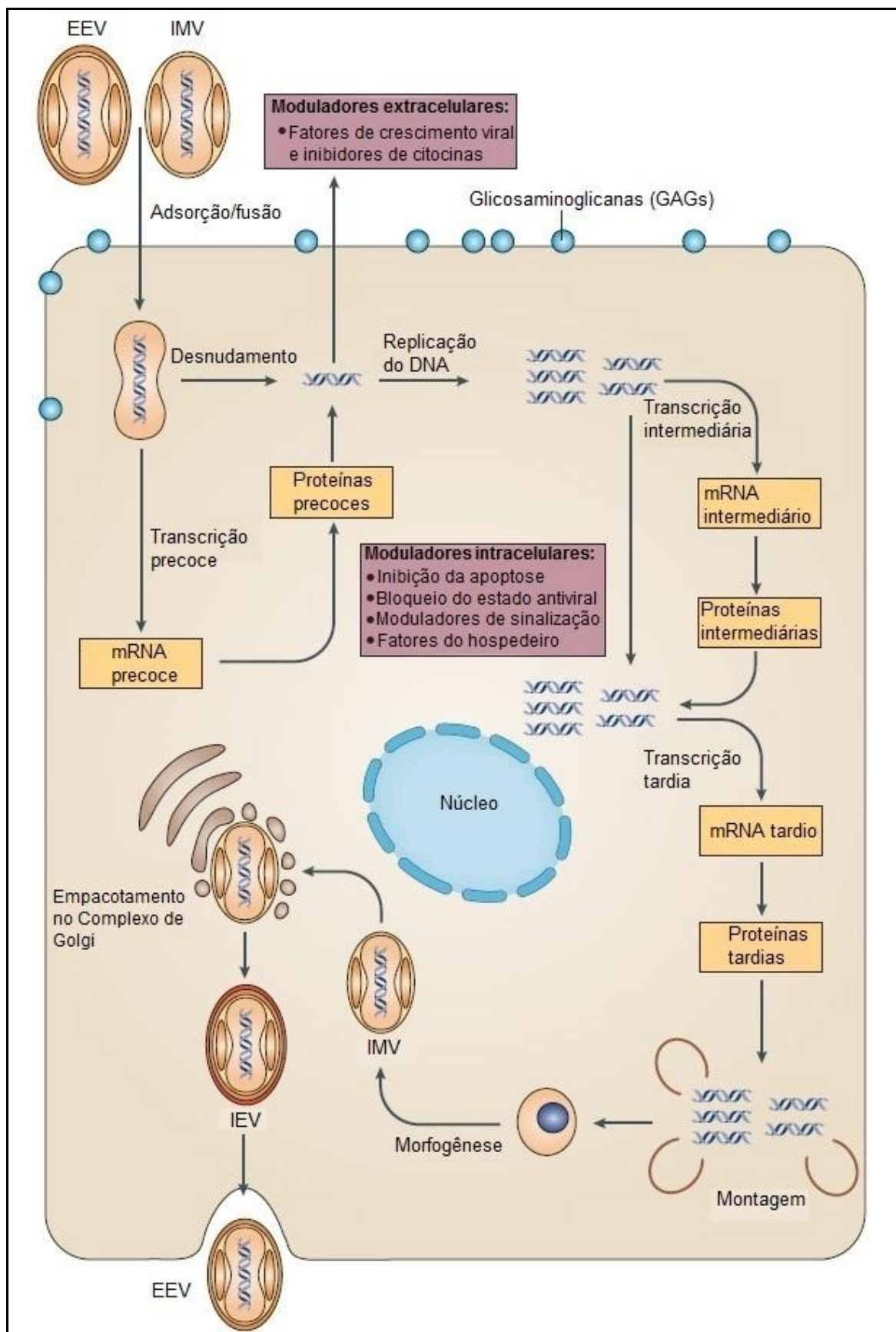
**FIGURA 3: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS DIFERENTES MODELOS PROPOSTOS DE PENETRAÇÃO DAS PARTÍCULAS DE IMV E EEV:** Existem dois modelos não-exclusivos para a entrada de IMV. O cerne viral pode ser depositado dentro do citoplasma por qualquer uma fusão direta da membrana de IMV com a membrana plasmática celular ou endocitose e / ou macropinocitose numa vesícula e em seguida, a fusão da membrana IMV com a membrana da

vesícula. EEV penetram nas células através da degradação da membrana externa do lado de fora da célula e, em seguida, a fusão da membrana do IMV formado com a membrana plasmática. (ROBERTS & SMITH, 2008 – modificado).

Quatro proteínas permitem a ligação de IMV à glicosaminoglicanas da célula hospedeira. As proteínas A27 e H3, codificadas pelos genes A27L e H3L, respectivamente, ligam-se a proteoglicanos e heparinas da superfície celular. Já a proteína D8 (gene D8L) liga-se ao sulfato de condroitina. A quarta proteína, A26 (gene A26L), está fisicamente associada com a proteína A27 e se liga à laminina na superfície celular. A fusão com a membrana celular e a penetração do cerne viral para o citoplasma requer outras proteínas transmembranas adicionais que formam um complexo conhecido como o complexo de fusão-penetração. Essas proteínas de entrada são A16, A21, A28, F9, G3, G9, H2, I2, J5, L1 e L5 (cujos genes são A16L, A21L, A28L, F9L, G3L, G9R, H2R, I2L, J5L, L1R e L5R). Foi demonstrado que as proteínas de membrana A21, H2, F9 e G9 são essenciais para penetração das partículas virais. Uma vez que mutantes negativos para essas proteínas não foram capazes de se multiplicar em sistemas *in vitro* (TOWNSLEY *et al.*, 2006; SENKEVICH *et al.*, 2004; 2005; BROWN *et al.*, 2006; MOSS, 2012; OJEDA *et al.*, 2006; VAN VLIET *et al.*, 2009).

Alguns estudos sugerem que as proteínas A25 e A26 servem como supressoras de fusão para IMV e determinam as vias de penetração de vírus específicos. Logo, IMV contendo as proteínas A25 e A26 funcionais não se fundem facilmente com a membrana plasmática celular e realizam a penetração através da via endocítica (CHANG *et al.*, 2010).

Um estudo realizado por MERCER e colaboradores (2010) evidenciou que IMV também podem penetrar na célula hospedeira através da ativação de uma complexa via de sinalização, seguida por internalização macropinocítica. Já a penetração de EEV consiste classicamente na adsorção com a célula hospedeira, seguida de fusão do envelope, ou por endocitose, ruptura da membrana externa dentro de um endossoma com pH levemente ácido, fusão do IMV formado com a membrana endossomal e liberação do cerne para o citoplasma (SANDGREN *et al.*, 2010; SCHMIDT *et al.*, 2011; MOSS *et al.*, 2012).

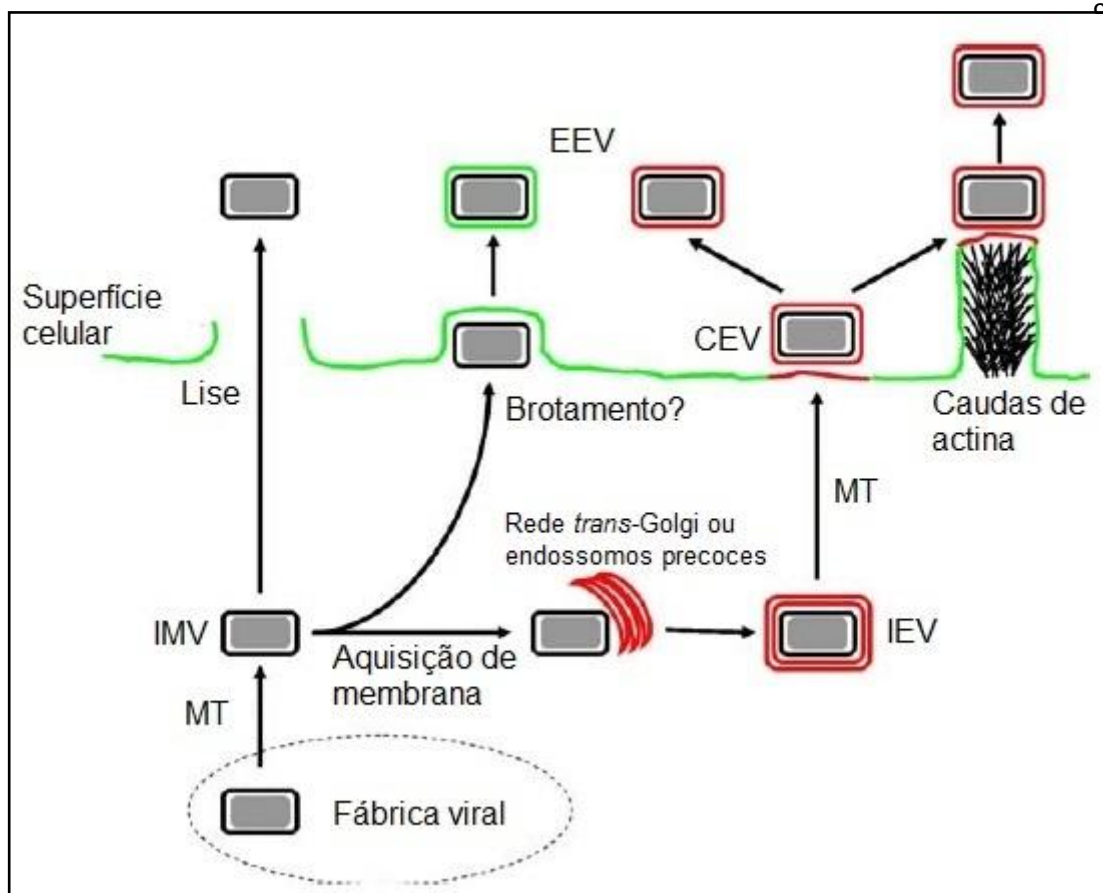


**FIGURA 4: DIAGRAMA DO CICLO DE MULTIPLICAÇÃO DOS POXVÍRUS:** As duas formas infecciosas dos poxvírus, o vírus envolvido extracelular/vírus envolvido associado à célula (EEV/CEV) e o vírus maduro intracelular (IMV), iniciam seu ciclo com a adsorção e penetração

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 propelidos 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).

Após a penetração na célula e liberação do nucleocapsídeo no citoplasma ocorre uma expressão gênica temporal, onde 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, onde o DNA começa a ser replicado, formando concatêmeros. Logo, os genes intermediários são transcritos e traduzidos, originando enzimas e fatores para a expressão dos genes tardios, que por sua vez, codificam proteínas estruturais e 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) (Figura 4). Este tipo de programação genética é conhecido como um mecanismo de cascata, porque os produtos de cada fase regulam a fase seguinte.

A morfogênese tem início em fábricas citoplasmáticas que são desprovidas de organelas celulares (Figura 5) (YODER *et al.*, 2004; MCFADDEN, 2005). As primeiras estruturas visíveis são compostas por proteínas virais e lipídeos derivados do hospedeiro. Estas estruturas dão origem a partículas esféricas, chamadas de vírus imaturos (IV). Após clivagens proteolíticas de elementos do capsídeo e condensação do cerne viral, os IV dão origem aos vírus maduros intracelulares (IMV) (MOSS, 2006; ROBERTS & SMITH, 2008). As partículas resultantes IMV representam a maioria da prole infecciosa a partir de cada célula infectada (SMITH *et al.*, 2002; ROBERTS & SMITH, 2008).

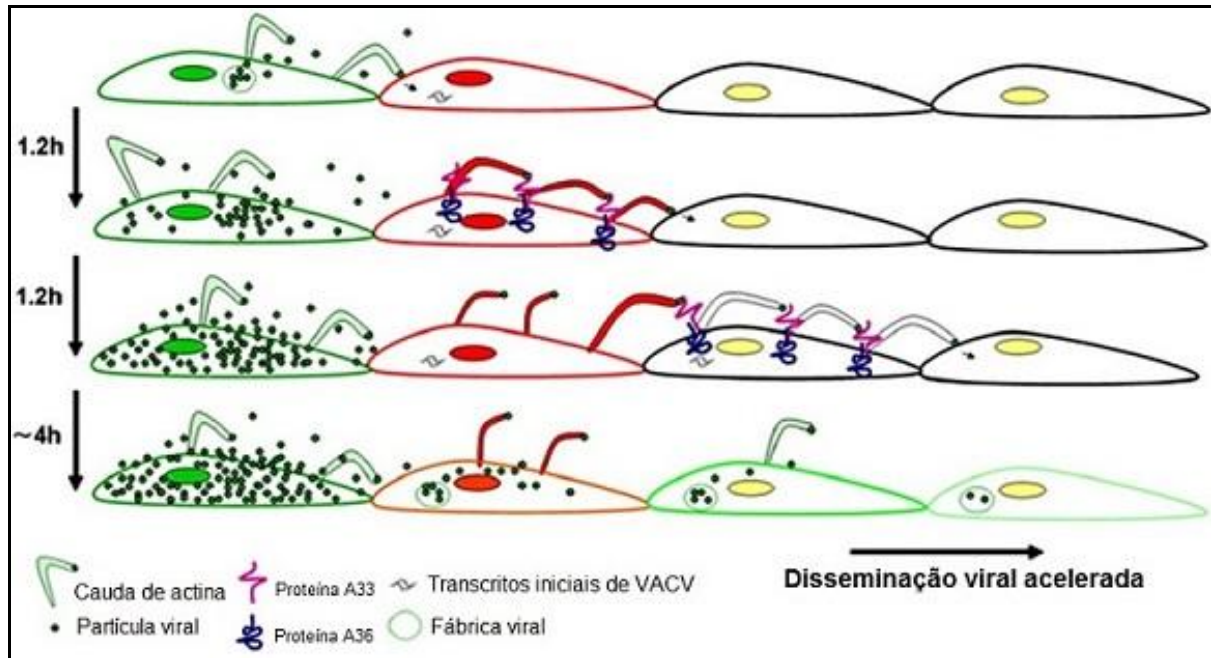


**FIGURA 5: MORFOGÊNESE DOS POXVÍRUS EVIDENCIANDO A FORMAÇÃO DAS DIVERSAS PARTÍCULAS VIRAIS DURANTE O CICLO DE MULTIPLICAÇÃO:** As partículas IMVs produzidas na fábrica viral são libertadas a partir de lise celular ou são transportadas através de microtúbulos, onde serão envolvidas por membranas intracelulares derivadas a partir da rede trans-Golgi para formar IEVs. Os IEVs são então transportadas através de microtúbulos a superfície da célula. Após a fusão da membrana externa do IEV com a membrana plasmática, uma partícula de CEV é exposta no exterior da célula por exocitose. O CEV induz a polimerização da actina por baixo da membrana plasmática e conduz os vírions para fora da célula. (SMITH *et al.*, 2004 – modificado).

A partícula IMV pode ser liberada através da lise da célula ou podem ser transportadas através dos microtúbulos até o complexo de Golgi, onde adquirem duas membranas, dando origem aos vírus envelopados intracelulares (IEV), que são partículas virais não infecciosas (Figura 5). Os IEV seguem para a periferia celular, direcionados pelos microtúbulos, e então se fundem com a membrana plasmática, formando os vírus envelopados extracelulares (EEV) (SMITH *et al.*, 2002; MOSS, 2006).

Durante o brotamento, também é possível que a membrana externa do EEV se funda com a membrana plasmática da célula, produzindo vírus envelopados associados à célula (CEV), que são importantes na dispersão viral célula-célula (SMITH *et al.*, 2002; MOS, 2006). Vale salientar que CEV pode induzir a formação de caudas de actina (Figura 6), responsáveis por impulsionar as partículas formadas

a grandes distâncias, sendo este fator importante para a rápida disseminação viral no organismo hospedeiro (DOCEUL *et al.*, 2010).



**FIGURA 6: MECANISMO RÁPIDO DE DISSEMINAÇÃO DO VACV ATRAVÉS DE CAUDAS DE ACTINA:** Modelo esquemático mostrando como VACV se dissemina rapidamente. A primeira célula infectada expressa EGFP-A5 tardiamente durante a infecção e libera vírions (verdes), que infectam uma célula vizinha expressando actina (vermelho). No início, após a infecção, as proteínas A33 e A36 são expressas na superfície da célula e marcam a mesma como infectada. Ao entrar em contato com as novas partículas de CEV/EEV, o complexo de proteínas A33/A36 induz a formação de caudas de actina, que repelem estes vírions em direção às células não infectadas. Os vírions superinfectantes podem ser repelidos a partir de múltiplas células infectadas (DOCEUL *et al.*, 2010 – modificado).

### 1.5. Patogênese

A infecção por poxvírus está associada a diversos sinais clínicos, que vão desde lesões pustulares localizadas e auto limitantes, a doenças sistêmicas generalizadas. 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, 2013; DAMON, 2013).

As infecções causadas por VACV e CPXV ocorrem através de microabrasões na pele, associadas a lesões ulcerativas nas tetas e úberes do gado, e nas mãos dos ordenhadores. Outros vírus como VARV, MPXV e *Camelpox virus* utilizam como via

de entrada o trato respiratório (MCFADDEN, 2005; MOSS, 2013; DAMON, 2013; 2011).

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.*, 1989). 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).

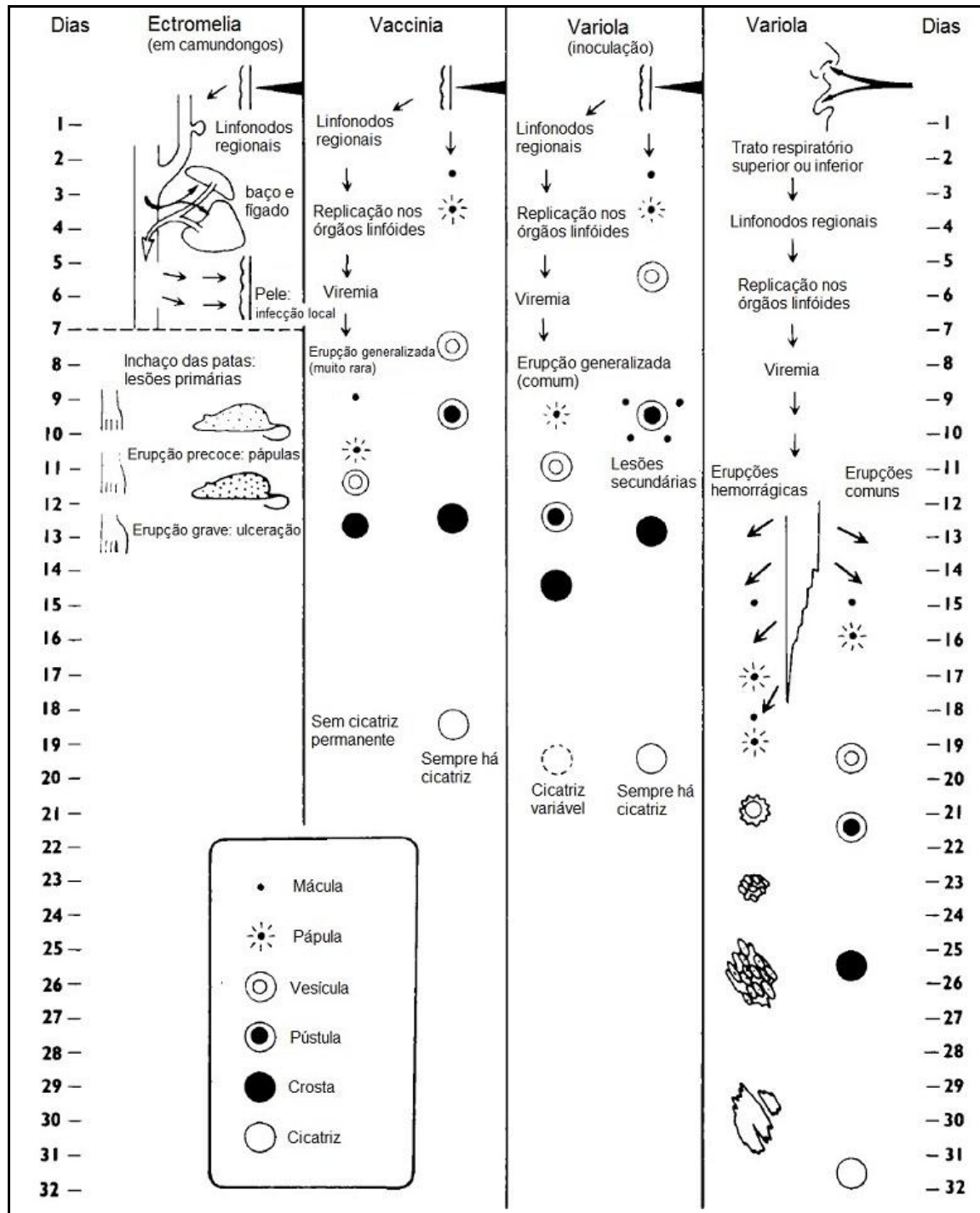
Em 1948, Fenner e colaboradores desenvolveram um modelo experimental de patogênese para os OPV envolvendo o *Ectromelia virus* (ECMV) (Figura 7). Após a multiplicação no sítio primário de infecção, o vírus alcança a corrente sanguínea causando uma viremia primária. A disseminação do vírus no organismo ocorre em associação com células sanguíneas. Essas partículas alcançam órgãos muito vascularizados, como o fígado e o baço, além dos linfonodos regionais. Após alguns dias, uma viremia secundária é observada, onde as partículas virais migram para a pele causando lesões ulcerativas generalizadas. Neste estágio, ocorre um processo de necrose avançada, observada nos tecidos esplênico, hepático e também pulmonar, acompanhado de falência múltipla de órgãos (revisado por ESTEBAN e BULLER, 2005). Vale acrescentar que este mecanismo depende da linhagem de camundongos, como Balb/c ou C57 por exemplo.

## **1.6. Aspectos clínicos**

As lesões causadas por VACV, assim como por outros *Orthopoxvirus*, apresentam-se nas formas vesiculares, 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. Outros sinais e sintomas também



estão presentes, como febre, dores de cabeça, linfadenopatia e fortes dores no local da lesão (LEWIS-JONES *et al.*, 2002; 2004; ESSBAUER *et al.*, 2010).



**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).

Na VB, o processo infeccioso se inicia pela formação de vesículas no úbere e teto de bovinos, que evoluem para a forma de pústulas com conteúdo purulento e, posteriormente, para crostas (Figuras 9 e 10). O quadro clínico do animal infectado evolui por cerca de três semanas e, além de ocorrer diminuição da produção de leite, surgem mastites que podem evoluir para a perda definitiva de parte das glândulas mamárias e, conseqüentemente, há impacto econômico significativo (TRINDADE *et al.*, 2003; LEITE *et al.*, 2005; LOBATO *et al.*, 2005; SCHATZMAYR *et al.*, 2005; SIMONETTI *et al.*, 2007; TRINDADE *et al.*, 2007a; MEGID *et al.*, 2008; TRINDADE *et al.*, 2009; ABRAHÃO *et al.*, 2010b; FONSECA *et al.*, 2011; KROON *et al.*, 2011).



**FIGURA 9:** Lesões nodulares (superiores) e ulcerativas (inferiores) presentes nos tetos de vacas infectadas pelo Vaccinia virus (MEGID *et al.*, 2008; LOBATO *et al.*, 2005).

A manipulação continuada da ordenha dos animais em produção pode causar a liberação das crostas, formando extensões hemorrágicas com certa facilidade (Figura 10) (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). Um estudo recente mostrou que a infecção pelo VACV não é localizada, ou seja, não está limitada somente no local de inoculação (como tetos das vacas por exemplo). Há também uma disseminação sistêmica do vírus, onde o DNA viral foi detectado em linfonodos, fígado e baço. Além disso, também houve detecção do DNA viral em amostras de fezes (RIVETTI JUNIOR *et al.*, 2013).



**FIGURA 10: LESÕES PRESENTES EM BEZERROS INFECTADOS PELO VACV:** (A) lesão em fase de crosta presente no focinho; (B) e (C) lesões presentes na mucosa oral; (D) lesão presente na língua (LEITE *et al.*, 2005; LOBATO *et al.*, 2005).

Em seres humanos, a evolução clínica ocorre igualmente em cerca de três semanas, com a formação e evolução de vesículas a crostas, sendo as lesões distribuídas nas mãos principalmente (Figura 11), mas também podendo ocorrer de forma mais rara nos braços e na face (Figura 12) (SILVA *et al.*, 2008). 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.*, 2010; MEDEIROS-SILVA *et al.*, 2010). Os indivíduos acometidos, geralmente ordenhadores, apresentam histórico de contato direto com ferimentos de animais infectados.



**FIGURA 11: LESÕES PRESENTES NAS MÃOS DE ORDENHADORES INFECTADOS PELO VACV: (A) e (B) Lesões ulcerativas; parte inferior: lesões em forma de crostas (TRINDADE *et al.*, 2007a; MEGID *et al.*, 2008).**



**FIGURA 12: Lesões faciais causadas pelo VACV em ordenhadores (da SILVA *et al.*, 2008).**

As manifestações clínicas de casos de *Buffalopox* descritos na Índia ocorrem de maneira semelhante à VB, bem como os aspectos epidemiológicos e de transmissão. Seres humanos adquirem a infecção através do contato direto com

búfalos infectados, principalmente durante a ordenha. Dessa forma, lesões em forma de pústulas e úlceras estão presentes nas mãos, podendo também ser encontradas na face, braços e pernas. Há também infecção bacteriana secundária (SINGH *et al.*, 2006; 2007; VENKATESAN *et al.*, 2010).

### 1.7. Diagnóstico

O diagnóstico conclusivo da Vaccínia 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 de bovinos como febre aftosa, estomatite vesicular, pseudovaríola, mamilita herpética, bem como a presença de infecção bacteriana secundária pode mascarar a VB (ABRAHÃO *et al.*, 2010; SANT'ANA *et al.*, 2013b).

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 por microscopia eletrônica, podendo ser visualizadas as partículas virais.

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; MILLER *et al.*, 2011).

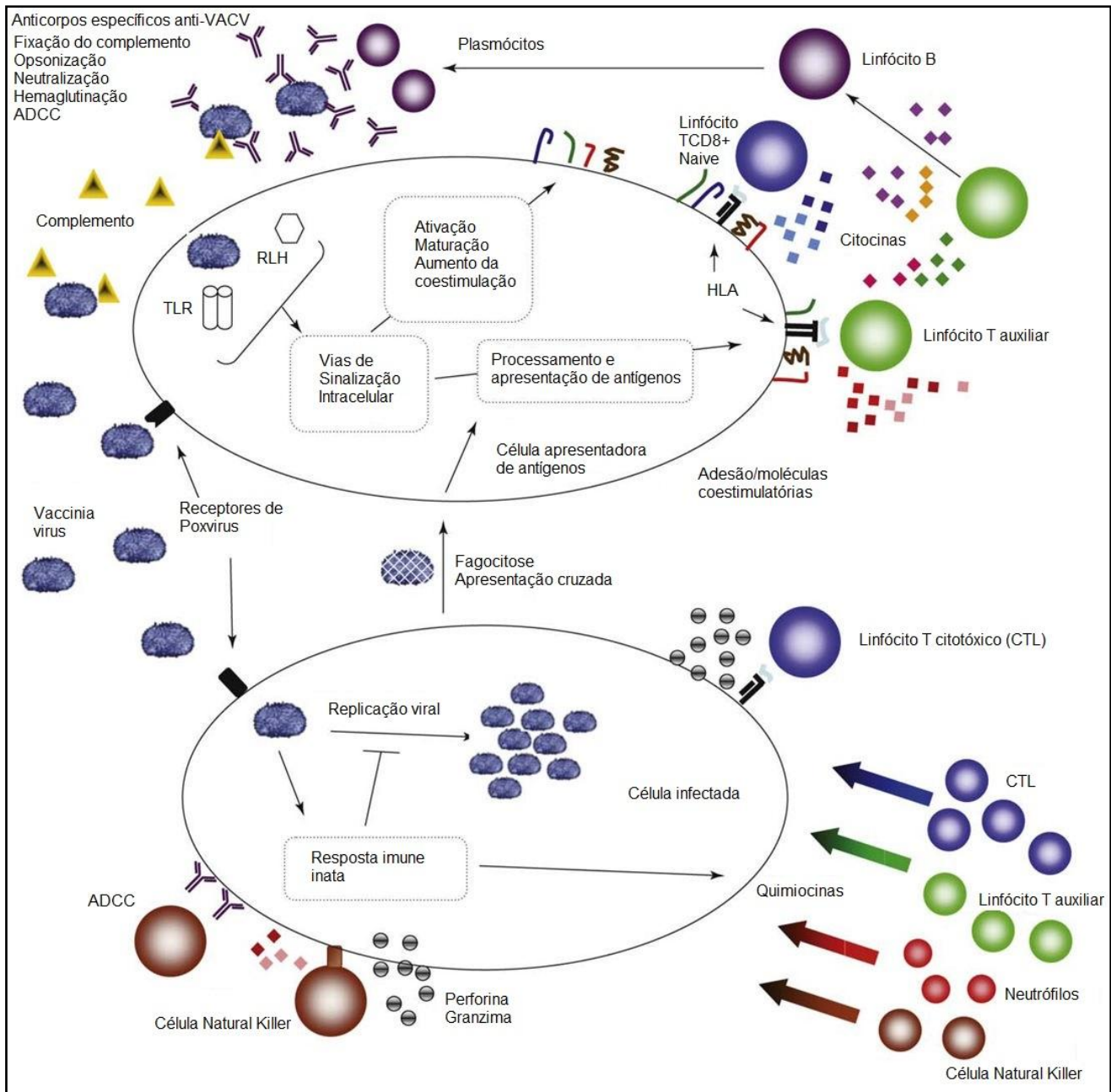
O diagnóstico molecular é de extrema importância na VB, pois além de detectar o tipo de vírus causador da infecção pode identificar variabilidades através da detecção de mutações, deleções ou inserções nos principais genes pesquisados, que são o *vgf* (*viral growth factor* – fator de crescimento viral), o *ha* (gene da hemaglutinina) e o *ati* (*A type inclusion body protein* – 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.*, 2010; ASSIS *et al.*, 2012). O material genético viral pode ser detectado diretamente das lesões (ricas em partículas virais), do sangue ou até mesmo do soro dos pacientes e animais infectados, uma vez que há viremia (NITSCHKE *et al.*, 2007). Além disso, alguns estudos indicam a presença do DNA viral em fezes e leite de animais infectados (ABRAHÃO *et al.*, 2009c; OLIVEIRA *et al.*, 2010; D'ANUNCIAÇÃO *et al.*, 2012; RIVETTI JR *et al.*, 2013).

O isolamento viral, técnica padrão ouro na detecção dos OPV, também se constitui uma importante ferramenta de diagnóstico, onde é possível a recuperação da partícula viral envolvida na infecção (LOBATO *et al.*, 2005; MEGID *et al.*, 2008; ABRAHÃO *et al.*, 2009). Entretanto, este tipo de diagnóstico é restrito a laboratórios de pesquisa, pois são necessários insumos e equipamentos de alto custo, além de profissionais extremamente especializados. Posteriormente ao isolamento é possível realizar outros estudos para melhor caracterização do vírus com seus hospedeiros (FERREIRA *et al.*, 2008; ABRAHÃO *et al.*, 2009; CAMPOS *et al.*, 2011). Do mesmo modo, o diagnóstico por microscopia de alta resolução é de difícil execução e apresenta alto custo. Em contrapartida é uma tecnologia bastante apropriada pois permite a visualização das partículas infecciosas, facilitando o diagnóstico (FONSECA *et al.*, 1998; DAMASO *et al.*, 2000; SANT'ANA *et al.*, 2013).

### **1.8. Resposta imunológica do hospedeiro**

Uma vez que o contato inicial dos OPVs com seus hospedeiros se dá pela pele ou mucosa, a resposta imune é iniciada após a penetração viral nas células epiteliais, com consequente produção de interferons (IFN) e outras citocinas, resultando na indução de um estado antiviral de células vizinhas, bem como no recrutamento de leucócitos para a área infectada (Figura 13) (SMITH & KOTWALL, 2002; DAMON *et al.*, 2007; TIAN *et al.*, 2009).



**FIGURA 13: PANORAMA GERAL DA RESPOSTA IMUNE CONTRA POXVÍRUS:** Respostas inatas não-específicas ativadas por receptores de reconhecimento padrões servem para inibir a replicação viral inicial e para ativar as células apresentadoras de antígenos. Em seguida, citocinas inflamatórias e quimiocinas atraem linfócitos efetores para os tecidos infectados. Células T auxiliares secretam citocinas (IL-4, IL-5) e sinais co-estimuladores (CD40L) para o recrutamento e maturação de linfócitos B. As células T auxiliares também promovem a ativação, expansão clonal e função efetora de linfócitos T citotóxicos através da secreção de (IL-2, IFN $\gamma$ ). Os linfócitos B produzem anticorpos que aglutinam, opsonizam e neutralizam as partículas virais, fixam o complemento e permitem a citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC). Células T CD8<sup>+</sup> ativadas lisam as células infectadas através de perforina e granzimas, e através de receptores de morte, tais como FasL. Secreção de citocinas IFN $\gamma$  e TNF $\alpha$  por linfócitos T também tem uma atividade antiviral direta. Juntas, as respostas humoral e adaptativa interrompem a replicação viral. (KENNEDY *et al.*, 2009a, com modificações). ADCC: *antibody dependent cellular cytotoxicity* (citotoxicidade celular dependente de anticorpo); CTL: linfócito T citotóxico; HLA: antígeno leucocitário humano; RLH; TLR: *toll like receptor* (receptor do tipo toll).

Após a migração celular para o tecido infectado, ocorre o reconhecimento das partículas virais por células dendríticas e macrófagos, através dos seus receptores de reconhecimento de padrões moleculares (PRR – *pattern recognition receptors*), os quais podemos citar os receptores do tipo Toll (TLR – *toll like receptors*). Além dos TLR de superfície celular, TLR citoplasmáticos também participam da resposta inata a poxvírus, reconhecendo moléculas de DNA e RNA produzidos durante a infecção (SMITH & KOTWALL, 2002; DAMON *et al.*, 2007; TIAN *et al.*, 2009).

A ativação desses receptores leva à produção de várias citocinas, como a interleucina 1 (IL-1), IL-12, fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e INF's do tipo I ( $\alpha$  e  $\beta$ ), que são mediadores proinflamatórios, além de IL-15 e IL-18 que também podem estar presentes. Essas citocinas estimulam a diferenciação das células T auxiliares (TCD4<sup>+</sup>) que estão quiescentes em células ativas produtoras de INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , que auxiliam no controle da multiplicação viral (SMITH & KOTWALL, 2002; DAMON *et al.*, 2007). Células T citotóxicas (TCD8<sup>+</sup>), importantes na eliminação de células infectadas, também são ativadas pela IL-12 e por INF's do tipo I. Juntamente com essas células, há ação de células matadoras naturais (células *natural killers* – NK). Ambas as células TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> podem persistir por até 75 anos após a vacinação contra a varíola (HAMMARLUND *et al.*, 2003).

Vale ressaltar que as células TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> desempenham um papel importante na proteção do hospedeiro no início da infecção por VACV. Segundo XU e colaboradores (2004), a imunidade mediada pelo reconhecimento de antígenos virais apresentados via MHC de classe II pelas células TCD4<sup>+</sup> é essencial para eliminação do vírus durante a infecção aguda. Neste mesmo estudo foi também demonstrado que camundongos deficientes de linfócitos B não eliminam as partículas virais de maneira eficiente. Além disso, os linfócitos TCD8<sup>+</sup> de memória podem persistir na ausência de antígeno, sendo provavelmente estimulados pelas citocinas IL-7 e IL-15, responsáveis pela sobrevivência e manutenção dessas células (AMANNA *et al.*, 2006).

A resposta imune humoral também parece ser importante para a eliminação do vírus através de diversos mecanismos. A ligação de anticorpos à partícula viral pode resultar em: 1) agregação das partícula, dificultando a disseminação do vírus; 2)



obstrução da adsorção e internalização do vírus na célula hospedeira; 3) lise da partícula viral via complemento; 4) opsonização, resultando em fagocitose do vírus; 5) ativação citotoxicidade celular dependente de anticorpos (*antibody dependent cellular cytotoxicity* – ADCC) levando à morte das células infectadas (SMITH & KOTWAL, 2002; XU *et al.*, 2004).

Os vírus do gênero *Orthopoxvirus* são antigenicamente relacionados devido à natureza altamente conservada das proteínas estruturais. Isso é possível graças à conservação do genoma, que é DNA dupla fita, permitindo que as proteínas de superfície apresentem vários epitopos conservados (JACOBS *et al.*, 2009; MILLER *et al.*, 2011; MOSS, 2011).

Vale destacar que essa similaridade antigênica entre os OPVs permitiu o sucesso da campanha de vacinação contra a varíola, onde o VACV foi utilizado vacina (JACOBS *et al.*, 2009), induzindo uma forte resposta de anticorpos neutralizantes que parecem ser o principal mecanismo efector responsável pela proteção contra a infecção secundária (AMANNA *et al.*, 2006; KENNEDY *et al.*, 2009; MOSS, 2011).

Os anticorpos específicos anti-OPV (IgG, IgM e anticorpos neutralizantes) atingem um pico um mês após a vacinação, diminuem durante o primeiro ano e, em seguida, se mantêm constantes durante longos períodos pós-vacinais (AMANNA *et al.*, 2006; KENNEDY *et al.*, 2009a). Alguns trabalhos conduzidos em modelo murino demonstraram que anticorpos específicos para as proteínas B5 e A33, (presentes na membrana das partículas virais extracelulares) e para as proteínas A27 e L1 (responsáveis pela replicação viral e adesão celular) conferem ampla proteção em infecções pelo VACV (RAMIREZ *et al.*, 2002; LUSTIG *et al.*, 2005; CHEN *et al.*, 2006).

De fato, estudos conduzidos por PUTZ e colaboradores (2005) e também por DAVIES e colaboradores (2005) demonstraram que os antígenos B5, A33, A56, A27 e H3 presentes no envelope de VACV, são os mais imunogênicos, induzindo uma forte resposta por anticorpos neutralizantes.

O possível uso do VARV como arma biológica tem causado preocupação à comunidade científica no que diz respeito à imunidade protetora da população vacinada, além daqueles indivíduos que não foram vacinados. Em 2005, HATAKEYAMA e colaboradores avaliaram o grau de proteção de uma população japonesa, verificando a persistência de anticorpos IgG e neutralizantes anti-VACV na grande maioria dos indivíduos vacinados (HATAKEYAMA *et al.*, 2005). Também no mesmo ano, um estudo populacional conduzido na Itália demonstrou uma soroprevalência de 66% entre os indivíduos analisados (PUTZ *et al.*, 2005). Entretanto, um outro estudo, realizado com uma população coreana, demonstrou que poucos dos indivíduos previamente vacinados apresentaram uma eficiente resposta imunológica específica para VACV, avaliada através dos níveis de expressão de INF- $\gamma$  (ou do mRNA de INF- $\gamma$ ) (KIM *et al.*, 2006).

A resposta imune protetora anti-OPV parece persistir por muitos anos (HAMMARLUND *et al.*, 2003; 2005; HATAKEYAMA *et al.*, 2005; KAREM *et al.*, 2005; PUTZ *et al.*, 2005; VINER & ISAACS, 2005; KIM *et al.*, 2006; PUTZ *et al.*, 2006; LIU *et al.*, 2012; TAN *et al.*, 2012). Porém, pesquisas realizadas no Brasil demonstraram que há uma diminuição dos níveis de anticorpos protetores em pessoas com histórico de vacinação, apresentando também sinais e sintomas da doença (SILVA-FERNANDES *et al.*, 2009), e que a circulação de OPV é ativa, sendo evidenciada por altas taxas de anticorpos anti-OPV em pessoas não vacinadas (SILVA-FERNANDES *et al.*, 2009; MOTA *et al.*, 2010).

Talvez, a ausência de anticorpos protetores possa estar relacionada com a diminuição da população de linfócitos T de memória, que parecem possuir uma meia-vida de até 12 anos, e que desempenham um importante papel na diferenciação dos linfócitos B e, conseqüentemente, na produção de anticorpos (HAMMARLUND *et al.*, 2003). Assim, com o avanço da idade e diminuição da população de linfócitos de memória, os anticorpos neutralizantes tendem a declinar (HSIEH *et al.*, 2004).

### 1.9. Vacinas antivariólicas

A vacinação contra a varíola, introduzida pela primeira vez por Edward Jenner há mais de 200 anos, foi a intervenção de saúde pública mais eficaz na história humana, onde inicialmente foi utilizado o CPXV derivado de vacas doentes, através da inoculação de preparados de escarificação das lesões (FENNER *et al.*, 1988).

Posteriormente, o VACV substituiu o CPXV na imunização de seres humanos na campanha de erradicação da varíola e, ainda hoje, é usado em muitos laboratórios por todo o mundo como um vetor para a geração de vacinas recombinantes capazes de expressar de forma segura as proteínas exógenas de vários agentes infecciosos (FENNER *et al.*, 1989; WISER *et al.*, 2006; JACOBS *et al.*, 2009).

As vacinas utilizadas na campanha global de erradicação da varíola consistiam de várias amostras de VACV (Dryvax<sup>®</sup> New York Board of Health [NYCBH], nas Américas; Lister, no Reino Unido e Índia; EM-63, uma variante derivada da NYCBH, utilizada na Rússia; Copenhagen na Dinamarca e Ankara, na Turquia), caracterizadas como vacinas de primeira geração, que eram inicialmente líquido extraído de uma crosta de um indivíduo infectado e posteriormente, material de pústula de animais infectados, administradas por via percutânea (FENNER *et al.*, 1988; WISER *et al.*, 2006; JACOBS *et al.*, 2009). Alguns indivíduos desenvolviam sinal clínico, caracterizado por uma pápula, seguida alguns dias depois pelo desenvolvimento de uma vesícula, e subsequentemente uma pústula e crosta, indicando uma vacinação bem sucedida (ROCK *et al.*, 2004). Ainda, sintomatologia sistêmica como febre, cefaléia, linfadenopatia e mialgia estavam presentes (FENNER *et al.*, 1988).

O uso de animais vivos para a obtenção das vacinas foi descartado por conta da qualidade e segurança do produto, surgindo assim as vacinas de segunda geração, produzidas a partir de linhagens celulares e ovos embrionados. Posteriormente, uma terceira geração de vacinas foi desenvolvida a partir da alteração das propriedades de amostras de VACV, como virulência e composição do genoma, através de múltiplas passagens em cultivos celulares, a exemplo o *Vaccinia virus Ankara* Modificado (*Modified Vaccinia Ankara* – MVA). Por fim, com o avanço da

biotecnologia, vacinas de quarta geração, que envolvem deleções, inserções ou bloqueio em genes supressores da resposta imune e essenciais para a multiplicação viral, tem sido estudadas (WISER *et al.*, 2006; JACOBS *et al.*, 2009).

No Brasil, pelo menos 4 variantes da vacina podem ter sido distribuídas durante a campanha de erradicação da varíola, que incluem a Lister, Dryvax<sup>®</sup>, NYCBH e a Paris (revisado por TRINDADE *et al.*, 2007b). Além disso, a vacina fornecida pelo Instituto Oswaldo Cruz pode ter sido originada pela vacina Paris (FENNER *et al.*, 1988; DAMASO *et al.*, 2000). Isso sugere uma possível origem de diferentes amostras isoladas em situações de surto pelo país. Entretanto, análises filogenéticas apontam para outra vertente da introdução do VACV no país, que ainda permanece controversa (FENNER *et al.*, 1988; TRINDADE *et al.*, 2007b).

#### **1.10. *Vaccinia virus***

O VACV foi o vírus utilizado como vacina contra a varíola, substituindo o CPXV. As diferentes amostras do VACV utilizadas em pesquisas clínicas apresentam diferentes níveis de risco. Amostras não atenuadas como NYCBH (New York City Board of Health), Copenhagen ou Lister, apresentam um risco maior para humanos com base no aumento da capacidade de multiplicação em células de mamíferos. Amostras altamente atenuadas como MVA (Vaccinia Modificado Ankara), NYVAC, ALVAC e TROVAC são incapazes de se multiplicarem (ou se multiplicam pobremente) em células de mamíferos, não sendo capazes de causar infecções em mamíferos (VERHEUST *et al.*, 2012).

A grande maioria dos trabalhos experimentais envolvendo o gênero *Orthopoxvirus* foi realizado tendo como base o VACV, considerado o protótipo do gênero (FENNER *et al.*, 1988). 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.*, 2007; DRUMOND *et al.*, 2008). No entanto, com a evolução da biologia molecular e obtenção de sequências genômicas completas de várias amostras do VACV, tornou-se claro se tratar de uma espécie viral distinta dos outros *Orthopoxvirus* como o VARV (GUBSER *et al.*, 2004; CARROLL *et al.*, 2011).

Durante períodos de vacinação em massa contra a varíola, o vírus podia ser isolado de lesões de pele de várias espécies de animais domésticos, havendo muitas oportunidades para a infecção ser transferida de pessoas recentemente vacinadas para esses animais, com a subsequente disseminação nos rebanhos, ou por ordenhadores agindo como vetores (ABRAHÃO *et al.*, 2010; SANT'ANA *et al.*, 2013).

A circulação natural do vírus, assim como o isolamento e caracterização de amostras de VACV têm sido descritos no Brasil desde 1999 (DAMASO *et al.*, 2000; TRINDADE *et al.*, 2003; LEITE *et al.*, 2005; LOBATO *et al.*, 2005; TRINDADE *et al.*, 2006; COSTA *et al.*, 2007; SIMONETTI *et al.*, 2007; TRINDADE *et al.*, 2007a; ABRAHÃO *et al.*, 2009; SILVA-FERNANDES *et al.*, 2009; TRINDADE *et al.*, 2009; MOTA *et al.*, 2010). Em paralelo, na Índia, vários casos de infecção humana e animal por *Buffalopox virus*, um OPV filogeneticamente muito semelhante ao VACV, vêm sendo identificados (SINGH *et al.*, 2006; 2007; BHANUPRAKASH *et al.*, 2010; DAMLE *et al.*, 2011).

Infecções com o VACV também têm sido relatadas em laboratórios, por picadas de agulha ou arranhões, devido à manipulação incorreta de material contaminado (OPENSHAW *et al.*, 1991; LOEB *et al.*, 2003; MEMPEL *et al.*, 2003; MOUSSATCHÉ *et al.*, 2003; WLODAVER *et al.*, 2004; LEWIS *et al.*, 2006; CDC, 2008; 2009; MACNEIL *et al.*, 2009; ISAACS, 2012; MCCOLLUM *et al.*, 2012) ou ainda associadas a processos de vacinação de militares nos Estados Unidos, quando estes indivíduos entram em contato direto com outros susceptíveis (NEFF *et al.*, 2002; EGAN *et al.*, 2004; VORA *et al.*, 2008; LEDERMAN *et al.*, 2009; CDC, 2007a; 2007b; 2008; 2009; 2010; 2013; YOUNG *et al.*, 2011; WERTHEIMER *et al.*, 2012).

### **1.11. Vaccinia Bovina**

A Vaccinia Bovina (VB), também conhecida como varíola bovina, é uma doença exantemática, caracterizada pelo aparecimento de lesões cutâneas localizadas nos tetos das vacas, de forma semelhante à doença causada pelo CPXV. Também podem ser observadas lesões nos lábios, focinho e cavidade oral dos bezerros que

mamam nas vacas doentes (TRINDADE *et al.*, 2003; LEITE *et al.*, 2005; LOBATO *et al.*, 2005; MEGID *et al.*, 2008). O VACV tem sido associado a surtos zoonóticos de VB em vários estados brasileiros, comprometendo milhares de vacas e grande número de ordenhadores.

Geralmente, a transmissão entre os animais se dá, principalmente, através do contato direto com lesões presentes no teto das vacas infectadas no momento em que os novilhos se alimentam. Do mesmo modo, os novilhos infectados ao mamarem, transmitem o vírus para as vacas através do contato de lábios, focinho e da mucosa oral contendo lesões vesiculares cheias de partículas virais (LOBATO *et al.*, 2005; LEITE *et al.*, 2005).

A contaminação humana ocorre pelo contato com as lesões presentes nos animais sendo, portanto, mais comum entre os ordenhadores que não utilizam proteção individual e adquirem os vírus por meio de microabrasões na pele. Do mesmo modo, a transmissão da infecção do homem para os animais se dá pelo contato entre as mãos dos trabalhadores rurais ou equipamentos de ordenha mecânica contaminados, onde as partículas virais penetram por soluções de continuidade presentes nos tetos das vacas (DAMASO *et al.*, 2000; TRINDADE *et al.*, 2003; LEWIS-JONES, 2004; LEITE *et al.*, 2005; LOBATO *et al.*, 2005; TRINDADE *et al.*, 2006; TRINDADE *et al.*, 2007; ABRAHÃO *et al.*, 2009; MEDAGLIA *et al.*, 2009; MEGID *et al.*, 2008; SILVA-FERNANDES *et al.*, 2009; TRINDADE *et al.*, 2009; ABRAHÃO *et al.*, 2010).

Além disso, a contaminação humana também pode ocorrer através de fômites no ambiente doméstico, quando há contato de indivíduos recentemente vacinados ou infectados com utensílios pessoais e de uso geral (LEDERMAN *et al.*, 2009; ASSIS *et al.*, 2012).

A possibilidade de eliminação de partículas virais no leite produzido por bovinos infectados não está totalmente esclarecida. Mas ainda sim, não é recomendável a ingestão de leite no estado *in natura* (cru) sob quaisquer hipóteses, uma vez que, segundo ABRAHÃO e colaboradores (2009c), partículas virais viáveis ou material genético do VACV podem estar presentes em amostras de leite. As partículas virais

também podem permanecer viáveis após tratamentos térmicos com altas e baixas temperaturas, no leite cru e no queijo, após infecção experimental (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

### 1.12. Epidemiologia da VB

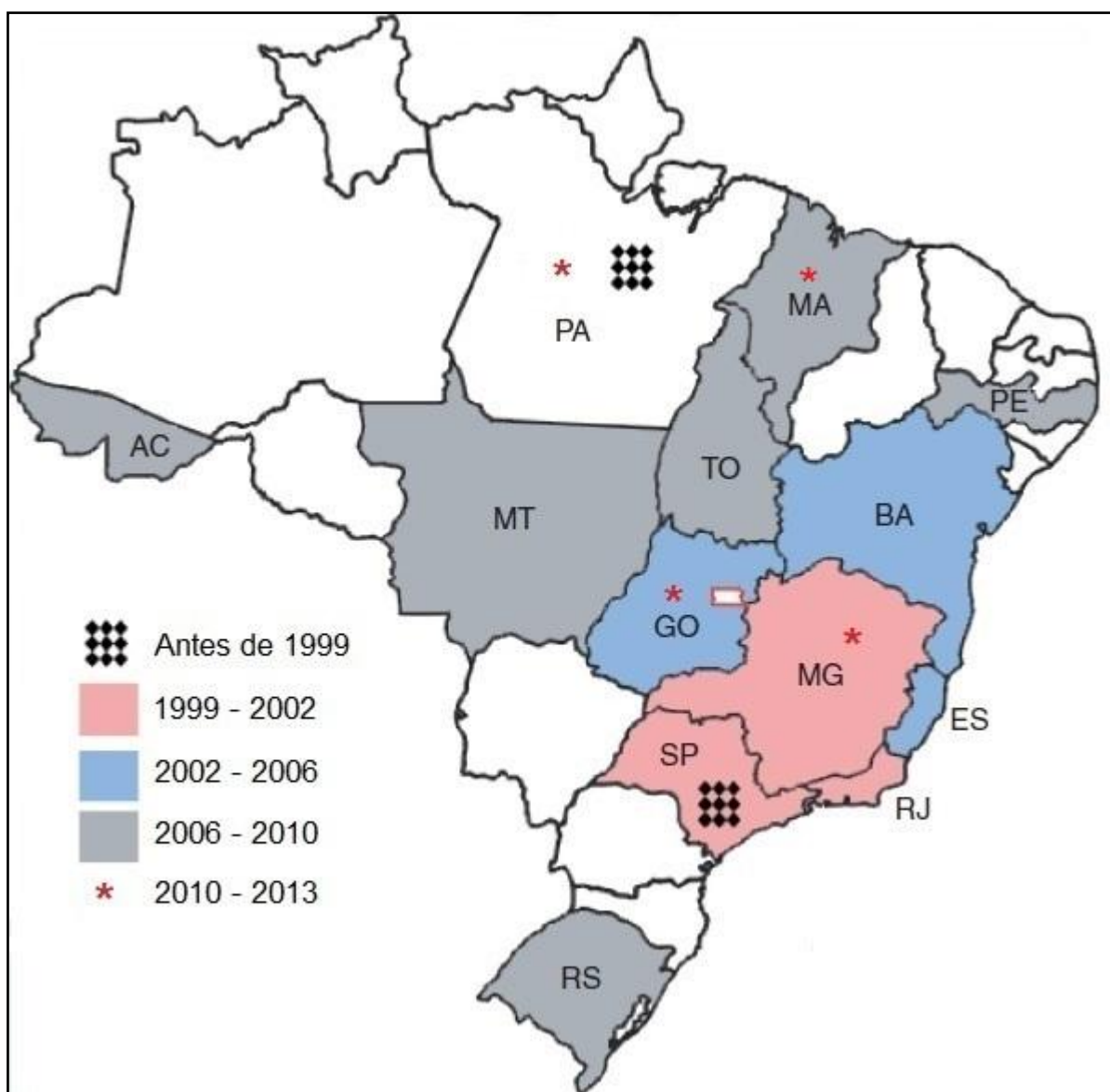
No Brasil, a Vaccinia Bovina não é uma doença de notificação compulsória, como observado para outras doenças infecciosas como a Dengue por exemplo. Os surtos são relatados através de grupos de pesquisa no país que estudam a dispersão do vírus.

Durante a década de 60 foram realizados os primeiros isolamentos do *Vaccinia virus*, obtidos através de um programa governamental de suporte a áreas rurais com registros de zoonoses virais desconhecidas (FONSECA *et al.*, 2002). Os vírus SPAn 232 (SAV) e Cotia foram isolados e re-isolados de camundongos sentinelas na estação de Cotia, São Paulo. Outro vírus chamado BeAn58058 (BAV) foi isolado a partir de um roedor silvestre do gênero *Oryzomys*, capturado na floresta de Utinga, na cidade Belém – PA. Através da biologia molecular foi possível afirmar que esses vírus se tratam de amostras de VACV (FONSECA *et al.*, 1998; MARQUES *et al.*, 2001; FONSECA *et al.*, 2002).

No ano de 1993, houve um surto de doença exantemática no Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO/UFMG), acometendo camundongos suíços que foram importados da Universidade de Campinas, São Paulo. A partir das lesões presentes nos camundongos foi possível a identificação de mais um poxvírus, denominado Belo Horizonte vírus (BHV) (DINIZ *et al.*, 2001; TRINDADE *et al.*, 2004).

A partir do final da década de 90, começaram a ser observados no Brasil sucessivos casos de infecção por VACV em bovinos e seres humanos (principalmente ordenhadores) que tiveram contato direto com animais infectados (Figura 14) (FONSECA *et al.*, 2011 com modificações). É importante salientar que até 1998 os vírus isolados foram provenientes de amostras de roedores. Em 1999 foi isolada de

vacas infectadas uma amostra de VACV na cidade de Cantagalo (estado do Rio de Janeiro), denominada de *Cantagalo virus* (CTGV). Após análises filogenéticas foi possível verificar que este vírus se aproximava da amostra vacinal VACV-IOC (Instituto Oswaldo Cruz) (DAMASO *et al.*, 2000). Também no mesmo ano, o *Araçatuba virus* (ARAV) foi isolado durante um surto de doença exantemática afetando o gado leiteiro e ordenhadores na cidade de Araçatuba (São Paulo). Após análises moleculares foi observado que o ARAV trata-se de mais uma amostra de VACV, relacionada aos outros isolados (CTGV, BeAn e Cotia), bem como de amostras vacinais (TRINDADE *et al.*, 2003).



**FIGURA 14: DISTRIBUIÇÃO DO *Vaccinia virus* NO BRASIL:** O mapa mostra a situação cronológica dos surtos e a disseminação do vírus no país. É importante ressaltar que a detecção no Acre diz respeito a um inquérito sorológico e não a surtos ou isolamento viral (FONSECA *et al.*, 2011 com modificações).



Posteriormente, em 2003, na cidade de Passatempo (Minas Gerais) foi isolada de bovinos e humanos mais uma amostra de VACV, o *Passatempo virus* (PSTV). As análises filogenéticas demonstraram uma íntima relação do PSTV com ARAV e CTGV, pois estes isolados apresentam uma mesma deleção no gene A56R, que codifica a proteína hemaglutinina (*ha*), indicando que estas amostras têm possivelmente uma origem em comum (LEITE *et al.*, 2003). Ainda na mesma época, o *Cantagalo virus* foi novamente identificado em surtos nos estados de São Paulo, Goiás e Minas Gerais, corroborando a disseminação do VACV no país (NAGASSE-SUGAHARA *et al.*, 2004).

Também no estado de Minas Gerais, outras 3 amostras de VACV foram isoladas, sendo estas o *Muriae virus* (MURV), isolado a partir de um surto de VB na cidade de Muriaé em 2000 (TRINDADE *et al.*, 2007); e os vírus Guarani P1 e Guarani P2 (GP1V e GP2V), ambos os vírus isolados durante um único surto em duas propriedades distintas na cidade de Guarani no ano de 2001 (TRINDADE *et al.*, 2006).

A partir dos isolados GP1V e GP2V uma interessante questão foi levantada a respeito da origem dos VACV isolados no Brasil. Estes apresentaram mais similaridade genética entre outras amostras de VACV do que entre si. Esta variabilidade genética pode ser corroborada por ensaios de fenótipo de placa e estudos de patogênese em camundongos (FERREIRA *et al.*, 2008; ABRAHÃO *et al.*, 2009).

Em 2008, outra amostra de VACV foi isolada durante um surto de VB ocorrido em São Paulo, afetando humanos e animais (MEGID *et al.*, 2008). No ano seguinte, mais um surto de VB foi relatado, desta vez no estado de Minas Gerais, na cidade Mariana, onde foi isolado o *Mariana virus* (MARV). É importante destacar que este foi o primeiro vírus isolado de um roedor (*Mus musculus*) durante um surto de VB, onde o mesmo também foi encontrado infectando bovinos e humanos (ABRAHÃO *et al.*, 2009).

No ano de 2010, outro fato interessante foi observado. Um surto de doença exantemática em Pelotas (Rio Grande do Sul) acometendo cavalos da raça crioula

foi descrito (BRUM *et al.*, 2010). Foram obtidas duas novas amostras de VACV, chamadas de *Pelotas virus 1* e *Pelotas virus 2* (P1V e P2V) (CAMPOS *et al.*, 2011). Após análises filogenéticas, infecções *in vitro* e de camundongos Balb/c foi possível estabelecer uma variabilidade genética entre os dois vírus como observado por TRINDADE e colaboradores (2006) em relação aos vírus Guarani P1 e Guarani P2.

Em 2011, outro surto de VB foi relatado na cidade de Serro, região norte de Minas Gerais. Os vírus isolados foram nomeados de acordo com o hospedeiro onde foram isolados: SH1V e SH2V (humanos) e SB1V (bovino). O primeiro vírus identificado nesta mesma região foi descrito por Trindade e colaboradores, em 2009.

Além de todos os isolamentos de amostras diferentes de VACV registrados desde 1999, inquéritos sorológicos também foram descritos. SILVA-FERNANDES e colaboradores em 2009 relataram aspectos clínicos e epidemiológicos de infecções por VACV em populações rurais do Rio de Janeiro, avaliando a imunidade humoral, exposição dos indivíduos, presença de sintomas e lesões nodulares. A frequência de anticorpos IgG foi de 57.4% e de anticorpos neutralizantes de 43%.

Em 2010, um inquérito sorológico foi realizado com amostras de uma população rural da região Amazônica, onde foi avaliada a imunidade humoral dos indivíduos e também fatores de exposição. Neste estudo foi observada uma soroprevalência de 27.89% em uma população de 294 indivíduos, sugerindo que há circulação do vírus nesta região (MOTA *et al.*, 2010).

Um estudo realizado por ABRAHÃO e colaboradores em 2010 demonstrou que macacos podem ser hospedeiros do VACV. Uma alta prevalência de anticorpos neutralizantes (24.4%) foi observada nesses animais (n = 344), além de DNAemia (5.2%). Mais recentemente, também foi observada uma prevalência de anticorpos neutralizantes de 31.25% em búfalos de regiões rurais de Minas Gerais (ASSIS *et al.*, 2012). Todos esses achados refletem uma elevada gama de hospedeiros do VACV, evidenciando uma ávida circulação desse vírus em regiões rurais e silvestres do país.

É importante destacar que outros surtos de OPV também foram relatados em vários estados e bacias leiteiras importantes (LOBATO *et al.*, 2005; DONATELE *et al.*, 2007; da SILVA *et al.*, 2008; MEDAGLIA *et al.*, 2009; SCHATZMAYR *et al.*, 2011; MEGID *et al.*, 2012). Recentemente, o VACV tem sido detectado causando surtos nas regiões norte, nordeste e centro-oeste do país (QUIXABEIRA-SANTOS *et al.*, 2011; ASSIS *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2013; SANT'ANA *et al.*, 2013b). Além disso, outros estudos também têm mostrado a co-infecção do VACV com vírus do gênero *Parapoxvirus* (ABRAHÃO *et al.*, 2010; SANT'ANA *et al.*, 2013a).

### **1.13. Impacto econômico**

Tendo em vista os aspectos clínicos e epidemiológicos descritos anteriormente, é notório pensar que a infecção causada pelo VACV leva a uma grande perda econômica (como discutido por vários estudos), entre as quais podem ser destacadas: grande queda na produção de leite; ocorrência de mastite e infecção bacteriana secundária, gastos com medicamentos e manutenção dos animais, acometimento de bezerros que mamam nas vacas doentes, levando a um emagrecimento dos mesmos, perda temporária de recursos humanos nas propriedades afetadas, pois o ordenhador se afasta por um determinado tempo, necessitando da contratação de um novo empregado (TRINDADE *et al.*, 2003; LEITE *et al.*, 2005; LOBATO *et al.*, 2005; TRINDADE *et al.*, 2006; TRINDADE *et al.*, 2007a).

Além disso, vale ressaltar que o estado de Minas Gerais é o maior produtor de leite do país, e que grande parte das amostras de VACV isoladas durante surtos são derivadas desse estado. Foi demonstrado ainda que amostras de leite coletadas de animais acometidos pela doença podem apresentar DNA e partículas infecciosas de VACV, o que poderia acarretar no embargo do produto (ABRAHÃO *et al.*, 2009).

Propriedades com surtos vigentes de VB são geralmente interditadas por órgãos públicos, como o Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA). Assim, os trabalhadores rurais que dependem exclusivamente desses recursos são amplamente afetados,

bem como os municípios cuja principal atividade econômica é a agropecuária e a economia leiteira.

#### **1.14. Impacto na saúde pública**

Os vírus que compõem o gênero *Orthopoxvirus* estão entre importantes micro-organismos causadores de doenças no homem gerando, assim, um grande interesse em estudos científicos.

Logo que a vacinação contra a varíola foi suspensa no Brasil a pouco mais de 30 anos, a presença de infecções em bovinos e seres humanos tem sido registrada, indicando que amostras virais de VACV estão em circulação na natureza em hospedeiros ainda não definidos (LEITE *et al.*, 2005; TRINDADE *et al.*, 2007a; TRINDADE *et al.*, 2007b). Também é importante lembrar a dificuldade que os profissionais de saúde têm em diagnosticar e lidar com essas infecções, sendo necessários mais estudos a respeito do assunto e um maior esclarecimento, a fim de evitar casos que passem despercebidos ou a recomendação de tratamentos e intervenções inapropriadas (TRINDADE *et al.*, 2007a).

Outro importante fator é que muitos profissionais da medicina veterinária e zootecnia tendem a confundir a Vaccínia Bovina com outras doenças vesiculares de bovinos, como febre aftosa, estomatite vesicular, pseudovaríola e mamilite herpética, o que pode levar à subnotificação dos casos de VB (ABRAHÃO *et al.*, 2010; SANT'ANA *et al.*, 2013).

Dessa forma, há necessidade de implantação de estratégias educativas entre os profissionais da saúde direcionadas para o diagnóstico, identificação clínica e manejo terapêutico de pacientes infectados, além da população rural, principalmente os que trabalham em regiões afetadas, com o objetivo de prevenir a infecção e reduzir a disseminação da VB em rebanhos e outras localidades.

## II. JUSTIFICATIVA

Infecções por poxvírus envolvendo bovinos e humanos após a vacinação contra a varíola, principalmente atingindo pessoas ligadas à área rural, têm sido descritas em diferentes países. No Brasil, a vaccínia bovina se destaca entre as zoonoses emergentes no país, com um crescente número de casos registrados desde o final da década de 90 e uma série de amostras de *Vaccinia virus* isoladas durante os surtos, sendo Minas Gerais um estado amplamente afetado pela VB, além de outros estados das demais regiões brasileiras.

Acredita-se que a ocorrência de vários surtos e a ampla dispersão do vírus acontecem, a princípio, pelo deslocamento dos animais e pela contratação de trabalhadores rurais temporários, todos de alguma forma evidentemente doentes ou assintomáticos, contribuindo para a manutenção da infecção. Entretanto, devido à comprovação da circulação do vírus no ambiente silvestre, a sua introdução em ambientes rurais a partir de animais silvestres não deve ser descartada.

Estes surtos causam danos à economia local e 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, bem como uma variação no quadro de funcionários, acarretando em prejuízos para o dono da propriedade e para o próprio trabalhador.

Estudos populacionais têm sido conduzidos para avaliar a duração e magnitude da resposta induzida pela vacina principalmente por causa de bioterrorismo. Outras pesquisas avaliaram a resposta imunológica de populações suscetíveis, não apenas buscando enfatizar a necessidade de investigação, mas também para fornecer informações importantes para o desenvolvimento de medidas de controle.

A grande maioria dos surtos de VACV no Brasil são zoonóticos, visto que a infecção se espalha facilmente através do contato dos trabalhadores que realizam ordenha manual e/ou mecânica em vacas infectadas, sem qualquer higiene ou segurança.

É importante mencionar que a maioria dos trabalhadores rurais infectados são indivíduos jovens e, portanto, não vacinados. Além disso, estudos apontam para um declínio na resposta imune anti-OPV conferida pela vacinação, o que contribui para a emergência da VB, visto que os ordenhadores se infectam e espalham fácil e amplamente o vírus dentro de um rebanho.

Ainda, é provável que os reservatórios naturais do VACV sejam animais silvestres, principalmente roedores, capazes de transmiti-lo para os bovinos e outros animais, favorecendo a sua manutenção na natureza e o ciclo infeccioso no campo.

A forte associação entre o *Vaccinia virus* e o ambiente rural, tendo como população vulnerável os produtores ou trabalhadores rurais que vivem em áreas onde a economia é dominada pela pecuária leiteira justifica a pesquisa deste agente, buscando não só o desenvolvimento de métodos diagnósticos mais sensíveis e específicos para detecção viral, como também a aplicação de ferramentas de diagnóstico que permitam avaliar o contato prévio e o grau de proteção, bem como o perfil de susceptibilidade da população alvo. Esta determinação é um auxílio indispensável para a medicina humana pelo desconhecimento, por parte dos profissionais de saúde, dos aspectos clínicos e epidemiológicos relacionadas às ortopoxvíroses.

O município do Serro, alvo frequente de surtos da doença, além de apresentar o cenário ideal para a ocorrência da vaccínia bovina, com inúmeras pequenas propriedades leiteiras, muitas ainda praticando a ordenha manual sem os cuidados e segurança necessários, ainda responde pela produção e consumo do famoso Queijo do Serro, produto artesanal fabricado com o leite cru. Estes aspectos peculiares da produção leiteira na bacia do Serro se caracterizam como fatores de risco para a disseminação da infecção e colocam o município em uma situação de vulnerabilidade frente à ocorrência da vaccínia bovina. Desta forma, com este trabalho procuramos conhecer o perfil da infecção na região, os fatores de risco associados à presença da infecção e à doença, e ainda fornecer dados para o estabelecimento de programas de prevenção e políticas de saúde.

### **III. OBJETIVOS**

#### **3.1. Geral**

Avaliar a ocorrência e soroprevalência do vírus da Vaccínia Bovina em duas populações distintas no Brasil, identificando os fatores de risco/exposição associados.

#### **3.2. Específicos**

- ✓ Determinar, a partir do teste de soroneutralização, a soroprevalência de anticorpos neutralizantes anti-ortopoxvírus em trabalhadores de um laboratório da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e em comunidades rurais do município do Serro, Minas Gerais;
- ✓ Determinar a ocorrência de casos clínicos humanos nas populações avaliadas e estimar a ocorrência de infecções passadas;
- ✓ Identificar os fatores de risco/exposição associados à doença clínica e à sorologia positiva (soropositivos não vacinados);

#### **4.1. ARTIGO 1: Neutralizing antibodies associated with exposure factors to *Orthopoxvirus* in laboratory workers**

DESCRIÇÃO DO ESTUDO: Após a erradicação da varíola, uma atenção vem sendo dada a outros vírus do gênero *Orthopoxvirus* (OPV), que são capazes de infectar o homem e muitas espécies de animais, a exemplo do *Vaccinia virus* (VACV), causador de uma doença exantemática conhecida por vaccínia bovina. No homem, após o contato direto com animais infectados, lesões ulcerativas e pustulares são observadas nas mãos, antebraços e face, além de febre, dor e mal estar. O VACV é amplamente utilizado na rotina científica para estudos de estrutura da partícula, interação com o hospedeiro e produção de vacinas. Geralmente, a vacinação é recomendada àqueles que manipulam o vírus e infecções podem ocorrer após o contato direto com um indivíduo recentemente vacinado ou através de exposição ao vírus em laboratório, com casos bem documentados no Brasil e Estados Unidos. O objetivo desse estudo foi investigar o status imunológico de trabalhadores de um laboratório de pesquisa, avaliando o perfil da imunidade humoral e os fatores de risco envolvidos em possíveis infecções acidentais pelo VACV. Foi realizado um inquérito epidemiológico e coletadas 50 amostras de soros humanos. Um total de 18 homens e 32 mulheres compõem a população estudada, sendo a maioria estudantes, além de professores e auxiliares técnicos, com idade variando entre 19 a 70 anos. Das características de risco avaliadas, constatou-se que 34 (68%) indivíduos têm contato direto com material contaminado por OPV como amostras clínicas, objetos pérfuro-cortantes, células e cobaias, e 29 (58%) esqueceram, em algum momento de experimentação, de usar equipamentos de proteção necessários. Vale ressaltar que 18% sofreram acidente com algum dos materiais previamente relatados, sendo que 8% apresentaram sinais e sintomas, e 16% possuem histórico de vacinação. Após o diagnóstico, foi constatado que 9 indivíduos possuem anticorpos neutralizantes anti-OPV. No Brasil, após a erradicação da varíola, a vacinação que confere imunidade anti-OPV foi interrompida e até mesmo os pesquisadores da área e profissionais de saúde não são vacinados. Sendo assim, é importante a condução de estudos dessa natureza pelo amplo risco que os poxvírus oferecem à saúde humana, bem como pela sua possibilidade de dispersão em ambientes laboratoriais e hospitalares.





## Brief report

## Neutralizing antibodies associated with exposure factors to *Orthopoxvirus* in laboratory workers



Galileu Barbosa Costa<sup>a</sup>, Elizabeth Castro Moreno<sup>b</sup>,  
Giliane de Souza Trindade<sup>a,\*</sup>, Studies Group in Bovine Vaccinia<sup>1</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Vírus, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Presidente Antônio Carlos, n° 6627, Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais CEP 31270-901, Brazil

<sup>b</sup> Fundação Hemominas, Rua Grão Pará, n° 882, Santa Efigênia, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 26 March 2013

Received in revised form 2 August 2013

Accepted 9 August 2013

Available online 20 August 2013

## Keywords:

Vaccinia virus

Occupational infection

Serological survey

## ABSTRACT

Extensive use of *Vaccinia virus* (VACV) in research has led to associated accidental human exposure in laboratories worldwide. In spite of the social and economic relevance of Bovine Vaccinia outbreaks in Brazil, national data concerning laboratory workers handling these infectious agents are relatively scarce. Therefore, a serological survey was conducted in a Brazilian laboratory to evaluate staff exposure to orthopoxviruses (OPVs). Information concerning direct work with OPVs, vaccination status and laboratory accidents was collected and correlated to serology results. This study presents an opportunity for discussion of routine procedures involving OPVs in laboratories and their intrinsic risks. Aspects of the live attenuated smallpox vaccine are also discussed.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

The family *Poxviridae* includes a group of pathogens capable of infecting a variety of organisms. It is segregated into two subfamilies: *Entomopoxvirinae*, represented by invertebrate viruses, and *Chordopoxvirinae*, with viruses that infect vertebrates. Among the genera of the subfamily *Chordopoxvirinae*, the *Orthopoxvirus* (OPV) draws attention to species like *Variola virus* (VARV), already eradicated; *Monkeypox virus* (MPXV), endemic in Africa and *Cowpox virus* (CPXV) which has been associated to several human and animal cases in Europe recently. All of these viruses are capable of significant impact on global public health [1,2].

VARV was the etiological agent of smallpox, an exanthematic disease of high morbidity and lethality. Although smallpox was declared eradicated in 1980, this status was only achieved after a global vaccination program conducted by the World Health Organization (WHO). *Vaccinia virus* (VACV) was used as a vaccine and it succeeded in producing protective immunity against smallpox due to cross antigenicity observed among OPV's species [1,3–5].

After smallpox eradication in 1980, mass vaccination was globally interrupted. The possibility of VARV use as a bioweapon motivated the United States of America (USA) to reestablish vaccination for military forces and health care professionals. The growth

of research related to OPV posed another concern and vaccination of laboratory workers is nowadays highly recommended in science centers of the USA and Europe [6–8].

Despite vaccination and specific biosecurity levels to manipulate OPVs, occupational infections in laboratories have been reported recently. These accidents usually involve direct contact during manipulation of contaminated sharp edge material. Mucosal exposure to contaminated aerosols is also a risk, especially when VACV infected animals or tissue cultures are involved. Vaccine wounds are also sources of infection as observed in cases of eczema vaccinatum and vaccinia necrosum described in US recently. Although frequently related to accidents among the USA military community, vaccinated scientists are also a risk to naïve individuals [9–16].

The natural circulation of VACV has been reported in Brazil since 1999, associated with a zoonosis called Bovine Vaccinia (BV). BV affects dairy cattle and those who work directly with bovines, either through milking procedures or veterinary health. Transmission occurs after the contact of bare hands with VACV lesions on the teats of infected cows [17]. Two atypical outbreaks involving equines were reported in 2009 and 2012 [18, LOBATO, 2012 – unpublished]. The source of infection is yet to be established as VACV infected cattle wasn't present in neither episode.

The significant social and economic impact of BV on rural areas of Brazil has inspired several VACV studies in the country. For instance, laboratories may isolate VACV from field samples, examine the biologic and molecular characterization of the virus, investigate the epidemiology of outbreaks, etc. [19–23]. National

\* Corresponding author. Tel.: +55 3134092747; fax: +55 3134436482.

E-mail address: [giliane@icb.ufmg.br](mailto:giliane@icb.ufmg.br) (G. de Souza Trindade).

<sup>1</sup> The group includes the following authors: Kennedy C. Ribeiro, Poliana O. Figueiredo, Iara A. Borges, Pedro A. Alves, Ana Paula M.F. Luiz, Paulo César P. Ferreira, Jônatas S. Abrahão, Erna G. Kroon.

research on VACV also concerns recombinant vaccines, cytology and oncology, following the current global trend.

This survey was conducted in a laboratory known for its work with VACV and other OPVs for several years. The objective was to determine staff exposure to OPV and correlate serological results with variables that might reveal unknown risks or confirm expected ones. Fifty workers among undergraduate, master's and PhD students, professors and technicians volunteered themselves to be part of the study. This study was approved by the Research Ethics Committee of UFMG under the registration protocol FR-413704.

Whole blood (in the absence of anticoagulants) was collected from all volunteers. To assess immunological data, a plaque reduction neutralizing test (PRNT) [24] was chosen, as it represents the gold standard for verifying the presence of neutralizing anti-OPV antibodies. Furthermore, neutralizing antibodies are extremely related to protective immunity against OPV(s). Sera were initially heated in a water bath at 56 °C for 30 min to denature complement system proteins and subsequently diluted in Eagle's Minimum Essential Medium (MEM) free of fetal bovine sera (FBS) to a screening ratio of 1:20. Samples were added to the same volume (1:1) of a solution containing approximately 150 plaque forming units (PFU) of VACV strain Western Reserve (WR) diluted in FBS-free MEM. The final solution (virus/serum) was homogenized and incubated for 16 h at 37 °C.

Six-well plates containing BSC-40 monolayers with approximately 90% of confluence were inoculated with virus/serum solution; plates were incubated at 37 °C for 1 h in an atmosphere supplemented with 5% of CO<sub>2</sub>. MEM supplemented with 2% FBS was added to each well in a volume sufficient to maintain cell monolayers during the subsequent incubation period of 48 h at 37 °C in atmosphere supplemented with 5% of CO<sub>2</sub>. BSC-40 monolayers were fixed with formalin at 10% and stained with crystal violet solution at 1% allowing naked eye observation of cytopathic effects.

All samples were tested in triplicate. A sample was considered positive when the average number of PFUs was lower than half the PFUs counted in the virus control (at least a 50% reduction in PFUs). The virus control (VC), also known as the negative serum control, was represented by using only FBS; it was treated as a regular serum sample and submitted to the same protocol. Each six-well plate included one well reserved for the VC and one for cell control (a negative control). Furthermore, a positive control was included by employing a human serum sample obtained during a VB outbreak.

All positive samples were titrated according to the PRNT protocol described above, with the exception of the two fold serial dilution of the sera. The last dilution in which 50% PFU reduction was observed was used as a reference to calculate the value of neutralizing units per milliliter. The value was obtained by dividing 1 mL by the volume of virus/serum solution inoculated and multiplying it by the last positive dilution value.

All volunteers were submitted to a questionnaire to obtain epidemiological information. These data were converted to variables and related to the presence or absence of neutralizing anti-OPV antibodies. Results were considered statistically significant when the Fisher's exact test resulted in a *P* value ≤ 0.05. Statistical analyses were performed using the program Open-Epi v.2.3.1.

General characteristics of the cohort are shown in Table 1. Age ranges from 19 to 70 years old. A majority of volunteers are women (64%). Graduate students represent 46%, with fifteen undergraduate students, seven technicians and five professors.

At a glance, nine PRNT<sub>50</sub> seropositive individuals (18%) are observed. Statistical analysis demonstrated that individuals who have worked in the laboratory for less than ten years are more likely not to have neutralizing anti-OPV antibodies than those who have worked over ten years (OR = 15.6, CI% = 2.3–108). A possible explanation could be the longer period of time these individuals have been exposed to an environment where OPVs are

manipulated. As showed in Table 3, experience time in laboratory is also statistically significant when compared with smallpox vaccination (*P* < 0.000). However, we cannot exclude the possibility of accidental imperceptible contamination within this group, working as a boost to the maintenance of immune response. Moreover, biosafety issues have changed much in the past decade. The increased use of personal protection equipment (PPE) and related technologies may be responsible for the greater number of seronegative individuals among recent workers.

As observed in Table 2, previous history of smallpox vaccination is significantly related to the presence of neutralizing antibodies (OR = 5.4, CI% = 283.9). Table 2, additionally, demonstrates vaccinated individuals with antibody titers ranging from 200 to 800 NU/mL, a much smaller range compared to those of accidentally exposed individuals (from 200 to ≥ 6400 NU/mL). This disparity may reflect the exposure dose or time elapsed since the exposure (accidental or vaccine). One seropositive individual injured had your ocular mucosa exposed, and 2 individuals had their oral mucosa, all of them with diluted virus solution. Accidents occurred in 1987 with one seropositive individual and in 2010 with two. Older accident could be related to insufficient laboratory protection in that time. This individual reported fever, lymphadenopathy and lesion development. Recent accidents are associated to the neglected use of PPE. Other seronegative individuals had similar accidents, except one, that was bitten by a VACV infected guinea pig.

It is known that all seropositive vaccinated individuals were vaccinated before 1980 during smallpox eradication campaign. The long-term immunity conferred by smallpox vaccination is related to neutralizing antibodies, which are correlated with protective immunity [25–28] and is observed among six of eight immunized subjects. The two vaccinated but seronegative individuals were immunized less than fifteen years ago with the Dryvax vaccine; neither presented the characteristic lesion produced on the left arm after VACV inoculation. A smallpox vaccine scar however, was observed in only four of the six seropositive vaccinated individuals.

Accidents during OPV manipulation are not statistically a risk when OPV exposure is evaluated through PRNT. Although it suggests the rules imposed by this biosecurity level 2 laboratory are effective, one cannot disregard the three individuals who became seropositive after accidents. It is important to evaluate the cohort statistically, but in this specific situation the event itself matters as much as a low *P* value. Two of the seropositive individuals described systemic nonspecific symptoms after OPV exposure. As evidenced by their high titers, they may have been more than exposed, but productively infected.

In this question, it is also important to consider OPV exposition in field works. Though individuals use recommended biosafety protocols and PPE, they deal with unknown viral load in sick animals and people, beyond wild environment with potentials unknown hosts.

VACV productive infection in laboratory workers may generate economic and public health onus [12]. When the amount of research involving mutant OPV based vaccines and oncolytic agents are considered, responsibility far beyond what is currently managed may emerge. Infected individuals easily spread virus to the environment through the inoculation site and possible recombination among different VACV may generate unexpected mutants or reversion to virulence of initially attenuated strains. Any unintended transmission event should be avoided, even though the risk applies to a small number of individuals. Epidemiology has proven that a single infected human is all it takes to spark a severe outbreak involving several dairy properties and hundreds of human and bovine hosts in Brazil [17–20,22,23].

In Brazil there are no data concerning the number of researchers working with OPVs. National education regarding the natural circulation of VACV among dairy cattle is exclusive to small specific VACV

**Table 1**  
Serology related to demographic variables.

| Variables                     | Tested individuals, n (%) <sup>a</sup> | PRNT positive individuals, n (%) | PRNT negative individuals, n (%) | P value <sup>b</sup> |
|-------------------------------|--|----------------------------------|----------------------------------|----------------------|
| Age                           |  |                                  |                                  |                      |
| <26 years                     | 29 (58)                                | 1 (4.8)                          | 21 (72.4)                        | 0.06                 |
| ≥26 years                     | 21 (42)                                | 8 (27.6)                         | 20 (95.2)                        |                      |
| Gender                        |  |                                  |                                  |                      |
| Female                        | 32 (64)                                | 6 (18.8)                         | 26 (81.2)                        | 1.00                 |
| Male                          | 18 (36)                                | 3 (16.7)                         | 15 (83.3)                        |                      |
| Occupation                    |  |                                  |                                  |                      |
| Professor                     | 5 (10)                                 | 2 (40)                           | 3 (60)                           | 0.334                |
| Technician                    | 7 (14)                                 | 1 (14.3)                         | 6 (85.7)                         |                      |
| Graduate student <sup>c</sup> | 23 (46)                                | 5 (21.8)                         | 18 (78.2)                        |                      |
| Undergraduate student         | 15 (30)                                | 1 (6.7)                          | 14 (93.3)                        |                      |
| Experience in the laboratory  |  |                                  |                                  |                      |
| <10 years                     | 44 (88)                                | 5 (11.4)                         | 39 (88.6)                        | 0.007                |
| ≥10 years                     | 6 (12)                                 | 4 (66.7)                         | 2 (33.3)                         |                      |
| Total                         | 50 (100)                               | 9 (18)                           | 41 (82)                          | –                    |

<sup>a</sup> The % represents frequency of tested individuals per category.<sup>b</sup> Fisher's exact test.<sup>c</sup> In Brazil this group includes master's, doctoral and post-doctoral students.**Table 2**  
Serology related to OPV possible exposure events.

| Variables                              | Tested individuals, n (%) <sup>a</sup> | PRNT positive individuals, n (%) | P value <sup>b</sup> | Seropositive individuals |                     |   |
|--|--|----------------------------------|----------------------|--------------------------|---------------------|---|
|  |  |                                  |                      | ID                       | Exposure event      | PRNT <sub>50</sub> titer (NU/mL) <sup>c</sup> |
| Works with OPV                         |  |                                  |                      |                          |                     |   |
| Yes                                    | 30 (60)                                | 7 (77.8)                         | 0.285                | 1                        | Smallpox vaccine    | 400   |
| No                                     | 20 (40)                                | 2 (22.2)                         |                      |                          |                     |   |
| Contact with OPV contaminated material |  |                                  |                      |                          |                     |   |
| Yes                                    | 34 (68)                                | 7 (77.8)                         | 0.699                | 2                        | Smallpox vaccine    | 400   |
| No                                     | 16 (32)                                | 2 (22.2)                         |                      |                          | 3                   | Unknown                                       |
| Accident during OPV manipulation       |  |                                  |                      |                          |                     |   |
| Yes                                    | 9 (18)                                 | 3 (33.3)                         | 0.334                | 4                        | Laboratory accident | ≥6400   |
| No                                     | 41 (82)                                | 6 (66.7)                         |                      |                          | 5                   | Smallpox vaccine & laboratory accident        |
| Contact with BV outbreaks              |  |                                  |                      |                          |                     |   |
| Yes                                    | 12 (24)                                | 3 (33.3)                         | 0.668                | 6                        | Smallpox vaccine    | 400   |
| No                                     | 38 (76)                                | 6 (66.7)                         |                      |                          | 7                   | Laboratory accident                           |
| Smallpox vaccination history           |  |                                  |                      |                          |                     |   |
| Yes                                    | 8 (16)                                 | 6 (66.7)                         | <0.000               | 8                        | Smallpox vaccine    | 800   |
| No                                     | 42 (84)                                | 3 (33.3)                         |                      |                          | 9                   | Smallpox vaccine                              |
| Total                                  | 50 (100)                               | 9 (100)                          | –                    | –                        | –                   | –   |

<sup>a</sup> % for tested individuals is represented by category and % for PRNT positive individuals is represented by rows.<sup>b</sup> Fisher's exact test.<sup>c</sup> Neutralizing units.**Table 3**  
Smallpox vaccination history related to others OPV possible exposure events<sup>a</sup>.

| Variables                              | Tested individuals, n (%) | PRNT positive individuals, n (%) | Smallpox vaccination history, n (%) <sup>b</sup> | P value <sup>c</sup> |
|--|---------------------------|----------------------------------|--|----------------------|
| Works with OPV                         |                           |                                  |  |                      |
| Yes                                    | 30 (60)                   | 7 (77.8)                         | 7 (87.5)   | 0.123                |
| No                                     | 20 (40)                   | 2 (22.2)                         | 1 (12.5)   |                      |
| Contact with OPV contaminated material |                           |                                  |  |                      |
| Yes                                    | 34 (68)                   | 7 (77.8)                         | 7 (87.5)   | 0.409                |
| No                                     | 16 (32)                   | 2 (22.2)                         | 1 (12.5)   |                      |
| Accident during OPV manipulation       |                           |                                  |  |                      |
| Yes                                    | 09 (18)                   | 3 (33.3)                         | 2 (25)   | 0.623                |
| No                                     | 41 (82)                   | 6 (66.7)                         | 6 (75)   |                      |
| Contact with BV outbreaks              |                           |                                  |  |                      |
| Yes                                    | 12 (24)                   | 3 (33.3)                         | 4 (50)   | 0.082                |
| No                                     | 38 (76)                   | 6 (66.7)                         | 4 (50)   |                      |
| Experience in the laboratory           |                           |                                  |  |                      |
| <10 years                              | 44 (88)                   | 5 (55.6)                         | 6 (75)   | <0.000               |
| ≥10 years                              | 6 (12)                    | 4 (44.4)                         | 2 (25)   |                      |
| Total                                  | 50 (100)                  | 9 (100)                          | 8 (100)  | –                    |

<sup>a</sup> All % represents frequency of tested individuals per category.<sup>b</sup> Column four refers to total number of individuals indicated in column two.<sup>c</sup> Fisher's exact test. Just related between variables and vaccinated individuals.

endemic areas and specific health care professionals. Although the use of live attenuated VACV vaccines is controversial, it still represents the best available prophylaxis, as observed in USA where second generation ACAM2000™ vaccine is successfully used. New generation vaccine, Modified Vaccinia Ankara (MVA), associated to mild adverse effects in mammal's cells, also poses as a strong candidate although it is still on clinical trial [5]. Nevertheless, no distribution policy occurs in places other than the USA and Europe.

### Acknowledgments

We thank João Rodrigues dos Santos and colleagues from the Laboratório de Vírus (ICB-UFMG) for their excellent technical support. We also thank Ginny Emerson from CDC for manuscript reviewing. Financial support was provided by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG). GS Trindade, PCP Ferreira and EG Kroon are researchers from CNPq.

### References

- [1] Moss B. Poxviridae: the viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PP, editors. *Fields virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p. 2906–30.
- [2] Essbauer S, Pfeffer M, Meyer H. Zoonotic poxviruses. *Vet Microbiol* 2010;140:229–36.
- [3] Fenner F, Henderson DA, Arita I, Jezec Z, Ladnyi ID. *Smallpox and its eradication*. Geneva: World Health Organization; 1988.
- [4] Damon IK. Poxviruses. In: Knipe DM, Howley PP, editors. *Fields virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p. 2947–75.
- [5] Jacobs BL, Langland JO, Kibler KV, Denzler KL, White SD, Holechek SA, et al. Vaccinia virus vaccines: past, present and future. *Antivir Res* 2009;84(1):1–13.
- [6] Strikas RA, Neff LJ, Rotz L, Cono J, Knutson D, Henderson J, et al. US civilian smallpox preparedness and response program, 2003. *Clin Infect Dis* 2008;46:157–67.
- [7] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Vaccinia (smallpox) vaccine – recommendations of the advisory committee on immunization practices (ACIP). *Morb Mortal Wkly Rep* 2001;50:RR-10.
- [8] Isaacs SN. Working safely with vaccinia virus: laboratory technique and review of published cases of accidental laboratory infections. *Vaccinia virus and poxvirology: methods and protocols*, chapter 1. *Method Mol Biol* 2012;890:1–21.
- [9] Openshaw PJM, Alwan WH, Cherrie AH, Record FM. Accidental infection of laboratory worker with recombinant vaccinia virus. *Lancet* 1991;338:459.
- [10] Loeb M, Zando I, Orvidas MC, Bialachowski A, Groves D, Mahoney J. Laboratory-acquired vaccinia infection. *Can Commun Dis Rep* 2003;29:134–6.
- [11] Mempel M, Isa G, Klugbauer N, Meyer H, Wildi G, Ring J, et al. Laboratory acquired infection with recombinant vaccinia virus containing an immunomodulating construct. *J Invest Dermatol* 2003;120:356–8.
- [12] Moussatché N, Tuyama M, Kato SEM, Castro APV, Njaine B, Peralta RH, et al. Accidental infection of laboratory worker with vaccinia virus. *Emerg Infect Dis* 2003;9:724–6.
- [13] Lewis FMT, Chernak E, Goldman E, Li Y, Karem K, Damon IK, et al. Ocular vaccinia infection in laboratory worker, Philadelphia, 2004. *Emerg Infect Dis* 2006;12:134–7.
- [14] Lederman E, Miramontes R, Openshaw J, Olson VA, Karem LK, Marcinek J, et al. Eczema vaccinatum resulting from the transmission of vaccinia virus from a smallpox vaccinee: an investigation of potential fomites in the home environment. *Vaccine* 2009;27:355–7.
- [15] Vora S, Damon I, Fulginiti V, Weber SG, Kahana M, Stein SL, et al. Severe eczema vaccinatum in a household contact of a smallpox vaccine. *Clin Infect Dis* 2008;46:1555–61.
- [16] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Progressive vaccinia in a military smallpox vaccine – United States, 2009. *Morb Mortal Wkly Rep* 2009;58(19):532–6.
- [17] Kroon EG, Mota BEF, Abrahão JS, Fonseca FG, Trindade GS. Zoonotic Brazilian vaccinia virus: from field to therapy. *Antivir Res* 2011;92(2):150–63.
- [18] Brum MCS, dos Anjos BL, Nogueira CEW, Amaral LA, Weiblen R, Flores EF. An outbreak of orthopoxvirus-associated disease in horses in southern Brazil. *J Vet Diagn Invest* 2010;22:143–7.
- [19] Damaso CRA, Esposito JJ, Condit RC, Moussatché N. An emergent poxvirus from humans and cattle in Rio de Janeiro State: cantagalo virus may derive from Brazilian smallpox vaccine. *Virology* 2000;277:439–49.
- [20] Nagasse-Sugahara TK, Kisielius JJ, Ueda-Ito M, Curti SP, Figueiredo CA, Cruz AS, et al. Human vaccinia-like virus outbreaks in São Paulo and Goiás States Brazil: virus detection, isolation and identification. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 2004;46:315–22.
- [21] Mota BEF, Trindade GS, Diniz TC, Silva-Nunes M, Braga EM, Urbano-Ferreira M, et al. Seroprevalence of orthopoxvirus in an Amazonian rural village, Acre, Brazil. *Arch Virol* 2010;155:1139–44.
- [22] Schatzmayr HG, Costa RVC, Gonçalves MCR, D'Andréa PS, Barth OM. Human and animal infections by vaccinia-like viruses in the state of Rio de Janeiro: a novel expanding zoonosis. *Vaccine* 2011;29:65–9.
- [23] Megid J, Borges IA, Abrahão JS, Trindade GS, Appolinário CM, Ribeiro MG, et al. Vaccinia virus zoonotic infection, Sao Paulo State, Brazil. *Emerg Infect Dis* 2012;18:189–91.
- [24] Newman FK, Frey SE, Blevins TP, Mandava M, Bonifacio Jr A, Yan L, et al. Improved assay to detect neutralizing antibody following vaccination with diluted or undiluted vaccinia (Dryvax) vaccine. *J Clin Microbiol* 2003;41:3154–7.
- [25] Hammarlund E, Lewis MW, Hansen SG, Strelow LI, Nelson JA, Sexton GJ, et al. Duration of antiviral immunity after smallpox vaccination. *Nat Med* 2003;9:1131–7.
- [26] Hatakeyama S, Moriya K, Saijo M, Morisawa Y, Kurane I, Koike K, et al. Persisting humoral antiviral immunity within the Japanese population after the discontinuation in 1976 of routine smallpox vaccinations. *Clin Diagn Lab Immunol* 2005;12:520–4.
- [27] Putz MM, Alberini I, Midgley CM, Manini I, Montomoli E, Smith GL. Prevalence of antibodies to vaccinia virus after smallpox vaccination in Italy. *J Gen Virol* 2005;86:2955–60.
- [28] Viner KM, Isaacs SN. Activity of vaccinia-virus-neutralizing antibody in the sera of smallpox vaccinees. *Microbes Infect* 2005;7:579–83.

## 4.2. ARTIGO 2: Alternative Routes of Zoonotic Vaccinia Virus Transmission, Brazil

DESCRIÇÃO DO ESTUDO: O *Vaccinia virus* (VACV) foi usado como vacina durante a campanha de erradicação da varíola, atualmente sendo restrito a trabalhadores de laboratório e militares nos Estados Unidos e alguns países da Europa. Infecções acidentais através do contato com pessoas recentemente vacinadas também têm sido relatadas. No Brasil, VACV é responsável por uma doença exantemática conhecida por Vaccinia Bovina (VB) que acomete bovinos e humanos. O objetivo é relatar um caso de transmissão intrafamiliar após um surto de VB. Foram coletadas amostras de soro de uma família (pai, mãe e 3 filhas) que vive numa região rural endêmica para VB no estado de Minas Gerais e também amostras de swab do pai que apresentava lesões semelhantes às aquelas observadas nos surtos de VB. Ele também relatou sinais e sintomas como febre, dor de cabeça, mialgia e linfadenopatia. Dados epidemiológicos também foram avaliados. O isolamento viral a partir da amostra de swab foi negativo. A sorologia foi feita através do ensaio de neutralização viral por redução de placa. Três pacientes (pai, mãe e uma filha) foram positivos, com títulos de anticorpos entre 800 to 3200 unidades neutralizantes/mL. Por PCR em tempo real todas as amostras foram positivas (com exceção de uma filha). Os dados epidemiológicos mostraram que o pai e a mãe foram vacinados contra varíola e possuem marca vacinal. Ainda, eles têm contato com bovinos e equídeos, e apenas o pai pratica a ordenha. As filhas não praticam nenhuma atividade que demonstra exposição ao VACV. VB é uma doença infecciosa emergente relatada com frequência no Brasil, entretanto, medidas de controle para evitar a disseminação ambiental do vírus não são bem conhecidas em populações rurais. Este trabalho evidencia um pequeno surto de VB e sugere uma possível transmissão intrafamiliar, uma vez que foi detectada DNAemia e anticorpos em duas filhas sem histórico de exposição ao VACV. Este caso reflete a falta de conhecimento em relação à da disseminação de VB em áreas rurais.

10. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol.* 2011;28:2731–9. <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msr121>

Address for correspondence: Rongliang Hu, Academy of Military Medical Sciences, 666 Liuying West Rd, Jingyue Economy Development Zone, Changchun 130122, China; email: ronglianghu@hotmail.com

## Alternative Routes of Zoonotic Vaccinia Virus Transmission, Brazil

Galileu B. Costa, Iara A. Borges, Pedro A. Alves, Júlia B. Miranda, Ana Paula M.F. Luiz, Paulo C.P. Ferreira, Jônatas S. Abrahão, Elizabeth C. Moreno, Erna G. Kroon, Giliane de Souza Trindade

Author affiliations: Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil (G.B. Costa, I.A. Borges, P.A. Alves, J.B. Miranda, A.P.M.F. Luiz, P.C.P. Ferreira, J.S. Abrahão, E.G. Kroon, G. de Souza Trindade); Fundação Hemominas. Belo Horizonte (E.C. Moreno)

DOI: <http://dx.doi.org/10.3201/edit2112.141249>

**To the Editor:** Vaccinia virus (VACV) causes exanthematous disease (bovine vaccinia) in Brazil. Outbreaks of this disease in humans have been reported since the late 1990s and have spread throughout Brazil (1). Natural human infections with VACV occur by close contact with infected cattle during milking. Lesions can spread to secondary body sites (forearms, arms, and face). Thus, person-to-person transmission occurs (1).

Moreover, virus can persist in household environments, remain infectious, and be transmitted by fomites (2). Although raw milk and cheese are potential sources of infection, no clinical cases have been associated with this transmission route (3,4). Data for person-to-person transmission in Brazil are scarce, but person-to-person transmission was recently reported (5). We report a possible case of person-to-person transmission of VACV.

This study was approved by the Research Ethics Committee of Universidade Federal de Minas Gerais (registration protocol FR-413704). In September 2012, during a serologic survey in a rural area of Serro City (18°36'17"S, 43°22'46"W), Minas Gerais, Brazil (online Technical Appendix Figure, panel A, <http://wwwnc.cdc.gov/EID/article/21/12/14-1249-Techapp1.pdf>), blood samples were obtained from a family of 5 persons (father, mother, and 3

daughters). The father and mother were 48 and 53 years of age, respectively, and had been vaccinated against smallpox. They reported contact with cows and horses (online Technical Appendix Table 1). Only the father had milked cows. The 3 daughters (13, 13, and 14 years of age) did not engage in any exposure activity. However, all family members had consumed raw milk and cheese.

Bovine vaccinia lesions were observed on the hand of the father (online Technical Appendix Figure, panel B). In 2011, he had vesicular disease (no laboratory diagnosis) with clinical and epidemiologic features (lesions) suggestive of bovine vaccinia on his hands and forearms and systemic symptoms (fever, headache, malaise, myalgia, lymphadenopathy, and abdominal pain). His symptoms were mild and without any systemic clinical features. Two lesions developed on his hands and dried swab samples were collected from both lesions. Swab samples were processed as described (2) and used for virus isolation and molecular diagnosis.

On the basis of previous studies that detected viral DNA in clinical samples from persons with bovine vaccinia (1), we used a quantitative PCR to amplify the *vgf* and *ha* genes of VACV (3–5), a standard PCR to detect the *ha* gene (3–5), and a seminested PCR to detect the *ati* gene (F.L. Assis, unpub. data). Serum samples were used for detection of virus-neutralizing antibodies (orthopoxvirus 50% plaque-reduction neutralization test) and molecular diagnostic studies (1). Virus isolation was attempted in Vero cells and chorioallantoic membrane. All results were negative.

The 50% plaque-reduction neutralization test showed that the father, mother, and 14-year-old daughter had neutralizing antibodies against orthopoxvirus (titers 800, 3,200, and 800 neutralizing units/mL, respectively). All family members had positive results by molecular diagnostic test for  $\geq 1$  virus gene (online Technical Appendix Table 1). To rule out infection with parapoxvirus, a complementary PCR (6) was also performed, and all family members had negative results.

Quantitative PCR products for the *ha* gene from 3 virus-positive samples were sequenced in both directions in triplicate (Mega BACE Sequencer; GE Healthcare, Little Chalfont, UK). Sequences were aligned by using ClustalW (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>) and MEGA4.1 (<http://www.megasoftware.net/>) and showed 100% identity with each other (Figure). A phylogenetic tree was constructed by using the neighbor-joining method and 1,000-bootstrap replicates in the Tamura-3 parameter model (MEGA4.1). Sequences were grouped with VACV group 2 isolates. Sequences obtained were deposited in GenBank under accession nos. KP889223–5).

In Brazil, outbreaks of bovine vaccinia are associated with rural environments. However, some clinical and

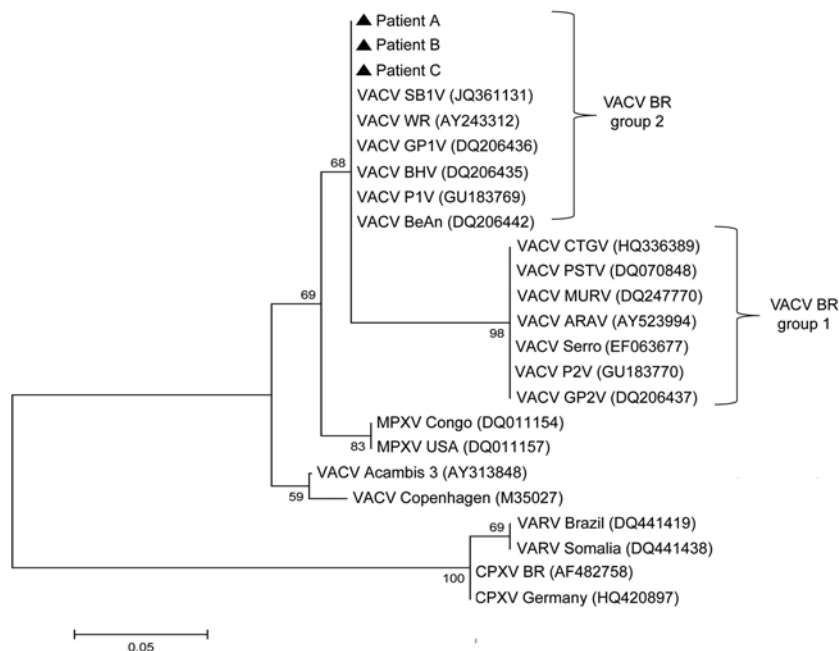
**A**

```

#VACV_WR (AY243312)   TGC GGA TCT TTA TGA TAC GTA CAA TGA TAA TGA --- --- TAC AGT ACC ACC AAC TAC TGT AGG GGG TAG TAC AAC CTC TAT TAG CAA TTA TAA AA
#PATIENT_A          .....
#PATIENT_B          .....
#PATIENT_C          .....
#VACV_SB1V (DQ361131) .....
#VACV_WR_Brazil (DQ206432) .....
#VACV_BHV (DQ206435) .....
#VACV_GP1V (DQ206436) .....
#VACV_P1V (GU183769) .....
#VACV_CTGV (HQ336389) .....
#VACV_GP2V (DQ206437) .....
#VACV_P2V (GU183770) .....
#VACV_PSTV (DQ070848) .....
#VACV_MURV (DQ247770) .....
#VACV_ARAV (AY523994) .....
#VACV_Serro (EF063677) .....
#VACV_COPENHAGEN (M35027) .....
#VACV_ACAMBIS_3 (AY313848) .....
#VARV_BRAZIL (DQ441419) .....
#VARV_SOMALIA (DQ441438) .....
#CPXV_CONGO (DQ011154) .....
#MPXV_USA (DQ011157) .....
#CPXV_GER (AF482758) .....
#CPXV_GERMANY (HQ420897) .....

```

**B**



**Figure.** A) Nucleotide sequence of vaccinia virus (VACV) hemagglutinin gene and homologous sequences of several orthopoxviruses, Brazil. Dots indicate sequence identity; dashes indicate deletions. VARV, variola virus; MPXV, monkeypox virus; CPXV, cowpox virus. B) Consensus phylogenetic tree based on nucleotide sequences of orthopoxvirus hemagglutinin genes. Tree was constructed with hemagglutinin gene sequences by using the neighbor-joining method with 1,000 bootstrap replicates and the Tamura 3-parameter model in MEGA4 (<http://www.megasoftware.net/>). Strains had the deletion region conserved and were grouped with other VACV (group 2) isolated in Brazil. Numbers along branches are bootstrap values. Scale bar indicates nucleotide substitutions per site.

epidemiologic aspects remain unclear. The infection of the father was associated with direct contact with cattle. Immunity conferred by smallpox vaccination did not prevent infection; this lack of immune response has been demonstrated in other studies in Brazil (7). Long-term protection might require multiple virus exposures, and severity of poxvirus infections might be influenced by the immunologic state of the host and virulence of virus strains (1,8,9).

The mother and 2 daughters with virus DNA in blood samples and the 14-year-old daughter with high titers of virus-neutralizing antibodies suggest that alternative routes (other than milking) for VACV infection of humans should be considered. These alternative routes can include person-to-person or environmental transmission because the 2 daughters did not report any exposure activities related to milking or contact with cattle (online Technical Appendix Tables 1, 2). Persistence of VACV in household environments has been reported (2,10). The family also consumed raw milk and cheese, a common practice in the region. Therefore, infection with VACV through raw milk and cheese consumption should also be considered. The

patients did not report oral lesions or a history of skin/mucosal lesions.

In conclusion, person-to-person transmission of VACV in these cases might have been caused by direct contact between the father and family members, contact with virus in the home, or consumption of unpasteurized milk and cheese. Additional studies are necessary to elucidate the role of these transmission pathways in spread of VACV in Brazil.

#### Acknowledgments

We thank João Rodrigues dos Santos and colleagues for excellent technical support and the Instituto Mineiro de Agropecuária for assistance.

This study was supported by 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. G.S.T., P.C.P.F., and E.G.K. are researchers of the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

## 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. Assis FL, Borges IA, Mesquita VS, Ferreira PC, Trindade GS, Kroon EG, et al. Vaccinia virus in household environment during bovine vaccinia outbreak, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2013;19:2045–7.
3. Abrahão JS, Oliveira TM, Campos RK, Madureira MC, Kroon EG, Lobato ZI. Bovine vaccinia outbreaks: detection and isolation of vaccinia virus in milk samples. *Foodborne Pathog Dis.* 2009;6:1141–6. <http://dx.doi.org/10.1089/fpd.2009.0324>
4. de Oliveira TM, Rehfeld IS, Siqueira JM, Abrahão JS, Campos RK, dos Santos AK, et al. Vaccinia virus is not inactivated after thermal treatment and cheese production using experimentally contaminated milk. *Foodborne Pathog Dis.* 2010;7:1491–6. <http://dx.doi.org/10.1089/fpd.2010.0597>
5. Pereira Oliveira G, Tavares Silva Fernandes A, Lopes de Assis F, Augusto Alves P, Moreira Franco Luiz AP, Barcelos Figueiredo L, et al. Intrafamilial transmission of vaccinia virus during a bovine vaccinia outbreak in Brazil: a new insight in viral transmission chain. *Am J Trop Med Hyg.* 2014;90:1021–3. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.13-0621>
6. Inoshima Y, Morooka A, Sentsui H. Detection and diagnosis of parapoxvirus by the polymerase chain reaction. *J Virol Methods.* 2000;84:201–8. [http://dx.doi.org/10.1016/S0166-0934\(99\)00144-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0166-0934(99)00144-5)
7. Silva-Fernandes AT, Travassos CE, Ferreira JM, Abrahão JS, Rocha ES, Viana-Ferreira F, et al. Natural human infections with *Vaccinia virus* during bovine vaccinia outbreaks. *J Clin Virol.* 2009;44:308–13. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2009.01.007>
8. Gallwitz S, Schutzbank T, Heberling RL, Kalter SS, Galpin JE. Smallpox: residual antibody after vaccination. *J Clin Microbiol.* 2003;41:4068–70. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.41.9.4068-4070.2003>
9. Hammarlund E, Lewis MW, Hansen SG, Strelow LI, Nelson JA, Sexton GJ, et al. Duration of antiviral immunity after smallpox vaccination. *Nat Med.* 2003;9:1131–7. <http://dx.doi.org/10.1038/nm917>
10. Lederman E, Miramontes R, Openshaw J, Olson VA, Karem KL, Marcink J, et al. Eczema vaccinatum resulting from the transmission of vaccinia virus from a smallpox vaccinee: an investigation of potential fomites in the home environment. *Vaccine.* 2009;27:375–7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.11.019>

Address for correspondence: Giliane de Souza Trindade, Departamento de Microbiologia, Laboratório de Vírus, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil. Av Antônio Carlos, no. 6627, Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais CEP: 31270-901, Brazil; email: giliane@icb.ufmg.br

## Hunter Island Group Phlebovirus in Ticks, Australia

Penelope J. Gauci, Jane McAllister, Ian R. Mitchell, Toby D. St. George, Daisy H. Cybinski, Steven S. Davis, Aneta J. Gubala

Author affiliations: Defence Science & Technology Organisation, Fishermans Bend, Victoria, Australia (P.J. Gauci, J. McAllister, I.R. Mitchell, A.J. Gubala); Long Pocket Laboratories,

Indooroopilly, Queensland, Australia (T.D. St. George, D.H. Cybinski, S.S. Davis); Department of Primary Industry and Fisheries, Berrimah, Northern Territory, Australia (S.S. Davis)

DOI: <http://dx.doi.org/10.3201/eid2112.141303>

**To the Editor:** A recent article described the isolation and subsequent analysis of a tickborne phlebovirus: Hunter Island Group virus (HIGV), associated with an albatross disease event that occurred in 2002 on Albatross Island, 6 kilometers off the northwest coast of Tasmania, Australia (1). The authors present HIGV as a novel isolate; however, new data and historical records demonstrate that the virus was originally isolated in 1983. Provisionally named Albatross Island virus (ABIV), the virus was classified as unidentified because of its uniqueness and dissimilarity to any known virus in Australia. ABIV and HIGV were isolated from ticks of the same species, *Ixodes eudyptidis*, collected from the nests of shy albatross (*Thalassarche cauta*) on Albatross Island, the only island inhabited by albatross within the Hunter Island Group Important Bird Area. At the time of collections, many immature albatross were dying. Records from this time indicate that postmortem blood samples were collected from the birds, and subsequent virus neutralization studies conducted soon after demonstrated that 50% of these samples were ABIV positive. Ensuing testing of samples collected in the next 2 years also identified a positive sample from a black noddy in Queensland (Table). ABIV was subsequently sent for testing at the Arbovirus World Reference Laboratory and, more than a decade later, to the Australian Animal Health Laboratory, Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation, where it was identified as a bunyavirus but remained largely uncharacterized.

We recently sequenced the genome of ABIV by using high-throughput sequencing and have compiled near complete sequences for the large (L), medium (M), and small (S) segments (GenBank accession nos. KM198925–7). Overall, ABIV shares 99% nt identity with HIGV, and thus they can be considered isolates of the same virus. The translated nucleocapsid and S segment nonstructural proteins of both viruses are identical, and the polymerases and glycoproteins share 99% identity. There are 26 nt changes across the whole genome (1 in S, 8 in M, 17 in L), but only 7 of these translate into an amino acid change (3 in the Gn/Gc polyprotein, 4 in the polymerase protein). Predictive protein analysis indicates that at least 1 of the 3 aa changes occurs in the ectodomain of the Gn protein, which could affect virus–host interactions. Of the remaining changes, 14 are silent mutations and 5 occur in noncoding regions.

In light of the genomic similarity of these 2 viruses, we suggest that the species name Albatross Island virus encompass both isolates, ABIV and HIGV, thereby representing the name of the original 1983 isolate and the location



# Alternative Routes of Zoonotic Vaccinia Virus Transmission, Brazil

## Technical Appendix

**Technical Appendix Table 1.** Epidemiologic data for 5 family members regarding exposure to vaccinia virus, Brazil

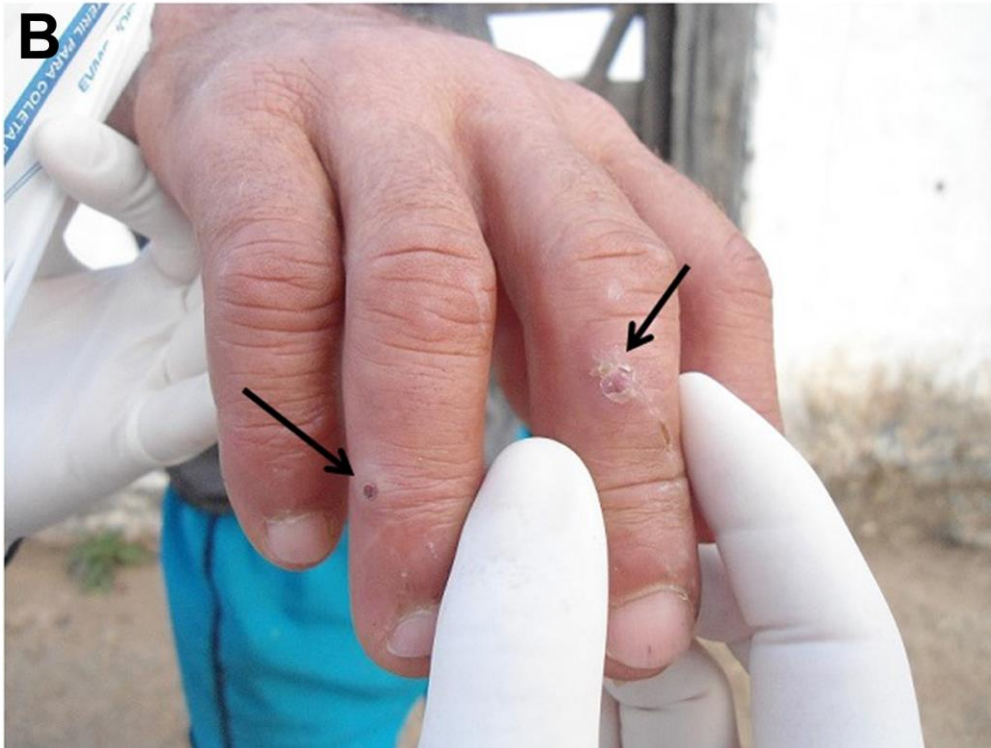
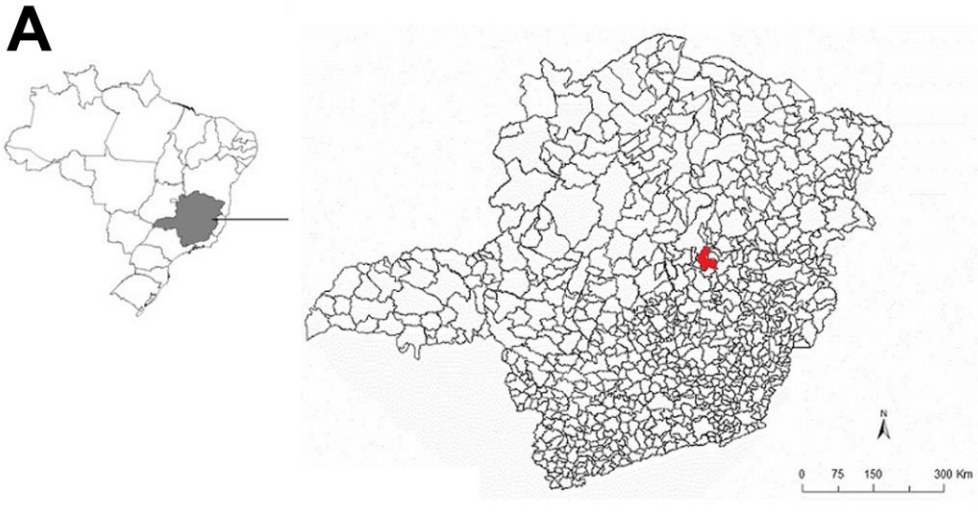
| Characteristic                 | Patient      |              |               |               |          |
|--------------------------------|--------------|--------------|---------------|---------------|----------|
|                                | Father       | Mother       | Twin daughter | Twin daughter | Daughter |
| Occupation                     | Rural worker | Rural worker | Student       | Student       | Student  |
| Contact with cows and horses   | Yes          | Yes          | No            | No            | No       |
| Contact with the environment   | No           | No           | No            | No            | No       |
| Vaccinated                     | Yes          | Yes          | No            | No            | No       |
| Consumption of raw milk/cheese | Yes          | Yes          | Yes           | Yes           | Yes      |
| Milked cows                    | Yes          | No           | No            | No            | No       |
| Cheese production              | Yes          | Yes          | No            | No            | No       |

**Technical Appendix Table 2.** Diagnostic results for 5 patients exposed to vaccinia virus, Brazil\*

| Patient       | Virus isolation | Serologic result<br>(neutralizing units/mL) | Quantitative PCR result |           | Standard PCR result |              |           |
|---------------|-----------------|---|-------------------------|-----------|---------------------|--------------|-----------|
|               |                 |   | <i>vgf</i>              | <i>ha</i> | <i>vgf</i>          | <i>ati</i> † | <i>ha</i> |
| Father        | –               | + (800)                                     | +                       | +         | +                   | +            | –         |
| Mother        | ND              | + (3,200)                                   | +                       | +         | –                   | –            | –         |
| Twin daughter | ND              | –   | –                       | +         | –                   | +            | –         |
| Twin daughter | ND              | –   | +                       | –         | –                   | –            | –         |
| Daughter      | ND              | + (800)                                     | –                       | –         | –                   | +            | –         |

\*PCR was performed with serum and swab samples from patient A. Other PCRs were performed only with serum samples. *vgf*, virus growth factor gene; *ha*, hemagglutinin gene; *ati*, A-type inclusion gene; –, negative; +, positive; ND, not done.

†By seminested PCR.



**Technical Appendix Figure.** A) Minas Gerais, Brazil (gray area) and Serro City (red area). B) Lesions (arrows) on the hands of a family member (father). These lesions were similar to those observed during outbreaks of bovine vaccinia, Brazil.

### **4.3. ARTIGO 3: Seroprevalence of Orthopoxvirus in rural Brazil: insights into anti-OPV immunity status and its complications for emergent zoonotic OPV**

DESCRIÇÃO DO ESTUDO: A varíola humana foi declarada erradicada em 1980, porém os Ortopoxvírus (OPV) ainda são uma fonte de preocupação devido ao aumento do número de casos nos últimos anos. No Brasil, o *Vaccinia virus* é responsável por causar uma doença conhecida por vaccinia bovina (VB). Os indivíduos mais afetados são aqueles alocados em áreas rurais, que têm contato direto com os animais domésticos infectados como bovinos. O objetivo deste estudo foi avaliar o perfil imunológico de pessoas que vivem em áreas rurais endêmicas para VB, avaliando também fatores de exposição à OPV. Foi conduzido um inquérito epidemiológico e coletadas 240 amostras de soro. A população estudada é composta por 127 homens (52.9%) e 113 mulheres (47.1%), com idade entre 5 e 90 anos. Destes, 185 (77%) relataram ter contato com animais domésticos, como bovinos e equídeos, 114 (47.5%) praticam ordenha, 213 (88.8%) consomem leite cru. Apenas 128 indivíduos (53.3%) foram vacinados contra varíola e 77 destes (60%) apresentam a marca vacinal. É importante destacar que 8 indivíduos (3.3%) foram infectados em surtos de VB. A imunidade humoral foi avaliada através do ensaio de neutralização viral por redução de placas, consideradas positivas as amostras que reduziram em pelo menos 50% o número de placas encontradas no controle positivo. Foi observado que 74 indivíduos (31%) apresentaram anticorpos neutralizantes anti-OPV, com títulos variando entre 100 e 6400 unidades neutralizantes/ml. Durante a campanha de erradicação da varíola, pensou-se que a imunidade contra OPV seria de longa duração. Entretanto, surtos causados pelo *Vaccinia virus* têm sido relatados no Brasil, inclusive afetando pessoas vacinadas. Como mostrado neste estudo, existe uma prevalência relevante de anticorpos anti-OPV em indivíduos que não foram verdadeiramente vacinados (sem a marca vacinal – 40.5%). Isto sugere uma ativa circulação de Ortopoxvírus, principalmente entre indivíduos que praticam atividades em risco de exposição.

RESEARCH

Open Access



# Seroprevalence of Orthopoxvirus in rural Brazil: insights into anti-OPV immunity status and its implications for emergent zoonotic OPV

Galileu Barbosa Costa<sup>1,2\*</sup>, Lídia Teodoro Santos Augusto<sup>3</sup>, Juliana Almeida Leite<sup>4</sup>, Paulo César Peregrino Ferreira<sup>1</sup>, Cláudio Antônio Bonjardim<sup>1</sup>, Jônatas Santos Abrahão<sup>1</sup>, Erna Geessien Kroon<sup>1</sup>, Elizabeth Castro Moreno<sup>5</sup> and Giliane de Souza Trindade<sup>1,2\*</sup>

## Abstract

**Background:** Bovine vaccinia (BV) is a zoonosis caused by *Vaccinia virus*, a virus from *Orthopoxvirus* genus (OPV) that affects mainly cattle herds and humans in rural areas in Brazil. Because most studies have focused on outbreaks situations, data on BV epidemiology is limited. A cross sectional study in Brazilian rural areas during 2012–2013 was conducted to determine the neutralizing antibodies seroprevalence and risk factors for BV.

**Methods:** A structured questionnaire was applied to elicit demographics data and farming practices considered risk factors for BV exposure. Neutralizing anti-OPV antibodies were investigated using plaque reduction neutralization test. The neutralizing antibodies prevalence rates were calculated and the risk factor analysis was performed using multivariate logistic regression.

**Results:** Two hundred and forty participants were enrolled in this study with a prevalence of neutralizing antibodies of 30.8 % (95 % confidence interval [CI], 25.3–36.9). In multivariate analysis, age > 35 years (Odds Ratio [OR] = 18.2; CI 95 % = 7.7 – 43.2) and previous outbreak in property (OR = 3.9; CI 95 % = 1.2 – 12.6) were independently associated with anti-OPV neutralizing antibodies.

**Conclusions:** In this study, anti-OPV protective immunity (neutralizing antibody titers) was assessed in an endemic BV Brazilian rural area. Our findings indicate that epidemiological surveillance is required and should be applied by public health authorities to create interventions and/or prevention strategies to avoid viral spread causing future outbreaks among individuals who are under risk of infection.

## Background

*Vaccinia virus* (VACV) was used during mass vaccination against smallpox leading to its eradication [1]. Routine vaccination was ended more than 30 years ago, except for military personnel, health assistance and laboratory workers professionals in the United States and some parts of Europe [2]. Although smallpox was declared eradicated in 1980 [1], the scientific community has reassessed the level of immunity in current populations driven by the

bioterrorism fear and also due to the emergence of zoonotic poxvirus around the world [3].

The emergence of zoonotic *Orthopoxvirus* (OPV) such as *Monkeypox virus* (MPXV), which is endemic in Africa [4, 5], but has also been accidentally introduced into the USA [6], *Cowpox virus* (CPXV) in Europe [7] and *Buffalopox virus* (BPXV) in India [8] has been frequently reported. Additionally, the emergence of new zoonotic OPVs such as Akhmeta virus [9], raises questions about the waning population immunity against OPV which, among other facts, could facilitate the emergence of zoonotic OPV. Nowadays, individuals less than 35 years were not vaccinated against smallpox and most of those

\* Correspondence: galileuk1@gmail.com; giliane@icb.ufmg.br

<sup>1</sup>Laboratório de Vírus, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil  
Full list of author information is available at the end of the article

over 35 did not receive booster immunizations since the early 70s. Therefore, immunity to smallpox and consequently to other zoonotic OPV is considered low or non-existent in the current populations [3, 10–16].

In Brazil, the emergence of Bovine vaccinia (VB), a zoonotic disease caused by VACV, is associated with rural environment and susceptible population, specially farmers/rural workers [17–19]. Domestic animals (particularly dairy cattle) and individuals who have direct contact with these animals can be affected. Nodular, ulcerated, necrotic and painful lesions are observed mainly on hands of infected people, due to contact with infected animals during the milking process [13, 17]. However, lesions can spread to secondary body sites such as forearms, arms and face [13]. Other signs and systemic symptoms have been also reported, such as fever, lymphadenopathy, headache and myalgia [13]. In general, affected people are men, predominantly aged  $\leq 40$  years, although individuals  $>40$  years which have been vaccinated against smallpox (with presence of a vaccine take) are also affected [13, 17, 20, 21]. This fact reinforces the decrease of general immunity against OPV.

BV presents relevant economic, social and public health impacts. The burden of the outbreaks compromise hundreds of properties in all regions leading to several economic losses due to decrease in milk production and occurrence of mastitis and other secondary bacterial infections [18, 19]. The burden of this disease is stressed by the fact that Brazil has the largest commercial cattle herd in the world. Furthermore, infected individuals are unable to work due to painful lesions and overall clinical conditions, and their families, in most times, depend on their wage/income. There are high costs associated with treatment and management of infected individuals and animals, under notification of disease, misdiagnosis and the absence of a government-enforced specific surveillance policy.

This work was carried out to assess anti-OPV protective immunity of a rural population in a major dairy region in Brazil. By using this approach, only exposure that resulted in protective humoral response (ie neutralizing antibody titers) was captured. Taking into account the increasing emergence of natural OPV infections we conducted the first epidemiological study in an endemic BV area designed to understand risk factors associated with OPV infection and protective status of rural populations which are in major risk to acquire infection.

## Methods

### Study area and population

A cross sectional study was carried out from September 2012 to March 2013, using sera samples collected from people in rural areas in Serro city ( $18^{\circ} 36' 17''$  S  $43^{\circ} 22' 46''$  W), State of Minas Gerais, Brazil (Fig. 1). Serro has

a population of 20.833 inhabitants, with 7.938 residents in rural areas (1.508 farms) (IBGE, 2010).

Sample size calculation was performed using an expected prevalence of 50 % and confidence interval of 95 %, an accuracy of 10 % around the estimate and a design effect of 2.0. Using Open-Epi version 2.3.1, a minimum sample of 190 individuals was determined for the study. Considering the possibility of loss, denial and exclusion a sample size of 210 individuals was planned. However, during the field work, a total of 240 individuals were enrolled.

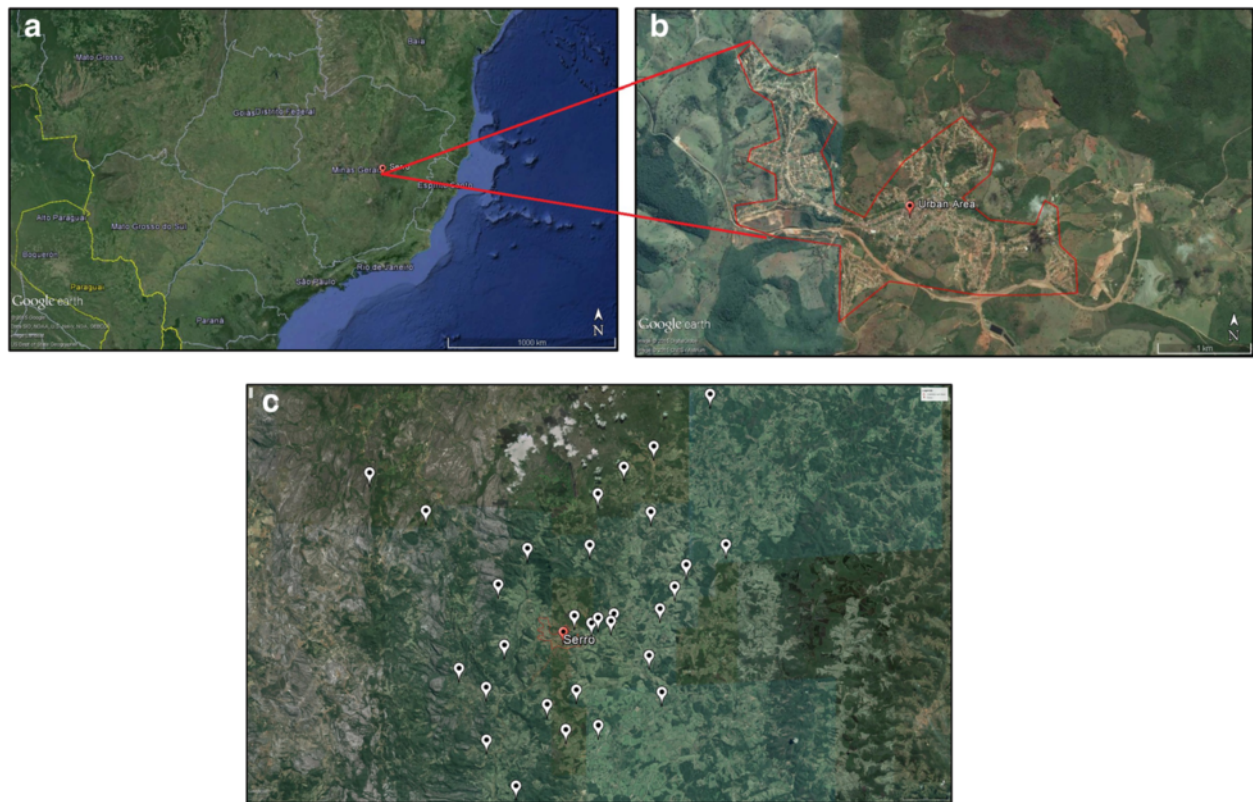
Monthly visits were made to dairy farms and individuals from all age groups were enrolled. The participation of individuals from small, medium and large properties was assured. Individuals who reported to live downtown and work in rural areas were also included.

### Study measures

A structured questionnaire was applied to elicit demographics data and risk factors for BV exposure. Demographic data included age, gender, self-reported skin color, occupation and education level. Questions about risk factors for BV exposure were focused on contact with cattle, horses and wild environment, practice of milking, type of milking, and consumption of raw milk and cheese. Additionally, a clinical inspection was made on left arm of participants  $\geq 35$  years old for the presence of smallpox vaccine scar (vaccine take), which is strongly correlated with protection, [22]. Routine smallpox vaccination was discontinued in Brazil in 1978 [1], then individuals with  $\geq 35$  years old should have received at least one dose of smallpox vaccine as recommended by WHO. We considered this group of individuals as vaccinated.

### Plaque reduction neutralization assay

Blood samples were collected without anticoagulants, centrifuged to harvest serum, which was stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until tested. A plaque reduction neutralizing test (PRNT) was used [23, 24] to assess immunological data. To this aim, sera were initially heated in a water bath at  $56^{\circ}\text{C}$  for 30 min to denature complement system proteins and subsequently diluted in Eagle's Minimum Essential Medium (MEM) (GIBCO<sup>®</sup>, USA) free of fetal bovine sera (FBS) to a screening ratio of 1:20. Samples were added to the same volume (1:1) of a solution containing approximately 150 plaque forming units (PFU) of VACV strain Western Reserve (WR) (VACV-WR is part of our collection and was kindly provided by Dr. C. Jungwirth, from Wurzburg University, Germany) diluted in FBS-free MEM. The final solution (virus/serum) was homogenized and incubated for 16 h at  $37^{\circ}\text{C}$ . Six-well plates (TPP<sup>®</sup>, Switzerland) containing BSC-40 (ATCC no. CRL-2671) monolayers with approximately 90 % confluence were inoculated with



**Fig. 1** Overview of Minas Gerais State, Brazil: **a**) The point marks Serro City location in Minas Gerais State. **b**) Extended view of the urban area of Serro City (marked in red). **c**) Locations of the properties sampled during the course of this investigation are marked with white points (Serro outlined by the red lines). (Google Earth, 2016)

virus/serum solutions; plates were incubated at 37 °C for 1 h in an atmosphere supplemented with 5 % of CO<sub>2</sub>. MEM supplemented with 2 % FBS (CULTILAB, Brazil) was added to each well in a volume sufficient to maintain cell monolayers during the subsequent incubation period of 48 h at 37 °C in atmosphere supplemented with 5 % of CO<sub>2</sub>. BSC-40 monolayers were fixed with formalin at 10 % (MERCK MILLIPORE, USA) and stained with crystal violet solution at 1 % (SYNTH®, Brazil) allowing naked eye observation of cytopathic effects. All samples were tested in triplicate. A sample was considered positive when the average number of PFUs was lower than half of the PFUs counted in the virus control (at least a 50 % reduction in PFUs). The virus control (VC), also known as the negative serum control, was made by using only FBS instead of sera; and submitted to the same protocol. It was treated as an OPV negative sample. Each six-well plate included one well reserved for the negative serum control and one for cell control (a negative control). A human serum sample obtained during a previous BV outbreak [13] was used as an OPV sera positive control.

All positive samples were titrated according to the PRNT protocol described above. Dilutions were performed in a twofold serial dilution of the sera from 1:40

to 1:5120. The last dilution in which 50 % PFU reduction was observed was used as a reference to calculate the value of neutralizing units per milliliter (NU/mL). The value was obtained by dividing 1 mL by the volume of virus/serum solution inoculated on cell monolayer and multiplying it by the least dilution that shows a 50 % reduction in PFUs.

#### Statistical analysis

A descriptive analysis of the results was carried out and comparisons between those participants with and without neutralizing antibodies were made using the Pearson's chi-squared test. A  $p < 0.05$  based on two-tailed alternatives was considered significant. Relative odds ratios and 95 % confidence intervals were calculated. All those variables that showed a significance level of 5 % in the univariate analysis were tested again in a multiple logistic regression model. The statistical software Epi Info™ was used for the analyses.

## Results

### Demographic profile of study population

A total of 240 individuals were enrolled in this study. Demographic characteristics are presented in Table 1.

**Table 1** Demographic variables related to the presence of anti-OPV neutralizing antibodies

| Demographics                 | N (%)       | PRNT positive (%) | PRNT negative (%) | <i>p</i> value |
|------------------------------|-------------|-------------------|-------------------|----------------|
| Gender                       |             |                   |                   |                |
| Male                         | 127 (52.9)  | 44 (34.6)         | 83 (65.4)         | 0.175          |
| Female                       | 113 (47.1)  | 30 (26.5)         | 83 (73.5)         |                |
| Age group (years)            |             |                   |                   |                |
| >35                          | 126 (52.5)  | 67 (53.1)         | 59 (46.9)         | <0.0001        |
| ≤35                          | 114 (47.5)  | 7 (6.2)           | 107 (93.8)        |                |
| Self-reported skin color     |             |                   |                   |                |
| Brown                        | 142 (59.2)  | 44 (31.0)         | 98 (69.0)         | 0.656          |
| Black                        | 62 (25.8)   | 21 (33.9)         | 41 (66.1)         |                |
| White                        | 36 (15.0)   | 9 (25.0)          | 27 (75.0)         |                |
| Education level <sup>a</sup> |             |                   |                   |                |
| Elementary school or less    | 156 (65.0)  | 45 (28.9)         | 111 (71.1)        | 0.032          |
| High school or more          | 60 (25.0)   | 16 (26.7)         | 44 (73.3)         |                |
| Have never gone to school    | 24 (10.0)   | 13 (54.1)         | 11 (45.9)         |                |
| Residence area               |             |                   |                   |                |
| Rural                        | 208 (86.7)  | 63 (30.3)         | 145 (69.7)        | 0.641          |
| Urban                        | 32 (13.3)   | 11 (34.4)         | 21 (65.6)         |                |
| Occupation                   |             |                   |                   |                |
| Rural workers                | 127 (52.9)  | 52 (21.0)         | 75 (59.0)         | 0.001          |
| Housewives                   | 59 (24.6)   | 15 (25.5)         | 44 (74.5)         |                |
| Others <sup>b</sup>          | 54 (22.5)   | 7 (13.0)          | 47 (87.0)         |                |
| Income <sup>c</sup>          |             |                   |                   |                |
| ≤1 min wage                  | 178 (74.2)  | 57 (32.0)         | 121 (68.0)        | 0.178          |
| >1 min wage                  | 19 (7.9)    | 9 (47.4)          | 10 (52.6)         |                |
| Not stated                   | 43 (17.9)   | 8 (19.6)          | 35 (81.4)         |                |
| Total                        | 240 (100.0) | 74 (30.8)         | 166 (69.2)        |                |

<sup>a</sup>: Elementary school or less (≤8 years of study), High school or more (>8 years of study); <sup>b</sup>: this group includes other professions such as Veterinary, Zootechnician, Dentist, Seller and children; <sup>c</sup>: income value in Brazilian currency in 2012 = R\$ 622,00 (R\$ 1,00 = US\$ 2,08 approximately)

The median age was 38.6 years (ranging from 5 to 90 years), being most of them over 35 years that corresponds to 52.5 %. Men represented 52.9 % of participants whereas women were 47.1 %. The majority (59.2 %) had self-reported mixed skin color.

Most individuals had a low wage income (74.2 %) and a minimum/medium education level (65 %). The rate of illiteracy among the participants was 10 %. As expected, a high proportion of participants worked directly in rural activities (52.9 %), such as handling of domestic animals and planting. Although 22.5 % had other professions, the majority of them reported execution rural activities. Remaining individuals were housewives and children.

### Prevalence

Prevalence rates of neutralizing antibodies are presented in Table 2. Among the 240 participants, 74 showed neutralizing antibodies, representing an overall prevalence rate of 30.8 % (CI 95 % = 25.3–36.9). Antibody titers ranged from

100 to 12.800 NU/ml. The prevalence among those classified as vaccinated individuals, using the age >35 years old criterion, was 53.1 % (CI 95 % = 44.5 – 61.7), whereas 6.1 % (CI 95 % = 3.0 – 12.1) of non-vaccinated, ≤35 years old criterion, had detectable OPV neutralizing antibodies ( $p < 0.0001$ ). If the vaccine take was used to identify the vaccinated group, the prevalence rates among those vaccinated were 57.1 % (CI 95 % = 46.0 – 67.6) and among the non-vaccinated are 18.4 % (CI 95 % = 13.2 – 25.6) ( $p < 0.0001$ ).

### Potential risk factors for BV exposure

Potential risk factors for BV exposure are presented in Table 3. Among them, direct contact with domestic animals, such as bovines, equids, dogs, cats, goats and pigs was reported by 201 individuals. Overall, 70.4 % of the participants had contact with bovines and equids. However, during the visits to the properties, no typical BV lesions similar to those observed during outbreaks were seen on cattle. Almost 50 % of the participants also

**Table 2** Prevalence rates of neutralizing antibodies in a rural population from Minas Gerais State, Brazil

| Interviewed                                 | Prevalence rate (CI 95 %) |
|---|---------------------------|
| Overall                                     | 30.8 (25.3 - 36.9)        |
| Vaccinated <sup>a</sup> (>35 years old)     | 53.1 (44.5 - 61.7)        |
| Non-vaccinated <sup>a</sup> (≤35 years old) | 6.1 (3.0 - 12.1)          |
| Presence of vaccine take <sup>b</sup>       |                           |
| Yes   | 57.1 (46.0 - 67.6)        |
| No  | 18.4 (13.2 - 25.6)        |

<sup>a</sup>: Vaccinated and non-vaccinated individuals were determined according to their age, which correspond that >35 years old participated of smallpox eradication campaign

<sup>b</sup>: The presence of vaccine take were determined by examination on left arm of each individual

reported activities involving access to wild environment as hunting, gathering firewood and search for cattle and horses, which frequently run away.

Milking was an activity done by 91 individuals (37.9 %). In this group, most individuals practiced milking ( $n = 60$ ; 65.9 %) only once per day ( $n = 52$ ; 57.1 %). Consumption of unpasteurized milk and/or cheese made from this product was reported by a high proportion of interviewed individuals (90.4 %), whereas only 21.3 % were involved in the cheese-making process, hereby having direct contact with unpasteurized milk.

We determined a 35 years old based cut-off, representing the last vaccinated individuals before smallpox has been eradicated. Using smallpox vaccination as exposure factor, 52.5 % of interviewed individuals were vaccinated (Table 1). Indeed, a high proportion of individuals reporting to be vaccinated ( $n = 126$ ) were considered in fact vaccinated ( $n = 77$ , 32.1 %), due to the presence of a vaccination scar or take on their left arm (Table 3).

#### Risk factors significantly linked to higher OPV seroprevalence

The demographic characteristics significantly associated with the presence of neutralizing antibodies in the univariate analysis were age >35 years old (crude Odds Ratio = 17.3; CI 95 % = 7.4 – 40.2), illiteracy (crOR = 2.9; CI 95 % = 1.2 – 7.0), and occupation as rural workers (crOR = 2.8; CI 95 % = 1.5 – 5.1), ( $p < 0.05$ ). Risk factors for BV exposure associated with the presence of neutralizing antibodies in the univariate analysis were contact with bovines or equids (crOR = 2.0; CI 95 % = 1.0 – 3.8), milking (crOR = 1.7; CI 95 % = 1.0 – 3.0), participation in the cheese-making process, (crOR = 2.4; CI 95 % = 1.3 – 4.6), have been vaccinated as measured by the presence of vaccine take (crOR = 5.9; CI 95 % = 3.2 – 10.7) and a previous outbreak in property (crOR = 3.0; CI 95 % = 1.2 – 7.7), ( $p < 0.05$ ).

Variables that showed significant differences between those with positive and negative serology were analyzed in the multivariate logistic regression model. Variables

independently associated with neutralizing antibodies were age and previous outbreak in property. Those older than 35 years were almost 20 times more likely to present neutralizing antibodies than the younger (OR = 18.2; CI 95 % = 7.7 – 43.2). Those who reported to live or work at the property at the time of previous outbreaks were almost four times more likely to present neutralizing antibodies (OR = 3.9; CI 95 % = 1.2 – 12.6) than those who did not live on the farms at that time.

#### Discussion

The interruption of smallpox vaccination since 1980 has increased the susceptibility to OPV infections in human population. Nowadays, the population majority has low or non-existent immunity to OPV [3, 8, 18, 19]. With concerns about the use of smallpox virus in a bioterrorist attack, some studies have been conducted to assess immunity and protection of different populations against OPV infections [24–31]. However, natural zoonotic OPV infections which cause a burden to public health and local economy are poorly monitored worldwide, due to a gap in epidemiological surveillance.

Seroprevalence studies of OPV in different populations worldwide have also been used as a marker for the status of protection elicited by vaccination [14, 16, 23, 25, 27, 28, 30, 31]. In this study, we have assessed only anti-OPV protective immunity (ie neutralizing antibody titers) and our findings demonstrated that 53.1 % of presumed vaccinated individuals presented OPV neutralizing antibodies, in comparison to 57.1 % of true vaccinees (represented by those with vaccine take), a non-significant difference ( $p > 0.05$ ). Similar results were observed in the United States, in studies done by Hammarlund et al. (50 %) [25] and Taub et al. (59.3 %) [30]; in Japan with individuals born between 1969 and 1975 (50 %) [27]; and in Italy (49–64 %), using ELISA IgG [8]. These findings can be explained by the fact that immunity against smallpox, and consequently other OPVs, has been believed to persist for years, as demonstrated by the studies cited above and other with military personnel [29]. Smallpox vaccination as exposure factor is also important to highlight. As in this study we found that 42.9 % of true vaccinees (33/77) are seronegative, we cannot assume that immunity is as long lasting as showed elsewhere [4, 25, 27, 28, 30]. Almost half of individuals in this category are seronegative and, indeed, neutralizing antibodies may have been maintained in the seropositive vaccinated individuals by continuous OPV exposure, since the studied region is endemic for BV [32–34]. In addition, in the studied community, the prevalence of neutralizing antibodies among the non-vaccinated individuals was 6.1 % (using the cut-off of age >35 years old) or 18.4 %, if the absence of a vaccine take was used to identify the non-vaccinated individuals. Also, it is important to



**Table 3** Exposure/risk factors related to the presence of anti-OPV neutralizing antibodies

| Exposure factors                                  | N (%)       | PRNT positive (%) | PRNT negative (%) | P value |
|---|-------------|-------------------|-------------------|---------|
| Contact with bovines or equids                    |             |                   |                   |         |
| Yes   | 169 (70.4)  | 59 (35.0)         | 110 (65.0)        | 0.035   |
| No  | 71 (29.6)   | 15 (21.2)         | 56 (78.8)         |         |
| Contact with others domestic animals <sup>a</sup> |             |                   |                   |         |
| Yes   | 122 (50.8)  | 38 (25.0)         | 84 (75.0)         | 0.915   |
| No  | 118 (49.2)  | 36 (30.5)         | 82 (69.5)         |         |
| Contact with wild environment <sup>b</sup>        |             |                   |                   |         |
| Yes   | 117 (48.8)  | 37 (31.6)         | 80 (68.4)         | 0.796   |
| No  | 123 (51.2)  | 37 (31.8)         | 86 (68.2)         |         |
| Practice milking                                  |             |                   |                   |         |
| Yes   | 91 (37.9)   | 35 (38.5)         | 56 (61.5)         | 0.046   |
| No  | 149 (62.1)  | 39 (26.2)         | 110 (73.8)        |         |
| Kind of milking <sup>c</sup>                      |             |                   |                   |         |
| Manual  | 60 (65.9)   | 26 (43.3)         | 34 (56.7)         | 0.193   |
| Mechanic  | 31 (34.1)   | 9 (29.1)          | 22 (70.9)         |         |
| Number of milkings/day <sup>c</sup>               |             |                   |                   |         |
| 1/day   | 52 (57.1)   | 24 (46.2)         | 28 (53.8)         | 0.082   |
| 2/day   | 39 (42.9)   | 11 (28.2)         | 28 (71.8)         |         |
| Raw milk/cheese consumption                       |             |                   |                   |         |
| Yes   | 217 (90.4)  | 70 (22.3)         | 147 (67.7)        | 0.142   |
| No  | 23 (9.6)    | 4 (13.4)          | 19 (86.6)         |         |
| Participate in cheese production                  |             |                   |                   |         |
| Yes   | 51 (21.3)   | 24 (47.1)         | 27 (52.9)         | 0.005   |
| No  | 189 (78.7)  | 50 (26.5)         | 139 (73.5)        |         |
| Vaccine take <sup>d</sup>                         |             |                   |                   |         |
| Yes   | 77 (32.1)   | 44 (57.1)         | 33 (42.9)         | <0.0001 |
| No  | 163 (67.9)  | 30 (19.4)         | 133 (80.6)        |         |
| Outbreak on property                              |             |                   |                   |         |
| Yes   | 20          | 11 (54.0)         | 9 (45.0)          | 0.015   |
| No  | 220         | 63 (26.9)         | 157 (71.3)        |         |
| Total   | 240 (100.0) | 74 (30.8)         | 166 (69.2)        |         |

<sup>a</sup>: Other domestic animals includes cats, dogs, goats, sheeps, pigs, chickens and ducks; <sup>b</sup>: Reported by those who were in the wild environment to hunt, gather firewood and fetch some animals of property, such as horse; <sup>c</sup>: The number of individuals in these two groups is relative to positives in practice milking group (N = 91); <sup>d</sup>: Individuals who had a vaccine scar on left arm

highlight that all seropositive non vaccinated individuals did not present any sign of VACV infection or report to have been infected previously. This finding reinforces the possibility of the existence of alternative VACV infection routes other than the direct contact with infected cattle [34].

The OPV seroprevalence has been used as an indicator of wild OPV exposure/circulation [5, 14–16, 35, 36]. The prevalence of anti-OPV neutralizing antibodies observed in this study (30.1 %) was similar to those reported in a

retrospective study performed in 2010 in Amazon region (27.9 %) [14], and higher when compared to 9.8 % found in another study done with two distinct Brazilian populations [16]. Although in these two studies [14, 16] the populations analyzed had some different characteristics and contexts for OPV serosurvey related to our study, other characteristics are similar, such as subsistence agriculture and farming as the main economic activities. Another Brazilian study carried out in the State of Rio de Janeiro showed a seropositivity of 43 % [13],

where participants were from rural properties affected by outbreaks and most of them were infected, presenting clinical signs and symptoms.

Studies conducted outside Brazil, such as for BPXV in India [10], showed a higher prevalence among rural dwellers. Although the total number of individuals sampled in this study was similar to ours ( $n = 269$ ), 121 of them were from rural areas that live in proximity with cattle and/or buffaloes, which justifies the higher seroprevalence.

Although age  $>35$  years and previous outbreak in property were risk factors independently associated with the presence of neutralizing antibodies ( $p < 0.0001$ ), it is impossible to distinguish if the high prevalence of neutralizing antibodies among vaccinated people was due to the background of remaining immunity from vaccinations or natural infections. On the other hand, age can be related to a higher likelihood of exposure to circulating VACV since older individuals could have had more chances to be exposed to the virus and also because a part of this population had direct contact with bovines by being farm owners or practicing manual milking. These findings are in agreement with data reported by Lederman et al. [5] who found that age  $> 25$  years was a risk factor to OPV exposure.

As discussed by Kennedy et al. [22], vaccinated army has high titers of neutralizing antibodies when vaccinated for at least 4 years. Differently in Brazil, the population has been vaccinated only during WHO campaign, and few individuals ( $n = 13$ ) presented high neutralizing antibodies titers (6400 – 12800 UN/ml). The high neutralizing antibodies titers found in participants  $>35$  years and the presence of antibodies in non-vaccinated individuals reinforce the possibility of silent VACV circulation in this population.

Unexpectedly, after adjustment by all the explanatory variables, occupation, educational level, income, animal handling, consumption of raw milk or cheese, cheese production or manual milking were not associated with presence of neutralizing antibodies. The fact that most visited properties are small subsistence farms with manual milking could explain the homogeneity of risks among the studied community. A more detailed survey in an extended area, including different farming practices is necessary to better comprehend the factors involved in susceptibility and natural history of the disease in humans and animals. BV is not a mandatory notifiable disease in Brazil and there are few epidemiological data showing prevalence and risk factors in human populations.

## Conclusion

Despite the fact BV is a burden to the milk economy in Brazil, the disease is neglected and there are still few studies about seroprevalence in the country. In the present study important data regarding natural OPV

circulation that is not focused on outbreaks was showed. Our results highlight the relevance of VACV virological surveillance representing a health threat with a high economical and medical burden. Furthermore, it is important to know the BV exposure risks factors in order to guide decision and recommendations to prevent future outbreaks.

## Acknowledgements

We thank colleagues from Laboratório de Vírus (ICB/UFMG) for their excellent technical support. We are grateful for the assistance of Secretaria de Saúde and Instituto Mineiro de Agropecuária from Serro City.

## Funding

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). CA Bonjardim, JS Abrahão, EG Kroon and GS Trindade are researchers from CNPq.

## Availability of data and materials

Not applicable.

## Authors' contributions

GST and ECM conceptualized and designed study; GBC and LTSA collected samples and data; GBC performed laboratory analysis; GBC, ECM and GST analyzed and interpreted data; GBC drafted the manuscript; GST, ECM, PCPF, CAB, JSA, EGC supervised the study plan and gave critical suggestions; All authors read and approved the final manuscript.

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

## Ethics approval and consent to participate

This study was approved by the Research Ethics Committee of Universidade Federal de Minas Gerais under the registration protocol FR – 413704. An informed consent was obtained from all participants. In case of minors, consent was signed by parents or guardians.

## Author details

<sup>1</sup>Laboratório de Vírus, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil. <sup>2</sup>Present address: Av Presidente Antônio Carlos, 6627, Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais CEP 31270-901, Brazil. <sup>3</sup>Instituto Mineiro de Agropecuária, Serro, Brazil. <sup>4</sup>Respiratory Virus Laboratory, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil. <sup>5</sup>Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia de Minas Gerais (HEMOMINAS), Belo Horizonte, Brazil.

Received: 25 February 2016 Accepted: 28 June 2016

Published online: 04 July 2016

## References

- Fenner F, Henderson DA, Arita I, Jezek Z, Ladnyi I. Smallpox and its eradication. Geneva: World Health Organization; 1988.
- Isaacs SN. Working safely with vaccinia virus: laboratory technique and review of published cases of accidental laboratory infections. *Vaccinia virus and poxvirology: methods and protocols*, chapter 1. *Method Mol Biol*. 2012; 890:1–21.
- Shchelkunov SN. An Increasing Danger of Zoonotic Orthopoxvirus Infections. *PLoS Pathog*. 2013;9, e1003756.
- Rimoin AW, Kitalu N, Kebela-Ilunga B, Mukaba T, Wright LL, Formenty P, et al. Endemic human monkeypox, Democratic Republic of Congo, 2001–2004. *Emerg Infect Dis*. 2007;13:934–7.
- Lederman ER, Reynolds MG, Karem K, Braden Z, Learned-Orozco LA, Wasswa-Wassa D, et al. Prevalence of Antibodies against Orthopoxviruses among Residents of Likouala Region, Republic of Congo: Evidence for Monkeypox Virus Exposure. *Am J Trop Med Hyg*. 2007;77:1150–6.

6. Reed KD, Melski JW, Graham MB, Regnery RL, Sotir MJ, Wegner MV, et al. The detection of monkeypox in humans in the Western Hemisphere. *N Engl J Med*. 2004;350:342–50.
7. Essbauer S, Pfeffer M, Meyer H. Zoonotic Poxviruses. *Vet Microbiol*. 2010;140:229–36.
8. Singh RK, Balamurugan V, Bhanuprakash V, Venkatesan G, Hosamani M. Emergence and Reemergence of Vaccinia-Like Viruses: Global Scenario and Perspectives. *Indian J Virol*. 2012;23:1–11.
9. Vora NM, Li Y, Geleishvili M, Emerson GL, Khmaladze E, Maghlakelidze G, et al. Human Infection with a Zoonotic Orthopoxvirus in the Country of Georgia. *N Engl J Med*. 2015;372:1223–30.
10. Kannangai R, Finny GJ, John TJ, Sridharan G, Gopal R. Vaccinia Reactive Antibodies in a South Indian Population. *J Med Virol*. 2000;62:293–7.
11. Huhn GD, Bauer AM, Yorita K, Graham MB, Sejvar J, Likos A, et al. Clinical Characteristics of Human Monkeypox, and Risk Factors for Severe Disease. *Clin Infect Dis*. 2005;41:1742–51.
12. Karem KL, Reynolds M, Hughes C, Braden Z, Nigam P, Crotty S, et al. Monkeypox-Induced Immunity and Failure of Childhood Smallpox Vaccination To Provide Complete Protection. *Clin Vaccine Immunol*. 2007;14:1318–27.
13. Silva-Fernandes AT, Travassos CE, Ferreira JM, Abrahão JS, Rocha ES, Viana-Ferreira F, et al. Natural human infections with Vaccinia virus during bovine vaccinia outbreaks. *J Clin Virol*. 2009;44:308–13.
14. Mota BEF, Trindade GS, Diniz TC, da Silva-Nunes M, Braga EM, Urbano-Ferreira M, et al. Seroprevalence of orthopoxvirus in an Amazonian rural village, Acre. *Brazil Arch Virol*. 2010;155:1139–44.
15. Macneil A, Abel J, Reynolds MG, Lash R, Fonnier R, Kanneh LD, et al. Serologic evidence of human orthopoxvirus infections in Sierra Leone. *BMC Res Notes*. 2011;4:465.
16. Figueiredo PO, Silva-Fernandes AT, Mota BEF, Costa GB, Borges IA, Ferreira PCP, et al. Evaluating anti-Orthopoxvirus antibodies in individuals from Brazil rural areas prior to the Bovine Vaccine era. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015;110(6):804–8.
17. Schatzmayr HG, Costa RVC, Gonçalves MCR, D'Andréa PS, Barth OM. Human and animal infections by vaccinia-like viruses in the state of Rio de Janeiro: A novel expanding zoonosis. *Vaccine*. 2011;29 Suppl 4:D65–9.
18. da Fonseca FG, Kroon EG, Nogueira ML, Trindade GS. Zoonotic vaccinia virus outbreaks in Brazil. *Future Virol*. 2011;6:697–707.
19. Kroon EG, Mota BEF, Abrahão JS, da Fonseca FG, de Souza Trindade G. Zoonotic Brazilian vaccinia virus: from field to therapy. *Antivir Res*. 2011;92:150–63.
20. Megid J, Appolinário CM, Langoni H, Pituco EM, Okuda LH. Vaccinia Virus in Humans and Cattle in Southwest Region of São Paulo State. *Brazil Am J Trop Med Hyg*. 2008;79:647–51.
21. Abrahão JS, Campos RK, Trindade GS, Guimarães da Fonseca F, Ferreira PC, Kroon EG. Outbreak of severe zoonotic vaccinia virus infection, Southeastern Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2015;21:695–8.
22. Kennedy RB, Ovsyannikova IG, Pankratz VS, Vierkant RA, Jacobson RM, Ryan MA, et al. Gender effects on humoral immune responses to smallpox vaccine. *Vaccine*. 2009;27:3319–23.
23. Newman FK, Frey SE, Blevins TP, Mandava M, Bonifacio Jr A, Yan L, et al. Improved assay to detect neutralizing antibody following vaccination with diluted or undiluted vaccinia (Dryvax) vaccine. *J Clin Microbiol*. 2003;41:5154–517.
24. Costa GB, Moreno EC, de Souza TG, Studies Group in Bovine Vaccinia. Neutralizing antibodies associated with exposure factors to Orthopoxvirus in laboratory workers. *Vaccine*. 2013;31:4706–9.
25. Hammarlund E, Lewis MW, Hansen SG, Strelow LI, Nelson JA, Sexton GJ, et al. Duration of antiviral immunity after smallpox vaccination. *Nat Med*. 2003;9:1131–7.
26. Hsieh SM, Pan SC, Chen SY, Huang PF, Chang SC. Age Distribution for T Cell Reactivity to Vaccinia Virus in a Healthy Population. *Clin Infect Dis*. 2004;38:86–9.
27. Hatakeyama S, Moriya K, Saijo M, Morisawa Y, Kurane I, Koike K, et al. Persisting humoral antiviral immunity within the Japanese population after the discontinuation in 1976 of routine smallpox vaccinations. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2005;12:520–4.
28. Putz MM, Alberini I, Midgley CM, Manini I, Montomoli E, Smith GL. Prevalence of antibodies to vaccinia virus after smallpox vaccination in Italy. *J Gen Virol*. 2005;86:2955–60.
29. Viner KM, Isaacs SN. Activity of vaccinia-virus neutralizing antibody in the sera of smallpox vaccines. *Microbes Infect*. 2005;7:579–83.
30. Taub DD, Ershler WB, Janowski M, Artz A, Key ML, McKelvey J, et al. Immunity from Smallpox Vaccine Persists for Decades: A Longitudinal Study. *Am J Med*. 2008;121:1058–64.
31. Liu Q, Huang W, Nie J, Zhu R, Gao D, Song A, et al. A Novel High-Throughput Vaccinia Virus Neutralization Assay and Preexisting Immunity in Populations from Different Geographic Regions in China. *PLoS One*. 2012;7, e33392.
32. Trindade GS, Guedes MIC, Drumond BP, Mota BE, Abrahão JS, Lobato ZI, et al. Zoonotic Vaccinia Virus: Clinical and Immunological Characteristics in a Naturally Infected Patient. *Clin Infect Dis*. 2009;48:e37–40.
33. Assis FL, Borges IA, Ferreira PC, Bonjardim CA, Trindade GS, Lobato ZI, et al. Group 2 Vaccinia Virus. *Brazil Emerg Infect Dis*. 2012;18:2035–8.
34. Costa GB, Borges IA, Alves PA, Miranda JB, Franco-Luiz AP, Ferreira PC, et al. Alternative routes of zoonotic Vaccinia virus transmission. *Brazil Emerg Infect Dis*. 2015;21:2244–6.
35. Reynolds MG, Carroll DS, Olson VA, Hughes C, Galley J, Likos A, et al. A silent enzootic of an orthopoxvirus in Ghana, West Africa: Evidence for multi-species involvement in the absence of widespread human disease. *Am J Trop Med Hyg*. 2010;82:746–54.
36. Reynolds MG, Damon IK. Outbreaks of human monkeypox after cessation of smallpox vaccination. *Trends Microbiol*. 2012;20(2):80–7.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at  
[www.biomedcentral.com/submit](http://www.biomedcentral.com/submit)



#### IV. DISCUSSÃO

Infecções por Poxvírus envolvendo bovinos e humanos após a vacinação contra a varíola, principalmente de pessoas ligadas à área rural, têm sido descritas em diferentes países (ESSBAUER *et al.*, 2010; SINGH *et al.*, 2012) e também no Brasil (da FONSECA *et al.*, 2011; KROON *et al.*, 2011). Desde o final da década de 90, diferentes amostras de VACV têm sido identificadas no Brasil, relacionadas principalmente à infecção humana e de bovinos.

Até meados da década de 2000, as infecções por Poxvírus concentravam-se apenas na região sudeste (DAMASO *et al.*, 2000; TRINDADE *et al.*, 2003; LEITE *et al.*, 2003; LOBATO *et al.*, 2005). Posteriormente, outros casos foram registrados nas demais regiões brasileiras e, atualmente, o VACV ocorre em todo o território nacional (ABRAHÃO *et al.*, 2010; ASSIS *et al.*, 2013; BRUM *et al.*, 2010; QUIXABEIRA-SANTOS *et al.*, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2013; SANT'ANA *et al.*, 2013a; 2013b).

A identificação do vírus foi inicialmente relatada em roedores (DINIZ *et al.*, 1998; FONSECA *et al.*, 1998; MARQUES *et al.*, 2001; FONSECA *et al.*, 2002; TRINDADE *et al.*, 2004), e posteriormente, causando sintomatologia clínica em bovinos, caracterizando a doença conhecida/designada por Vaccínia Bovina, acometendo também humanos através do contato direto com esses animais infectados (DAMASO *et al.*, 2000; TRINDADE *et al.*, 2003; NAGASSE-SUGAHARA *et al.*, 2004; LEITE *et al.*, 2005; LOBATO *et al.*, 2005; MEGID *et al.*, 2008; SILVA-FERNANDES *et al.*, 2009; SCHATZMAYR *et al.*, 2011). Entretanto, outros animais também foram registrados como hospedeiros do vírus, como equídeos e macacos (neste último apenas identificação sorológica e molecular, sem doença clínica) confirmando o amplo espectro de hospedeiros (ABRAHÃO *et al.*, 2009; BRUM *et al.*, 2010; CAMPOS *et al.*, 2011; ASSIS *et al.*, 2012).

O diagnóstico sorológico dos poxvírus é realizado basicamente através de testes de ELISA e soroneutralização. Estes testes são extremamente úteis, pois além de avaliarem o estado imune da população, atuam como ferramentas de vigilância epidemiológica. Os anticorpos induzidos após uma infecção viral podem ser

neutralizantes e não-neutralizantes. Os anticorpos neutralizantes se ligam ao vírus de forma que a ligação às proteínas virais com o receptor celular é impedida. Desta forma, ocorre um impedimento espacial da ligação da proteína viral com o receptor celular ou uma mudança conformacional das proteínas virais (SMITH e KOTWAL, 2002; HANGARTNER *et al.*, 2006).

Além disso, estas técnicas têm sido empregadas para verificar a robustez e duração da imunidade de diferentes populações que foram vacinadas contra a varíola. Como demonstrado por diversos autores, a resposta imune parece ser de longa duração, principalmente em grupos com idade superior a 30 anos (HAMMARLUND *et al.*, 2003; VINER e ISAACS 2005, KAREM *et al.*, 2005; HAMMARLUND *et al.*, 2005; PUTZ *et al.*, 2005; KIM *et al.*, 2006; PUTZ *et al.*, 2006; HATAKEYAMA *et al.*, 2005; LIU *et al.*, 2012; TAN *et al.*, 2012). Apesar de ainda não terem sido registradas infecções por OPV nessas regiões estudadas, não se pode descartar quaisquer tipo de contato desses indivíduos com possíveis amostras de OPV circulantes, uma vez que não há dados epidemiológicos a respeito de fatores de exposição, atividade profissional diretamente ligada ao manejo de animais ou histórico de viagens para áreas com ocorrência de OPV serem mencionados. Esse possível contato com amostras virais seria responsável pela manutenção da resposta imune.

Poucos estudos de caráter epidemiológico com o objetivo de determinar a soroprevalência e fatores de risco/exposição para poxvírus têm sido relatados. Lederman e colaboradores determinaram uma prevalência de 56.9% de anticorpos IgG anti-OPV em indivíduos de Likouala, República do Congo (África do Sul), e assim como neste trabalho, os autores encontraram uma associação significativa entre a presença de anticorpos e a idade. Esta associação pode estar relacionada com a vacinação, bem como com uma maior probabilidade de exposição ao vírus.

MacNeil e colaboradores (2011) verificaram uma prevalência de anticorpos IgG anti-OPV (1.3%) em Serra Leoa, e apenas um indivíduo apresentou anticorpo IgM. Mesmo a soroprevalência sendo baixa, isso indica que há circulação de OPV (nesse caso o MPXV) e que os casos ocorrem com baixa frequência.

No Brasil, também são poucos os dados epidemiológicos a respeito da VB, visto que esta não é uma doença de notificação obrigatória. Silva-Fernandes e colaboradores verificaram em 2009 uma prevalência de 57.4% de anticorpos IgG e 43% de anticorpos neutralizantes. Entretanto, todos os indivíduos incluídos neste estudo haviam sido infectados por VACV, o que torna inviável estimar a prevalência na população.

Em 2010, um estudo retrospectivo realizado por Mota e colaboradores verificou a soroprevalência de anticorpos anti-OPV numa população rural do Acre. Do total de 140 indivíduos que não alcançaram a vacinação contra a varíola, 32.9% foram IgG positivos, o que sugere uma circulação de OPV nesta população, uma vez que a prevalência entre os indivíduos vacinados ( $n = 154$ ) foi relativamente baixa, 23.4%.

Embora não tenha sido feita avaliação de anticorpos IgG totais neste trabalho, a soroprevalência encontrada para a população rural do Serro não é distante dos estudos acima citados (30.1%). É importante destacar que, os indivíduos assumidos como vacinados ( $n = 128$ ) tem como base sua idade, ou seja,  $\geq 35$  anos. Entretanto, no momento da inspeção clínica do braço esquerdo (local onde era aplicada a vacina contra a varíola), foi verificado que apenas 77 indivíduos possuem essa marca, o que os incluem num grupo de indivíduos verdadeiramente vacinados. Deste total, apenas 44 mantiveram resposta imune ativa. Entretanto, ambas as variáveis analisadas foram estatisticamente significativas, com valor de  $p < 0.000$ .

A marca vacinal é um bom indicador de que a vacinação foi efetiva, pois há multiplicação viral eficiente no local da inoculação com forte resposta celular, além da resposta humoral (KENNEDY *et al.*, 2009a; 2009b; TAN *et al.*, 2012). Como visto no parágrafo anterior, esta situação está de acordo com o nosso estudo. Kennedy e colaboradores (2009b) também mostraram que todos os indivíduos incluídos em sua pesquisa (total de 1076) mantêm altos títulos de anticorpos neutralizantes, embora a maioria seja militares com tempo de vacinação máximo de 4 anos. Diferentemente, a população aqui avaliada foi vacinada apenas durante a campanha de erradicação da varíola, onde apenas 13 indivíduos mantiveram altos títulos de anticorpos (entre 6400 e 12800 UN/ml). Mesmo que haja um contato prévio com algum OPV

circulante na região, a maioria dos indivíduos soropositivos ( $n = 61$ ) possuem baixos títulos de anticorpos neutralizantes (entre 100 e 3200 UN/ml).

Tan e colaboradores (2012) também mostraram que a resposta de anticorpos produzida por indivíduos que possuem a marca vacinal não é diferentemente significativa daqueles que não possuem a marca. Contudo, o mesmo estudo demonstrou que havia uma resposta imunológica prévia, tanto em indivíduos com marca vacinal quanto naqueles que não a possuíam. Essa resposta prévia pode estar relacionada devido a algum tipo de exposição à OPV (TAN *et al.*, 2012). No caso da população analisada neste estudo, o mesmo pode ser considerado, uma vez que indivíduos sem marca vacinal ( $n = 30$ ) podem ter sido expostos a uma baixa carga viral, insuficiente para produzir doença e manifestações clínicas, mas suficiente para sua imunização.

Como descrito em outros estudos, o declínio da imunidade contra OPV em indivíduos que foram vacinados pode ter várias explicações, sendo a primeira delas atribuída a queda da imunidade devido ao avanço da idade, como relatado por Hsieh e colaboradores (2004), onde a imunidade fornecida pela vacinação tende a declinar entre 20 e 30 anos, com uma queda específica nos níveis de linfócitos T.

Além disso, um dos 8 indivíduos infectados durante os surtos tem idade igual a 48 anos (paciente A descrito no item 5.8) e por outro indivíduo que tem idade igual a 58 anos (sendo que este não possui marca vacinal). Outra explicação para o declínio da resposta imune seria a baixa qualidade da vacina recebida pela população brasileira, talvez principalmente pelas populações rurais. Como discutido por Fenner (1988), as vacinas que foram produzidas no Brasil raramente atingiam os padrões de qualidade internacionais, apresentando muitas vezes contaminação por bactérias patogênicas. Além disso, a eficácia pode ter sido comprometida durante sua distribuição no campo ou em áreas mais remotas, através de transporte e refrigeração inadequada, podendo levar a uma inativação das partículas virais ou desnaturação de proteínas de superfície que são antigênicas.

Neste estudo, foi verificado que a idade é significativamente relacionada à presença de anticorpos neutralizantes ( $p < 0.000$ ), o que pode ser facilmente associado com a

imunidade conferida pela vacinação contra varíola. Entretanto, este achado também pode estar diretamente ligado à ocupação de cada indivíduo, onde a maioria trabalha em atividades ligadas ao meio rural e pelo contato direto com bovinos e equídeos, ambas variáveis estatisticamente significativas para a presença de anticorpos neutralizantes, com valores de p iguais a 0.049 e 0.046, respectivamente.

A falta de higiene da ordenha ocorre principalmente em propriedades que utilizam a ordenha manual. Na maioria das vezes, as propriedades com ordenha mecânica adotam medidas de desinfecção mais eficientes (LOBATO *et al.*, 2005). Como observado neste trabalho, 85 indivíduos (93.4%) de um total de 91 realizam a higiene das mãos, sendo que 83 deles fazem o procedimento antes e após a ordenha. Entretanto, esta higiene é feita com água e sabão, e apenas uma minoria 27 (29.6%) utiliza cloro para a desinfecção final. Do mesmo modo, 78 indivíduos (38.4%) realizam a desinfecção dos tetos das vacas. O uso de desinfetante eficiente, como cloro ou iodo (principalmente) não deve ser descartado, pois estes minimizam a carga viral no ambiente, nas mãos dos ordenhadores e também nos tetos das vacas, reduzindo riscos de transmissão da doença para humanos e animais, diminuindo conseqüentemente o número de infectados (LOBATO *et al.*, 2005).

A ocorrência de VB é mais frequentemente observada quando ordenha manual é predominante, embora casos esporádicos da doença sejam relatados em propriedades com ordenha mecânica. Lobato e colaboradores (2005) observaram taxas de infecção inferiores em propriedades com ordenha mecânica quando comparadas com propriedades com ordenha manual. Este fato pode estar diretamente relacionado ao manejo diferenciado nas propriedades onde a utilização de desinfetantes para higienização das ordenhadeiras diminui a sobrevivência de vários patógenos, reduzindo a carga microbiana e diminuindo a probabilidade de transferência da doença de um animal para outro e para o homem, contribuindo para uma menor disseminação da doença dentro da mesma propriedade e também para outras.

Essas evidências corroboram o achado de caso clínico durante uma das visitas, onde um paciente infectado (paciente A) transmitiu a infecção para seus familiares através do contato direto ou até mesmo através de fômites. Apesar da



soropositividade dos pacientes A e B serem atribuídas à vacinação contra varíola, a DNAemia encontrada em todos os pacientes, principalmente nas filhas cuja idade são 13 e 14 anos, e que não possuem contato com bovinos e equídeos, reforça o caso de infecção através de contato direto.

Outro fator que deve ser considerado é o contato desses pacientes com o leite cru (*in natura*) e queijo feito a partir deste material. Como mostrado em alguns estudos, DNA viral e partículas viáveis podem ser encontrados nestes alimentos. Além disso, o tratamento térmico com diferentes temperaturas diminui a carga viral, mas não as elimina completamente (ABRAHÃO *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2010). Talvez, a imunidade presente na paciente E, e a DNAemia nos demais pacientes possam ser atribuídas a este fato.

Vale acrescentar que a imunidade humoral acessada neste estudo diz respeito somente a anticorpos neutralizantes, que estão fortemente relacionados à imunidade protetora e à vacinação. Possivelmente, a avaliação de outros anticorpos, principalmente da classe IgG não neutralizantes, fornecessem uma real estimativa do contato da população com amostras de OPV circulantes nessa região, principalmente em indivíduos oligossintomáticos e/ou assintomáticos.

## V. CONCLUSÕES

1. A partir da técnica de soroneutralização, foi possível verificar uma soroprevalência de anticorpos neutralizantes anti-ortopoxvírus de 30.1% na população rural do município do Serro.
2. Considerando a região estudada e a alta frequência de surtos de VB, foi confirmada a ocorrência de um caso clínico humano, com transmissão intrafamiliar do vírus, fato este descrito apenas em 2 ocasiões no Brasil.
3. A duração e magnitude da imunidade antiviral induzida pela vacinação e/ou pela infecção recente pelo VACV foi estimada através da análise de anticorpos neutralizantes, visto que estes estão intimamente relacionados à proteção.
4. Foram identificados fatores de exposição associados à sorologia positiva, como: contato com bovinos e equídeos, histórico de vacinação, presença da marca vacinal, participação na produção do queijo e a prática da ordenha, os quais foram estatisticamente significativos com um valor de  $p \leq 0.05$ . Além disso, outros fatores como a idade e *status* ocupacional também foram estatisticamente relevantes.

## VI. REFERÊNCIAS

ABRAHÃO, J. S.; DRUMOND, B. P.; TRINDADE, G. S.; *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.; *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.; *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.; *et al.* 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.; ASSIS, F. L.; *et al.* Human *Vaccinia virus* and *Pseudocowpox virus* co-infection: Clinical description and phylogenetic characterization. **Journal of Clinical Virology**, v.48, n.1, p.69-72, 2010b.

ABRAHÃO, J. S.; SILVA-FERNANDES, A. T.; LIMA, L. S.; *et al.* Vaccinia Virus Infection in Monkeys, Brazilian Amazon. **Emerging Infectious Diseases**, v.16, n.6, p.976-79, 2010a.

ABRAHÃO, J. S.; TRINDADE G. S.; FERREIRA, J. M. S.; *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.

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

ANDERSON, M. G.; FRENKEL, L. D.; HOMANN, S.; *et al.* A case of severe monkeypox virus disease in an American child: emerging infections and changing professional values. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v.22, n.12, p.1093-96, 2003.

ASSIS, F. L.; BORGES, I. A.; FERREIRA, P. C. P.; *et al.* Group 2 Vaccinia Virus, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.18, n.12, p.2035-38, 2012.

ASSIS, F. L.; BORGES, I. A.; MESQUITA, V. S.; *et al.* Vaccinia Virus in Household Environment during Bovine Vaccinia Outbreak, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.19, n.12, p.2046-p.2047, 2013b.

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

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

BENZEKRI, N.; GOLDMAN, E.; LEWIS, F.; *et al.* Laboratory worker knowledge, attitudes and practices towards smallpox vaccine. **Occupational Medicine**, v.60, p.75-7, 2010.

BERNARD, S. M.; ANDERSON, S. A. Qualitative Assessment of Risk for Monkeypox Associated with Domestic Trade in Certain Animal Species, United States. **Emerging Infectious Diseases**, v.12, n.12, p.1827-33, 2006.

BHANUPRAKASH, V.; VENKATESAN, G.; BALAMURUGAN, V.; *et al.* Zoonotic Infections of Buffalopox in India. **Zoonoses Public Health**, v.57, p.149–155, 2010.

BONNEKOH, B.; FALK, K.; RECKLING, K. F.; *et al.* Cowpox infection transmitted from a domestic cat. **Journal of the German Society of Dermatology**, v.6, n.3, p.210-3, 2008.

BROWN, E.; SENKEVICH, T. A.; MOSS, B. Vaccinia Virus F9 Virion Membrane Protein Is Required for Entry but Not Virus Assembly, in Contrast to the Related L1 Protein. **Journal of Virology**, v.80, n.19, p.0455-64, 2006.

BROYLES, S. S. Vaccinia virus transcription. **Journal of General Virology**, v.84, p.2293-2303, 2003.

BRUM, M. C. S.; dos ANJOS, B. L.; NOGUEIRA, C. E. W.; *et al.* 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.; *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.

CARGNELUTTI, J. F.; WENDLANTI, A.; WEIBLEN, R.; *et al.* Guinea pigs experimentally infected with vaccinia virus replicate and shed, but do not transmit the virus. **Ciência Rural, Santa Maria**, v.42, n.6, p.1057-60, 2012.

CARROLL, D. S.; EMERSON, G. L.; LI, Y., *et al.* Chasing Jenner's vaccine: revisiting cowpox virus classification. **PLoS ONE**, v.6, n.8, p.e23086, 2011.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Household Transmission of Vaccinia Virus from Contact with a Military Smallpox Vaccinee – Illinois and Indiana, 2007. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.56, n.17, p.417-9, 2007b.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Laboratory Acquired-Vaccinia Exposure and Infections – United States, 2005-2007. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.57, n.15, p. 401-3, 2008.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Laboratory Acquired-Vaccinia Virus Infection – Virginia, 2008. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.58, n.29, p. 797-800, 2009.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Secondary and Tertiary Transmission of Vaccinia Virus After Sexual Contact with a Military Smallpox Vaccine – San Diego, California, 2012. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.62, n.8, p.145-6, 2013.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Vaccinia Virus Infection After Sexual Contact with a Military Smallpox Vaccine – Washington, 2010. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.59, n.25, 2010a.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Vulvar Vaccinia Infection After Sexual Contact With a Military Smallpox Vaccinee – Alaska, 2006. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.56, n.19, 2007a.

CHANG, S. J.; CHANG, Y. Y.; IZMAILYAN, R.; *et al.* Vaccinia Virus A25 and A26 Proteins Are Fusion Suppressors for Mature Virions and Determine Strain-Specific Virus Entry Pathways into HeLa, CHO-K1 and L Cells. **Journal of Virology**, v.84, n.17, p.8422-32, 2010b.

CHEN, Z.; EARL, P.; AMERICO, J.; *et al.* Chimpanzee/human mAbs to vaccinia virus B5 protein neutralize vaccinia and smallpox viruses and protect mice against vaccinia virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.103, n.6, p.1882-87.

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

COSTA, R. V. C.; SIMONETTI, B. R.; ABREU, D. C.; *et al.* Animal infections by vaccinia-like viruses in the State of Rio de Janeiro: 2 - Paraiba river valley. **Virus Reviews & Research**, v. 12, n. 1-2, p. 37-42, 2007.

CROTTY, S.; FELGNER, P.; DAVIES, H.; *et al.* Cutting Edge: Long-Term B Cell Memory in Humans after Smallpox Vaccination. **The Journal of Immunology**, v.171, n.10, p.4969-73, 2003.

D'ANUNCIAÇÃO, L.; GUEDES, M. I. M.; OLIVEIRA, T. L.; *et al.* Filling One More Gap: Experimental Evidence of Horizontal Transmission of Vaccinia Virus Between Bovines and Rodents. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v.12, n.1, p.61-4, 2012.

da FONSECA, F. G.; TRINDADE, G. S.; SILVA, R. L.; *et al.* Characterization of a vaccinia-like virus isolated in a Brazilian forest. **Journal of General Virology**, v.83, n.1, p.223-8, 2002.

da SILVA, A. C.; REIS, B. B.; RICCI JUNIOR, J. E. R.; *et al.* Infecções 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.

DAMASO C. R. A.; ESPOSITO J. J.; CONDIT, R. C.; *et al.* An emergent poxvirus from humans and cattle in Rio de Janeiro State: Cantagalo virus may derive from Brazilian smallpox vaccine. **Virology**, v.277, n.2, p.439-449, 2000.

DAMLE A. S.; GAIKWAD, A. A.; PATWARDHANN. S.; *et al.* Outbreak of human buffalopox infection. **Journal of Global Infectious Diseases**, v.3, n.2, p.187-8, 2011.

DAMON, I. K. Poxviruses. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. *et al.* (Eds), **Fields Virology**, 6.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2013. p.2160-2184.

DAMON, I. K. Status of human monkeypox: clinical disease, epidemiology and research. **Vaccine**, v.29, sup.4, D54-9, 2011.

DAMON, I. K.; DAVIDSON, W. B.; HUGHES, C. M.; *et al.* Evaluation of smallpox vaccines using variola neutralization. **Journal of General Virology**, v.90, p.1962-66, 2009.

DAMON, I. K.; ROTH, C. E.; CHOWDHARY, V. Discovery of Monkeypox in Sudan. **The New England Journal of Medicine**, v.355, n.9, p.962-3, 2006.

DAVIES D. H.; McCAUSLAND, M. M.; VALDEZ, C.; *et al.* Vaccinia virus H3L envelope protein is a major target of neutralizing antibodies in humans and elicits protection against lethal challenge in mice. **Journal of Virology**, v.79, n.18, p.11724-33, 2005.

DINIZ, S.; TRINDADE, G. S.; FONSECA, F. G.; *et al.* 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.

DIVEN, D. G. An overview of poxviruses. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v.44, n.1, p.1-16, 2001.

DOCEUL, V.; HOLLINSHEAD, M.; van der LINDEN, L.; *et al.* Repulsion of superinfecting virions: a mechanism for rapid virus spread. **Science**, v.327, n.5967, p.873-6, 2010.

DONATELE, D. M.; TRAVASSOS, C. E. P. F.; LEITE, J. A.; *et al.* 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.

DOWER, K.; RUBINS, K. H.; HENSLEY, L. E.; *et al.* Development of Vaccinia Reporter Viruses for Rapid, High Content Analysis of Viral Function at All Stages of Gene Expression. **Antiviral Research**, v.91, n.1, p.72-80, 2011.

DRUMOND, B. P.; LEITE, J. A.; FONSECA, F. G.; *et al.* Brazilian Vaccinia virus strains are genetically divergent and differ from the Lister vaccine strain. **Microbes and Infection**, v.10, p.185-97, 2008.

DUMBELL K., RICHARDSON M. Virological investigation of specimens from buffaloes affected by buffalopox in Maharashtra State, India between 1985 and 1987. **Archives of Virology**, v.128, n.3-4, p.257-67, 1993.



EICHNER, M. Analysis of Historical Data Suggests Long-lasting Protective Effects of Smallpox Vaccination. **American Journal of Epidemiology**, v.158, n.8, p.717-23, 2003.

ESSBAUER, S.; MEYER, H.; OZCURUMEZ-PORSCH, M.; *et al.* Long-Lasting Stability of Vaccinia Virus (Orthopoxvirus) in Food and Environmental Samples. **Zoonoses and Public Health**, v.54, p.118-24, 2007.

ESSBAUER, S.; PFEFFER, M.; MEYER, H. Zoonotic poxviruses. **Veterinary Microbiology**, v.140, p.229-36, 2010.

ESTEBAN, D. J.; BULLER, R. M. Ectromelia virus: the causative agent of mousepox. **Journal of General Virology**, v.86, n.10, p. 2645-59, 2005.

ESTEBAN, D. J.; HUTCHINSON, A. P. Genes in the terminal regions of orthopoxvirus genomes experience adaptive molecular evolution. **BMC Genomics**, v.23, n.12, p.261-73, 2011.

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

FERREIRA, J. M. S.; DRUMOND, B. P.; GUEDES, M. I. M. C.; *et al.* Virulence in Murine Model Shows the Existence of Two Distinct Populations of Brazilian *Vaccinia virus* Strains. **PLoS ONE**, v.3, n.8, e3043, 2008.

FONSECA F. G.; KROON, E. G.; NOGUEIRA, M. L.; *et al.* 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.; *et al.* Morphological and molecular characterization of the poxvirus BeAn 58058. **Archives of Virology**, v.143, n.6, p.1171-86, 1998.

GARCÍA, A. D.; MESEDA, C. A.; MAYER, A. E.; *et al.* Characterization and Use of Mammalian-Expressed Vaccinia Virus Extracellular Membrane Proteins for Quantification of the Humoral Immune Response to Smallpox Vaccines. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.14, n.8, p.1032-44, 2007.

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

HAMMARLUND, E.; LEWIS, M. W.; HANSEN, S. G.; *et al.* Duration of antiviral immunity after smallpox vaccination. **Nature Medicine**, v.9, n.9, p.1131-37, 2003.

HATAKEYAMA, S.; MORIYA, K.; SAIJO, M.; *et al.* Persisting Humoral Antiviral Immunity within the Japanese Population after the Discontinuation in 1976 of Routine Smallpox Vaccinations. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.12, n.4, p.520-24, 2005.

HSIEH, S. M.; PAN, S. C.; CHEN, S. Y.; *et al.* Age distribution of T cell reactivity to vaccinia virus in a healthy population. **Clinical Infectious Diseases**, v.38, n.1, p.86-9, 2004.

HUGHES, C. M.; BLYTHE, D.; LI, Y.; *et al.* Vaccinia Virus Infections in Martial Arts Gym, Maryland, USA, 2008. **Emerging Infectious Diseases**, v.17, n.4, p.730-33, 2011.

HUGHES, C. M.; NEWMAN, F. K.; DAVIDSON, W. B.; *et al.* Analysis of Variola and Vaccinia Virus Neutralization Assays for Smallpox Vaccines. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.19, n.7, p.1116-8, 2012.

HUHN, G. D.; BAUER, A. M.; YORITA, K.; *et al.* Clinical Characteristics of Human Monkeypox, and Risks Factors for Severe Disease. **Clinical Infectious Diseases**, v.41, n.12, p.1742-51, 2005.

Internacional Committee On Taxonomy Of Viruses (ICTV). Master Species List 2011. Disponível em <<http://www.ictvonline.org>> Acesso em 10/03/2012.

ISAACS, S. N. Working Safely with Vaccinia Virus: Laboratory Technique and Review of Published Cases of Accidental Laboratory Infections. *Vaccinia Virus and Poxvirology: Methods and Protocols* – Chapter 1. **Methods in Molecular Biology**, v.890, p.1-22.

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

KAREM, K. L.; REYNOLDS, M.; BRADEN, Z.; *et al.* Characterization of acute-phase humoral immunity to monkeypox: use of immunoglobulin M enzyme-linked immunosorbent assay for detection of monkeypox infection during the 2003 North American outbreak. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.12, n.7, p.867-872, 2005.

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

KENNEDY, R. B.; OVSYANNIKOVA, I. G.; PANKRATZ, V. S.; *et al.* Gender effects on humoral immune responses to smallpox vaccine. **Vaccine**, v.27, n.25-26, p.3319-3323, 2009b.

KIM, S. H.; YEO, S. G.; PARL, K. H.; *et al.* The persistence of humoral and cellular immunities more than three decades after smallpox vaccination. **Clinical Microbiology and Infection**, v.13, n.1, p.91-3, 2006.

KINNUNEN, P. M.; HENTTONEN, H.; HOFFMAN, B.; *et al.* Orthopox Virus Infections in Eurasian Wild Rodents. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v.11, n.8, p.1133-9, 2011.

KRAMSKI, M.; DROZD, A.; LICHTFUSS, G. F.; *et al.* Rapid detection of anti-Vaccinia virus neutralizing antibodies. **Virology Journal**, v.8, n.139, 2011.

KRETZSCHMAR, M.; WALLINGA, J.; TEUNIS, P.; *et al.* Frequency of Adverse Events after Vaccination with Different Vaccinia Strains. **PLoS Medicine**, v.3, n.8, e272.

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

KURTH, A.; WIBBELT, G.; GERBER, H. P.; *et al.* Rat-to-Elephant-to-Human Transmission of Cowpox Virus. **Emerging Infectious Diseases**, v.14, n.4, p.670-1, 2008.

LAW, R. Risk of cowpox to small animal practitioners. **Veterinary Record**, v.166, n.20, p.631, 2010.

LAWRENCE, S. J.; LOTTENBACH, K. R.; NEWMAN, F. K.; *et al.* Antibody responses to vaccinia membrane proteins following smallpox vaccinations. **Journal of Infectious Diseases**, v.196, n.2, p.220-29, 2007.

LEDERMAN, E. R.; REYNOLDS, M. G.; KAREM, K.; *et al.* Prevalence of Antibodies against Orthopoxviruses against Residents in Likouala Region, Republic of Congo: Evidence for Monkeypox Virus Exposure. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.77, n.6, p.1150-6, 2007.

LEDERMAN, E.; MIRAMONTES, R.; OPENSHAW, J.; *et al.* Eczema vaccinatum resulting from the transmission of vaccinia virus from a smallpox vaccinee: An investigation of potential fomites in the home environment. **Vaccine**, v.27, p.375-77, 2009.

LEITE, J. A.; DRUMOND, B. P.; TRINDADE, G. S.; *et al.* Brazilian Vaccinia vírus strains show genetic polymorphism at the *ati* gene. **Virus Genes**, v.35, n.3, p.531-9, 2007.

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

LEWIS, F. M. T.; CHERNAK, E.; GOLDMAN, E.; *et al.* Ocular Vaccinia Infection in Laboratory Worker, Philadelphia, 2004. **Emerging Infectious Diseases**, v.12, n.1, p.134-37, 2006.

LEWIS-JONES, S. The zoonotic poxviruses. **Dermatology Nursing**, v.14, n.2, p.79-82, 2002.

LEWIS-JONES, S. Zoonotic poxvirus infections in humans. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v.17, n.2, p.81-9, 2004.

LIU, Q.; HUANG, W.; NIE, J.; *et al.* A Novel High-Throughput Vaccinia Virus Neutralization Assay and Preexisting Immunity in Populations from Different Geographic Regions in China. **PLoS ONE**, v.7, n.3, e33392, 2012.

LOBATO, Z. I. P.; TRINDADE, G. S.; FROIS, M. C. 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.

LOEB, M.; ZANDO, I.; ORVIDAS, M. C.; *et al.* Laboratory-acquired vaccinia infection. **Canada Communicable Disease Report**, v.29, n.15, p.134-36, 2003.

LUSTIG, S.; FOGG, C.; WHITBECK, J. C.; *et al.* Combinations of polyclonal or monoclonal antibodies to proteins of the outer membranes of the two infections forms of vaccinia virus protect mice against a lethal respiratory challenge. **Journal of Virology**, v.79, n.21, p.13454-62, 2005.

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

MACNEIL, A.; REYNOLDS, M. G.; DAMON, I. K. Risk associated with vaccinia virus in the laboratory. **Virology**, v.385, p.1-4, 2009.

MARQUES, J. T.; TRINDADE, G. D.; DA FONSECA, F. G.; *et al.* Characterization of ATI, TK and IFN-alpha/betaR genes in the genome of the BeAn 58058 virus, a naturally attenuated wild Orthopoxvirus. **Virus Genes**, v.23, n.3, p.291-301, 2001.

MCCOLLUM, A. M.; AUSTIN, C.; NAWROCKI, J.; *et al.* Investigation of the First Laboratory-Acquired Human Cowpox Virus Infection in the United States. **The Journal of Infectious Diseases**, v.206, p.63-8, 2012.

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

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.; *et al.* Spread of cantagalo virus to northern Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.15, n.7, p.1142-3, 2009.

MEDEIROS-SILVA, D. C.; MOREIRA-SILVA, E. A. S.; GOMES, J. A. S.; FONSECA, F. G.; *et al.* 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.; *et al.* 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.; *et al.* Vaccinia virus Zoonotic Infection, Sao Paulo State, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.18, n.1, p.189-191, 2012.

MEMPEL, M.; ISA, G.; KLUGBAUER, N.; MEYER, H.; *et al.* Laboratory Acquired Infection with Recombinant Vaccinia Virus Containing an Immunomodulating Construct. **The Society for Investigate Dermatology**, v.120, n.3, p.356-8, 2003.

MERCER, J.; KNÉBEL, S.; SCHMIDT, F. I.; *et al.* Vaccinia virus strains use distinct forms of macropinocytosis for host-cell entry. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.107, n.20, n.9643-51, 2010.

MEYER, H.; ROPP, S. L.; ESPOSITO, J. J. Gene for A-type inclusion body protein is useful for a polimerase chain reaction assay to differentiate orthopoxviruses. **Journal of Virological Methods**, v.64, n.2, p.217-21, 1997.

MILLER, L.; RICHTER, M.; HAPKE, C.; *et al.* Genomic Expression Libraries for the Identification of Cross-Reactive Orthopoxvirus Antigens. **PLoS ONE**, v.6, n.7, e21950, 2011.

MOSS, B. Poxviridae: The Viruses and Their Replication. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. *et al.* (Eds), **Fields Virology**, 6.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2013. p.2129-2159.

MOSS, B. Poxvirus Cell Entry: How Many Proteins Does It Take? **Viruses**, v.4, n.5, p.688-707, 2012.

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.

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

MOUSSATCHÉ, N.; TUYAMA, M.; KATO, S. E. M.; *et al.* Accidental Infection of Laboratory Worker with Vaccinia virus. **Emerging Infectious Diseases**, v.9, n.6, p.724-26, 2003.

NAGASSE-SUGAHARA, T. K.; KISIELIUS, J. J.; UEDA-ITO, M.; *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.

NEFF, J. M.; LANE, J. M.; FULGINITI, V. A.; *et al.* Contact Vaccinia – Transmission of Vaccinia From Smallpox Vaccination. **Journal of American Medical Association**, v.288, n.15, 2002.

NEWMAN, F. K.; FREY, S. E.; BLEVINS, T. P.; *et al.* Improved Assay To Detect Neutralizing Antibody following Vaccination with Diluted or Undiluted Vaccinia (Dryvax) Vaccine. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.7, p.3154-7, 2003.

NITSHCE, A.; KURTH, A.; PAULI, G. Viremia in human Cowpox virus infection. **Journal of Clinical Virology**, v.40, n.2, p.160-2, 2007.

OJEDA, S.; DOMI, A.; MOSS, B. Vaccinia virus G9 protein is an essential component of the poxvirus entry-fusion complex. **Journal of Virology**, v.80, n.19, p.9822-30, 2006.

OLIVEIRA, D. B.; ASSIS, F. L.; FERREIRA, P. C. P.; *et al.* Group 1 Vaccinia virus zoonotic outbreak in Maranhão State, Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.89, n.5, 2013.

OPENSHAW, P. M. J.; ALWAN, W. H.; CHERRIE, A. H.; *et al.* Accidental infection of laboratory worker with recombinant vaccinia virus. **The Lancet**, v.338, p.459, 1991.

PANCHANATHAN, V.; CHAUDHRI, G.; KARUPIAH, G. Correlates of protective immunity in poxvirus infection: where does antibody stands? **Immunology and Cell Biology**, v.86, n.1, p.80-86, 2008.



PERES, M. G.; BACCHIEGA, T. S.; APPOLINÁRIO, C. 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 of Virology**, 2013.

PUTZ, M. M.; ALBERINI, I.; MIDGLEY, C. M.; *et al.* Prevalence of antibodies to Vaccinia virus after smallpox vaccination in Italy. **Journal of General Virology**, v.86, p.2955-60, 2005.

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

RAMÍREZ, J. C.; TAPIA E.; ESTEBAN M. Administration to mice of a monoclonal antibody that neutralizes the intracellular mature virus form of vaccinia virus limits replication efficiently under prophylactic and therapeutic conditions. **Journal of General Virology**, v.83, p.1059-67, 2002.

REED, J. L.; SCOTT, D. E.; BRAY, M. Eczema Vaccinatum. **Clinical Infectious Diseases**, v.54, n.6, p.832-40, 2012.

REED, K. D.; MELSKI, J. W.; GRAHAM, M. B.; *et al.* The Detection of Monkeypox in Humans in the Western Hemisphere. **The New England Journal of Medicine**, v.350, n.4, p.342-50, 2004.

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, 2012.

REYNOLDS, M. G.; EMERSON, G. L.; PUKUTA, E.; *et al.* Short Report: Detection of Human Monkeypox in the Republic of the Congo Following Intensive Community Education. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.88, n.5, p.982-5, 2013.

REYNOLDS, M. G.; YORITA, K. L.; KUEHNERT, M. J.; *et al.* Clinical Manifestations of Human Monkeypox Influenced by Route of Infection. **Journal of Infectious Diseases**, v.194, n.6, p.773-80, 2006.

RIET-CORREA, F.; MOOJEN, V.; ROEHE, P. M.; *et al.* Viroses confundíveis com febre aftosa. **Ciência Rural, Santa Maria**, v.26, n.2, p.323-332, 1996.

RIVETTI JR, A. V.; GUEDES, M. I. M. C.; REHFELD, I. 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.; *et al.* PCR Strategy for Identification and Differentiation of Smallpox and Other Orthopoxviruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, n.8, p.2069-76, 1995.

SALZER, J. S.; CARROLL, D. S.; RWEGO, I. B.; *et al.* Serologic evidence for circulating Orthopoxviruses in peridomestic rodents from Rural Uganda. **Journal of Wildlife Diseases**, v.49, n.1, p.125-31, 2013.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. **Cold Spring Harbour Laboratory Press**, New York. 5th ed. 1989.

SANDGREN, K. J.; WILKINSON, J.; MIRANDA-SAKSENA, M.; *et al.* A Differential Role for Macropinocytosis is Mediating Entry of the Two Forms of Vaccinia Virus into Dendritic Cells. **PLoS Pathogens**, v.6, n.4, e1000866, 2010.

SANT'ANA, F. J. F.; LEAL, A. A.; RABELO, R. E.; VULCANI, V. A. S.; *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, 2013b.

SANT'ANA, F. J. F.; LEAL, F. A. A.; RABELO, R. E.; *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**, XX(X), 1-6, 2013a.

SCHATZMAYR, H. G.; COSTA, R. V. C.; GONÇALVES, M. C. R.; *et al.* Infecções humanas causadas por poxvirus relacionados ao vírus vaccinia no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.42, n.6, p.672-76, 2009.

SCHATZMAYR, H. G.; de LEMOS, E. R. S.; MAZUR, C.; *et al.* Detection of Poxvirus in Cattle Associated with Human Cases in the State of Rio de Janeiro: Preliminary Report. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.95, n.5, p.625-27, 2000.

SCHATZMAYR, H. G.; ROMJIN, P. C.; BARRETO, D. F.; *et al.* 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.

SCHMIDT, F. I.; BLECK, C. K. E.; HELENIUS, A.; *et al.* Vaccinia extracellular virions enter cells by macropinocytosis and acid-activated membrane rupture. **The EMBO Journal**, v.30, n.17, p.3647-61, 2011.

SCHMIDT, F. I.; BLECK, C. K. E.; REH, L.; *et al.* Vaccinia Virus Entry Is Followed by Core Activation and Proteasome-Mediated Release of the Immunomodulatory Effector VH1 from Lateral Bodies. **Cell Reports**, v.4, n.3, p.464-476, 2013.

SENKEVICH, T. G.; OJEDA, S.; TOWNSLEY, A.; *et al.* Poxvirus multiprotein entry-fusion complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.102, n.51, p.18572-7, 2005.

SENKEVICH, T. G.; WARD, B. M.; MOSS, B. Vaccinia virus Entry into Cells Is Dependent on a Virion Surface Protein Encoded by the A28L Gene. **Journal of Virology**, v.78, n.5, p.2357-66, 2004.

SHCHELKUNOV, S. N. Orthopoxvirus Genes That Mediate Disease Virulence and Host Tropism. **Advances in Virology**, v.2012, n.524743, 17 pages, 2012.

SHCHELKUNOV, S. N.; MARENNIKOVA S. S.; MOYER R. W. Classification of poxviruses and brief characterization of the genus Orthopoxvirus. *In*: Orthopoxviruses pathogenic for humans. New York: Springer Science, 2005, p. 11-18.

SILVA-FERNANDES A. T.; TRAVASSOS, C. E. P. F.; FERREIRA, J. M. S.; *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.; *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.; HOSAMANI, M.; BALAMURUGAN, V.; *et al.* An outbreak of buffalopox in buffalo (*Bubalus bubalis*) dairy herds in Aurangabad, India. **Revue Scientifique Technique Office International des Epizooties**, v.25, n.3, p.981-87, 2006.

SINGH, R. K.; HOSAMANI, M.; BALAMURUGAN, V.; *et al.* Buffalopox: an emerging and re-emerging zoonosis. **Animal Health Research Reviews**, v.8, n.1, p.105-14, 2007.

SMITH, G. L.; LAW, M. The exit of Vaccinia virus from infected cells. **Virus Research**, v.106, p.189-197, 2004.

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.

SMITH, S. A.; KOTWAL, G. J. Immune Response to Poxvirus Infections in Various Animals. **Critical Reviews in Microbiology**, v.28, n.3, p.149-185, 2002.

STORCH, G. A.; WANG, D. Diagnostic Virology In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. *et al.* (Eds), **Fields Virology**, 6.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2013. p.414-451.

STRIKAS, R. A.; NEFF, L. J.; ROTZ, L.; *et al.* US Civilian Smallpox Preparedness and Response Program, 2003. **Clinical Infectious Diseases**, v.46, Supl.3, p.S157-67, 2008.

TAN, X.; CHUN, S.; PABLO, J.; *et al.* Failure of the Smallpox Vaccine To Develop a Skin Lesion in Vaccinia Virus-Naïve Individuals Is Related to Differences in Antibody Profiles before Vaccination, No After. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.19, n.3, p.418-428, 2012.

TAUB, D. D.; ERSHLER, W. B.; JANOWSKI, M.; *et al.* Immunity from Smallpox Vaccine Persists for Decades: A Longitudinal Study. **The American Journal of Medicine**, v.121, p.1058-64, 2008.

TOWNSLEY, A. C.; WEISBERG, A. S.; WAGENAAR, T. R.; *et al.* Vaccinia virus Entry into Cells via a Low-pH-Dependent Endosomal Pathway. **Journal of Virology**, v.80, n.18, p.8899-8908, 2006.

TRINDADE, G. S.; FONSECA, F. G.; MARQUES, J. T.; *et al.* Araçatuba Virus: A Vaccinia-like 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.; *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.; *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.; *et al.* Brazilian Vaccinia Viruses and Their Origins. **Emerging Infectious Diseases**, v.13, n.7, p.965-72, 2007b.

TRINDADE, G. S.; GUEDES, M. I. C.; DRUMOND, B. 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.; *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.; *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.

TRINDADE, G. S.; VILELA, J. M. C.; FERREIRA, J. M. S.; *et al.* Use of atomic force microscopy as a diagnostic tool to identify orthopoxvirus. **Journal of Virological Methods**, v.141, p.198-204, 2007c.

VENKATESAN, G.; BALAMURUGAN, V.; PRABHU, M.; *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.

VERHEUST, C.; GOOSSENS, M.; PAUWELS, K.; *et al.* Biosafety aspects of modified vaccinia virus Ankara (MVA)-based vectors used for gene therapy or vaccination. **Vaccine**, v.30, n.16, p.2623-2632, 2012.

VINER, K. M.; ISAACS, S. N. Activity of vaccinia virus-neutralizing antibody in the sera of smallpox vaccinees. **Microbes and Infection**, v.7, p.579-583, 2005.

VAN VLIET, K.; MOHAMED, M. R.; ZHANG, L.; *et al.* Poxvirus Proteomics and Virus-Host Protein Interactions. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.73, n.4, p.730-49, 2009.

VOGEL, S.; SARDY, M.; GLOS, K.; *et al.* The Munich Outbreak of Cutaneous Cowpox Infection: Transmission by Infected Pet Rats. **Acta Dermatovenereologica**, v.92, n.2, p.126-31, 2012.

VORA, S.; DAMON, I.; FULGINITI, V.; *et al.* Severe Eczema Vaccinatum in a Household Contact of a Smallpox Vaccinee. **Clinical Infectious Diseases**, v.46, p.1555-61, 2008.

WERTHEIMER, E. R.; OLIVE, D. S.; BRUNDAGE, J. F.; *et al.* Contact transmission of vaccinia virus from smallpox vaccinees in the United States, 2003-2011. **Vaccine**, v.30, p.985-8, 2012.

WISER, I.; BALICER, R. D.; COHEN, D. An update on smallpox vaccine candidates and their role in bioterrorism related vaccination strategies. **Vaccine**, v.25, n.6, p.976-84, 2006.

WLODAVER, C. G.; PALUMBO, G. J.; WANER, J. L. Laboratory-acquired vaccinia infection. **Journal of Clinical Virology**, v.29, p.167-70, 2004.

XU, R.; JOHNSON, A. J.; LIGGITT, D.; *et al.* Cellular and humoral immunity against vaccinia virus infection of mice. **The Journal of Immunology**, v.172, p.6265-71, 2004.

YANG, Z.; REYNOLDS, S. E.; MARTENS, C. A.; *et al.* 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.

YOUNG, G. E.; HIDALGO, C. M.; SULLIVAN-FROHM, A.; *et al.* Secondary and Tertiary Transmission of Vaccinia Virus from US Military Service Member. **Emerging Infectious Diseases**, v.17, n.4, p.718-721, 2011.

ZAFAR, A.; SWANEPOEL, R.; HEWSON, R.; *et al.* Nosocomial Buffalopoxvirus Infection, Karachi, Pakistan. **Emerging Infectious Diseases**, v.13, n.6, p.902-4, 2007.



## VII. APÊNDICES

### 9.1. APÊNDICE A – Ficha epidemiológica para coleta de soros controles no Laboratório de Vírus

Data da Investigação: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Ficha n°: \_\_\_\_\_

Nome: \_\_\_\_\_

Nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_ Sexo: \_\_\_\_\_

Profissão: \_\_\_\_\_ Ano de ingresso no Laboratório \_\_\_\_\_

Ocupação no Laboratório \_\_\_\_\_

Foi vacinado (a) para varíola? 1. Sim ( ) 2. Não ( )

Se sim, possui a marca vacinal? 1. Sim ( ) 2. Não ( )

Trabalha ou já trabalhou com Poxvírus? 1. Sim ( ) 2. Não ( )

Assinalhe os EPI's e EPC's que sempre usou ao realizar experimentos: ( ) luvas ( ) jaleco/guarda-pó ( ) calça comprida ( ) sapatos fechados ( ) capela de fluxo laminar ( ) máscara, fora de capela de fluxo laminar ( ) óculos fora de capela de fluxo laminar ( ) propé.

Quais dos descritos acima você já esqueceu de usar? \_\_\_\_\_

Tem contato com material infectado com Poxvírus? 1. Sim ( ) 2. Não ( )

Que tipo de material? \_\_\_\_\_

Teve acidente com algum material infeccioso no Laboratório? 1. Sim ( ) 2. Não ( )

Se sim, qual tipo de material? \_\_\_\_\_

O acidente ocorreu mais de uma vez? 1. Sim ( ) 2. Não ( )

Teve algum tipo de sintoma após o acidente? 1. Febre ( ); 2. Cefaléia ( ); 3. Mialgia ( ); 4. Conjuntivite ( ); 5. Dor abdominal ( ); 6. Calafrios ( ); 7. Vômitos ( ); 8. Linfadenopatia ( ); 9. Náuseas ( ); 10. Icterícia ( ); 11. Lesões disseminadas ( );  
Outros \_\_\_\_\_

Já visitou áreas de ocorrência (surto) de vaccínia bovina? 1. Sim ( ) 2. Não ( )

Recorda de apresentar sintomatologia característica de infecção por vaccínia? 1. Sim ( ) 2. Não ( )

Já teve histórico de muito contato com equídeos, bovinos, roedores e outros mamíferos silvestres?  
1. Sim ( ) 2. Não ( )

---

Assinatura do voluntário

## 9.2. APÊNDICE B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



**Projeto:** Avaliação do risco de infecção em humanos pelo vírus da Vaccínia Bovina (VACV): estudo seccional em comunidades rurais do município do Serro, Minas Gerais.

Termo de consentimento livre e esclarecido  
(de acordo com Resolução nº 196/96, Conselho Nacional de Saúde)

Você está sendo convidado pelo nosso grupo a participar de uma pesquisa que tem como finalidade analisar a resposta do sistema imunológico contra a infecção pelo vírus da Vaccínia Bovina ou induzida pela vacinação contra a varíola, por viver em uma região onde está ocorrendo surtos desta doença. Assim, gostaríamos de convidá-lo a participar como voluntário de um estudo que nos auxiliará a compreender melhor esta doença, ajudando-nos a encontrar possíveis tratamentos e métodos de prevenção contra a mesma.

A vaccínia bovina é uma doença que ataca o gado e outros animais domésticos, e é normalmente causada por um vírus denominado “vaccinia”. No gado, a doença pode ser reconhecida pelo surgimento de pústulas e ferimentos nas tetas da vaca, embora este sinal clínico possa ocorrer em outras doenças que afetam o gado. Eventualmente, pessoas que entram em contato com animais infectados podem adquirir a doença. Em pessoas, esta infecção pode causar prostração, febre, inchaço dos membros superiores, dor e surgimento de pústulas e ferimentos nas mãos e membros superiores parecidos com os ferimentos que aparecem nos animais. A doença é benigna e a cura espontânea ocorre em pouco tempo. Em pessoas com o sistema imunológico comprometido a doença pode ser mais grave, com o surgimento de pústulas por todo o corpo. Atualmente, já se sabe que a produção de anticorpos contra o vírus vaccínia é muito importante para a recuperação dos indivíduos afetados pela doença.

Você será convidado a participar como voluntário. Caso aceite, você responderá a um questionário simples, sobre suas atividades de rotina e seu estado de saúde. Os indivíduos doentes e também aqueles que moram na mesma região e que concordarem em participar do estudo será realizado um exame de sangue. Esse exame poderá provocar um leve ardor causado pela picada da agulha, e, muito raramente, hematoma (mancha roxa). Esses são os mesmos efeitos que qualquer exame de sangue pode causar. Todos os testes serão acompanhados por profissional habilitado e medidas para diminuir os problemas citados serão realizadas. Serão retirados 20 ml de sangue, que é pouco maior que a rotineiramente usada para exames de sangue. Todo material utilizado é descartável ou estéril, portanto isento de risco de contaminação. Serão utilizadas seringas descartáveis individuais para cada paciente. Todo material utilizado será destruído em frente ao paciente. Todos os exames a

serem realizados serão gratuitos e os resultados serão enviados gratuitamente aos pacientes doadores.

Sua participação neste estudo possibilitará maior conhecimento sobre a Vaccínia bovina no Brasil e o vírus causador desta doença. Este estudo não acarretará em nenhum benefício imediato para o participante. No entanto, com o andamento do projeto, todo e qualquer achado que possa ser aplicado e revertido em benefício público será imediatamente implementado. O conhecimento gerado a partir de sua participação ajudará a se entender melhor como nosso organismo responde à infecção, ou porque algumas pessoas não são acometidas pela vaccínia bovina. Também auxiliará os agentes de saúde a se prepararem de forma eficiente para o surgimento de novos surtos e poderá indicar se existe a necessidade futura de vacinação contra o vírus ou não.

Para a realização deste projeto, os pesquisadores o submeteram ao Comitê de Ética em Pesquisas envolvendo seres humanos da Universidade Federal de Minas Gerais. O projeto completo está disponível para que todo e qualquer participante possa ter conhecimento. Caso queira conhecer o projeto com mais detalhes, basta solicitar uma cópia à Professora Giliane de Souza Trindade através do telefone (31) 3409-2747, ou através da autoridade de saúde pública local. Você tem a liberdade de se recusar a participar e ainda se recusar a continuar participando em qualquer momento da pesquisa, sem qualquer prejuízo. A pesquisa será realizada no Laboratório de Vírus, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Nenhum dos procedimentos usados oferece riscos à sua dignidade, e em nenhum momento usaremos seu nome. Desta forma, as identidades serão preservadas. Esclarecemos também que ao participar desta pesquisa você poderá não ter nenhum benefício direto, assim como não terá nenhum tipo de despesa para participar desta pesquisa, bem como nada será pago por sua participação. Entretanto, esperamos que este estudo nos forneça informações importantes sobre a presença da vaccínia bovina na região, de forma que possamos contribuir para evitar infecções futuras.

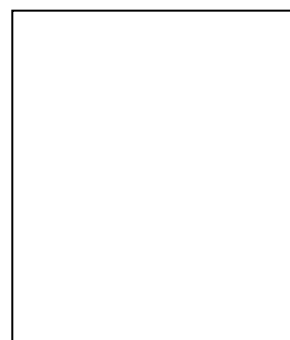
Após estes esclarecimentos, solicitamos o seu consentimento de forma livre para participar desta pesquisa. Portanto, preencha, por favor, os itens que se seguem.

#### **Termo de consentimento livre após esclarecimento**

Eu, \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

li e/ou ouvi o esclarecimento acima e compreendi para que serve o estudo e qual o procedimento a que serei submetido. As informações esclarecem riscos e benefícios do estudo, deixando claro que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento, sem justificar minha decisão. Sei que meu nome não será divulgado, que não terei despesas e não receberei dinheiro para participar do

|  |   |
|--|---|
| estudo.<br>Assim sendo, concordo em participar do estudo.<br><br>Serro, ____/____/____ |   |
| _____<br>Assinatura do voluntário  | Nome:<br>Identidade:<br>Telefone pessoal:<br>Telefone para contato:<br>Nome do contato: |
| _____<br>Giliane de Souza Trindade<br>Pesquisador responsável                          | Telefones para contato: (73) 3409-3002  |



Marca do polegar

### 9.3. APÊNDICE C – Ficha epidemiológica para coleta de soros no Serro



**Projeto:** Avaliação do risco de infecção em humanos pelo vírus da Vaccínia Bovina (VACV): estudo seccional em comunidades rurais do município do Serro, Minas Gerais.

Data da Investigação: \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

Ficha nº: \_\_\_\_\_

#### 1. DADOS PESSOAIS

---

Nome: \_\_\_\_\_

Nascimento: \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_      Idade: \_\_\_\_\_      Sexo: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Zona: 1. Urbana ( ) ; 2. Rural ( ) ; 3. Urbana/Rural ( ) ; 4. Ignorado ( )

Telefone para contato: \_\_\_\_\_

Profissão: \_\_\_\_\_

Escolaridade: 1) Analfabeto ( ) ; 2) 1° incompleto ( ) ; 3) 1° completo ( ) ; 4) 2° incompleto ( ) ; 5) 2° completo ( ) ; 6) superior incompleto ( ) ; 7) superior completo ( ) ; 8) pós-graduado ( ) .

Como você classifica sua cor/etnia? 1. Branco ( ) ; 2. Preto ( ) ; 3. Pardo ( ) ; 4. Amarelo ( ) ; 5. Indígena ( ) .

Qual a sua faixa de renda familiar bruta mensal?

1. Até 1 salário ( ) ; 2. Até 2 salários ( ) ; 3. De 2 a 3 salários ( ) ; 4. De 3 a 4 salários ( ) ; 5. Acima de 4 salários ( ) ; 6. Ignorado ( ) .

#### 2. DADOS CLÍNICOS-EPIDEMIOLÓGICOS

---

1. Contato com animais domésticos? 1. Sim ( ) 2. Não ( ) Quais: \_\_\_\_\_

2. Presença de animais com alguma lesão? 1. Sim ( ) 2. Não ( ) Quais: \_\_\_\_\_

3. Contato com o ambiente silvestre? 1. Sim ( ) 2. Não ( ) Quais: \_\_\_\_\_

4. Já ouviu falar da Vaccínia Bovina? 1. Sim ( ) 2. Não ( )

5. Como ficou conhecendo a doença? 1. Ocorrência de surto ( ) ; 2. Rádio ( ) ; 3. TV ( ) ; 4. Outro proprietário ( ) ; 5. Técnico ( ) ; 6. Jornal ou revista ( ) ; 7. Internet ( ) ; 8. Outro meio \_\_\_\_\_

6. Já ocorreu surto de Vaccínia Bovina na propriedade? 1. Sim ( ); Não ( )  
Quando?\_\_\_\_\_

7. Teve a Vaccínia Bovina? 1. Sim ( ) 2. Não ( ) 9. Ignorado ( )

8. Se sim, quais sintomas apresentou? 1. Febre ( ); 2. Cefaléia ( ); 3. Mialgia ( ); 4. Conjuntivite ( ); 5. Dor abdominal ( ); 6. Calafrios ( ); 7. Vômitos ( ); 8. Linfadenopatia ( ); 9. Náuseas ( ); 10. Icterícia ( ); 11. Lesões disseminadas ( );  
Outros\_\_\_\_\_

9. Ocorrência de lesões visíveis? 1. Sim ( ) 2. Não ( ) 9. Ignorado ( )

Local da lesão:\_\_\_\_\_

Duração (dias):\_\_\_\_\_

10. Tipo da lesão: 1. Pápula ( ); 2. Vesícula ( ); 3. Pústula ( ); 4. Úlcera ( ); 5. Eritema periférico ( ); 6. Infecção bacteriana ( ); Mais lesões:\_\_\_\_\_

11. Presença de cicatriz? 1. Sim ( ) 2. Não ( ) 0. Ignorado ( )

Onde: 1. Mãos ( ); 2. Braço ( ); 3. Antebraço ( ); 4. Face ( ); 5. Pernas ( ); 6. Outra ( )

12. Mais alguém na propriedade adoeceu? 1. Sim ( ); 2. Não ( )

Se sim, em que regiões do corpo apareceram lesões características? 1. Mãos ( ); 2. Braço ( );

3. Antebraço ( ); 4. Face ( ); 5. Pernas ( ); 6. Outra ( )\_\_\_\_\_

### **3. ANTECEDENTE VACINAL**

---

1. Vacinado para a varíola? 1. Sim ( ) 2. Não ( )

2. Marca vacinal no braço esquerdo? 1. Sim ( ) 2. Não ( )

### **4. OUTRAS INFORMAÇÕES RELEVANTES**

---

1. Consume de leite cru/queijo? 1. Sim ( ); 2. Não ( )

3. Participa da produção do queijo? 1. Sim ( ); 2. Não ( )

4. Pratica ordenha? Sim ( ); 2. Não ( )

5. Tipo de ordenha: 1. Manual ( ); 2. Mecânica ( )

6. Número de ordenhas por dia: 1 ( ); 2 ( ); 3 ( ); mais\_\_\_\_\_

7. Utiliza algum produto para a desinfecção das mãos durante a ordenha? 1. Sim ( ); 2. Não ( )

Se sim, em qual momento? 1. Antes da ordenha ( ) 2. Entre vacas ( ) 3. Após a ordenha ( )

4. Antes e depois ( )

8. Utiliza algum produto para a desinfecção dos tetos durante a ordenha? 1. Sim ( ); 2. Não ( )

Se sim, em qual momento? 1. Antes da ordenha ( ) 2. Depois da Ordenha ( ) 3. Antes e

depois ( )

9. Utiliza algum produto para desinfecção da ordenhadeira? 1. Sim ( ); 2. Não ( )

Se sim, em qual momento? 1. Antes da ordenha ( ) 2. Depois da Ordenha 3. Antes e depois ( )

## VIII. Lista de Trabalhos Publicados em Anais de Eventos

### VIII Fórum de Microbiologia Profa. Maria Auxiliadora Roque de Carvalho, 2012:

1) **COSTA, G. B.**; RIBEIRO, K. C.; FIGUEIREDO, P. O.; AMBRÓSIO, L. L. D.; *et al.* Busca por soros controles e comparação entre técnicas sorológicas frente ao diagnóstico de infecção por Ortopoxvírus.

2) AMBRÓSIO, L. L. D.; ALVES, P. A.; **COSTA, G. B.**; *et al.* Padronização de um teste de PCR para detecção de Ortopoxvírus em fezes de capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*): implicações para o estudo da cadeia natural de transmissão do Vaccinia virus no Brasil.

3) ALVES, P. A. ; OLIVEIRA, D. B. ; ALMEIDA, G. M. F. ; RIBEIRO, K. C. ; **COSTA, G. B.**; *et al.* Desenvolvimento de uma plataforma de diagnóstico molecular para doenças vesiculares de bovinos.

### XXIII Brazilian Congress of Virology and VII Mercosur Meeting of Virology, 2012:

1) **COSTA, G. B.**; RIBEIRO, K. C.; FIGUEIREDO, P. O.; *et al.* Immunological profile and risk factors associated to possible occupational infections by Vaccinia virus.

2) AMBRÓSIO, L. L. D.; ALVES, P. A.; **COSTA, G. B.**; *et al.* Development of a PCR test for Orthopoxvirus DNA detection from capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) stool samples.

3) ALVES, P. A.; OLIVEIRA, D. B.; ALMEIDA, G. M. F.; RIBEIRO, K. C.; **COSTA, G. B.**; *et al.* Cattle infections vesicular diseases: development of a qPCR diagnostic platform.

### XXI Congresso Latino Americano de Microbiologia, 2012:

1) **COSTA, G. B.**; RIBEIRO, K. C.; FIGUEIREDO, P. O.; *et al.* Infecções ocupacionais por Vaccinia virus: perfil imunológico e fatores de risco associados.

### 27º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2013:

1) **COSTA, G. B.**; BORGES, I. A.; MIRANDA, J. B.; *et al.* Avaliação da imunidade humoral contra Ortopoxvírus numa população rural do interior de Minas Gerais.

### XXIV Brazilian Congress of Virology VIII Mercosur Meeting of Virology, 2013:

1) BORGES, I. A.; REYNOLDS, M. G.; MACCOLLUM, A. M.; AMBRÓSIO, L. L. D.; **COSTA, G. B.**; *et al.* Evaluation of Orthopoxvirus circulation among Equids from Minas Gerais, Brazil: serological and historical implications.

2) LUIZ, A. P. M. F.; PEREIRA, A. F.; **COSTA, G. B.**; *et al.* Serological and molecular evidence of Vaccinia virus in Argentina.

3) AMARAL, C. D.; BORGES, I. A.; **COSTA, G. B.**; *et al.* Small mammals versus the emergence of viral diseases: a prospective study in rural areas from Minas Gerais.

4) **COSTA, G. B.**; BORGES, I. A.; MIRANDA, J. B.; *et al.* Evidence of Orthopoxvirus circulation in a vulnerable rural populations in Minas Gerais State.

5) **COSTA, G. B.**; BORGES, I. A.; MIRANDA, J. B.; *et al.* Orthopoxvirus household transmission in a family resident in a Bovine Vaccinia endemic rural area.

#### **2nd International Congress on Pathogens at the Human-Animal Interface, 2013:**

1) **COSTA, G. B.**; AUGUSTO, L. T. S.; BORGES, I. A.; *et al.* Serological and epidemiological evidence to Orthopoxvirus infection in a population located in an endemic rural area to Bovine Vaccinia.

2) **COSTA, G. B.**; AMARAL, C. D.; BORGES, I. A.; *et al.* Human Orthopoxvirus infections: a household transmission case during a Bovine Vaccinia Outbreak.

3) FIGUEIREDO, P. O.; BORGES, I. A.; **COSTA, G. B.**; *et al.* Are environmental factors relevant to the occurrence of Bovine Vaccinia?

#### **IX Fórum de Microbiologia Professor Romain Rolland Golgher, 2013:**

1) AMARAL, C. D.; BORGES, I. A.; VIEIRA, F. N.; **COSTA, G. B.**; *et al.* Pequenos mamíferos versus doenças virais emergentes: um estudo prospectivo em áreas rurais no Estado de Minas Gerais.

2) LUIZ, A. P. M. F.; PEREIRA, A. F.; **COSTA, G. B.**; *et al.* Evidência sorológica e molecular do Vaccinia virus na Argentina.

3) **COSTA, G. B.**; BORGES, I. A.; MIRANDA, J. B.; *et al.* Avaliação da imunidade humoral contra Ortopoxvírus numa população rural do interior de Minas Gerais.

4) **COSTA, G. B.**; BORGES, I. A.; MIRANDA, J. B.; *et al.* Transmissão intrafamiliar de Ortopoxvírus durante um surto de Vaccinia Bovina numa área rural endêmica do interior de Minas Gerais.