UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-graduação em Microbiologia

Pedro Henrique Bastos e Silva

VACCÍNIA VÍRUS: aspectos biológicos e epidemiológicos de um patógeno negligenciado no Brasil

Belo Horizonte
2023

Pedro Henrique Bastos e Silva

VACCÍNIA VÍRUS: aspectos biológicos e epidemiológicos de um patógeno negligenciado no Brasil

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Giliane de Souza Trindade

Belo Horizonte
2023

043 Silva, Pedro Henrique Bastos e.
Vaccínia Vírus: aspectos biológicos e epidemiológicos de um patógeno negligenciado no Brasil [manuscrito] / Pedro Henrique Bastos e Silva. – 2023.
101 f. : il. ; 29,5 cm.

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

1. Microbiologia. 2. Vírus da Varíola. 3. Vírus Vaccinia. I. Trindade, Giliane de Souza. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 579

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

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

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE: **PEDRO HENRIQUE BASTOS E SILVA**

Nº REGISTRO: **2021665415**

Às 09:30 horas do dia **27 de abril de 2023**, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Jônatas Santos Abrahão (Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG), Felipe Campos de Melo Iani (Chefe do Serviço de Virologia e Riquetsioses - Lacen-MG (Fundação Ezequiel Dias) e a Profa. Dra. Giliane de Souza Trindade (Orientadora), para julgar o trabalho final **"VACCINIA VIRUS: aspectos biológicos e epidemiológicos de um patógeno negligenciado no Brasil"**, do aluno **Pedro Henrique Bastos e Silva**, requisito final para a obtenção do Grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profa. Dra. Giliane de Souza Trindade - orientadora, 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 pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. O candidato tem 60 (sessenta) dias, a partir desta data, para entregar a versão final da dissertação ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da UFMG e requerer seu diploma.

Belo Horizonte, 27 de abril de 2023

Membros da banca:

Prof. Dr. Jônatas Santos Abrahão

Dr. Felipe Campos de Melo Iani

De acordo:

Profa. Dra. Giliane de Souza Trindade

(Orientadora)

Profa. Dra. Daniele da Glória de Souza

(Coordenadora do Programa de Pós-graduação
em Microbiologia)

Documento assinado eletronicamente por **Giliane de Souza Trindade**, **Professora do Magistério Superior**, em 05/05/2023, às 09:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Jonatas Santos Abrahao**, **Professor do Magistério Superior**, em 05/05/2023, às 12:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Felipe Campos de Melo Iani**, **Usuário Externo**, em 08/05/2023, às 09:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Daniele da Gloria de Souza**, **Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 19/05/2023, às 14:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2203519** e o código CRC **C7CCECAD**.

Referência: Processo nº 23072.228144/2021-13 SEI nº 2203519

AGRADECIMENTOS

À UFMG, por proporcionar um ambiente de excelência que permitiu o desenvolvimento do meu potencial durante a formação acadêmica.

Ao Instituto de Ciências Biológicas, minha segunda casa, onde exerci minha criatividade, cresci como cientista e conheci pessoas incríveis que contribuíram para meu crescimento.

Aos professores, colegas e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da UFMG.

A todos os integrantes, passados e presentes, do Laboratório de Vírus, por construírem um ambiente de acolhimento e excelência desde o primeiro dia, onde conheci pessoas que levarei para sempre na vida profissional e pessoal.

À minha orientadora, Giliane, por acreditar em mim, mesmo quando eu duvidava, e por suas excelentes orientações científicas, sensibilidade e carinho ao longo do tempo.

Aos integrantes do ECOVIR, pelo espírito de união e ajuda mútua, fundamental para meu desenvolvimento profissional.

Aos meus amigos Iago, Matheus, Douglas, Vinicius, Erick, Rony, João Victor e Yuri, por estarem comigo em todos os momentos, trazendo alegria em cada encontro.

À minha família – meu pai Edmilton, minha mãe Luciana, minha irmã Larissa, meus avós Evaristo e Maria Inês, minha falecida avó Maria de Lourdes, meus tios Alessandra e Evaristo Júnior, e minha sogra Simone – pelo apoio e amor incondicional, mesmo à distância.

À minha namorada, Flávia Rayssa, por construir uma vida ao meu lado, com amor e carinho, e por compartilhar sonhos e alegrias, proporcionando leveza na conclusão do mestrado.

Aos meus gatos, Givanilda Josefina e Chupa-Cabra, por encherem nossos dias de amor e alegria com sua presença.

Por fim, a todos que passaram pela minha vida, deixando marcas que contribuíram para quem sou hoje – alguém capaz de sonhar e realizar.

“Eu tenho um sonho, que é ser o rei dos piratas. Não me importo de morrer para realizar esse sonho.”

(**MONKEY D. LUFFY**)

RESUMO

Os ortopoxvírus (OPXV) compreendem diversos vírus emergentes de grande importância para a medicina humana e veterinária, como o vaccínia vírus (VACV). A circulação zoonótica do VACV foi relatada pela primeira vez no Sudeste do Brasil em 1999, desde então, a infecção por VACV tem sido associada a diversos surtos de doença exantemática em zonas rurais brasileiras, afetando principalmente o gado leiteiro e os seus ordenhadores, em que a região sudeste é o epicentro dos surtos de vaccínia bovina (VB). Os surtos de VACV geram impactos substanciais na saúde pública e nas economias locais das regiões afetadas. Apesar da importância do VACV no contexto epidemiológico brasileiro, pouco se sabe sobre sua origem, circulação e manutenção no ambiente. O primeiro capítulo desse trabalho realiza a caracterização biológica e molecular de novas amostras de VACV brasileiros (VACV-BR) isoladas a partir de amostras clínicas de humanos suspeitos de infecção por OPXV e descreve o perfil sorológico dessas populações afetadas pela VB no estado de Minas Gerais durante as duas últimas décadas. Foram isolados um total de cinco novas amostras de VACV-BR caracterizados como pertencentes ao Grupo I, que apresentam uma deleção de 18 nucleotídeos no gene A56R que codifica a hemaglutinina viral. O perfil sorológico de vinte pacientes demonstrou positividade global de 80% em altos títulos de anticorpos neutralizantes. No segundo capítulo foi estabelecido o perfil demográfico, perfil clínico e fatores de risco associados à infecção por OPXV em pacientes residentes de diversos municípios de Minas Gerais. Os resultados obtidos reforçam o caráter ocupacional da VB, em que homens residentes de áreas rurais que trabalham diretamente com bovinos apresentam maior chance de exposição ao VACV. Além disso, foi realizado um levantamento epidemiológico da ocorrência e distribuição do VACV em Minas Gerais, descrevendo a evolução da distribuição e números de casos de VB no estado durante as últimas décadas, utilizando bancos de dados obtidos a partir da colaboração com a Secretaria de Saúde do Estado de Minas Gerais (SES), Fundação Ezequiel Dias (FUNED) e Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA), além de dados obtidos na literatura científica. Estes dados demonstram o aumento da área de ocorrência e do número de casos nas últimas décadas, principalmente em regiões importantes na produção de leite no estado. Também é descrita a atuação do LV como laboratório de referência em estudos de caracterização e diagnóstico de OPXV no Brasil. A combinação desses resultados contribui com o conhecimento acerca de variantes de VACV circulantes, descreve riscos associados a infecções por OPXV no Brasil, e o aumento do número de casos e distribuição desse vírus.

Palavras-chave: ortopoxvírus; vaccínia vírus; zoonoses; vigilância; doença ocupacional.

ABSTRACT

The orthopoxviruses (OPXV) comprise several emerging viruses of great importance to human and veterinary medicine, such as vaccinia virus (VACV). Zoonotic circulation of VACV was first reported in southeastern Brazil in 1999, since then, VACV infection has been associated with several outbreaks of exanthematous disease in rural areas of Brazil, mainly affecting dairy cattle and their milkers, in which the southeastern region is the epicenter of bovine vaccinia (VB) outbreaks. VACV outbreaks generate substantial impacts on public health and local economies in the affected regions. Despite the importance of VACV in the Brazilian epidemiological context, little is known about its origin, circulation and maintenance in the environment. The first chapter of this work performs the biological and molecular characterization of new Brazilian VACV samples (VACV-BR) isolated from clinical samples of humans suspected of OPXV infection and describes the serological profile of these populations affected by BV in the state of Minas Gerais. A total of five new samples of VACV-BR characterized as belonging to Group I were isolated, which present an 18-nucleotide deletion in the A56R gene encoding the viral hemagglutinin. The serological profile of the twenty patients showed overall positivity of 80% at high titers. The second chapter established the demographic profile, clinical profile and risk factors associated with OPXV infection in patients residing in several municipalities of Minas Gerais. The results obtained reinforce the occupational nature of BV, in which men residing in rural areas who work directly with cattle have a greater chance of exposure to BV. Furthermore, an epidemiological survey of the occurrence and distribution of VACV in Minas Gerais was carried out, describing the evolution of the distribution and numbers of cases of BV in the state during the last decades, using databases obtained from the partnership with the Secretaria de Saúde do Estado de Minas Gerais (SES), Fundação Ezequiel Dias (FUNED) and Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA), in addition to data obtained from the scientific literature. These data demonstrate the increase in the area of occurrence and the number of cases in recent decades, especially in important regions of milk production in the state. The performance of the LV as a reference laboratory in studies of characterization and diagnosis of OPXV in Brazil is also described. The combination of these results contributes to the knowledge about circulating VACV variants, describes risks associated with OPXV infections in Brazil and the increase in the number of cases and distribution of this virus.

Keywords: orthopoxviruses; vaccinia virus; zoonosis; surveillance; occupational disease.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 — Infecções causadas por OPXV em diferentes hospedeiros 16
Figura 2 — Distribuição geográfica e gama de hospedeiros de OPXV atuais 17
Figura 3 — Classificação taxonômica dos OPXV 18
Figura 4 — Representação esquemática de uma partícula de um poxvírus 19
Figura 5 — Modelo esquemático do genoma dos poxvírus 20
Figura 6 — Sintenia dos poxvírus 20
Figura 7 — Modelo esquemático do ciclo de multiplicação dos poxvírus 22
Figura 8 — Modelo esquemático do curso da infecção de alguns OPXV 24
Figura 9 — Infecção pelo VARV 25
Figura 10 — Infecções causadas pelo CPXV em diferentes hospedeiros 27
Figura 11 — Distribuição global dos casos de infecção por MPXV 28
Figura 12 — Detecção do VACV em diferentes hospedeiros 30
Figura 13 — Lesões causadas pela infecção de VACV 31
Figura 14 — Infecção por VACV em humano 32
Figura 15 — Estados com detecção de VACV no Brasil 34
Figura 16 — Árvore Filogenética de alguns VACV 35
Figura 17 — Perfil de placas e curva de multiplicação de VACV 36
Figura 18 — Placa de PRNT para detecção de anti-OPXV 47
Figura 19 — Placa de PRNT para titulação de anti-OPXV 49
Figura 20 — Gráficos de amplificação de qPCR para diagnóstico molecular de OPXV das amostras clinicas 51
Figura 21 — Gráficos de amplificação de qPCR para caracterização molecular dos isolados de VACV 53
Figura 22 — Fenótipo de placas dos isolados de VACV 54
Figura 23 — Microscopia óptica de placas de lise de isolados de VACV 54
Figura 24 — Distribuição da detecção de OPXV em Minas Gerais 66
Figura 25 — Mapa do desenvolvimento da pecuária leiteira no estado de Minas Gerais 70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 — Iniciadores utilizados para detecção e caracterização de OPXV 45
Tabela 2 — Resultado dos ensaios de PRNT para detecção de anti-OPXV 48
Tabela 3 — Resultado dos ensaios de PRNT para titulação de anti-OPXV 50
Tabela 4 — Resultado da tentativa de isolamento viral 52
Tabela 5 — Caracterização demográfica da população analisada 63
Tabela 6 — Fatores de risco e exposição ao VACV 64
Tabela 7 — Sinais clínicos relacionados à infecção pelo VACV 65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μg — Microgramas

μl — Microlitro

ARAV — Araçatuba vírus

CO2 — Dióxido de carbono

BAV — BeAn58058 vírus

CEV — Vírus com envelope associado à célula

CMLV — Camelpox vírus

CPXV — Cowpox vírus

CTGV — Cantagalo vírus

DNA — Ácido desoxirribonucleico

ECTV — Ectromelia vírus

EV — Vírus envelopados

EEV — Vírus envelopados extracelulares

FUNED — Fundação Ezequiel Dias

GP1V — Guarani P1 vírus

GP2V — Guarani P2 vírus

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

IMA — Instituto Mineiro de Agropecuária

ITR — Repetição terminal invertida

Kbp — Quilo pares de Base

LV — Laboratório de Vírus

MEM — Meio mínimo essencial

mg — Miligrama

mL — Mililitro

MPXV — Monkeypox vírus

MV — Vírus maduros

mRNA — RNA mensageiro

nm — Nanômetro

WHO — Organização Mundial da Saúde

OPXV — Ortopoxvírus

pb — Pares de base

PBS — Tampão salina fosfato

PCR — Reação em cadeia da polimerase

pH — Potencial hidrogeniônico

PIB — Produto interno bruto

PRNT — Teste de neutralização por redução de placas

PSTV — Passatempo vírus

qPCR — Reação em cadeia da polimerase em tempo real

RNA — Ácido ribonucleico

RPXV — Rabbitpox vírus

S2V — Serro 2 vírus

SES — Secretaria de Estado de Saúde

SFB — Soro Fetal Bovino

SPAnv — SPAn 232 vírus

UFMG — Universidade Federal de Minas Gerais

UFP — Unidades formadoras de placa

UN — Unidades neutralizantes

VACV — Vaccínia vírus

VACV-BR — Vaccínia vírus brasileiro

VACV-WR — Amostra *Western Reserve*

VARV — Varíola vírus

VB — Vaccínia bovina

VBH — Belo Horizonte vírus

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 16

1.1 OPXV 16

1.1.1 Classificação taxonômica 17

1.1.2 Estrutura da partícula 18

1.1.3 Genoma 19

1.1.4 Ciclo de multiplicação 21

1.1.5 Patogênese 23

1.2 VARV 25

1.3 CPXV 26

1.4 MPXV 27

1.5 VACV 29

1.5.1 Vaccínia bovina 30

1.5.2 VACV Isolados no Brasil 33

1.5.3 Diversidade dos VACV brasileiros 34

1.6 Diagnóstico de OPXV 37

2. JUSTIFICATIVA 39

3. CAPÍTULO I — DETECÇÃO, ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE VACV EM AMOSTRAS CLÍNICAS E PERFIL SOROLÓGICO DE INDIVÍDUOS AFETADOS 41

3.1 Objetivos 41

3.1.1 Objetivo Geral 41

3.1.2 Objetivos Específicos 41

3.2 Metodologia 41

3.2.1 Descrição das amostras biológicas 41

3.2.2 Células Vero e BSC-40 42

3.2.3 Vírus controle 42

3.2.4 Soros controles 42

3.2.5 Ensaios de soroneutralização 43

3.2.6 Extração de DNA....43
3.2.7 Ensaios Moleculares....44
3.2.8 Isolamento Viral....45
3.2.9 Multiplicação viral....46
3.2.10 Ensaio de fenótipo de placa....46
3.3 Resultados....47
3.3.1 Detecção de anticorpos neutralizantes....47
3.3.2 Titulação de anticorpos neutralizantes....49
3.3.3 Diagnóstico molecular....50
3.3.4 Isolamento viral....51
3.3.5 Caracterização molecular dos isolados....52
3.3.6 Ensaios de fenótipo de placa....53
3.4 Discussão....55
4. CAPÍTULO II — CIRCULAÇÃO DE VACV EM MINAS GERAIS: VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA NO EPICENTRO DOS SURTOS DE VB....59
4.1 Objetivos....59
4.1.1 Objetivo Geral....59
4.1.2 Objetivos Específicos....59
4.2 Metodologia....60
4.2.1 Dados da SES....60
4.2.2 Dados do IMA....60
4.2.3 Dados dos do LV....60
4.2.4 Levantamento bibliográfico....61
4.2.5 Fichas de notificação....61
4.2.6 Mapas e recursos visuais....61
4.3 Resultados....61
4.3.1 Caracterização Demográfica....61

4.3.2 Fatores de risco de exposição à OPXV 63
4.3.3 Perfil clínico 64
4.3.4 Circulação de OPXV em Minas Gerais 65
4.3.5 Catalogação do diagnóstico realizado pelo LV 66
4.4 Discussão 67
5. CONCLUSÕES 72
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 73
7 ANEXOS 84
7.1 Anexo A 84
7.2 Anexo B 96

1 INTRODUÇÃO

1.1 OPXV

Os ortopoxvírus (OPXV) são vírus emergentes de grande importância no cenário epidemiológico global, compreendem diversos patógenos conhecidos por causar surtos de doenças exantemáticas em uma extensa gama de hospedeiros (Figura 1) (FENNER, 1989; DAMON, 2013; MOSS, 2013; WHO, 2023).

Figura 1 — Infecções causadas por OPXV em diferentes hospedeiros

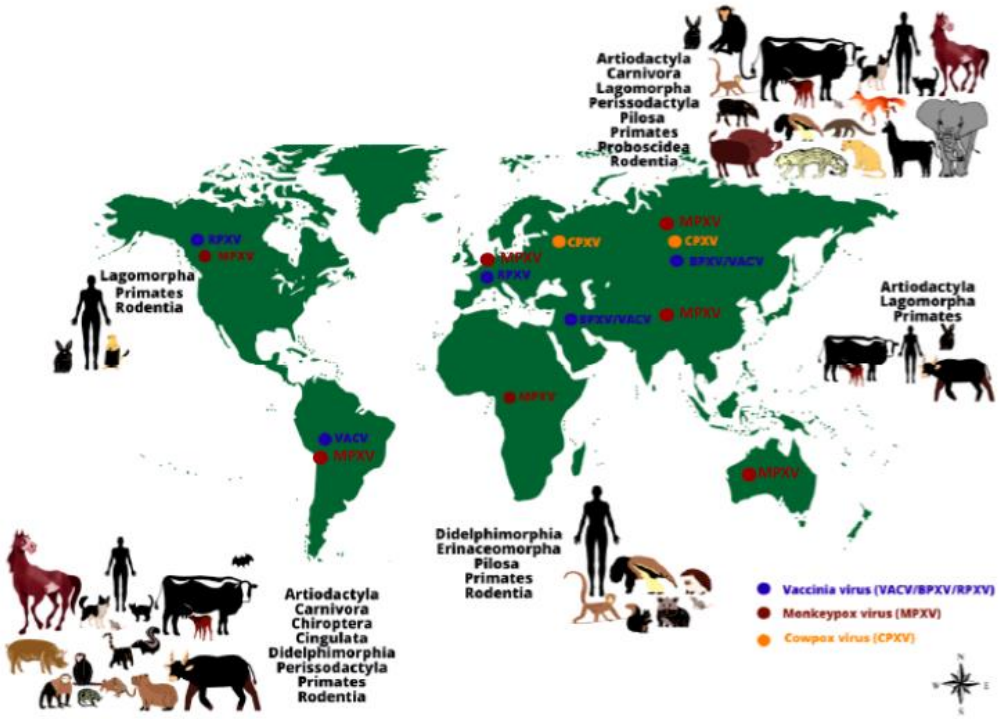
Fotos de lesões exantemáticas características causadas pela VARV em humano (A) pelo ECTV em murino (B), pelo CPXV em camelo (C). Fonte: Mcffaden, 2005.

Dentre os vírus de maior importância histórica, destacam-se, o varíola vírus (VARV), conhecido como o patógeno humano mais letal de todos os tempos, o vaccínia vírus (VACV), que foi utilizado como vírus vacinal contra a varíola e que circula endemicamente no Brasil, o cowpox vírus (CPXV), que circula há séculos em diversos países da Europa e Ásia; e o monkeypox vírus (MPXV), que recentemente emergiu em regiões fora da África, causando diversos surtos no mundo, incluindo no Brasil. (FENNER, 1989; DAMON, 2013; MOSS, 2013; WHO, 2023).

Os OPXV compartilham diversas características genéticas comuns, que se traduzem em um alto grau de semelhança antigênica. A reatividade imunológica cruzada, faz com que a infecção por uma espécie de OPXV possa conferir proteção substancial contra a infecção de outras espécies. Diante disso, a vacina que utilizava o VACV como vírus vacinal na campanha de erradicação da varíola era capaz de conferir imunidade substancial contra doenças causadas por VARV, MPXV ou CPXV (STANFORD et al., 2007; PETERSEN et al., 2019). Em 1980, as vacinações contra a varíola foram descontinuadas a nível mundial e, desde então, a população mundial tem enfrentado um risco cada vez maior de infeção por OPXV. É importante destacar que a vacinação foi descontinuada em diferentes épocas em diferentes países, no Brasil, as vacinas foram interrompidas no ano de 1978 (HOCHMAN, 2009; CDC, 2021; HENDERSON,

2021). O aumento no número de indivíduos suscetíveis não vacinados no mundo, ampliou a frequência e distribuição geográfica de casos de diversos OPXV ao redor do mundo (Figura 2) (SILVA et al., 2021; WHO 2023).

Figura 2 — Distribuição geográfica e gama de hospedeiros de OPXV atuais

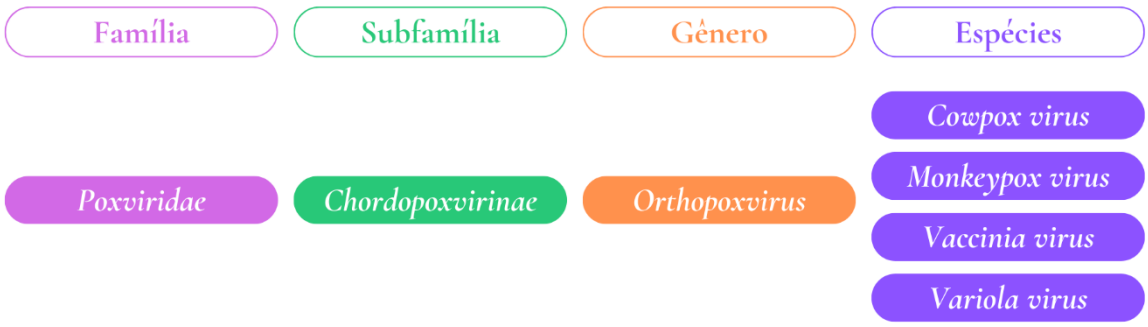


A Figura demonstra alguns hospedeiros conhecidos dos OPXV atuais, os locais a circulação do VACV e suas variantes nas Américas, Ásia e Europa (azul), a circulação de MPXV na África, Américas, Ásia, Europa e Oceania (vermelho) e a circulação do CPXV na Europa e na Ásia (amarelo. Fonte: Modificado de Silva et al., 2021, atualizado a partir de dados da WHO, 2023.

1.1.1 Classificação taxonômica

Os OPXV são classificados na família *Poxviridae*, na subfamília *Chordopoxvirinae*, que reúne vírus que infectam vertebrados, e no gênero *Orthopoxvirus*, que inclui os principais vírus de relevância para a saúde pública (Figura 3) (MOSS, 2013; ICTV, 2021).

Figura 3 — Classificação taxonômica dos OPXV



Esquema da classificação taxonômica de algum OPXV de importância em saúde pública. Fonte: Elaborado pelos autores, 2023.

1.1.2 Estrutura da partícula

As partículas virais dos poxvírus são maiores que a maioria dos vírus de animais, com dimensões aproximadas de 360 nm de comprimento por 250 nm de largura. São partículas pleomorfas, de formato oval ou semelhante a um tijolo, e possuem uma camada externa constituída por uma bicamada de membrana lipídica. A estrutura interna do vírion é bastante complexa, consistindo no genoma de DNA de fita dupla, que está localizado no interior do nucleocapsídeo, que possui um cerne em forma de haltere, corpúsculos laterais ancorados entre as duas concavidades e a membrana externa (Figura 4) (CYRKLAFF et al., 2005; MOSS, 2013; VORA et al., 2015).

Figura 4 — Representação esquemática de uma partícula de um poxvírus

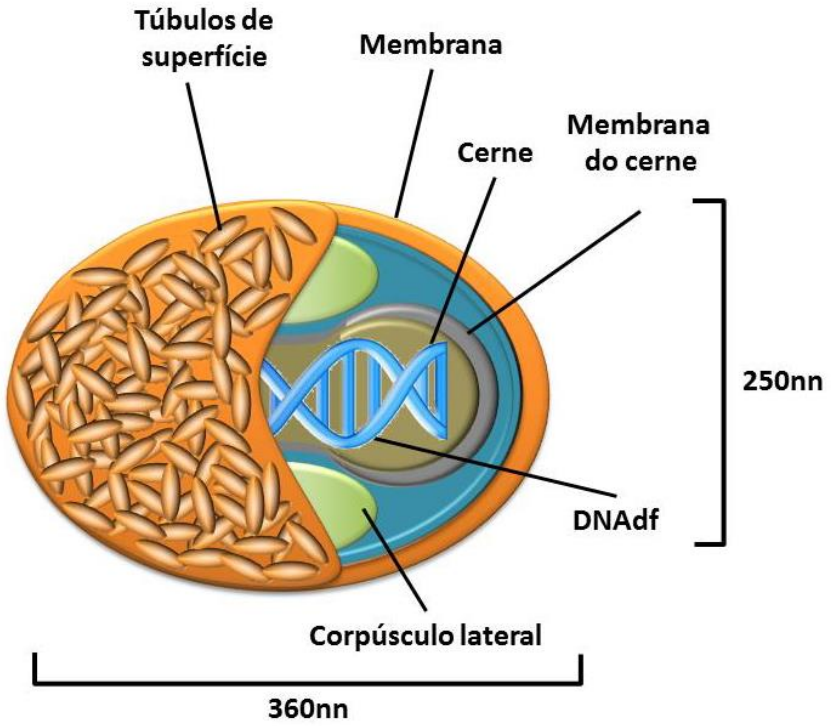


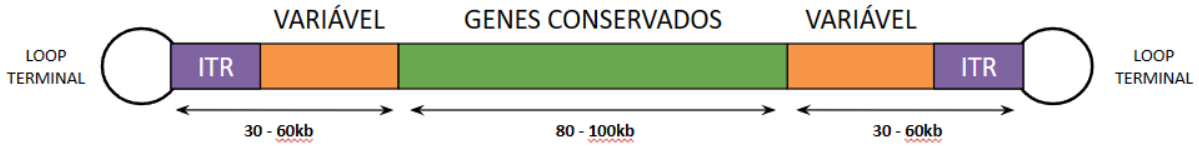
Ilustração de uma partícula de um poxvírus, indicando as dimensões aproximadas e diversas estruturas. Fonte: Elaborado pelos autores, 2018.

Durante a morfogênese dos poxvírus ocorre a formação de múltiplas formas virais, que diferem umas das outras por sua membrana externa e proteínas de superfície, sendo estes, os vírus maduros (MV) e os vírus envelopados (EV). Os MV possuem uma única membrana lipoprotéica derivada da modificação de membranas do retículo endoplasmático com proteínas virais, são as formas infectantes mais abundantes, que só são liberadas a partir da lise celular. Os EV são formados tardiamente na morfogênese viral, em que alguns MV são circundados por uma membrana lipídica adicional, possivelmente derivada do Golgi, e são liberados por exocitose (MOSS, 2006; MOSS, 2013; SCHMIDT et al., 2012).

1.1.3 Genoma

Os poxvírus possuem genomas de DNA linear de fita dupla que variam de 130 mil a 300 mil pares de bases. Nas duas extremidades do genoma dos poxvírus estão contidas as repetições terminais invertidas (ITR), que consistem em sequências idênticas, mas orientadas de forma oposta. As ITR incluem um loop em forma de grampo rico em A + T, responsáveis por conectar as duas fitas de DNA. As alças terminais ITR são importantes para a formação de concatâmeros durante a replicação do DNA (Figura 5) (SMITH & MCFADDEN, 2002; MOSS, 2013).

Figura 5 — Modelo esquemático do genoma dos poxvírus



Esquema do genoma dos poxvírus, destacando a região central (verde) e as regiões terminais (laranja), com indicação das regiões terminais invertidas (roxo). Fonte: Elaborado pelos autores, 2023.

A organização geral do genoma dos poxvírus é mantida em todos os membros da família. A região central do genoma é altamente conservada, codifica genes relacionados à replicação do genoma, síntese de proteínas estruturais e montagem dos vírions. Essa região codifica aproximadamente 100 genes, dos quais, aproximadamente 30% são compartilhados por todos os membros da família. Em contraste, os genes codificados por regiões terminais são bem mais variados entre os diferentes gêneros e espécies, muitos desses genes codificam proteínas associadas ao espectro de hospedeiros, virulência e imunomodulação (Figura 6) (MCLYSAGHT et al., 2003; GUBSER et al., 2004; MOSS, 2013).

Figura 6 — Sintenia dos poxvírus

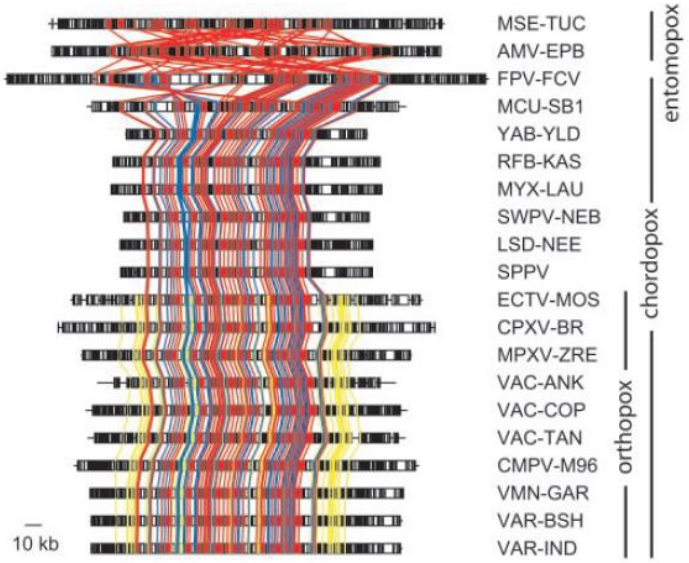


Ilustração da sintenia algumas espécies de poxvírus (preto), com a indicação de genes conservados entre os poxvírus (vermelho), entre as espécies de cordopoxvírus (azul) e entre as espécies de OPXV (amarelo). Fonte: McLysaght et al., 2003.

A caracterização molecular dos poxvírus é em grande parte sustentada pelos estudos realizados nos OPXV, que são extensivamente mais estudados do que vírus agrupados em outros gêneros (MCFADDEN, 2005; MOSS, 2013). Isso se observa pelo número de sequências de genomas completo depositadas nos bancos de dados do NCBI, com 2.193 genomas depositados dos quais 1.743 são de OPXV. A partir do ano de 2022 observa-se um aumento

significativo no número de genomas depositados, principalmente pela emergência do MPXV para fora da África, detentor de 82% dos genomas depositados dos OPXV. Contudo, com o avanço tecnológico dos métodos de sequenciamento, montagem e análise de genomas, diversos vírus incluídos em outros gêneros da família *Poxviridae* vêm sendo caracterizados molecularmente (CARULEI et al. 2017; GÜNTHER et al. 2017; TU et al. 2017; SARKER et al. 2018; ÁGUEDA-PINTO et al. 2019).

1.1.4 Ciclo de multiplicação

Os MV dos poxvírus são as formas virais mais abundantes, são principalmente relacionados à disseminação da infecção entre diferentes hospedeiros, pois são liberados no meio ambiente junto às células das lesões. Os EV são mais resistentes às ações de anticorpos neutralizantes, são responsáveis principalmente pela disseminação viral entre as células de um mesmo hospedeiro (MOSS, 2016).

Diferentes estruturas de membrana fazem com que os MV e EV de poxvírus não compartilhem epítopos virais comuns, o que acarreta na utilização de diferentes ligantes porá cada forma viral. É importante notar que modos de fixação redundantes evoluíram nesses vírus, o que pode contribuir para a capacidade dos poxvírus de infectar diversos tipos celulares. Graças a utilização de múltiplos fatores de fixação redundantes e o tropismo é geralmente determinado por etapas após a penetração viral (SCHMIDT et al., 2012; MOSS, 2016).

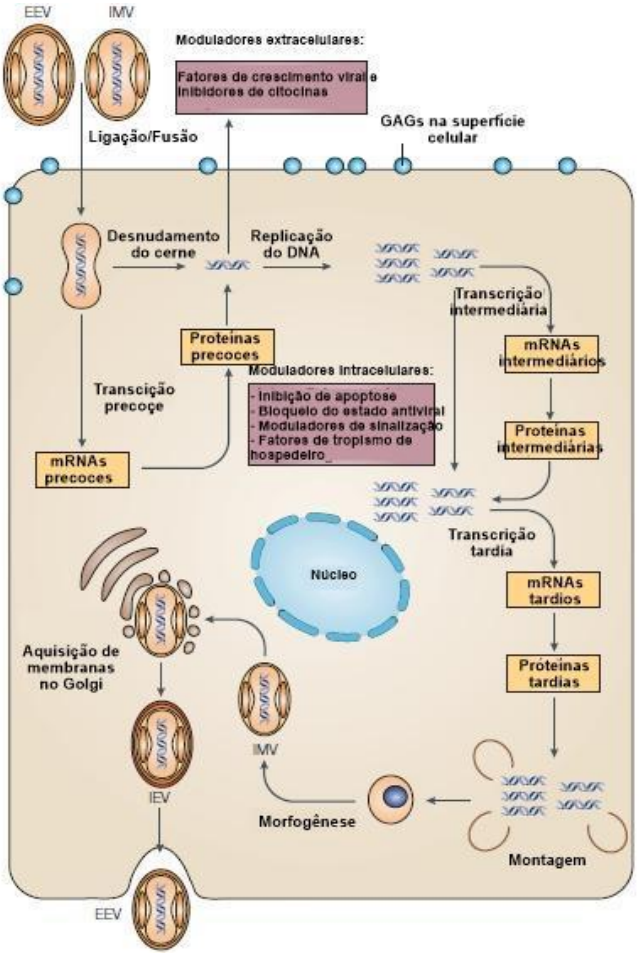
A penetração dos poxvírus na célula pode ocorrer de duas formas: pela fusão direta da membrana viral com a membrana plasmática da célula, o que permite a liberação do nucleocapsídeo no citoplasma celular; e pela via endossomal, através da macropinocitose dependente de pH ácido, que desencadeia uma cascata de sinalização que resulta em rearranjos de e fusão da membrana viral com a membrana do endossomo , resultando na deposição do nucleocapsídeo no citosol (BENGALI et al., 2012; SCHMIDT et al., 2012; LIU et al., 2014; MOSS, 2016).

Após a penetração, o nucleocapsídeo viral é transportado em microtúbulos para a região mais interior do citoplasma e se acumulam na região perinuclear da célula onde começa a transcrição dos mRNAs pela RNA polimerase dependente de DNA viral. Aproximadamente metade dos genes codificados pelos poxvírus são transcritos no início da infecção. As proteínas traduzidas destes mRNAs iniciais servem para a replicação do DNA e fatores de imunomodulação da célula hospedeira. Os genes intermediários, que estão em menor número, codificam principalmente proteínas regulatórias que induzem a transcrição de genes tardios. Os

genes tardios codificam a maioria das proteínas estruturais do vírus que compõem novas partículas virais e também as enzimas que são empacotadas nos vírions formados (BROYLES, 2003; MCFADDEN, 2005; ROBERTS & SMITH, 2008; YANG ET AL., 2011; MOSS, 2013;).

As primeiras estruturas observadas na progênie viral são estruturas lipídicas e proteicas chamadas de crescente virais, que irão formar uma estrutura esférica que envolve os componentes do nucleocapsídeo, chamada de vírus imaturo (IV). O DNA viral é empacotado nos IV, e dá origem ao vírus maduro intracelular (IMV). A maioria da progênie permanece como IMV e são liberados através da lise celular. No entanto, alguns IMV são transportados da fábrica viral, através de microtúbulos, e são envolvidos por uma membrana celular adicional, derivada dos endossomos iniciais ou via complexo de Golgi para formar o vírus envelopado intracelular (IEV). Os IEV serão então transportados para a membrana da célula e liberadas por fusão de membrana, onde os IEV perdem a sua membrana mais externa e são liberados formando os vírus envelopados extracelulares (EEV) ou permanecem retidas na superfície celular formando os vírus com envelope associado à célula (CEV) (Figura 7) (SMITH et al., 2002; MCFADDEN, 2005; ROBERTS & SMITH, 2008; MOSS, 2013; LIU et al., 2014).

Figura 7 — Modelo esquemático do ciclo de multiplicação dos poxvírus



Esquema do processo de multiplicação dos poxvírus destacando as múltiplas formas virais. Fonte: Modificado de Mcfadden, 2005.

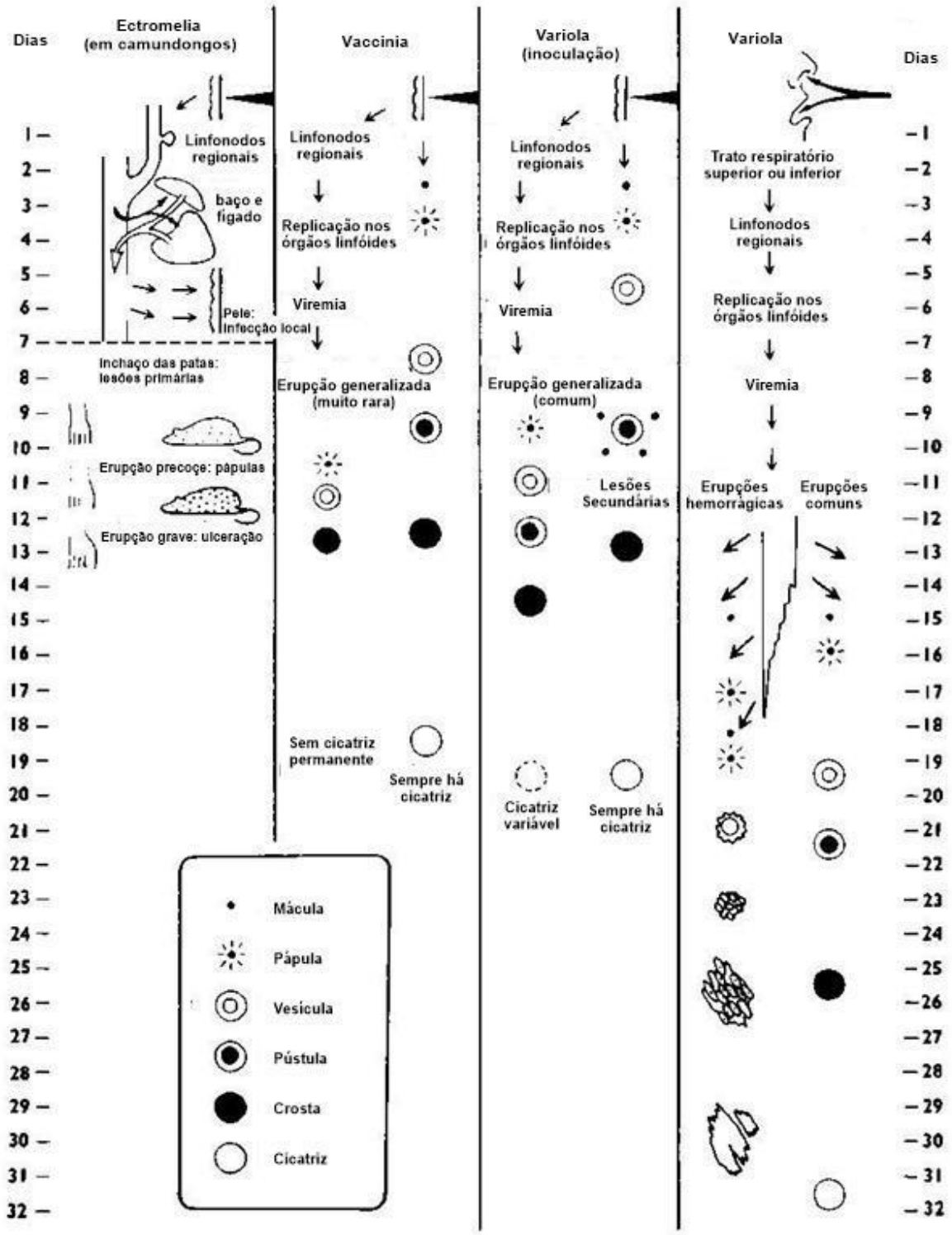
1.1.5 Patogênese

A patogênese resultante das infecções por poxvírus é influenciada pelo tropismo viral e pelas respostas imunológicas e inflamatórias do hospedeiro. O tropismo é frequentemente relacionado às propriedades específicas do gênero e dos genes codificados pela região variável do genoma (DAMON, 2013; MCFADDEN, 2005).

Os poxvírus capazes de infectar vertebrados são classificados na subfamília *Chordopoxvirinae* e compartilham várias características biológicas em comum. As infecções por esses vírus ocorrem principalmente por via percutânea, com o vírus entrando no organismo através de lesões na pele do hospedeiro, como observado na infecção causada pelo VACV. No entanto, alguns vírus utilizam outras vias de entrada: o VARV, por exemplo, entra pelo trato respiratório, enquanto o ectromélia vírus (ECTV) penetra pelo trato gastrointestinal (FENNER et al., 1988; ESTEBAN & BULLER, 2005; MCFADDEN, 2005).

O tipo de infecção resultante depende da espécie do vírus, da via de entrada e do hospedeiro. Alguns vírus podem apresentar diferentes patogenias em diferentes espécies de hospedeiros, como CPXV, em que o padrão de lesões é capaz de se manifestar de forma sistêmica em felinos, e de forma localizada em humanos e bovinos (Figura 8) (FENNER et al., 1988; BULLER & PALUMBO, 1991; DAMON, 2013; MCFADDEN, 2005).

Figura 8 — Modelo esquemático do curso da infecção de alguns OPXV



Esquema do curso de infecção pelo ECTV, VACV e VARV, destacando as diferentes vias de infeção, sinais clínicos e duração da patogênese Fonte: Modificado de Fenner et al., 1988.

1.2 VARV

O VARV é provavelmente o patógeno humano mais antigo e mortal de que se tem registro (FENNER et al., 1988). Evidências arqueológicas indicam que o VARV já circulava entre populações humanas há pelo menos 3 mil anos. Embora o número exato de mortes não seja conhecido, estima-se que, ao longo da história, centenas de milhões de pessoas morreram devido à varíola, com cerca de 400 milhões de mortes apenas no século XX (FENNER et al., 1988; CDC, 2021; HENDERSON, 2021; THÈVES et al., 2021). A taxa de letalidade para a varíola era de 30%, porém no final do século 19, uma forma menos letal de varíola foi documentada na África e nas Américas, apresentando taxa de letalidade de 1%, devido a isso, as diferentes formas da varíola foram denominadas varíola major e varíola minor, respectivamente (FENNER et al., 1988; MEYER et al., 2020; REYNOLDS et al., 2018). A Figura 9 demonstra um quadro infeccioso pelo VARV.

Figura 9 — Infecção pelo VARV

Fotos de infecção causadas pelo VARV em paciente humano, evidenciando as erupções causadas após 9 dias de infecção. Fonte: Modificado de Fenner et al., 1988.

No final do século XVIII, Edward Jenner demonstrou que um agente infeccioso causador de lesões na pele e nas mucosas de vacas e seus cuidadores poderia ser usado para prevenir a infecção por varíola. Dessa forma, Jenner desenvolveu metodologias que, provavelmente, utilizavam os vírus CPXV e VACV como estratégia para prevenir a varíola no

século XIX. Essa abordagem levou à criação do termo "vacinação" (DAMON, 2013; FENNER et al., 1988; MEYER et al., 2020).

Em 1958, a décima segunda Assembleia Mundial da Saúde adotou uma resolução para alcançar a erradicação da varíola, que se baseava apenas na vacinação em massa de pelo menos 80% da população. Porém, diversos casos de varíola ainda ocorriam em locais densamente povoados, portanto em 1967 o programa foi intensificado, com a adoção de medidas de isolamento para interromper a cadeia de transmissão do vírus. Com isso, em apenas uma década a varíola foi erradicada, com o último caso natural acontecido na Somália em 1977. Por fim, em 1980 a Organização Mundial de Saúde, declarou oficialmente a erradicação da varíola no planeta (FENNER et al., 1988; THÈVES et al., 2016; MEYER et al., 2020; WHO, 2023).

O sucesso da erradicação da varíola dependeu de esforços globais em diagnóstico, vigilância e vacinação. Fatores como a baixa variabilidade genética entre as cepas do VARV, a imunidade duradoura conferida pela vacina, o fato de ser um patógeno exclusivamente humano (sem reservatório silvestre) e a ausência de infecções latentes foram essenciais para o sucesso do programa (MEYER et al., 2020).

1.3 CPXV

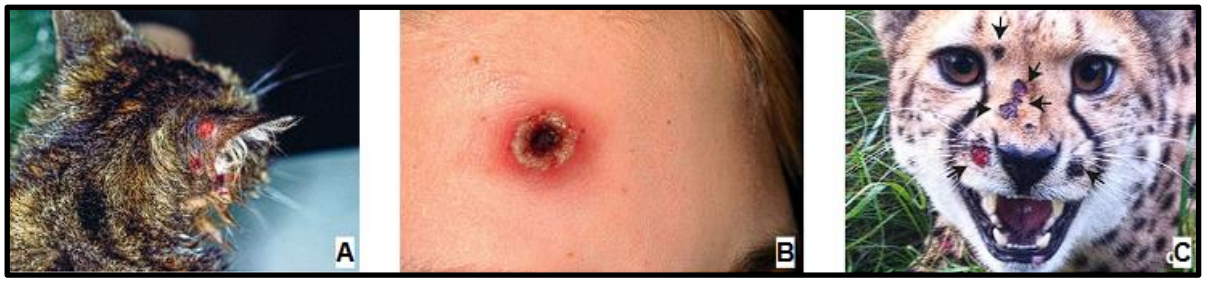
O CPXV é o agente etiológico da varíola bovina. O CPXV é distribuído na Europa, oeste da ex-URSS e áreas adjacentes do Norte e centro da Ásia, sendo patogênico em humanos, em animais domésticos, mantidos em zoológicos, e potencialmente em vida selvagem (CHANTREY et al., 1999; VOROU et al., 2008; DAMON, 2013).

Apesar do nome sugestivo, os reservatórios naturais do CPXV são roedores silvestres, com a maior soroprevalência relatada em ratos-do-mato (*Clethrionomys glareolus*) e camundongos da madeira (*Apodemus sylvaticus*), endêmicos do continente Europeu (CARSLAKE et al., 2006). Infecções em espécies exóticas mantidas em cativeiro em zoológicos europeus já foram relatadas. Animais suscetíveis à infecção por CPXV incluem chitas, leões, tamanduás, rinocerontes, elefantes e ocapi (BAXBY et al., 1979; DAMON, 2013; STAGEGAARD et al., 2017).

O número de infecções por CPXV em humanos vem aumentando expressivamente nas últimas décadas. Isso deve-se, principalmente, pelo crescimento de populações não vacinadas, suscetíveis a infecções por OPXV. A infecção em humanos ocorre, principalmente, por meio de hospedeiros intermediários, notadamente por gatos e outros animais domésticos, comumente

infectados com o CPXV por meio do contato com roedores (Figura 10) (PELKONEN et al., 2003; SCARFF 2012; BECKER et al., 2009).

Figura 10 — Infecções causadas pelo CPXV em diferentes hospedeiros



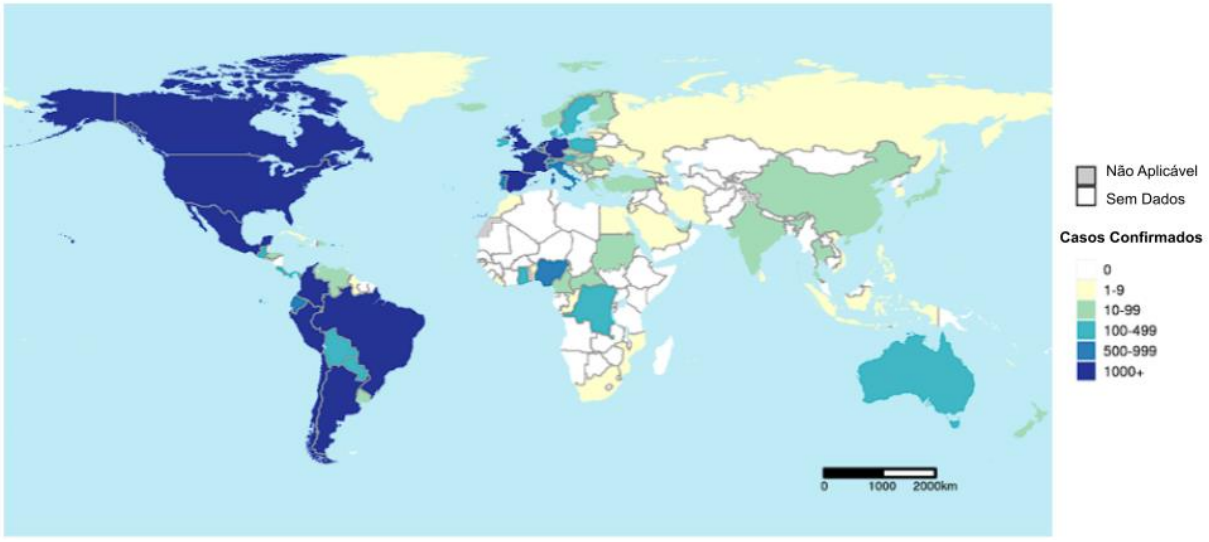
Fotos demostrando uma Infecção em gato doméstico (A), Infecção em humano (B) e Infecção em Guepardo (C). Fonte: Modificado de Becker et al., 2009; Scarff, 2012; Stagegaard et al., 2017.

1.4 MPXV

O MPXV foi isolado e identificado pela primeira vez em 1958, quando macacos enviados de Cingapura para um centro de pesquisa na Dinamarca adoeceram. No entanto, o primeiro caso humano confirmado foi em 1970, quando o vírus foi isolado de uma criança com suspeita de varíola na República Democrática do Congo. Embora o vírus tenha sido pela primeira vez em macacos em cativeiro, os dados disponíveis sugerem que diversos roedores silvestres, são os verdadeiros reservatórios naturais do vírus. (LADNY et al., 1972; SKLENOVSKÁ & VAN RANST, 2018; MOORE & ZAHRA, 2021; CURAUDEAU et al., 2023).

Durante aproximadamente 50 anos após sua descoberta, o MPXV permaneceu endêmico em países africanos. Duas linhagens de MPXV circulam na África, a linhagem Central e a linhagem da África Ocidental (MAULDIN et al., 2020; WHO, 2022). Porém, em 2022, diversos casos de infecção por MPXV vêm sendo reportados em países fora da África, principalmente nas Américas e Europa. Nos surtos atuais, o MPXV já foi detectado em 110 países dos quais 103 não haviam reportado casos de MPXV anteriormente. Mais de 86.000 casos e 112 mortes já foram confirmadas no mundo até a data de 29 de março de 2023. O Brasil é o segundo país com o maior número de casos, com aproximadamente 11.000 infectados e 15 mortes confirmadas até a data de 29 de março de 2023 (Figura 11) (WHO, 2022; CDC, 2023).

Figura 11 — Distribuição global dos casos de infecção por MPXV



Distribuição do número de casos confirmados por MPXV na atual emergência de 2023 de janeiro de 2022 a março de 2023. O mapa indica maior circulação nas Américas e na Europa. Fonte: Modificado de WHO, 2023.

Em humanos, a doença clínica resulta de exposições respiratórias, percutâneas ou permucosas. No surto em andamento grande parte dos casos são através da exposição sexual, e afetando amplamente redes de homens que fazem sexo com homens, mas não exclusivamente. Os sintomas clássicos observados em regiões endêmicas duram de 2 a 4 semanas e a apresentação clínica da varíola dos macacos é semelhante à da varíola, em termos de início dos sintomas, tempo de ocorrência da erupção e distribuição da erupção, mas geralmente menos grave que a varíola em termos de taxa de complicações, taxa de letalidade e níveis de escarificação. Os casos graves ocorrem mais comumente entre crianças e estão relacionados à extensão da exposição ao vírus, estado de saúde do paciente e natureza das complicações. (DAMON, 2013; PETERSEN et al., 2019; CDC 2023; WHO 2023).

Campanhas de vigilância realizadas na África entre 2005 e 2007 demonstraram que a incidência de casos humanos aumentou 20 vezes nos anos após o fim das campanhas de vacinação contra a varíola. Em 2010, apenas 24,5% da população do Congo tinha evidência da cicatriz de vacinação contra a varíola. Porém até o início do século XXI o MPXV continuou sendo uma ameaça à saúde pública global ignorada e só recebeu atenção internacional quando os primeiros casos fora da África foram registrados. (SKLENOVSKÁ & VAN RANST, 2018; PETERSEN et al., 2019; MOORE & ZAHRA, 2021; CDC 2023; WHO 2023).

1.5 VACV

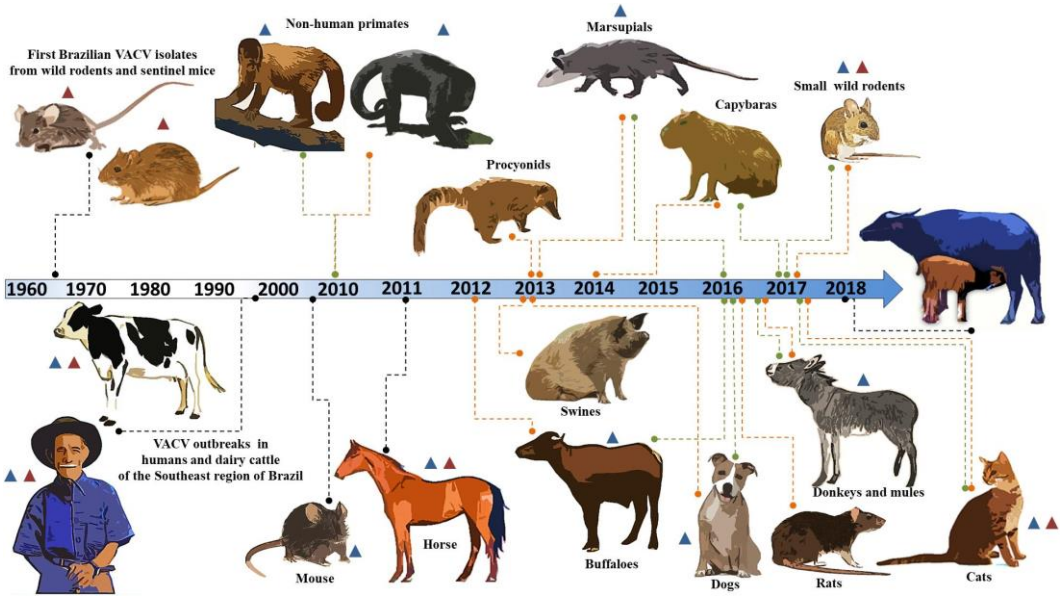
O VACV é um dos vírus animais mais bem estudados devido à sua importância vacinal. O VACV apresenta menor virulência quando comparado com o CPXV, portanto, o VACV foi utilizado como vírus vacinal na campanha mundial de erradicação da varíola. Com o sucesso da campanha e pelos efeitos colaterais causados pela vacina, as vacinações foram suspensas em 1980, após a erradicação da varíola (FENNER et al., 1988; MOSS, 2013; OLIVEIRA et al., 2017).

As amostras vacinais de VACV mais utilizadas pela Organização Mundial da Saúde (WHO) na campanha de vacinação contra a varíola foram as amostras *Lister* (Inglaterra) e e *New York City Board of Health* (EUA). No Brasil, foram utilizadas amostras derivadas da amostra *Lister* (Inglaterra), produzida pelo instituto Butantã (São Paulo), e vacinas relacionadas às amostras IOC, produzida pelo Instituto Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro). A origem da linhagem do IOC não é bem estabelecida, algumas evidências sugerem que a origem dessa amostra é derivada da amostra Beaugency que possivelmente constituiu as primeiras amostras vacinais importadas para o Brasil em 1887 do Instituto *Chambon* (França) (FENNER et al., 1988; TRINDADE et al., 2007; DRUMOND et al., 2008; MEDAGLIA et al., 2015).

O VACV é considerado um vírus zoonótico e endêmico na América do Sul, sendo a sua circulação descrita em diversos países, como o Uruguai, Argentina, Colômbia e Brasil (DAMASO et al., 2000; FRANCO-LUIZ et al., 2014, 2016; TRINDADE et al., 2003; USME-CIRO et al., 2017). A circulação do VACV zoonótico foi relatada pela primeira vez no Sudeste do Brasil em 1999 e desde então causa diversos surtos de doença exantemática em áreas rurais brasileiras, afetando principalmente o gado leiteiro e seus ordenhadores. Desde sua emergência, amostras de VACV vêm sendo constantemente isoladas e caracterizadas no Brasil, principalmente relacionadas a surtos de doença exantemática em bovinos e humanos. (DAMASO et al., 2000; TRINDADE et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2017; SILVA et al., 2021)

Além da circulação em bovinos e humanos, evidências da circulação de VACV foram identificados em diversos animais, tais como cães, gatos, búfalos, cavalos, porcos, capivaras, roedores silvestres e urbanos, gambás, quatis, tatus, coelhos e primatas não humanos (Figura 12) (ABRAHÃO et al., 2009b; TRINDADE, et al., 2009; PERES et al., 2013, 2016; COSTA et al., 2017; DUTRA et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2017; LIMA et al., 2019; MARTINS DA COSTA et al., 2020; SILVA et al., 2021).

Figura 12 — Detecção do VACV em diferentes hospedeiros



Linha do tempo indicando a detecção da circulação do VACV no Brasil em diferentes hospedeiros de animais silvestres e domésticos, Fonte: Lima et al., 2019.

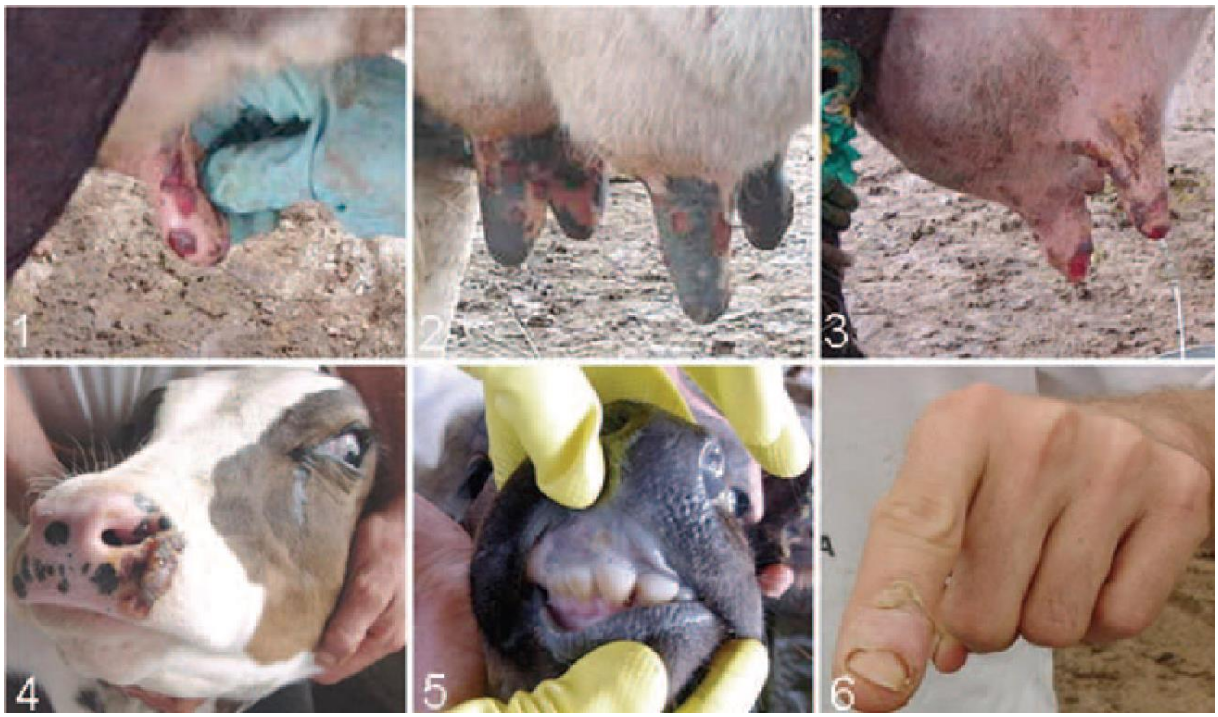
Além da circulação nas Américas, diversos surtos de doença exantemática foram causados por linhagens de VACV ao redor do mundo. O Buffalopox vírus (BPXV), é uma linhagem de VACV que circula na Ásia e África. Diversos surtos de infecção causadas pelo BPXV foram descritos na Índia, Paquistão, Egito, Nepal e Bangladesh. O BPXV causa uma infecção viral zoonótica reemergente que afeta principalmente búfalos, mas também bovinos e humanos. Além disso, outra linhagem de VACV, chamada Rabbitpox vírus (RPXV), foi associada a infecções em coelhos domésticos na Holanda e nos Estados Unidos (OLIVEIRA et al., 2017; ELTOM et al., 2020; SILVA et al., 2021).

1.5.1 Vaccínia bovina

A vaccínia bovina (VB) é uma zoonose viral emergente, causada pelo VACV. A VB afeta principalmente as vacas leiteiras e os trabalhadores rurais que possuem contato direto com esses animais. A VB é caracterizada por lesões exantemáticas nas tetas e úberes de vacas afetadas. Em vacas naturalmente infectadas, as lesões aparecem como pápulas vermelhas localizadas principalmente na pele das tetas e do úbere. As pápulas progridem para vesículas e as vesículas tornam-se pústulas umbilicadas rodeadas por tecido inflamatório. Essas pústulas evoluem para úlceras até que ocorra a cicatrização completa da ferida. O curso da infecção do estágio das lesões até a cura completa leva aproximadamente de 2 a 4 semanas. As lesões são comumente acompanhadas de mastite que podem evoluir para a perda definitiva das glândulas mamárias, reduzindo a produção de leite e gerando impactos econômicos substanciais. Quando

a infecção ocorre durante o período de lactação das vacas, os bezerros tornam-se infectados durante a amamentação, apresentam lesões na mucosa oral e focinho (Figura 13) (TRINDADE et al., 2003, 2016; LEITE et al., 2005; LOBATO et al. 2005; FONSECA et al., 2011; KROON et al., 2011).

Figura 13 — Lesões causadas pela infecção de VACV



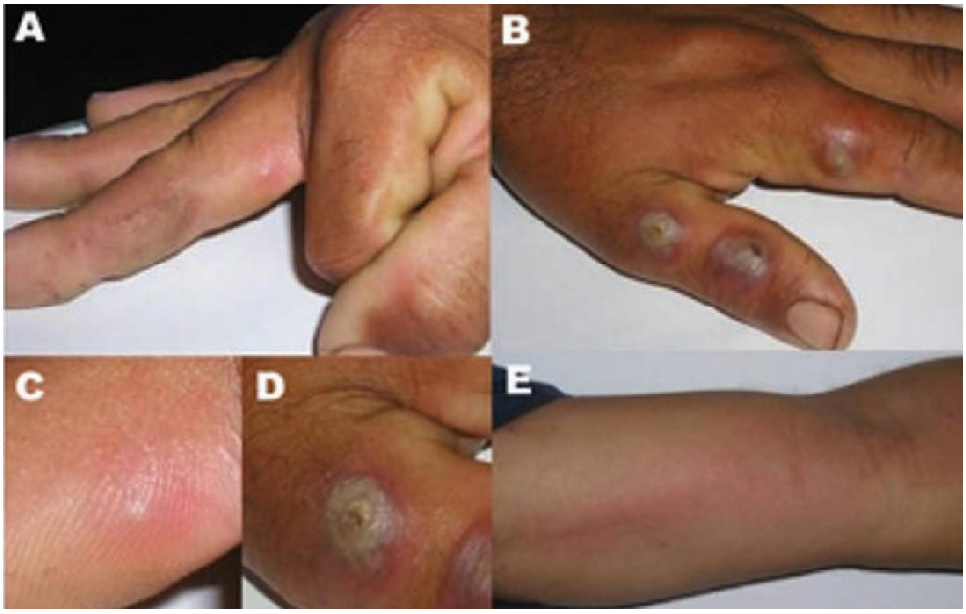
Lesões ulcerativas nas tetas das vacas (1 e 2), mastite causada por infecção bacteriana secundária (3), lesão no focinho e mucosa oral de bezerros (4 e 5), lesões na mão de um ordenhador (6). Fonte: Leite et al., 2005.

Comumente, os trabalhadores rurais contraem a infecção pelo contato direto com as vacas infectadas durante a ordenha, portanto, a VB se caracteriza como uma zoonose ocupacional. Em humanos, a infecção está geralmente relacionada à uma doença de evolução benigna. O período de incubação do vírus dura de 1 a 7 dias, e aproximadamente 12 dias após o aparecimento inicial das lesões, elas se transformaram em úlceras necróticas e dolorosas. A progressão da doença é normalmente acompanhada por sintomas semelhantes aos da gripe sistêmica, incluindo cefaleia, mialgia, febre e linfadenopatia. O tempo de cicatrização total leva aproximadamente 21 dias. (LEITE et al., 2005; SILVA-FERNANDES et al., 2009; TRINDADE et al., 2009; FONSECA et al., 2011; KROON et al., 2011)

Os sinais clínicos da infecção por VACV consistem nas lesões características que ocorrem no sítio primário da infecção, comumente encontrado nas mãos dos ordenhadores que tiveram contato com vacas infectadas (Figura 14) (TRINDADE et al., 2009; KROON et al., 2011;). No entanto, há relatos da presença de lesões características à infecção por VACV em diferentes áreas do corpo, como no rosto, olhos, mucosas e genitais, provavelmente devido à

autoinoculação do paciente (SCHATZMAYR et al.,2009). A infecção por VACV em pacientes imunocomprometidos pode progredir a casos graves com diversas complicações clínicas (LAITON-DONATO et al., 2020).

Figura 14 — Infecção por VACV em humano



Fotos de infeção pelo VACV em mão de ordenhador. Pápula inicial na base do dedo médio (A e C), lesões com crosta no polegar e indicador (B e D) e Linfangite periférica no braço esquerdo (E). Fonte Trindade et al., 2009.

A via clássica de transmissão do VACV se dá pelo contato direito entre humanos e o gado leiteiro, porém, alguns levantam hipóteses de que o leite e seus derivados são fontes em potencial de exposição e/ou transmissão do VACV (OLIVEIRA et al., 2017). Partículas virais de VACV já foram detectadas e isoladas em amostras de leite durante surtos no estado de Minas Gerais (ABRAHÃO et al., 2009c; OLIVEIRA, et al., 2009). Além disso, foi demonstrado que após infecção experimental em leite cru e queijo, as partículas virais de VACV permaneciam viáveis, mesmo após tratamento térmico com altas e baixas temperaturas (OLIVEIRA et al., 2010). Também foi avaliado se o processo de maturação, aplicado em queijos para reduzir a contaminação e modificar suas características físicas e químicas, seria capaz de inativar as partículas virais de VACV. No entanto, as partículas virais persistiram durante e após o processo de maturação e foram isoladas após 60 dias de maturação. Além disso, DNA de VACV foi detectado no leite de vacas leiteiras sintomáticas e assintomáticas, incluindo propriedades onde surtos de VB não foram relatados (REHFELD et al., 2017). Também foi demonstrado uma alta soroprevalência em rebanhos leiteiros em diversos municípios de Minas Gerais, indicando uma exposição ao VACV em todos os rebanhos analisados (BORGES et al., 2017). Recentemente, foi demonstrado que queijos artesanais comercializados em grandes centros urbanos continham DNA de VACV (OLIVEIRA et al., 2017). Apesar de não haver confirmação

da infecção natural por VACV através do consumo de leite e queijo, um estudo demonstrou a infecção por VACV através de leite contaminado em modelo murino. Foi observado disseminação viral sistêmica e detecção do genoma nas fezes e mucosa oral dos animais. Apesar da infecção, nenhum sinal clínico foi observado nos animais experimentais (REHFELD et al., 2015).

1.5.2 VACV Isolados no Brasil

As primeiras amostras de VACV isolados no Brasil (VACV-BR) datam da década de 1960, quando amostras clínicas foram coletadas por agências de pesquisa nacionais e internacionais com objetivo de ampliar a compreensão sobre as zoonoses virais circulantes no país. Contudo, a caracterização dos isolados como uma linhagem de VACV só aconteceu anos após o isolamento inicial, sendo esses, o vírus SPAn 232 (SPAnv), isolado a partir de roedores sentinelas no município de Cotia (São Paulo) e o vírus BeAn58058 (BAV), isolado de um roedor silvestre da floresta de Utinga em Belém (Pará) (WOODAL 1967; ESPOSITO et al., 1980; UEDA et al., 1995; FONSECA et al., 1998, 2002; AFONSO et al., 2017). Apenas em 1993 outro isolado foi obtido no Brasil, o Belo Horizonte vírus (VBH), isolado a partir de um surto de doença exantemática, que acometeu camundongos laboratoriais trazidos da Universidade de Campinas à UFMG, em Belo Horizonte (Minas Gerais), em que os animais apresentavam lesões características de infecção por OPXV, e posteriormente caracterizados como um VACV (TRINDADE et al., 2004).

A partir do final da década de 1990, a circulação natural do VACV foi associada a diversos surtos de VB no país, principalmente associados a infecções em bovinos e humanos. O primeiro VACV isolado durante surtos de doença exantemática no Brasil foi o Cantagalo vírus (CTGV), no município de Cantagalo (Rio de Janeiro) em 1999 (DAMASO et al., 2000). No mesmo ano, um surto de doença exantemática em bovinos ocorreu na cidade de Araçatuba (São Paulo) do qual foi isolado o Araçatuba vírus (ARAV) (TRINDADE et al., 2003). Durante um surto de VB na cidade de Guarani (Minas Gerais) em 2001, foram isolados, a partir de duas propriedades rurais, dois vírus molecularmente distintos, Guarani P1 (GP1V) e Guarani P2 (GP2V) (TRINDADE et al., 2006). Em 2003 um isolado foi obtido na cidade de Passa tempo (Minas Gerais) em que, através de análises moleculares demonstraram uma deleção de 18 nucleotídeos no gene A56R, compartilhados com os isolados anteriores CTGV e ARAV (LEITE et al., 2005). Desde então diversos novos surtos isolados de VACV vem sendo descritos em diversos estados e regiões do Brasil (Figura 15) (MEGID et al., 2008; MEDAGLIA et al.,

2009; BRUM et al., 2010; ASSIS et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2015; TRINDADE et al. 2016).

Figura 15 — Estados com detecção de VACV no Brasil

Estados brasileiros com detecção confirmada de VACV de Grupo I e Grupo II. Fonte: Modificado de Oliveira et al., 2013, atualizado a partir de dados de Oliveira et al., 2015.

Além do isolamento de diferentes linhagens de VACV, a ocorrência de cocirulação de coinfecção vem sendo descrita no Brasil. O primeiro caso descrito de coinfecção ocorreu em Pelotas (Rio Grande do Sul), em que duas amostras foram isoladas de um mesmo hospedeiro, denominados Pelotas vírus 1 (PV1) e Pelotas vírus 2 (PV2) (CAMPOS et al. 2011). Além desse, outros casos de coinfecção vêm sendo descritos na literatura (OLIVEIRA et al., 2015; LIMA et al., 2018).

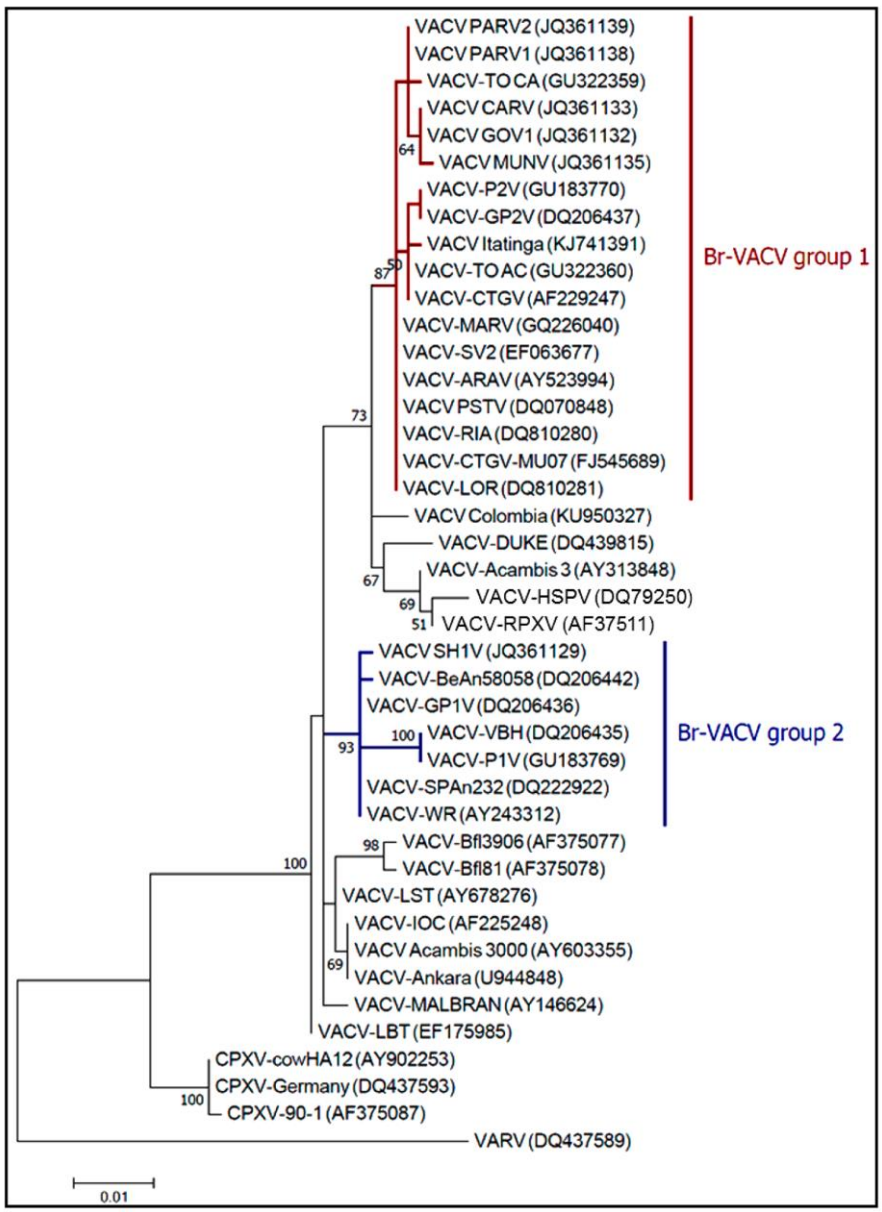
1.5.3 Diversidade dos VACV brasileiros

A partir do isolamento do GP1V e GP2V em 2001, a variação genética presente nos VACV brasileiros (VACV-BR) ficou mais evidenciada e através de análises filogenéticas foi estabelecido a existência de dois grupos filogenéticos distintos circulantes no Brasil. Assim, foi possível agrupar os VACV-BR em dois clados, Grupo I (ARAV, CTGV, GP2V e PSTV) e Grupo II (GP1V, VBH, BeAn58058 e SPAn323) (Figura 15). Os vírus do Grupo I se caracterizam por uma deleção de 18 nucleotídeos no gene A56R, responsável por codificar a

hemaglutinina viral, já os vírus do Grupo II não possuem essa deleção (TRINDADE et al., 2007; DRUMOND et al., 2008).

Além das diferenças genéticas de ambos os grupos, alguns fatores biológicos também são diferentes. A virulência desse vírus é significativamente diferente em modelo murino, em que linhagens do Grupo II são consideravelmente mais virulentas. A infecção por linhagens do Grupo II causa morbidade grave, com sinais clínicos como pelo eriçado, dorso arqueado e perda de peso em camundongos infectados, enquanto infecção por linhagens do Grupo I não gera nenhum sinal clínico aparente (FERREIRA et al., 2008; CAMPOS et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2015 CALIXTO et al., 2017).

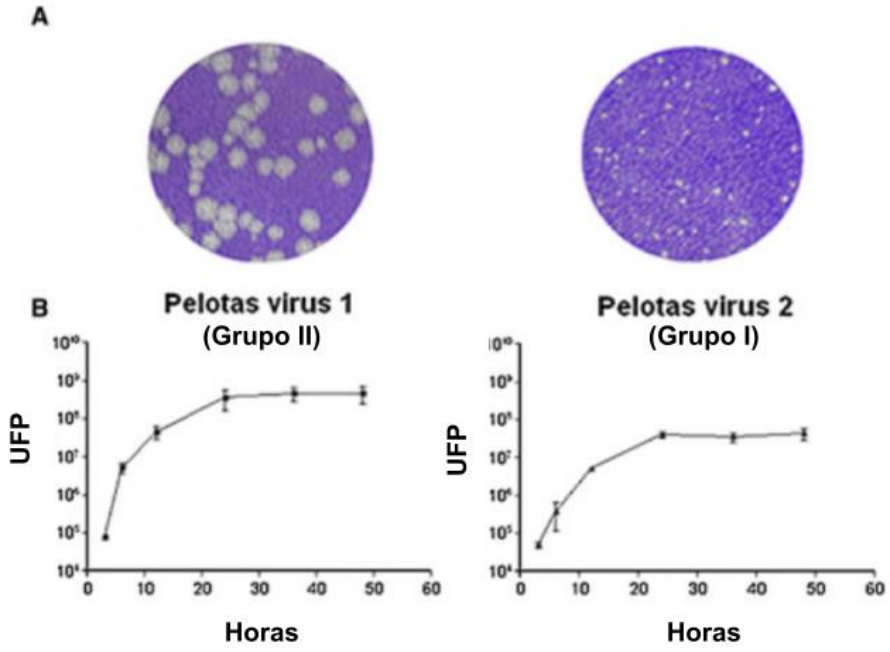
Figura 16 — Árvore Filogenética de alguns VACV



Análise filogenética baseada no gene A56R do OPXV, indicando a presença de dois grupos monofiléticos, os VACV de Grupo I (vermelho) e de Grupo II (azul). Fonte: Oliveira et al., 2017.

A diferenciação biológica do VACV-BR de Grupo I e Grupo II também se observa no perfil de replicação dos vírus e consequentemente na formação de placas de lise em culturas de células (Figura 16). Os vírus do Grupo I induzem a formação de placas de lise consideravelmente menores quando comparadas às placas formadas por vírus do Grupo II (ABRAHÃO et al., 2009b; CAMPOS et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2015; TRINDADE et al.,2016; CALIXTO et al., 2017; LIMA et al., 2018).

Figura 17 — Perfil de placas e curva de multiplicação de VACV



Fenótipo de placas de lise em monocamada celular (A) e curva de crescimento (B) em Unidades Formadoras de Placa (UFP) do PV1 e PV2. Fonte: Modificado de Campos et al., 2011.

A origem das linhagens de VACV-BR ainda não foi completamente elucidada. Algumas hipóteses relacionam a origem desse vírus a partir do escape de uma amostra vacinal ancestral da linhagem IOC, que também apresenta a deleção de 18 nucleotídeos no gene A56R (DAMASO et al., 2000; MEDAGLIA et al. 2015). Contudo, análises filogenéticas posteriores do gene A56R e outros como B5R, B8R, B19R, C6L, C7L, C23L, E3L, K1L, K2L e K3L dos VACV-BR, indicam a existência de dois grupos filogenéticos e que podem ter mais de uma origem e não ligadas diretamente à linhagens vacinais, sugerindo a existência de linhagens selvagens mais antigas (TRINDADE et al., 2007; DRUMOND et al., 2008; ABRAHÃO et al., 2012; ASSIS et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2015; TRINDADE et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2017).

1.6 Diagnóstico de OPXV

O diagnóstico conclusivo da VB e de outras ortopoxviroses é apenas possível por metodologias laboratoriais, uma vez que as lesões e os sinais clínicos presentes em animais e humanos são facilmente confundidos com outras doenças vesiculares de bovinos, como a febre aftosa, estomatite vesicular, pseudovaríola, mamilite herpética, até mesmo algumas infecções bacterianas secundárias podem confundir o diagnóstico da VB (ABRAHÃO et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2017).

O diagnóstico laboratorial poder ser molecular, através de técnicas de PCR e qPCR; sorológico, através da detecção de anticorpos neutralizantes; através do isolamento viral em cultivo celular ou em fibroblastos de embrião de galinha; e também por microscopia eletrônica, capaz de promover a visualização das partículas virais (KROON et al., 2016).

A detecção molecular é de extrema importância no diagnóstico da VB, pois ela permite a detecção de infecções agudas causadas pelo VACV e permite a caracterização viral através da identificação de mutações em diversos genes utilizados no diagnóstico, como os genes A56R, C11R e E9L (DRUMOND et al., 2007; LI et al., 2008; TRINDADE et al., 2008; ABRAHÃO et al., 2010; ASSIS et al., 2012; KROON et al., 2016). O material genético do VACV pode ser detectado a partir de diversos tipos de amostras clínicas, de animais e humanos. Para a detecção de DNA e isolamento de OPXV, é utilizado preferencialmente amostras coletadas diretamente das lesões, pois apresentam partículas virais em altos títulos. Amostras de sangue, soro e outros materiais clínicos também podem ser utilizados para detecção de OPXV, porém com taxa de sucesso inferior. Além disso, o material genético de VACV já foi identificado em alimentos, derivados do leite, e também em fezes de animais silvestres (ABRAHÃO et al., 2009a; ABRAHÃO et al., 2010; RIVETTI et al., 2013).

Na detecção sorológica, através da identificação de anticorpos neutralizantes anti-OPXV, é possível estimar infecções passadas, porém não é possível diferenciar o tipo de OPXV, devido à reatividade imunológica cruzada presente em vírus desse gênero. Essa característica se deve à semelhança de proteínas estruturais altamente conservadas no genoma dos OPXV. Dessa forma os anticorpos capazes de neutralizar a infecção por VACV também podem neutralizar a infecção por VARV, MPXV e CPXV, por exemplo (STANFORD et al., 2007; JACOBS et al., 2009; KROON et al., 2016; PETERSEN et al., 2019).

O isolamento viral é de extrema importância, como ferramenta de diagnóstico, em que é possível a recuperação da partícula viral envolvida na infecção. O isolamento viral também é importante como ferramenta de pesquisa, pois é possível realizar diversos outros estudos em

laboratórios especializados, que permite elucidar as relações do vírus com seus hospedeiros e a caracterização biológica do vírus isolado. Esse tipo de diagnóstico é restrito a laboratório de pesquisa, pois são necessários diversos equipamentos e insumos de alto custo, e profissionais especializados (ABRAHÃO et al., 2009b; OLIVEIRA et al., 2009; KROON et al., 2016; TRINDADE et al., 2016).

Apesar da importância de metodologias laboratoriais para o diagnóstico preciso de infecções por OPXV e o aumento significativo do número de casos e surtos em todas as regiões do Brasil, poucos laboratórios nacionais possuem capacidade de diagnóstico de ortopoxviroses, apenas quatro estados da federação possuem um laboratório de referência (DOMINGOS et al., 2020). Além da carência estrutural, Oliveira e colaboradores (2017) demonstraram que profissionais de saúde de uma região endêmica de VB, demonstraram falta de conhecimento generalizado acerca da doença, quase metade dos profissionais não conheciam a existência da VB, e a maior parte não conhecia o agente etiológico, sintomas, vias de transmissão e outros fatores importantes. Isso demonstra que a vigilância epidemiológica de OPXV é escassa, caracterizando o VACV como um patógeno fortemente negligenciado no Brasil, favorecendo a circulação do vírus e dificultando a obtenção de conhecimento da biologia e epidemiologia desses vírus, o que pode gerar impactos substanciais na saúde pública.

2. JUSTIFICATIVA

Os OPXV são vírus emergentes de grande importância para a medicina humana e veterinária, incluindo o VACV, que causa surtos VB na América do Sul. Desde o final da década de 1990 o VACV vem sendo associado a vários surtos exantemáticos descritos em áreas rurais brasileiras, afetando principalmente gado leiteiro e seus ordenhadores.

Nos animais a VB se caracteriza pelo desenvolvimento de lesões dolorosas nas tetas e úberes dos animais, comumente associados a infecções bacterianas secundárias, contribuindo para o agravamento do quadro clínico dos animais, diminuindo significativamente a produção de leite e aumentando os custos veterinários, afetando as economias locais e pequenos produtores.

A VB, uma zoonose ocupacional, também representa um problema de saúde pública humana, acometendo diversos trabalhadores rurais que possuem contato direto com os animais infectados durante a ordenha. Nos humanos, além das lesões características no sítio primário de infecção, geralmente a VB causa sintomas sistêmicos, implicando no afastamento dos trabalhadores e até mesmo hospitalização. Em pacientes imunocomprometidos a VB pode evoluir para quadros graves, levando o paciente à internação por longos períodos de tempo, além de diversas outras complicações clínicas.

A VB é considerada uma doença negligenciada no Brasil, portanto, o diagnóstico é muitas vezes impreciso, pela falta de conhecimento dos profissionais de saúde e o tratamento médico aplicado é inapropriado. Além disso, o VACV é um vírus de caráter zoonótico, portanto a erradicação se torna praticamente impossível, devido a existência de animais reservatórios em ambiente silvestre.

Por causa da diminuição da imunidade global contra OPXV e transmissão zoonótica do VACV, cada vez mais é relatado casos de VB no Brasil, mesmo em pacientes que receberam a vacina antivariólica, que teoricamente deveriam estar protegidos contra essa infecção, logo, o entendimento real das áreas de circulação, fatores de risco e impactos da circulação do VACV são valiosos.

Poucos estudos visando a caracterização biológica e molecular de OPXV circulantes no Brasil foram conduzidos nos últimos anos, portanto, a caracterização de novos isolados de VACV-BR são importantes para demostrar a atual circulação do vírus no país e descrever quais as características biológicas e genéticas desses vírus.

A partir do isolamento e caracterização de novas amostras de VACV-BR, mapeamento das áreas de circulação e fatores de risco associados à infecção, os resultados obtidos no

presente trabalho, podem contribuir para diversas aplicações práticas, em vigilância e combate aos surtos do VACV em regiões e populações de maior risco ao aparecimento de surtos de VB e outros OPXV no país.

3. CAPÍTULO I — DETECÇÃO, ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE VACV EM AMOSTRAS CLÍNICAS E PERFIL SOROLÓGICO DE INDIVÍDUOS AFETADOS

3.1 Objetivos

3.1.1 Objetivo Geral

Realizar ensaios sorológicos, moleculares, isolamento e caracterização viral a partir de amostras clínicas de pacientes suspeitos de infecção por OPXV de Minas Gerais coletadas de 2017 a 2021.

3.1.2 Objetivos Específicos

- Detectar e quantificar anticorpos neutralizantes contra OPXV (anti-OPXV) em amostras de soros humanos por meio do teste de soroneutralização por redução de placa (PRNT).
- Detectar a presença de DNA de VACV em amostras clínicas humanas utilizando a reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR).
- Isolar o VACV de amostras clínicas humanas em células Vero.
- Caracterizar os isolados de VACV-BR dos Grupos I e II por qPCR.
- Caracterizar os isolados de VACV-BR dos Grupos I e II através do fenótipo da placa de lise em células BSC-40.

3.2 Metodologia

3.2.1 Descrição das amostras biológicas

Neste estudo, foram analisadas 30 amostras clínicas de 27 pacientes suspeitos de infecção por OPXV, coletadas entre 2017 e 2021, em 10 municípios do estado de Minas Gerais. De três indivíduos, foram coletadas amostras de crosta de lesão e soro: um de Iturama (2019) e dois de Joanésia (2021). De 20 indivíduos, foram coletadas apenas amostras de soro: um de Paracatu (2017), quatro de Salto da Divisa (2018), uma de Prados (2019), oito de Joanésia (2021), quatro de Papagaios (2021), um de Juiz de Fora (2021) e um de Uberaba (2021). Além disso, de quatro indivíduos, foram coletadas exclusivamente amostras de crostas de lesão: três de Teófilo Otoni (2018) e um de Araçuaí (2019).

Estes materiais clínicos foram encaminhados ao Laboratório de Vírus da UFMG (LV), para a realização de diagnósticos moleculares e sorológicos de OPXV, para fins de esclarecimento de caso junto à Fundação Ezequiel Dias (FUNED), vigilância epidemiológica dos municípios, Secretaria de Estado de Saúde De Minas Gerais (SES). Cada amostra foi acompanhada de uma Ficha de Notificação e Investigação correspondente. As amostras foram armazenadas em freezer -70ºC ou freezer -20ºC. As amostras clinicas e demais dados foram coletados e enviados à FUNED sob autorização ética 62702222.6.0000.9507. O patrimônio biológico e genético gerado nesse estudo foi depositado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN) sob os números A7BAA6B e A19E6BB.

3.2.2 Células Vero e BSC-40

As células Vero e BSC-40 (American Type Culture Collection, EUA), utilizadas durante o projeto, são linhagens contínuas derivadas de células epiteliais de rim de macaco verde africano (*Cercopthecus aeothiops*). As células foram cultivadas em meio mínimo de Eagle (MEM) (Gibco, EUA), com acréscimo de 5% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Brasil). Para inibir o possível crescimento de bactérias e fungos, eram adicionados antimicrobianos (penicilina a 100 U/mL, estreptomicina a 100 µg/mL e anfetericina B a 2 µg/mL) nos estoques de MEM. As culturas foram mantidas em estufa a 37ºC com atmosfera de 5% de CO2. As células Vero foram utilizadas para o isolamento viral, produção de estoques de vírus e titulação viral. As células BSC-40 foram utilizadas para os testes de soroneutralização, purificação e fenótipo de placa.

3.2.3 Vírus controle

Para os testes de soroneutralização e controle positivo para as análises moleculares foi utilizado o DNA extraído ou isolado da amostra *Western Reserve* (VACV-WR) (New York City Board of Health, EUA) em títulos conhecidos, que faz parte da coleção de vírus do LV.

3.2.4 Soros controles

Como soros controle negativo foram utilizados um pool de soros humanos pertencentes à coleção de soros do LV previamente testados por ensaios de soroneutralização.

3.2.5 Ensaios de soroneutralização

Para a detecção de anti-OPXV foi utilizado o teste de PRNT, desenvolvido segundo os protocolos de Newman e colaboradores (2003) e Kroon e colaboradores (2016).

Inicialmente, os soros foram separados em duplicata na diluição de 1:40, em volume final de 400uL por alíquota. Essa diluição é feita em meio MEM sem adição de SFB e adicionado de igual volume de MEM contendo 100 a 150 unidades formadoras de placas (UFP) do VACV-WR. Antes da diluição, as proteínas do sistema do complemento foram desnaturadas através da incubação do soro a 56ºC por 30 minutos em banho maria. Para o controle do vírus, o mesmo processo foi adotado, utilizando um soro negativo ou SFB. As soluções de soro e vírus foram homogeneizadas e incubadas por 16 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO2. Essas soluções foram inoculadas em placas de seis poços com monocamadas de BSC-40 entre 90 e 100% de confluência e levadas para adsorção, em que, as placas foram incubadas a 37°C em atmosfera de 5% de CO2 e homogeneizadas a cada 15 minutos por 1 hora. Após a adsorção, 2mL de MEM com 2% de SFB foi adicionado a cada um dos poços e as placas foram incubadas por 48 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO2. Decorridas 48 horas de incubação, as placas foram fixadas com solução de formaldeído 3,7% e coradas com solução de cristal violeta a 1%. As placas de lise viral foram visualizadas e contadas. A partir da média do número de placas de lise de cada amostra, foram consideradas positivas as amostras que apresentaram redução maior ou igual a 50% daquela encontrada no controle de vírus.

Para a titulação, as amostras de soros positivas foram separadas em duplicada e diluídas serialmente na razão de dois, iniciando-se pela diluição de 1:40 até a diluição de 1:640 em volume final de 400µL. O restante do teste ocorreu conforme mencionado anteriormente. O valor do título de anticorpos por amostra foi calculado com base na maior diluição que apresentou positividade, dado por Unidades neutralizantes por mililitro (UN/mL).

3.2.6 Extração de DNA

A extração de DNA viral das amostras de soro e crosta foram realizadas utilizando o *High Pure Viral Nucleic Acid Kit* (Roche, Suíça), seguindo as orientações do fabricante. O processo de lise tecidual das crostas s lesões foi realizado através de trituração em triturador de esferas (BioSpec, Brasil) usando três esferas por microtubo por 2 minutos. O material resultante foi suspendido em tampão conforme a orientação do fabricante.

3.2.7 Ensaios Moleculares

Para a detecção e caracterização molecular de OPXV, em cada amostra biológica, foram realizadas cinco qPCR com alvos em diferentes genes conhecidos de OPXV. Foram utilizadas diversas combinações de pares de iniciadores (Tabela 2). Além de aumentar a chance de detecção, a combinação dos resultados permite a diferenciação molecular de algumas linhagens de VACV. Foram utilizados um par de iniciadores, descritos por Abrahão e colaboradores (2010) e Kroon e colaboradores (2016), capazes de amplificar fragmentos do gene C11R, que codifica o fator de crescimento viral, conservado e duplicado na maioria dos genomas de OPXV. Em adição, foram utilizados os iniciadores descritos por Li e colaboradores (2006), capazes amplificar fragmentos do gene E9L, que codifica a DNA polimerase dos OPXV. Do mesmo modo, foi utilizado a metodologia descrita por Trindade e colaboradores (2008), composta por três reações distintas que podem ser realizadas sob as mesmas condições. As três reações amplificam diferentes fragmentos do gene A56R que codifica a hemaglutinina viral. A primeira reação foi projetada para amplificar todas as linhagens de VACV descritas e alguns outros OPXV incluindo CPXV, MPXV e ECTV; A segunda reação foi projetada para amplificar todas as linhagens não vacinais de VACV; A terceira reação foi projetada para amplificar as linhagens de VACV que não apresentam a deleção de 18 nucleotídeos no gene A56R (Grupo II). Portanto, a combinação das três reações propostas pelo protocolo é capaz de amplificar e distinguir amostras de diferentes espécies de VACV-BR e de alguns outros OPXV. A Primeira reação foi empregada para o diagnóstico molecular, enquanto a segunda e terceira foram utilizados para a caracterização molecular dos isolados.

Todas as reações foram realizadas em placas de 48 poços (Applied Biosystems, EUA) no equipamento *StepOne* (Applied Biosystems, EUA). Para a detecção dos fragmentos amplificados dos genes A56R e C11R, foi utilizado o *SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems, EUA) como marcador de fluorescência. Para a detecção do gene E9L, foi utilizado o *TaqMan® Universal PCR Master mix* (Applied Biosystems, EUA) para a marcação da fluorescência.

Tabela 1 — Iniciadores utilizados para detecção e caracterização de OPXV

Reação	Iniciadores	Sequência	Aplicação	Especificidade
qPCR 1	VGF Forward	5'-CGC TACA ACA GAT ATT CCA GCT ATC AG-3'	Diagnóstico Molecular de OPXV	OPXV
	VGF Reverse	5'-AGC GTG GAT ACA GTC ACC GTG TAA-3'		
qPCR 2	E9L Forward	5'-TCA ACT GAA AAG GCC ATC TA TGA-3'	Diagnóstico Molecular de OPXV	OPXV
	E9L Reverse	5'-GAG TAT AGA GCA CTA TTT CTA AAT CCC A-3'		
qPCR 3	HA-generic Forward	5'-CAT CAT CTG GAA TTG TCA CTA CTA AA-3'	Diagnóstico Molecular de OPXV	OPXV
	HA-generic Reverse	5'-ACG GCC GAC AAT ATA ATT AAT GC-3'		
qPCR 4	HA-BVV Forward	5'-ACC GAT GAT GCG GAT CTT TA-3'	Caracterização Molecular de VACV	VACV não vacinais
	HA-generic Reverse	5'-ACG GCC GAC AAT ATA ATT AAT GC-3'		
qPCR 5	HA BVV-nDEL Forward	5'-GCG GAT CTT TAT GAT ACG TAC AAT G-3'	Caracterização Molecular de VACV	VACV do Grupo 2
	HA-generic Reverse	5'-ACG GCC GAC AAT ATA ATT AAT GC-3'		

Fonte: LI et al., 2006, TRINDADE et al., 2008 e KROON et al., 2016.

3.2.8 Isolamento Viral

Para as amostras positivas na triagem por qPCR, foram realizadas diversas tentativas de isolamento de partículas virais em células Vero como descrito por Kroon e colaboradores (2016), com modificações. As amostras foram devidamente processadas em volume final de 400µL. As diluições foram inoculadas em monocamadas de células Vero com 90% a 95% de confluência, em placas de 6 poços. Cada placa continha um poço inoculado com 400uL de MEM para o controle de célula. O meio da placa foi descartado e lavado 2x com PBS antes da

inoculação. As placas inoculadas foram incubadas a 37°C em atmosfera de 5% de CO2 por 1 hora para adsorção, com homogeneização a cada 15 minutos. Após a adsorção, cada poço recebeu 5mL de meio MEM suplementado com 2% de soro fetal bovino e incubadas a 37°C em atmosfera de 5% de CO2 por 72 horas ou até o aparecimento de efeito citopático (ECP). A cada 24hrs as placas eram visualizadas em microscópio invertido para observar o aparecimento do ECP. Caso houvesse o aparecimento de ECP durante as primeiras 96 horas, as células e o sobrenadante eram coletados e armazenados em freezer -70ºC. Caso o ECP não fosse observado após 96 horas, 4,5mL do sobrenadante era descartado, as células coletadas e submetidas a 3 ciclos de congelamento e descongelamento para a liberação dos vírus das células. Após esse procedimento, as células lisadas e o sobrenadante eram novamente inoculados em placas de 6 poços por até mais 2 passagens.

3.2.9 Multiplicação viral

Os estoques de vírus isolados foram obtidos com a multiplicação em células Vero cultivadas a 37ºC, em atmosfera 5% de CO2. Monocamadas de células Vero com 90% a 95% de confluência, cultivadas em garrafas de cultura celular de 175 cm². As células foram lavadas duas vezes com PBS e infectadas com 400 mL da solução obtida no isolamento. Após 1 hora de adsorção, a 37ºC, foram acrescentados 25 mL de MEM suplementado com 1% SFB. Novamente, as células foram incubadas a 37ºC e monitoradas diariamente ao microscópio óptico até a detecção de 80-90% de ECP na monocamada celular. As desprendidas das garrafas com auxílio de um raspador. A suspensão obtida foi centrifugada durante 10 minutos a 2500 x g. O meio de cultura e o sedimento foram coletados e armazenados a – 70°C.

3.2.10 Ensaio de fenótipo de placa

Os ensaios de fenótipo de placa foram aplicados aos vírus isolados. Cada isolado foi diluído na razão de 10 (10^{-1} até 10^{-5}) em volume final de 400µL. As suspensões virais foram inoculadas em camadas de célula BSC-40 com confluência de 90% a 95% em placas de 6 poços. Um dos poços de cada placa foi utilizado para o controle de qualidade das células, portanto não foi inoculado com o vírus. As placas inoculadas foram incubadas a 37°C em atmosfera de 5% de CO2 por 1 hora para adsorção, com homogeneização a cada 15 minutos. Após a adsorção, cada poço recebeu 2mL de meio MEM semissólido suplementado com 1% de SFB e incubadas por 48 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO2. Decorridas 48 horas de incubação, as placas

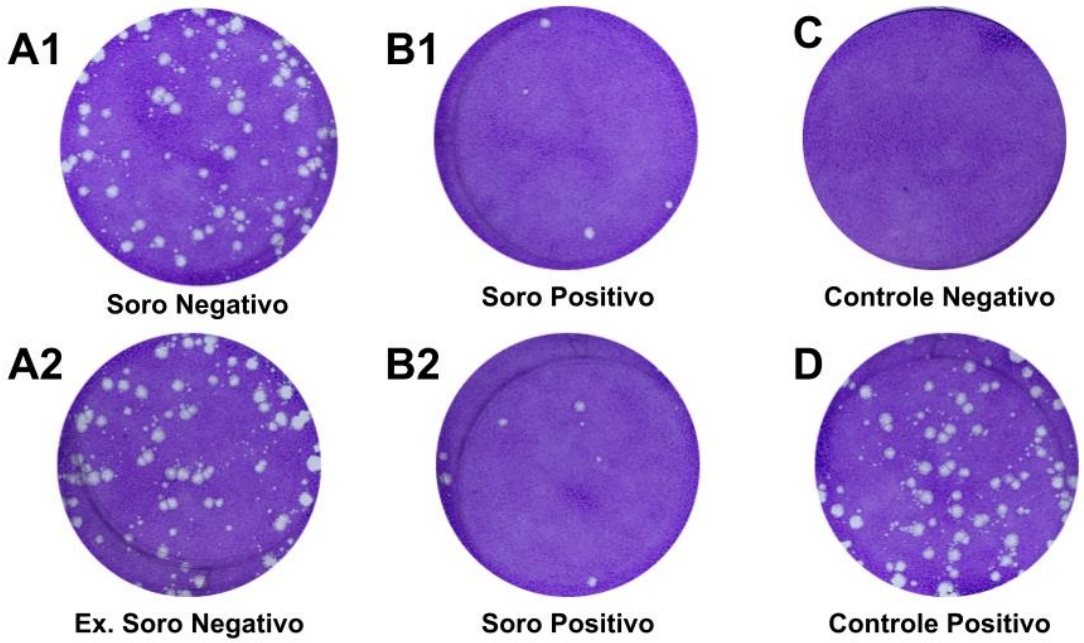
foram fixadas com solução de formaldeído 3,7% e coradas com solução de cristal violeta a 1%. As placas fixadas foram fotografadas e analisadas.

3.3 Resultados

3.3.1 Detecção de anticorpos neutralizantes

Para a detecção de anti-OPXV em soros humanos, a técnica de PRNT foi aplicada (Figura 18) (Tabela 2). Dos 20 soros analisados, 16 apresentaram soropositividade nas análises de diagnóstico. Os controles de vírus apresentaram média de 100 UFP. A redução do número de placas das amostras positivas, diluídas 40 vezes, variou de 76% a 98% de redução em relação ao controle.

Figura 18 — Placa de PRNT para detecção de anti-OPXV



Resultado de um ensaio de PRNT para detecção de anti-OPXV. Soro negativo (A). Soro positivo (B). Controle negativo (C). Controle positivo (D). Fonte: Elaborado pelos autores, 2023.

Tabela 2 — Resultado dos ensaios de PRNT para detecção de anti-OPXV

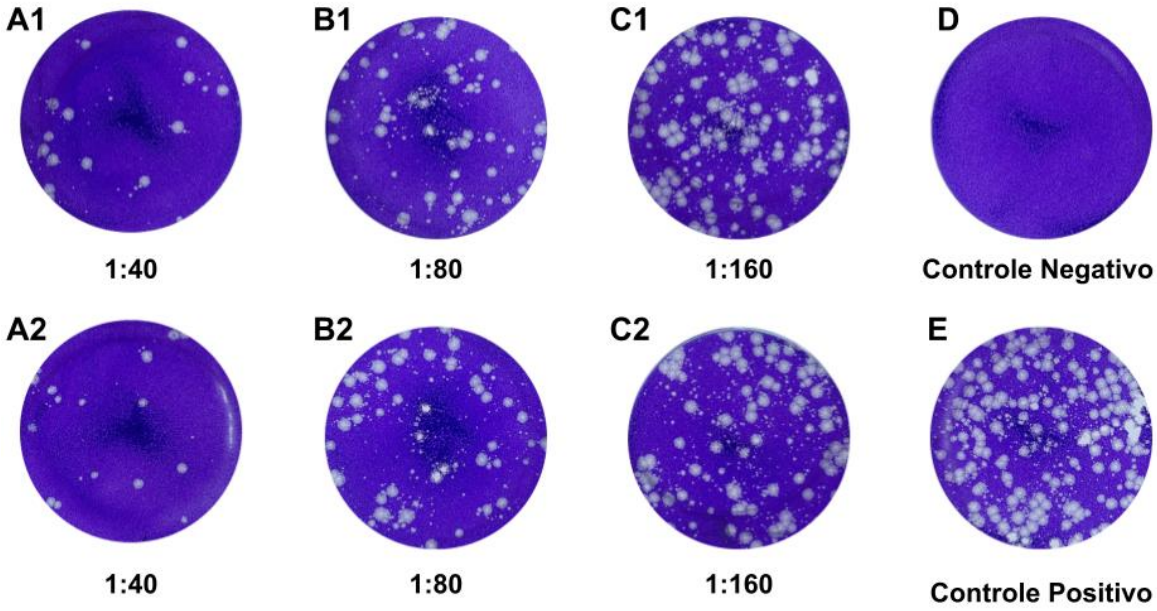
Amostra	Local	Redução de placa	PRNT positivo
Soro 1	Paracatu	98%	Sim
Soro 2	Salto da Divisa	85%	Sim
Soro 3	Salto da Divisa	28%	Não
Soro 4	Salto da Divisa	98%	Sim
Soro 5	Salto da Divisa	98%	Sim
Soro 6	Salto da Divisa	0%	Não
Soro 7	Papagaios	96%	Sim
Soro 8	Papagaios	96%	Sim
Soro 9	Papagaios	96%	Sim
Soro 10	Papagaios	94%	Sim
Soro 11	Iturama	0%	Não
Soro 12	Joanésia	92%	Sim
Soro 13	Joanésia	95%	Sim
Soro 14	Joanésia	80%	Sim
Soro 15	Joanésia	92%	Sim
Soro 16	Joanésia	90%	Sim
Soro 17	Joanésia	96%	Sim
Soro 18	Joanésia	8%	Não
Soro 19	Joanésia	96%	Sim
Soro 20	Joanésia	95%	Sim

PRNT positivo: Redução maior ou igual à 50% do total de placas no controle. Fonte: Elaborado pelos autores, 2023.

3.3.2 Titulação de anticorpos neutralizantes

Para a determinação dos títulos de anti-OPXV, os soros humanos positivos foram diluídos em razão de 2 (1:20 a 1:640) e submetidos a PRNT (Figura 19) (Tabela 3). Os controles de vírus apresentaram média de 100 PFU.

Figura 19 — Placa de PRNT para titulação de anti-OPXV



Resultado de um ensaio de PRNT para titulação de anti-OPXV, indicando as diferentes diluições para cada poço (A, B e C). Controle negativo (D). Controle positivo (E). Fonte: Elaborado pelos autores, 2023.

Tabela 3 — Resultado dos ensaios de PRNT para titulação de anti-OPXV

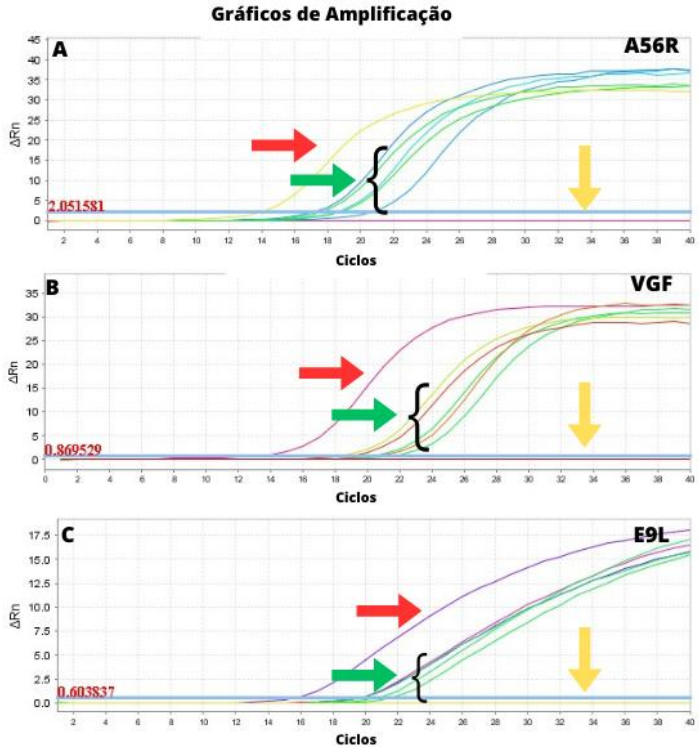
Amostra	Local	Títulos (UN/mL)
Soro 1	Paracatu	800
Soro 2	Salto da Divisa	50
Soro 4	Salto da Divisa	100
Soro 5	Salto da Divisa	800
Soro 7	Papagaios	100
Soro 8	Papagaios	100
Soro 9	Papagaios	50
Soro 10	Papagaios	800
Soro 12	Joanésia	800
Soro 13	Joanésia	100
Soro 14	Joanésia	50
Soro 15	Joanésia	100
Soro 16	Joanésia	50
Soro 17	Joanésia	400
Soro 19	Joanésia	200
Soro 20	Joanésia	800

Un/mL: Unidades neutralizantes por mililitro. Fonte: Elaborado pelos autores, 2023.

3.3.3 Diagnóstico molecular

Para o diagnóstico molecular de OPXV em amostras clínicas humanas foram realizadas três qPCR com alvos nos genes A56R, C11R e E9L. As três reações são capazes de detectar DNA de diversos OPXV, incluindo o VACV. Todas as sete amostras de crosta apresentaram amplificação específica para os três genes analisados (Figura 20). Não houveram amplificações nas amostras de soro.

Figura 20 — Gráficos de amplificação de qPCR para diagnóstico molecular de OPXV das amostras clinicas



Gráficos dos resultados de qPCR (A, B e C), com indicação de cada alvo molecular utilizado (A56R, VGF e E9L), curvas de amplificação do controle positivo (seta vermelha), curvas de amplificação obtida pelas amostras positivas (seta verde) e Indicação do controle negativo (seta amarela). Fonte: Elaborado pelos autores, 2023.

3.3.4 Isolamento viral

As amostras clínicas humanas positivas para OPXV em qPCR foram submetidas à tentativa de isolamento em células Vero por até três passagens cegas. A presença de ECP típico de infecção por VACV foi monitorada a cada 24 horas após a infecção. Das 7 amostras submetidas ao isolamento, 4 amostras de crostas apresentaram ECP na primeira passagem e 1 amostra na segunda passagem. Duas das amostras de crosta não apresentaram ECP em nenhum momento do experimento (Tabela 4).

Tabela 4 — Resultado da tentativa de isolamento viral

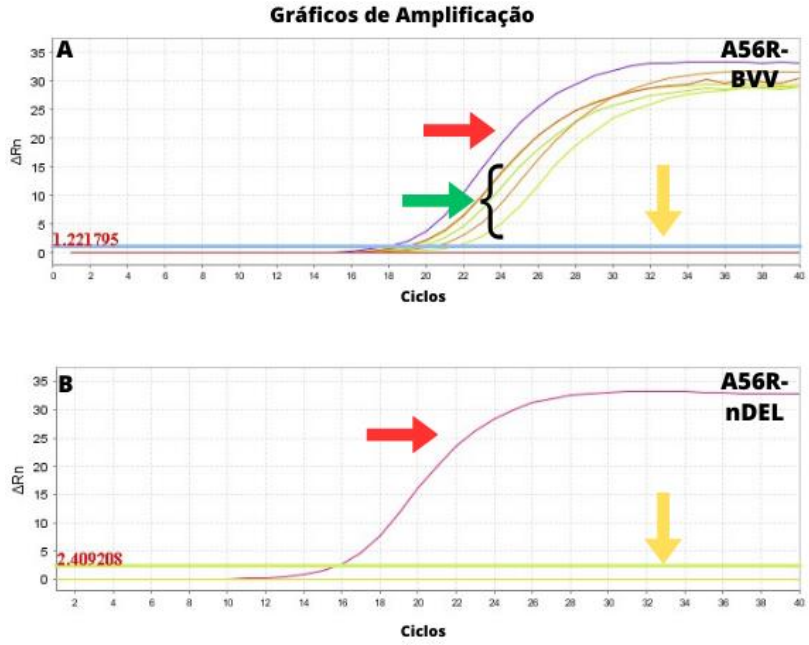
Amostra	Município	ECP	Passagem	Coleta	Isolado
Crosta 1	Iturama	Sim	1	24H	Vírus 1
Crosta 2	Araçuaí	Sim	1	48H	Vírus 2
Crosta 3	Teófilo Otoni	Sim	1	24H	Vírus 3
Crosta 4	Teófilo Otoni	Sim	1	24H	Vírus 4
Crosta 5	Teófilo Otoni	Não	-	-	Não
Crosta 6	Joanésia	Sim	2	48H	Vírus 5
Crosta 7	Joanésia	Não	-	-	Não

Fonte: Elaborado pelos autores, 2023.

3.3.5 Caracterização molecular dos isolados

Os isolados obtidos foram submetidos a duas reações de qPCR para a caracterização molecular baseados em diferenciações do gene A56R como descrito por Trindade e colaboradores (2008). A primeira reação amplifica fragmentos do gene A56R de todos os VACV-BR conhecidos e algumas amostras laboratoriais como o VACV-WR usado no controle. Todos os isolados foram positivos para VACV-BR na reação. A segunda reação amplifica fragmentos do gene A56R dos VACV incluídos no Grupo II que não possuem a deleção de 18 nucleotídeos no gene. O VACV-WR representa um VACV de Grupo II. Nenhum dos isolados foi positivo na análise, indicando o isolamento de, apenas, VACV-BR de Grupo I (Figura 21).

Figura 21 — Gráficos de amplificação de qPCR para caracterização molecular dos isolados de VACV

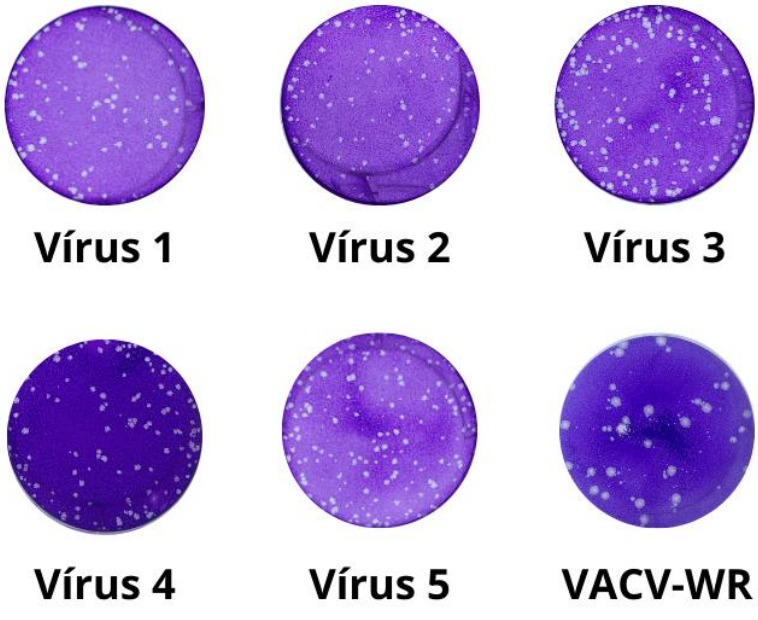


Gráficos dos resultados de qPCR (A e B), com indicação de cada alvo molecular utilizado (A56R-BVV e A56R-nDEL), curvas de amplificação do controle positivo (seta vermelha), curvas de amplificação obtida pelas amostras positivas (seta verde) e Indicação do controle negativo (seta amarela). Fonte: Elaborado pelos autores, 2023.

3.3.6 Ensaios de fenótipo de placa

Para a caracterização biológica inicial, os isolados foram submetidos ao ensaio de fenótipo de placa, dado que, estudos anteriores demonstraram que o tamanho das placas de lise é característica biológica diferencial entre VACV-BR pertencentes ao Grupo I e Grupo II, que geram placas de lise menores e maiores, respectivamente. Os resultados obtidos demonstram a formação de placas de lise menores em comparação com o controle positivo, VACV-WR, demonstrando o isolamento de linhagens pertencentes ao Grupo I dos VACV-BR (Figura 22)

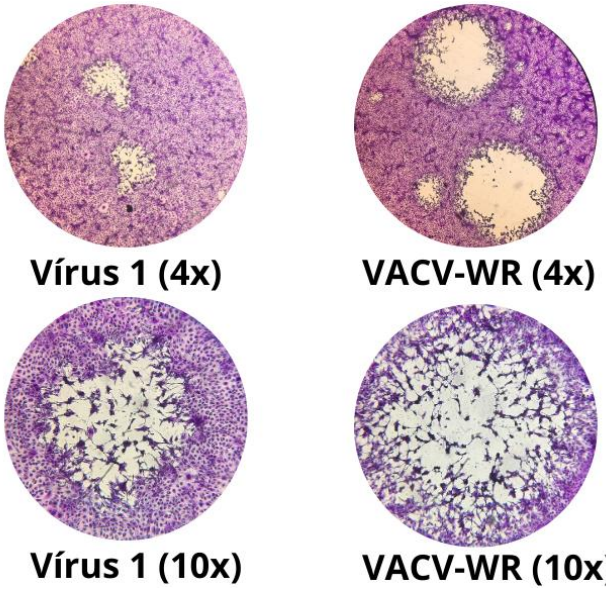
Figura 22 — Fenótipo de placas dos isolados de VACV



Resultado da técnica de Fenótipo de placa dos isolados, caracterizados como Grupo I e do VACV-WR, caracterizado como Grupo II. Resultados obtidos em monocamada de células BSC-40. Fonte: Elaborado pelos autores, 2023.

Em microscopia óptica, a morfologia das placas de lise formadas pelo VACV-WR é distinta a de todos os isolados. Além da diferença de tamanho observado pelas placas, as placas formadas pelo VACV-WR apresentam aspecto mais arredondado e bordas mais uniformes do que nos isolados (Figura 23).

Figura 23 — Microscopia óptica de placas de lise de isolados de VACV



Micrografia de placas de lise produzidas pelo Vírus 1 (Grupo I) e VACV-WR (Grupo II) em microscopia óptica em aumento de 4x e 10x. Resultados obtidos em monocamada de células BSC-40. Fonte: Elaborado pelos autores, 2023.

3.4 Discussão

Os OPXV Figuram entre os vírus animais mais importantes na medicina humana e veterinária. Dentre eles, o VACV é o vírus mais estudado do gênero, devido sua utilização como vírus vacinal na campanha mundial de erradicação da varíola que ocorreu de 1958 a 1980 (FENNER et al., 1988). A maior parte do conhecimento acerca do VACV vem de estudos realizados com amostras vacinais e laboratoriais, tanto em estudos de caracterização e manipulação biotecnológica, como na produção de vetores vacinais mais seguros (MOSS, 2013). Estudos acerca de amostras selvagens de VACV são muito mais escassos, gerando dificuldades no estabelecimento das relações filogenéticas, diversidade viral, gama de hospedeiros e ciclo epidemiológico do VACV.

Desde o final da campanha de vacinação contra a varíola em 1980, observa-se um aumento expressivo nos números de surtos de doença exantemática causadas por diversas espécies de OPVX ao redor do mundo. No Brasil, a partir de 1999, diversos casos e surtos de VB vêm sendo descritos no país, afetando principalmente o gado leiteiro e seus ordenhadores, gerando diversos prejuízos econômicos e em saúde pública. Diversos estudos demonstraram a circulação de VACV em todas as regiões do Brasil através de evidências sorológicas, moleculares ou de isolamento viral.

No presente estudo, 20 amostras de soros humanos, oriundas de residentes de áreas rurais de 5 municípios de Minas Gerais, foram submetidas ao diagnóstico molecular e sorológico. Nenhum soro, foi positivo em qPCR. Dos 20 soros submetidos à PRNT, 16 apresentaram soropositividade para anticorpos neutralizantes Anti-OPXV utilizando o VACV-WR como controle. Os soros positivos foram titulados e demonstraram altos títulos. Todos os indivíduos soropositivos residem em área rural, e a maioria são pessoas que, de alguma forma, participam de atividades relacionadas à produção de leite e derivados no país. É importante destacar a soropositividade de um núcleo familiar composto por 4 pessoas (Pai, mãe e 2 filhas) da cidade de Papagaios (Minas Gerais), em que todos os membros apresentaram soropositividade, e apenas o pai trabalha com bovinos, contudo, sua esposa e filhas de 6 e 9 anos de idade também foram positivas em PRNT. Demonstrando indícios de possível infecção familiar por OPXV, assim como demonstrado por Costa e colaboradores (2015) a partir de evidências moleculares. Este achado também pode indicar a possibilidade de exposição por vias alternativas, como exposição à alimentos contaminados, ou dejetos de animais infectados. Nenhum indivíduo da família possui idade correspondente à vacinação anti variólica.

Diversas amostras de VACV-BR foram isoladas durante surtos que ocorreram no país, contudo lacunas importantes no entendimento da biologia e reais impactos gerados pela circulação do VACV no Brasil permanecem obscuras. Durante os primeiros isolamentos de VACV-BR as características biológicas e moleculares dos isolados eram compartilhadas, indicando a circulação de uma linhagem única de VACV no Brasil. Trindade e colaboradores (2006) demonstraram a existência de diferentes linhagens de VACV-BR através do isolamento de dois vírus distintos durante um mesmo surto. Os dois isolados apresentaram diferenças moleculares no gene A56R, em que um dos isolados possuía uma deleção de 18 nucleotídeos no gene, indicando a existência de duas linhagens distintas de VACV-BR circulando no Brasil. Nos anos subsequentes, diversos novos isolados e marcadores moleculares foram descritos para VACV-BR, que demonstraram uma diversidade genética ainda maior entre os grupos circulantes no país. A maioria considerável dos isolados brasileiros caracterizados pertencem aos VACV-BR de Grupo I. Oliveira e colaboradores (2018) isolaram 48 clones virais de 5 estados brasileiros e demonstraram que 92% dos isolados se agrupavam junto aos VACV-BR do Grupo I. Além da diferença genética dos dois grupos, fatores biológicos distintos também são observados, como a diferença de tamanho das placas de lise em monocamada celular de células BSC-40 em que vírus do Grupo II formam placas de lise maiores em comparação com os VACV do Grupo I (CAMPOS et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2015; LIMA et al., 2018). Diferenças no perfil clínico da doença em modelo murino também é observado, camundongos infectados por VACV de Grupo I não apresentam sinais clínicos aparentes, enquanto diversos sinais são observados em infecção causada por vírus do Grupo II.

Neste estudo, foram isoladas 5 amostras distintas de VACV-BR a partir de 7 amostras clínicas humanas positivas em qPCR para OPXV. As amostras foram obtidas de 5 indivíduos adultos suspeitos de infecção por OPXV que residem em área rural de 4 municípios mineiros: 2 de Teófilo Otoni coletados em 2018; 1 de Araçuaí coletado em 2019; 1 de Iturama coletado em 2019; 1 de Joanésia coletado em 2021. Os 5 indivíduos exercem profissões que possuem contato direto com bovinos, corroborando o caráter ocupacional da VB. Duas das três amostras de crosta de lesão de Teófilo Otoni, submetidas ao isolamento, foram coletadas a partir de dois irmãos que trabalham em fazendas distintas, reforçando os possíveis riscos de infecção familiar por VACV em áreas rurais brasileiras.

A caracterização molecular dos isolados através de qPCR para o gene A56R, descrito por Trindade e colaboradores (2008), demonstrou que todos os isolados pertencem ao Grupo I dos VACV-BR. Os padrões biológicos dos isolados também indicam o isolamento de VACV-BR do Grupo I, apresentando placas menores e com bordas menos definidas do que as

produzidas pelo VACV-WR em monocamada de células BSC-40. Nenhuma evidência de coinfecção foi observada.

A razão pela qual VACV-BR de Grupo I são isolados em taxas muito superiores aos de Grupo II, permanece uma incógnita. Diversas hipóteses são levantadas para explicar esse fenômeno, uma possível hipótese é que os vírus do Grupo I são realmente mais abundantes na natureza. Um dos fatores para isso, poderia ser a virulência de ambos os grupos, que causa um quadro infeccioso muito mais grave, demonstrada em murino, podendo interferir na cadeira de transmissão para humanos e bovinos, principalmente na perspectiva de hospedeiros murinos intermediários. Outra hipótese pode ser um viés laboratorial, em que, de algum modo, as técnicas de isolamento utilizadas favorecem a detecção e isolamento de VACV-BR de Grupo I, pois não há diferenças aparentes na morfologia da placa de lise de cada um dos grupos em células Vero nem em membrana corioalantóide de ovos de galinha embrionados, muito comumente utilizados em isolamentos no Brasil.

A origem dos VACV-BR permanece desconhecida, diferentes ideias da origem e distribuição de cada linhagem de VACV-BR são propagadas na literatura científica. Uma hipótese da origem dos VACV-BR de Grupo I é o escape vacinal, em que a linfa de Beaugency, da França, que foi importada ao Brasil no ano de 1887, é ancestral comum de todas a linhagens de VACV-BR, incluindo as amostras selvagens e a amostra vacinal IOC, amplamente distribuída no Brasil durante a campanha de erradicação contra a varíola até o final da década de 1978. Contudo, não resta nenhuma amostra original da linfa de Beaugency para que análises comparativas sejam feitas com amostras atuais, tanto amostras vacinais como a IOC e amostras selvagens (MEDAGLIA et al., 2015; DAMASO et al. 2018). Algumas análises filogenéticas de diversos genes canônicos para a caracterização de VACV não corroboram com este agrupamento (TRINDADE et al., 2007; ABRAHÃO et al., 2012; ASSIS et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2015; TRINDADE et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2017). Um trabalho feito por Usme-Ciro e colaboradores (2017), demonstrou que amostras de VACV isolados na colômbia se agrupam juntamente aos VACV-BR de Grupo I e indica que esses vírus se forma um grupo independente que se separou a muito tempo dos VACV-BR, indicando a possível circulação de linhagens selvagens antes dos surtos ocorridos a partir de 1999 no Brasil.

A origem do VACV-BR pertencente ao Grupo II é ainda mais obscura. Os padrões genéticos destes vírus estão relacionados a diversas amostras laboratoriais como o VACV-WR. Alguns estudos relacionam a origem dos VACV-BR de Grupo II a um possível escape de amostras laboratoriais, como proposto por Afonso e colaboradores (2012) ao caracterizar

amostras do Cotia Vírus, previamente relacionado aos VACV-BR de Grupo II, ao sugerir a hipótese de contaminação por amostras laboratoriais de VACV possivelmente relacionados ao VACV-WR. Contudo, análises do genoma dos vírus do Grupo II, demonstram que, apesar das semelhanças ao VACV-WR e Lister, os isolados brasileiros apresentam diferenças significavas para caracterizá-los como vírus distintos, como demonstrado por Leite e colaboradores (2007) e Trindade e colaboradores (2008), em que algumas linhagens, como o vírus GP1V e VBH, apresentam deleções significativas no gene A26L que não são encontradas em amostras laboratoriais, sugerindo uma origem independente desses vírus. Tais diferenças também são ressaltadas nos trabalhos de Fonseca e colaboradores (1998 e 2002) e Trindade e colaboradores (2004), em que os mapas de digestão genômica de diferentes vírus isolados no Brasil apresentam diferenças entre eles e com o VACV-WR. Hipóteses divergentes sobre a origem dos VACV-BR são apresentadas na literatura científica, portanto, novas análises do genoma completo de diversos OPXV precisam ser realizadas para que a origem e história evolutiva desses vírus seja devidamente caracterizada.

O principal achado desse capítulo, é a obtenção de 5 novos isolados de VACV-BR pertencentes ao Grupo I isoladas de amostras humanas no estado de Minas Gerais. A obtenção dos isolados permitirá a obtenção de clones que serão utilizados para contribuir com o entendimento da origem e de fatores biológicos e genéticos acerca dos VACV que atualmente circulam em Minas Gerais e no Brasil. Além disso, nenhuma detecção ou isolamento de OPXV nos 4 municípios dos isolados havia sido publicado em banco de dados oficiais ou na literatura científica, contribuindo com a ampliação do conhecimento sobre as áreas de risco e circulação mais recentes de VACV em Minas Gerais.

4. CAPÍTULO II — CIRCULAÇÃO DE VACV EM MINAS GERAIS: VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA NO EPICENTRO DOS SURTOS DE VB

4.1 Objetivos

4.1.1 Objetivo Geral

Realizar estudo retrospectivo da circulação de VACV em Minas Gerais através de dado secundários e caracterizar grupo populacional afetado pela VB no período de 2000 a 2021.

4.1.2 Objetivos Específicos

- Realizar levantamento de notificações e casos por OPXV em Minas Gerais de bancos de dados da SES, IMA e bibliografia;
- Descrever o perfil socioeconômico, aspectos clínicos e fatores de risco associados à infecção pelo VACV em populações de Minas Gerais;
- Descrever a área de ocorrência da circulação de OPXV em Minas Gerais;
- Realizar levantamento do diagnóstico de OPXV realizado pelo LV no Brasil.

4.2 Metodologia

4.2.1 Dados da SES

Neste trabalho utilizamos informações disponibilizadas pelo banco de dados da SES. O banco de dados apresenta notificações da ocorrência de casos e surtos de doenças definidas como “Infecções virais caracterizadas por lesões da pele e das membranas mucosas, causadas por ortopoxvírus*”* no estado de Minas Gerais. As notificações fazem parte do banco de dados Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) do Ministério da Saúde. No Brasil, essas infecções não fazem parte da lista nacional de notificação compulsória de doenças, agravos e eventos de saúde pública. No estado de Minas Gerais a notificação é obrigatória, mas não fazem parte da lista de doenças de notificação imediata.

Os dados apresentam notificações de casos individuais de humanos no estado. Estes contêm informações de cada caso individual, como local da ocorrência, data e diagnóstico. também há informações sobre idade, gênero e outros aspectos socioeconômicos. Além dos casos individuais, também há informações sobre surtos que ocorreram em Minas Gerais, descrevendo-o número de casos reportados, data de ocorrência e informações geográficas das regiões em que ocorreram os surtos. As notificações estão distribuídas entre os anos de 2005 e 2021. Os dados são preenchidos de acordo com o Dicionário de dados do SINAN.

4.2.2 Dados do IMA

Para a análises da circulado do VACV, foi utilizado um banco de dados disponibilizado pelo Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA), órgão de defesa animal do estado, que contêm notificações de casos de bovinos em Minas Gerais de 2005 a 2017, oferecendo informações sobre o local e a data de cada ocorrência.

4.2.3 Dados dos do LV

Para a construção do banco de dados do LV um levantamento foi realizado a partir de registros em pastas e documentos arquivados no laboratório. Estes contêm informações sobre amostras clínicas recebidas pelo laboratório para a realização de diagnóstico de OPXV durante o período de 2008 e 2021. Estão contidos dados de diversos estados e espécies. Foram considerados apenas os registros que incluem os testes, resultados, tipo de amostra, espécie de origem, local e data de coleta.

4.2.4 Levantamento bibliográfico

Para o complemento das análises da circulação do VACV no estado, foi realizado um levantamento bibliográfico. Foram incluídos no levantamento artigos que descrevem a detecção sorológica, molecular ou o isolamento de OPXV no estado. Foram considerados nas análises apenas registros que continham o município específico, data de coleta da amostra e o diagnóstico realizado.

4.2.5 Fichas de notificação

Para determinar o perfil socioeconômico, clínico e potenciais fatores de risco associados à infecção por OPXV em humanos, também foram analisadas fichas de notificação e investigação enviadas à FUNED em parceria com a SES. Os dados das fichas são provenientes de trabalhadores e moradores de zonas rurais do Estado. Cada ficha epidemiológica inclui-informações pessoais como idade e gênero, assim como local de residência e ocupação. Além disso, estão anexados questionários epidemiológicos, respondidos pelos pacientes, que incluem informações dos sintomas clínicos, contato com animais e histórico vacinal. todas as analises forma aprovadas pelo comitê de ética.

4.2.6 Mapas e recursos visuais

Para a criação dos mapas da ocorrência e distribuição de casos de OPXV no estado e outros recursos visuais, foi utilizado o *software* QGIS versão 3.28. Para a demarcação dos territórios foram utilizadas as malhas territoriais do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística de 2021.

4.3 Resultados

4.3.1 Caracterização Demográfica

Para a caracterização populacional dos pacientes de casos suspeitos e confirmados de infecção por OPXV em Minas Gerais, foram utilizadas informações do banco de dados da SES em conjunto com dados das fichas epidemiológicas encaminhadas pela FUNED. Foram incluídos 73 participantes nas análises. Alguns critérios analisados não foram registrados para todos os participantes. Os dados foram coletados do ano de 2010 até o ano de 2021. Nas análises

referentes à vacinação, o ano de nascimento dos pacientes foi utilizado para o *cut off* de idade do recebimento da vacina antivariólica que ocorreu até 1978 no Brasil.

Dos pacientes analisados, aproximadamente 75% é composto por homens e 25% de mulheres. A idade dos participantes varia de 1 a 72 anos, a mediana da idade é de 29 anos. Aproximadamente 70% da população analisada não apresentava idade correspondente à vacinação antivariólica no momento da coleta. Mais de 80% da população estava em idade produtiva, dos 15 aos 65 anos de idade, característica de doenças ocupacionais. É importante destacar que o contingente populacional de 27,40% é composto por crianças e adolescentes em idade escolar.

A maior parte da população se declara como pardos (49,09%), seguido de brancos (45,45%) e pretos (5,45%). Em relação a zona habitacional, 70,31% dos participantes declararam residir em áreas rurais e 29,54% em áreas urbanas (Tabela 5).

Tabela 5 — Caracterização demográfica da população analisada

CARACTERÍSTICA	FREQUÊNCIA	(%)
Gênero (n= 73)		
Feminino	19	26,03
Masculino	54	73,97
Idade declarada (n= 73)		
0 a 10 anos	10	13,70
11 a 20 anos	10	13,70
21 a 30 anos	20	27,40
31 a 40 anos	14	19,18
41 a 50 anos	12	16,44
51 anos ou mais	7	9,58
Idade Vacinal (n= 73)		
Sim	23	31,51
Não	50	68,49
Etnia Declarada (n= 55)		
Branca	25	45,45
Parda	27	49,09
Preta	3	5,45
Zona Habitacional (n= 64)		
Rural	45	70,31
Urbana	19	29,69

Fonte: Elaborado pelos autores, 2023.

4.3.2 Fatores de risco de exposição à OPXV

Alguns fatores comportamentais e sociais que podem aumentar o risco de exposição à OPXV foram coletados durante a obtenção dos dados epidemiológicos. Todos os participantes que responderam às perguntas, afirmam ter tido contato com bovinos e aproximadamente 80% possui contato com animais domésticos. Apenas um participante (6,25%) afirma ter tido contato com roedores e nenhum afirma ter tido contato com animais silvestres.

Dois terços dos participantes afirmam que a infecção por OPXV está diretamente relacionada à ocupação dos indivíduos, mas apenas 50% declaram afastamento do trabalho. É importante destacar que 27,78% dos pacientes declararam a ocorrência da infecção em outros membros da família (Tabela 6).

Tabela 6 — Fatores de risco e exposição ao VACV

Característica	Frequência	(%)
Contato com Bovinos (n = 18)		
Sim	18	100
Não	0	0
Contato com animais domésticos (n= 16)		
Sim	13	81,25
Não	3	18,75
Contato com animais silvestres (n= 16)		
Sim	0	0
Não	16	100
Contato com roedores (n=16)		
Sim	1	6,25
Não	15	93,75
Doença relacionada ao trabalho (n= 45)		
Sim	30	66,67
Não	15	33,33
Afastamento do trabalho (n = 16)		
Sim	8	50
Não	8	50
Infecção Familiar (n= 18)		
Sim	5	27,78
Não	13	72,22

Fonte: Elaborado pelos autores, 2023.

4.3.3 Perfil clínico

O perfil clínico dos pacientes foi determinado a partir dos relatos obtidos nas fichas epidemiológicas. Os participantes foram solicitados a responderem a ocorrência de sintomas clínicos relacionados à infecção por OPXV.

Mais da metade (61,11%) dos pacientes declaram a ocorrência de febre durante a infecção, e 44,44% dos participantes relatam a presença de edema e pústulas no local da infecção. Cinco indivíduos (27,78%) declaram a presença de vesículas, quatro (22,22%) a presença de crostas e dois (11,11%) a ocorrência de linfadenopatia (Tabela 8).

Tabela 7 — Sinais clínicos relacionados à infecção pelo VACV

CARACTERÍSTICA	FREQUÊNCIA	(%)
Febre (n = 18)		
Sim	11	61,11
Não	7	38,89
Edema local (n= 18)		
Sim	8	44,44
Não	10	55,56
Vesícula (n= 18)		
Sim	5	27,78
Não	13	72,22
Pústula (n= 18)		
Sim	8	44,44
Não	10	55,56
Crosta (n=18)		
Sim	4	22,22
Não	14	77,78
Linfadenopatia (n= 18)		
Sim	2	11,11
Não	16	88,89

Fonte: Elaborado pelos autores, 2023.

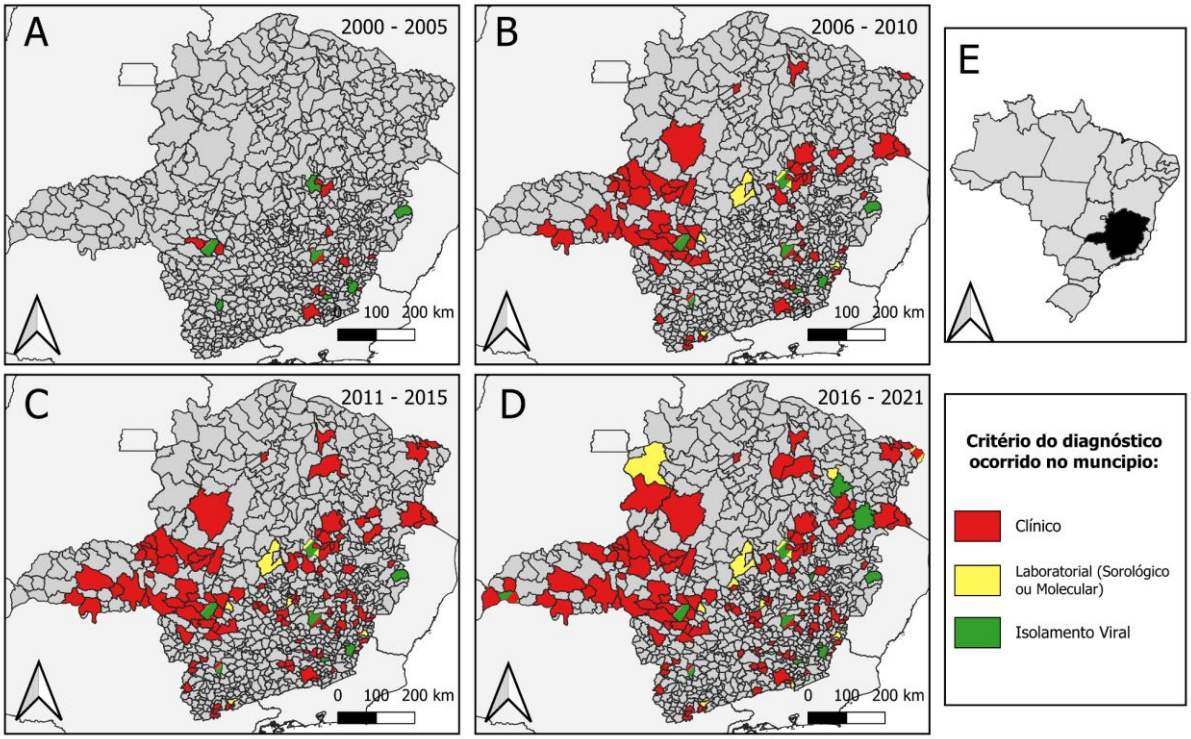
Além dos sintomas tradicionais, quatro (22,22%) participantes declararam a ocorrência de prurido nas lesões, além de uma (5,56%) ocorrência de dor na garganta e uma (5,56%) ocorrência de nódulo na axila.

4.3.4 Circulação de OPXV em Minas Gerais

Para determinar as regiões e municípios de circulação de OPXV em Minas Gerais, um levantamento retrospectivo de dados da literatura científica, SES e IMA foi empregado.

Foram considerados os dados que descreviam o município de ocorrência, anos de ocorrência, espécie analisada e o critério de detecção. Foram identificados em 149 municípios de Minas Gerais apresentaram evidências da circulação de OPXV diante aos dados e critérios utilizados (Anexo A). A evolução temporal da detecção de OPXV indica aumento na área de circulação do VACV no estado (Figura 24).

Figura 24 — Distribuição da detecção de OPXV em Minas Gerais



Mapas da distribuição de casos de detecção de OPXV nos municípios de Minas Gerais indicando o critério de diagnóstico e a evolução temporal da detecção. Mapa indicativo da detecção de OPXV dos anos 2000 a 2005 (A). Mapa indicativo da detecção de OPXV dos anos 2006 a 2010 (B). Mapa indicativo da detecção de OPXV dos anos 2011 a 2015 (C). Mapa indicativo da detecção de OPXV dos anos 2016 a 2021 (D). Mapa indicativo da região de Minas Gerais no Brasil (E). Fonte: Elaborado pelos autores. 2023.

4.3.5 Catalogação do diagnóstico realizado pelo LV

O LV é referência nacional no diagnóstico e pesquisa de OPXV no Brasil, durante décadas o laboratório realizou diversos diagnósticos laboratoriais, sorológicos e moleculares para a detecção de OPXV em amostras de diferentes espécies. Diante disso, um levantamento de diagnósticos a nível nacional foi realizado. O banco de dados levantado possui o resultado do diagnóstico de diferentes amostras a partir do ano de 2008 com descrições do resultado e critério utilizado, além da origem geográfica, da espécie e tipo de cada amostra analisada. Os dados demonstram a participação do LV no diagnóstico de OPXV em pelo menos 5 estados da federação e 55 municípios (Anexo B).

4.4 Discussão

A VB, causada pelo VACV, é endêmica em várias regiões rurais brasileiras e caracteriza como uma doença ocupacional, pois afeta principalmente o gado leiteiro e seus ordenhadores. Além disso, casos de infeção familiar já foram descritos na literatura, e evidências disso foram demonstradas no capítulo 1. O VACV é considerado um patógeno negligenciado, no Brasil a VB não faz parte da lista de doenças de notificação compulsória do Sistema Único de Saúde (SUS) (MINISTÉRIO DA SAÚDE 2023). Portanto, os casos de infecção por VACV são substancialmente subnotificados, dificultando as análises acerca da epidemiologia dos vírus no Brasil.

O caráter ocupacional da VB é reforçado diversas vezes pelos resultados obtidos neste trabalho, mais de 80% dos pacientes estavam em idade produtiva no momento da coleta, e trinta pessoas (66,67%) declararam a associação da infecção por OPXV ao ambiente de trabalho. Aproximadamente 70% dos indivíduos são do sexo masculino, o que era esperado, já que maior parte dos produtores rurais são homens, portanto, indivíduos do sexo masculino são mais expostos a infeções pelo VACV (IBGE 2017). Mais de 70% dos participantes residem em áreas rurais, em que boa parte estão inseridas em regiões de grande desenvolvimento de pecuária leiteira (OVIEDO-PASTRANA et al., 2014)

A principal via de transmissão do VACV em humanos é pelo contato direto das pessoas com animais infectados, comumente pelo contato das mãos dos ordenhadores nas lesões dos tetos e úberes das vacas durante o processo da ordenha manual (LEITE et al., 2005; TRINDADE et al., 2009; FONSECA et al., 2011; KROON et al., 2011). Dos 18 participantes que responderam à pesquisa sobre contato com animais, todos declararam ter tido contato direto com bovinos, reforçando o papel fundamental desses animais na cadeia de transmissão. Nessas regiões deveríamos ter maior vigilância e disseminação do conhecimento, principalmente em regiões com alto desenvolvimento de pecuária leiteira (BORGES et al., 2017). Em adição, é importante destacar que treze pessoas (81,25%) declaram contato com animais doméstico e uma pessoa (6,25%) declarou contato com roedores, o que pode sinalizar para outras potenciais vias de infecção do VACV, já que o vírus vêm sendo cada vez mais detectados em diferentes animais no Brasil (OLIVEIRA et al., 2017; LIMA et al., 2019). Diversos estudos já demonstraram a circulação de VACV em animais domésticos, como cães, gatos e porcos, através de evidências sorológicas e moleculares, porém, nenhum relato de desenvolvimento de lesões características de infecção por OPXV foi observado nesses animais (PERES et al., 2013, 2016; COSTA et al., 2017; BORGES et al., 2018). A atuação desses animais no ciclo

epidemiológico de VACV no Brasil não é totalmente compreendida, porém, o contato com animais domésticos é um fator de exposição a ser considerado. Importante destacar a importância dos gatos domésticos na transmissão do CPXV na Europa (VOROU et al., 2008; BECKER et al., 2009; KIERNAN et al., 2021). Outro fator de exposição a ser considerado é o contato com os roedores, esses demonstram grande potencial no ciclo epidemiológico do VACV no Brasil, em que a circulação do vírus já foi detectada em diversos gêneros e espécies de roedores. Esse grupo de animais é extremamente diverso, amplamente distribuído em todo o país, e podem atuar como potenciais hospedeiros e reservatórios de diversas zoonoses e transportá-las entre os ambientes silvestre, rural e urbano (ABRAHÃO et al., 2009b).

Vinte e três pacientes (31,5%), no momento da coleta, possuíam idade suficiente para o recebimento da vacina contra a varíola, que aconteceu até 1975 no país, contudo, a garantia do recebimento da vacina não pode ser inferida, a presença da marca vacinal ou a autodeclaração de vacinação não fazem parte dos dados analisados. Este recorte populacional demonstra que a maior parte da população que trabalha ou vive em áreas de risco à infecção pelo VACV está suscetível a infecções por OPXV. No contexto atual, também é importante destacar que na pandemia atual de MPXV, o Brasil é o segundo país com o maior número de infecções, com mais de dez mil casos confirmados (CDC 2023; WHO 2023). Isso alerta para um risco do estabelecimento do MPXV como uma zoonose endêmica do país, já que o Brasil apresenta diversidade biológica e características climáticas correspondentes às das florestas tropicais africanas em que o MPXV é naturalmente endêmico (CURAUDEAU et al., 2023). Portanto, diante da possibilidade de duas espécies de OPXV terem seus nichos ecológicos sobrepostos. É importante que trabalhos e estudos destinados à vigilância epidemiológica de OPXV sejam devidamente financiados e executados, para que os impactos do possível estabelecimento do MPXV no Brasil sejam minimizados.

A VB é uma doença zoonótica e emergente causada pelo VACV. Em humanos e bovinos, o curso clínico da doença é caracterizado pelo aparecimento de lesões ulcerativas na pele e mucosas (FONSECA et al., 2011; KROON et al., 2011). As lesões são normalmente encontradas no local primário da infecção, principalmente não mãos e braços de ordenhadores, todavia, casos de infecção em regiões não características já foram descritos. Em humanos imunocompetentes, a evolução da doença é benigna e tem curso aproximado de 21 dias, acompanhada de diversos sintomas sistêmicos similares aos da gripe comum, como febre e mialgia durante o quadro infeccioso. Apesar da evolução benigna da doença, a VB causa uma alta morbidade, o que propicia a propagação do vírus através do contato direto entre pessoas, principalmente entre familiares, gerando quadros de infecções em outros indivíduos. Sinaliza-

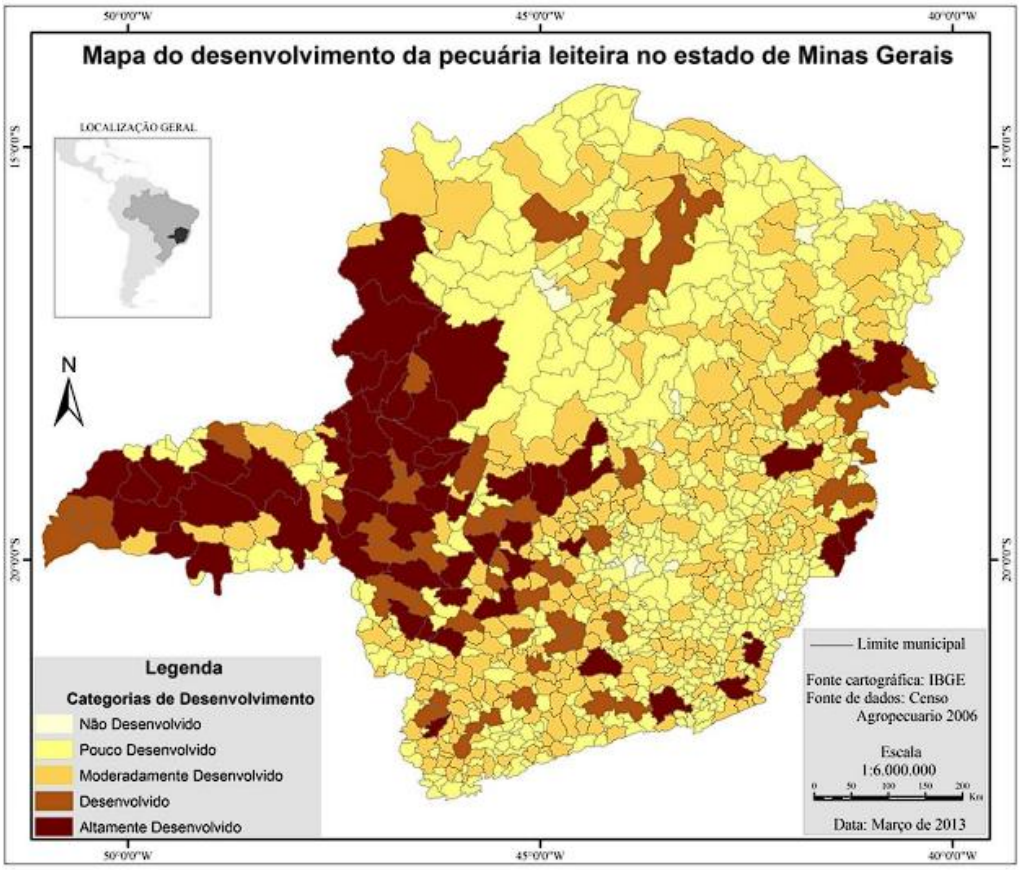
se para o risco de infecção familiares que podem resultar em complicações graves em pessoas imunocomprometidas (LAITON-DONATO et al., 2020).

O conhecimento da população em geral, acerca dos OPXV e das doenças relacionadas é bastante escasso, pouca ou nenhuma informação acerca do agente causador e formas de transmissão da VB. Diversos profissionais de saúde que trabalham em áreas endêmicas para o VACV não possuem os conhecimentos necessários acerca da VB para a realização do manejo correto dos pacientes (OLIVEIRA et al., 2017; DOMINGOS et al., 2020). Os sintomas e sinais clínicos causados pelo VACV são bastante similares aos de outras doenças causadoras de lesões cutâneas, como febre aftosa, em bovinos. A combinação da falta de conhecimento generalizado acerca da VB e a não especificidade de diversos sinais clínicos, impossibilita a realização de um diagnóstico clínico preciso, sendo necessária a confirmação laboratorial da infecção. A partir disso, é possível inferir que a falta de investimento e capacitação de profissionais gera uma grande perda na obtenção de conhecimento acerca do ciclo epidemiológico do VACV e possíveis aplicações no manejo clínico.

A partir do final da década de 1990, diversos surtos de doença exantemática, afetando bovinos e humanos vem sendo descritos e associados à infecção pelo VACV. Durante as últimas décadas, a circulação do VACV foi descrita em todas as regiões do Brasil, em que a região sudeste se caracteriza como o epicentro dos surtos de VB, sendo Minas Gerais o estado mais afetado (OLIVEIRA et al., 2017). Isso se deve ao fato de que a região sudeste apresenta números expressivos na pecuária do Brasil, sendo o seu rebanho bovino o terceiro maior do país. Além disso, Minas Gerais se destaca por conter o maior rebanho leiteiro do País, com 3,1 milhões de cabeças, produzindo cerca de 30% da produção brasileira total (IBGE, 2022).

Com o aumento expressivo de casos e surtos causados pelo VACV em todo o país, muito trabalhos que detectam a circulação de OPXV no Brasil foram produzidos por diversos grupos de pesquisa, durante as últimas duas décadas, além das notificações de casos e surtos, coletados pelos órgãos competentes de saúde em cada unidade da federação. A compilação dos dados realizados neste trabalho, demonstra a evolução do número de casos e municípios afetados pela VB, em que, observa-se uma clara sobreposição das áreas de circulação do VACV apresentadas neste trabalho, com as maiores bacias leiteiras do estado de Minas Gerais (Figura 25) (OVIEDO-PASTRANA et al., 2014). Destacam-se as regiões do Triângulo Mineiro, Central, Oeste, Zona da Mata, Vale do Rio Doce e Vale do Mucuri como as mais afetadas pelo OPXV.

Figura 25 — Mapa do desenvolvimento da pecuária leiteira no estado de Minas Gerais



Mapa do estado de Minas gerais indicando os municípios pela categoria de desenvolvimento da pecuária leiteira. Fonte: Oviedo-Pastrana et al., 2014.

O diagnóstico conclusivo de infecções por OPXV em geral, só é possível através da utilização de métodos laboratoriais, de detecção direta ou indireta. A realização de diagnóstico clínico é altamente imprecisa, vale salientar que para a construção do banco de dados das áreas de circulação do VACV no estado, foram utilizados dados cedidos pela SES, em que a informação acerca do diagnóstico era descrita como "diagnóstico clínico para varíola bovina", isso salienta para uma possível inconsistência dos dados apresentados. Apesar disso, como descrito anteriormente, as regiões afetadas são altamente sobreponíveis às regiões produtoras de leite do estado, o que faz total sentido, já que a VB afeta principalmente os leiteiros e seus tratadores.

Mediante a necessidade da ampliação dos estudos acerca da ecologia, epidemiologia e outros aspectos a respeito das OPXV no Brasil, destaca-se a atuação do LV, em que diversas vezes contribuiu com o diagnóstico e caracterização de OPXV em diversas regiões do Brasil, através de parcerias com instituições públicas de saúde e de pesquisa nacionais e internacionais, assim, se apresenta como um laboratório de referência de estudos de OPXV no país, e salienta a necessidade da ampliação das parcerias do setor público ligados à saúde em realizar o

intercâmbio de informações e pesquisas com as instituições públicas de pesquisa ligados à vigilância de zoonoses emergentes.

5. CONCLUSÕES

1. Pela Técnica de PRNT, foram detectadas evidências de circulação de VACV em dezesseis pacientes humanos residentes em quatro municípios de Minas Gerais, em que três desses (Joanésia, Papagaios e Salto da Divisa) não haviam evidências de detecção de OPXV anteriormente.
2. Foram isoladas cinco novas amostras de VACV circulantes em humanos de quatro municípios de Minas Gerais, em que três desses (Araçuaí, Joanésia e Teófilo Otoni) não haviam evidências de detecção ou isolamento de OPXV anteriormente. A caracterização molecular do gene A56R indica o isolamento de 5 amostras de VACV-BR pertencentes ao grupo I, suportadas pelo fenótipo de placa característico dos vírus desse grupo.
3. Os resultados referentes aos fatores de risco associados às infecções por OPXV, reforçaram o caráter ocupacional da VB. Demonstrando que pessoas residentes de áreas rurais que trabalham diretamente com bovinos apresentam maior risco de exposição ao VACV. O Trabalho também indica evidências de possíveis infecções familiares. Pouco sobre o perfil clínico real de infecções por VACV em humanos pôde ser determinado.
4. A compilação dos dados de circulação de OPXV em Minas Gerais reforça o estado como epicentro da ocorrência de surtos e infecções de VB no país, demonstrando a evolução da detecção e distribuição ao longo das últimas décadas. Destaca-se a maior ocorrência dos casos em regiões sobrepostas às bacias leiteiras do estado, reforçando novamente o caráter ocupacional da doença.
5. Foi demonstrado a capacidade e competência de diagnóstico e contribuição em análises de vigilância epidemiológica de OPXV no Brasil realizados pelo LV, reforçando a importância da associação dos órgãos públicos de saúde com laboratórios de referência.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHÃO, Jônatas S.; DE SOUZA TRINDADE, Giliane; FERREIRA, Jaqueline M. Siqueira; *et al*. Long-lasting stability of Vaccinia virus strains in murine feces: implications for virus circulation and environmental maintenance. **Archives of Virology**, v. 154, n. 9, p. 1551–1553, 2009a.

ABRAHÃO, Jônatas S.; GUEDES, Maria Isabel M.; TRINDADE, Giliane S.; *et al*. One More Piece in the VACV Ecological Puzzle: Could Peridomestic Rodents Be the Link between Wildlife and Bovine Vaccinia Outbreaks in Brazil? **PLoS ONE**, v. 4, n. 10, p. e7428, 2009b.

ABRAHÃO, Jônatas S.; OLIVEIRA, Tércia M.L.; CAMPOS, Rafael K.; *et al*. Bovine Vaccinia Outbreaks: Detection and Isolation of Vaccinia Virus in Milk Samples. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 6, n. 9, p. 1141–1146, 2009c.

ABRAHÃO, Jônatas Santos; DRUMOND, Betânia Paiva; DE SOUZA TRINDADE, Giliane; *et al*. Rapid detection ofOrthopoxvirusby semi-nested PCR directly from clinical specimens: A useful alternative for routine laboratories. **Journal of Medical Virology**, v. 82, n. 4, p. 692–699, 2010.

AFONSO, Priscila P.; SILVA, Patrícia M.; SCHNELLRATH, Laila C.; *et al*. Biological Characterization and Next-Generation Genome Sequencing of the Unclassified Cotia Virus SPAn232 (Poxviridae). **Journal of Virology**, v. 86, n. 9, p. 5039–5054, 2012.

ÁGUEDA-PINTO, Ana; LEMOS DE MATOS, Ana; ABRANTES, Mário; *et al*. Genetic Characterization of a Recombinant Myxoma Virus in the Iberian Hare (Lepus granatensis). **Viruses**, v. 11, n. 6, p. 530, 2019.

ASSIS, Felipe L.; ALMEIDA, Gabriel M. F.; OLIVEIRA, Danilo B.; *et al*. Characterization of a New Vaccinia virus Isolate Reveals the C23L Gene as a Putative Genetic Marker for Autochthonous Group 1 Brazilian Vaccinia virus. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, p. e50413, 2012.

BAXBY, D.; SHACKLETON, W. B.; WHEELER, Jean; *et al*. Comparison of cowpox-like viruses isolated from European zoos. **Archives of Virology**, v. 61, n. 4, p. 337–340, 1979.

BECKER, Christian; KURTH, Andreas; HESSLER, Frank; *et al*. Cowpox Virus Infection in Pet Rat Owners. **Deutsches Ärzteblatt international**, 2009.

BENGALI, Zain; SATHESHKUMAR, P.S.; MOSS, Bernard. Orthopoxvirus species and strain differences in cell entry. **Virology**, v. 433, n. 2, p. 506–512, 2012.

BORGES, I.A.; MCCOLLUM, A.M.; MEHAL, J.M.; *et al*. Dairy production practices and associated risks for bovine vaccinia exposure in cattle, Brazil. **New Microbes and New Infections**, v. 20, p. 43–50, 2017.

BORGES, Iara A.; REYNOLDS, Mary G.; MCCOLLUM, Andrea M.; *et al*. Serological Evidence of Orthopoxvirus Circulation Among Equids, Southeast Brazil. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 2018.

BROYLES, Steven S. Vaccinia virus transcription. **Journal of General Virology**, v. 84, n. 9, p. 2293–2303, 2003.

BRUM, Mário C S; LEITE DOS ANJOS, Bruno; E. W. NOGUEIRA, Carlos; *et al*. An Outbreak of Orthopoxvirus-Associated Disease in Horses in Southern Brazil. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 22, n. 1, p. 143–147, 2010.

BULLER, R M; PALUMBO, G J. Poxvirus pathogenesis. **Microbiological Reviews**, v. 55, n. 1, p. 80–122, 1991.

CALIXTO, Rafael; OLIVEIRA, Graziele; LIMA, Maurício; *et al*. A Model to Detect Autochthonous Group 1 and 2 Brazilian Vaccinia virus Coinfections: Development of a qPCR Tool for Diagnosis and Pathogenesis Studies. **Viruses**, v. 10, n. 1, p. 15, 2017.

CAMPOS, Rafael K.; BRUM, Mário C. S.; NOGUEIRA, Carlos 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, 2010.

CARSLAKE, David; BENNETT, Malcolm; HAZEL, Sarah; *et al*. Inference of cowpox virus transmission rates between wild rodent host classes using space–time interaction. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 273, n. 1588, p. 775–782, 2005.

CARULEI, Olivia; DOUGLASS, Nicola; WILLIAMSON, Anna-Lise. Comparative analysis of avian poxvirus genomes, including a novel poxvirus from lesser flamingos (Phoenicopterus minor), highlights the lack of conservation of the central region. **BMC Genomics**, v. 18, n. 1, 2017.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **History of Smallpox** . CDC. Disponível em: <https://www.cdc.gov/smallpox/history/history.html>. Acesso em: 1 Feb. 2023.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **History of Smallpox** . CDC. Disponível em: <https://www.cdc.gov/smallpox/history/history.html>. Acesso em: 1 Feb. 2023.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Mpox in the U.S.** Centers for Disease Control and Prevention. Disponível em: <https://www.cdc.gov/poxvirus/mpox/response/2022/world-map.html>. Acesso em: 6 Mar. 2023.

CHANTREY, J.; MEYER, H.; BAXBY, D.; *et al*. Cowpox: reservoir hosts and geographic range. **Epidemiology and Infection**, v. 122, n. 3, p. 455–460, 1999.

COSTA, Galileu B.; BORGES, Iara A.; ALVES, Pedro A.; *et al*. Alternative Routes of Zoonotic Vaccinia Virus Transmission, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 12, p. 2244–2246, 2015.

COSTA, Galileu Barbosa; MIRANDA, Júlia Bahia; ALMEIDA, Gregório Guilherme; *et al*. Detection of Vaccinia Virus in Urban Domestic Cats, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 2, p. 360–362, 2017.

CURAUDEAU, Manon; BESOMBES, Camille; NAKOUNÉ, Emmanuel; *et al*. Identifying the Most Probable Mammal Reservoir Hosts for Monkeypox Virus Based on Ecological Niche Comparisons. **Viruses**, v. 15, n. 3, p. 727, 2023.

CYRKLAFF, Marek; RISCO, Cristina; FERNÁNDEZ, Jose Jesús; *et al*. Cryo-electron tomography of vaccinia virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 8, p. 2772–2777, 2005.

DA FONSECA, Flávio G.; TRINDADE, Giliane S.; SILVA, Ricardo L. A.; *et al*. Characterization of a vaccinia-like virus isolated in a Brazilian forest. **Journal of General Virology**, v. 83, n. 1, p. 223–228, 2002.

DA FONSECA, Flávio Guimarães; KROON, Erna Geessien; NOGUEIRA, Maurício Lacerda; *et al*. Zoonotic vaccinia virus outbreaks in Brazil. **Future Virology**, v. 6, n. 6, p. 697–707, 2011.

DAMASO, Clarissa R. Revisiting Jenner's mysteries, the role of the Beaugency lymph in the evolutionary path of ancient smallpox vaccines. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 18, n. 2, p. e55–e63, 2018.

DAMASO, Clarissa R.A.; ESPOSITO, Joseph J.; CONDIT, Richard 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.

DAMON, Inger K. Poxviruses. *In*: **Fields Virology**. [s.l.]: Lippincott Williams & Wilkins, 2013, p. 2160–2184.

DE OLIVEIRA, Jaqueline Silva; COSTA, Galileu Barbosa; FRANCO LUIZ, Ana Paula Moreira; *et al*. Cross-sectional study involving healthcare professionals in a Vaccinia virus endemic area. **Vaccine**, v. 35, n. 25, p. 3281–3285, 2017.

DE OLIVEIRA, Jaqueline Silva; COSTA, Galileu Barbosa; FRANCO LUIZ, Ana Paula Moreira; *et al*. Cross-sectional study involving healthcare professionals in a Vaccinia virus endemic area. **Vaccine**, v. 35, n. 25, p. 3281–3285, 2017.

DE OLIVEIRA, Tércia M. Ludoulfo; REHFELD, Izabelle S.; SIQUEIRA, Jaqueline Maria Ferreira; *et al*. Vaccinia Virus Is Not Inactivated After Thermal Treatment and Cheese Production Using Experimentally Contaminated Milk. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 7, n. 12, p. 1491–1496, 2010.

DOMINGOS, Iago José da Silva; SILVA DE OLIVEIRA, Jaqueline; LORENE SOARES ROCHA, Kamila; *et al*. Twenty Years after Bovine Vaccinia in Brazil: Where We Are and Where Are We Going? **Pathogens**, v. 10, n. 4, p. 406, 2021.

DRUMOND, Betânia Paiva; LEITE, Juliana Almeida; DA FONSECA, Flávio Guimarães; *et al*. Brazilian Vaccinia virus strains are genetically divergent and differ from the Lister vaccine strain. **Microbes and Infection**, v. 10, n. 2, p. 185–197, 2008.

DUTRA, Lara Ambrosio Leal; DE FREITAS ALMEIDA, Gabriel Magno; OLIVEIRA, Graziele Pereira; *et al*. Molecular evidence of Orthopoxvirus DNA in capybara (Hydrochoerus hydrochaeris) stool samples. **Archives of Virology**, v. 162, n. 2, p. 439–448, 2016.

ELTOM, Kamal; SAMY, Abdallah; ABD EL WAHED, Ahmed; *et al*. Buffalopox Virus: An Emerging Virus in Livestock and Humans. **Pathogens**, v. 9, n. 9, p. 676, 2020.

ELWOOD, J M. Smallpox and its eradication. **Journal of Epidemiology & Community Health**, v. 43, n. 1, p. 92–92, 1989.

ESPOSITO, J. J.; PALMER, E. L.; BORDEN, E. C.; *et al*. Studies on the Poxvirus Cotia. **Journal of General Virology**, v. 47, n. 1, p. 37–46, 1980.

ESSBAUER, Sandra; PFEFFER, Martin; MEYER, Hermann. Zoonotic poxviruses. **Veterinary Microbiology**, v. 140, n. 3–4, p. 229–236, 2010.

ESTEBAN, David J.; BULLER, R. Mark L. Ectromelia virus: the causative agent of mousepox. **Journal of General Virology**, v. 86, n. 10, p. 2645–2659, 2005.

FENNER, Frank; HENDERSON, Donald A; ARITA, Isao; *et al*. **Smallpox and its eradication / F. Fenner ... [et al.]**. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/39485>.

FERREIRA, Jaqueline Maria Siqueira; DRUMOND, Betânia Paiva; GUEDES, Maria Isabel Maldonado Coelho; *et al*. Virulence in Murine Model Shows the Existence of Two Distinct Populations of Brazilian Vaccinia virus Strains. **PLoS ONE**, v. 3, n. 8, p. e3043, 2008.

FONSECA, F. G.; LANNA, M. C. S.; CAMPOS, M. A. S.; *et al*. Morphological and molecular characterization of the poxvirus BeAn 58058. **Archives of Virology**, v. 143, n. 6, p. 1171–1186, 1998.

FRANCO-LUIZ, Ana Paula Moreira; FAGUNDES-PEREIRA, Alexandre; COSTA, Galileu Barbosa; *et al*. Spread of Vaccinia Virus to Cattle Herds, Argentina, 2011. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, n. 9, p. 1576–1578, 2014.

FRANCO-LUIZ, Ana Paula Moreira; OLIVEIRA, Danilo Bretas; PEREIRA, Alexandre Fagundes; *et al*. Detection of Vaccinia Virus in Dairy Cattle Serum Samples from 2009, Uruguay. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 12, p. 2174–2177, 2016.

GEESSIEN KROON, Erna; SANTOS ABRAHÃO, Jônatas; DE SOUZA TRINDADE, Giliane; *et al*. Natural Vaccinia Virus Infection: Diagnosis, Isolation, and Characterization. **Current Protocols in Microbiology**, v. 42, n. 1, 2016.

GUBSER, Caroline; HUÉ, Stéphane; KELLAM, Paul; *et al*. Poxvirus genomes: a phylogenetic analysis. **Journal of General Virology**, v. 85, n. 1, p. 105–117, 2004.

GÜNTHER, Thomas; HAAS, Ludwig; ALAWI, Malik; *et al*. Recovery of the first full-length genome sequence of a parapoxvirus directly from a clinical sample. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 2017.

HEMMER, Christoph J.; LITTMANN, Martina; LÖBERMANN, Micha; *et al*. Human cowpox virus infection acquired from a circus elephant in Germany. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 14, p. e338–e340, 2010.

HENDERSON, D. A. **Smallpox: the Death of a Disease: The Inside Story of Eradicating a Worldwide Killer**. [s.l.]: Prometheus Books, 2021.

HOCHMAN, Gilberto. Priority, Invisibility and Eradication: The History of Smallpox and the Brazilian Public Health Agenda. **Medical History**, v. 53, n. 2, p. 229–252, 2009.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Censo Agro 2017**. IBGE - Censo Agro 2017. Disponível em: <https://censoagro2017.ibge.gov.br/templates/censo_agro/resultadosagro/produtores.html>. Acesso em: 30 Mar. 2023.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **IBGE - Produção da pecuária municipal**. Produção da pecuária municipal. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/index.php/biblioteca-catalogo?view=detalhes&id=784>. Acesso em: 30 Mar. 2023.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES (ICTV). **Current ICTV Taxonomy Release**. ICTV. Disponível em: <https://ictv.global/taxonomy>. Acesso em: 30 Jan. 2023.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES (ICTV). **Poxviridae**. ICTV. Disponível em: <https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/dsdna-viruses-2011/w/dsdna_viruses/74/poxviridae>. Acesso em: 26 Jan. 2023.

JACOBS, Bertram L.; LANGLAND, Jeffrey O.; KIBLER, Karen V.; *et al*. Vaccinia virus vaccines: Past, present and future. **Antiviral Research**, v. 84, n. 1, p. 1–13, 2009.

JOKLIK, W.K. The purification of four strains of poxvirus. **Virology**, v. 18, n. 1, p. 9–18, 1962.
KIERNAN, Miles; KOUTROUMANOS, Nikolaos. Orbital Cowpox. **New England Journal of Medicine**, v. 384, n. 23, p. 2241–2241, 2021.

KROON, Erna Geessien; MOTA, Bruno Eduardo F.; ABRAHÃO, Jônatas Santos; *et al*. Zoonotic Brazilian Vaccinia virus: From field to therapy. **Antiviral Research**, v. 92, n. 2, p. 150–163, 2011.

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

LAITON-DONATO, Katherine; ÁVILA-ROBAYO, Paola; PÁEZ-MARTINEZ, Andrés; *et al*. Progressive Vaccinia Acquired through Zoonotic Transmission in a Patient with HIV/AIDS, Colombia. **Emerging Infectious Diseases**, v. 26, n. 3, p. 601–605, 2020.

LEITE, Juliana A.; DRUMOND, Betânia P.; TRINDADE, Giliane S.; *et al*. Passatempo Virus, a Vaccinia Virus Strain, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 12, p. 1935–1941, 2005.

LEITE, Juliana Almeida; DRUMOND, Betânia Paiva; DE SOUZA TRINDADE, Giliane; *et al*. Brazilian Vaccinia virus strains show genetic polymorphism at the ati gene. **Virus Genes**, v. 35, n. 3, p. 531–539, 2007.

LIMA, Mauricio Teixeira; OLIVEIRA, Graziele Pereira; AFONSO, José Augusto Bastos; *et al*. An Update on the Known Host Range of the Brazilian Vaccinia Virus: An Outbreak in Buffalo Calves. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 2019.

LIMA, Maurício Teixeira; OLIVEIRA, Graziele Pereira; ASSIS, Felipe Lopes; *et al*. Ocular Vaccinia Infection in Dairy Worker, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 24, n. 1, p. 161–162, 2018.

LIU, Liang; COOPER, Tamara; HOWLEY, Paul; *et al*. From Crescent to Mature Virion: Vaccinia Virus Assembly and Maturation. **Viruses**, v. 6, n. 10, p. 3787–3808, 2014.

LOBATO, Z.I.P.; TRINDADE, G.S.; FROIS, M.C.M.; *et al*. Surto de varíola bovina causada pelo vírus Vaccinia na região da Zona da Mata Mineira. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 4, p. 423–429, 2005.

MARTINS DA COSTA, Pedro Starling Pereira; OLIVEIRA, Jaqueline Silva; DA SILVA DOMINGOS, Iago José; *et al*. Circulation of Vaccinia virus in Southern and Southeastern wildlife, Brazil. **Transboundary and Emerging Diseases**, 2020.

MAULDIN, Matthew R; MCCOLLUM, Andrea M; NAKAZAWA, Yoshinori J; *et al*. Exportation of Monkeypox Virus From the African Continent. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 225, n. 8, p. 1367–1376, 2020.

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

MCLYSAGHT, Aoife; BALDI, Pierre F.; GAUT, Brandon S. Extensive gene gain associated with adaptive evolution of poxviruses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 26, p. 15655–15660, 2003.

MEDAGLIA, Maria Luiza G.; MOUSSATCHÉ, Nissin; NITSCHE, Andreas; *et al*. Genomic Analysis, Phenotype, and Virulence of the Historical Brazilian Smallpox Vaccine Strain IOC: Implications for the Origins and Evolutionary Relationships of Vaccinia Virus. **Journal of Virology**, v. 89, n. 23, p. 11909–11925, 2015.

MEDAGLIA, Maria Luiza G.; PESSOA, Leila Cristina G.D.; SALES, Elisabeth R.C.; *et al*. Spread of Cantagalo Virus to Northern Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 7, p. 1142–1144, 2009.

MEGID, Jane; OKUDA, Liria Hiromi; LANGONI, Hélio; *et al*. Vaccinia Virus in Humans and Cattle in Southwest Region of São Paulo State, Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 79, n. 5, p. 647–651, 2008.

MEYER, Hermann; EHMANN, Rosina; SMITH, Geoffrey L. Smallpox in the Post-Eradication Era. **Viruses**, v. 12, n. 2, p. 138, 2020.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Lista Nacional de Notificação Compulsória de Doenças, Agravos e Eventos de Saúde Pública**. Ministério da Saúde. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/composicao/svsa/notificacao-compulsoria/lista-nacional-de-notificacao-compulsoria-de-doencas-agravos-e-eventos-de-saude-publica>. Acesso em: 7 Feb. 2023.

MOORE, Marlyn J.; RATHISH, Balram; ZAHRA, Farah. **Mpox (Monkeypox)**. NCBI Bookshelf. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK574519/>.
MOSS, Bernard. Membrane fusion during poxvirus entry. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 60, p. 89–96, 2016.

MOSS, Bernard. Poxviridae. *In*: **Fields Virology**. [s.l.]: Lippincott Williams & Wilkins, 2013, p. 2129–2159.

MOSS, Bernard. Poxvirus entry and membrane fusion. **Virology**, v. 344, n. 1, p. 48–54, 2006.
NEWMAN, Frances K.; FREY, Sharon E.; BLEVINS, Tamara 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. 3154–3157, 2003.

OLIVEIRA, Danilo Bretas; ABRAHÃO, Jônatas Santos; BONJARDIM, Cláudio Antônio; *et al*. Group 1 Vaccinia virus Zoonotic Outbreak in Maranhão State, Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 89, n. 6, p. 1142–1145, 2013.

OLIVEIRA, Graziele; ASSIS, Felipe; ALMEIDA, Gabriel; *et al*. From Lesions to Viral Clones: Biological and Molecular Diversity amongst Autochthonous Brazilian Vaccinia Virus. **Viruses**, v. 7, n. 3, p. 1218–1237, 2015.

OLIVEIRA, Jaqueline; FIGUEIREDO, Poliana; COSTA, Galileu; *et al*. Vaccinia Virus Natural Infections in Brazil: The Good, the Bad, and the Ugly. **Viruses**, v. 9, n. 11, p. 340, 2017.

OVIEDO-PASTRANA, M.E.; MOURA, A.C.M.; SOCARRÁS, T.J.O.; *et al*. Mapa do desenvolvimento da pecuária leiteira no estado de Minas Gerais, Brasil: nova abordagem na pecuária para integração espacial de variáveis produtivas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 4, p. 1147–1154, 2014.

PELKONEN, Paula M.; TARVAINEN, Kyllikki; HYNNINEN, Arja; *et al*. Cowpox with Severe Generalized Eruption, Finland. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 11, p. 1458–1461, 2003.

PERES, Marina G.; BARROS, Claudenice B.; APPOLINÁRIO, Camila M.; *et al*. Dogs and Opossums Positive for Vaccinia Virus during Outbreak Affecting Cattle and Humans, São Paulo State, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 2, p. 271–273, 2016.

PERES, Marina Gea; BACCHIEGA, Thais Silva; APPOLINÁRIO, Camila Michele; *et al*. Serological study of vaccinia virus reservoirs in areas with and without official reports of outbreaks in cattle and humans in São Paulo, Brazil. **Archives of Virology**, v. 158, n. 12, p. 2433–2441, 2013.

PETERSEN, Brett W.; KABAMBA, Joelle; MCCOLLUM, Andrea M.; *et al*. Vaccinating against monkeypox in the Democratic Republic of the Congo. **Antiviral Research**, v. 162, p. 171–177, 2019.

PETERSEN, Eskild; KANTELE, Anu; KOOPMANS, Marion; *et al*. Human Monkeypox. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 33, n. 4, p. 1027–1043, 2019.

REHFELD, Izabelle S.; FRAIHA, Ana Luiza S.; MATOS, Ana Carolina D.; *et al*. Short communication: Survival of Vaccinia virus in inoculated cheeses during 60-day ripening. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 9, p. 7051–7054, 2017.

REHFELD, Izabelle Silva; GUEDES, Maria Isabel Maldonado Coelho; FRAIHA, Ana Luiza Soares; *et al*. Vaccinia virus Transmission through Experimentally Contaminated Milk Using a Murine Model. **PLOS ONE**, v. 10, n. 5, p. e0127350, 2015.

REYNOLDS, Mary G; GUAGLIARDO, Sarah Anne J; NAKAZAWA, Yoshinori J; *et al*. Understanding orthopoxvirus host range and evolution: from the enigmatic to the usual suspects. **Current Opinion in Virology**, v. 28, p. 108–115, 2018.

RIVETTI, Anselmo V., Jr.; GUEDES, Maria Isabel M.C.; REHFELD, Izabelle S.; *et al*. Bovine vaccinia, a systemic infection: Evidence of fecal shedding, viremia and detection in lymphoid organs. **Veterinary Microbiology**, v. 162, n. 1, p. 103–111, 2013.

ROBERTS, Kim L.; SMITH, Geoffrey L. Vaccinia virus morphogenesis and dissemination. **Trends in Microbiology**, v. 16, n. 10, p. 472–479, 2008.

SARKER, Subir; ISBERG, Sally R.; MILIC, Natalie L.; *et al*. Molecular characterization of the first saltwater crocodilepox virus genome sequences from the world's largest living member of the Crocodylia. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 2018.

SCARFF, David. Cowpox (orthopox virus) in the cat. **Companion Animal**, v. 17, n. 4, p. 36–38, 2012.

SCHATZMAYR, Hermann G.; COSTA, Renata Vitória Campos; GONÇALVES, Márcia Cristina Rosa; *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. 672–676, 2009.

SCHMIDT, Florian Ingo; BLECK, Christopher Karl Ernst; MERCER, Jason. Poxvirus host cell entry. **Current Opinion in Virology**, v. 2, n. 1, p. 20–27, 2012.

SHCHELKUNOV, Sergei N. An Increasing Danger of Zoonotic Orthopoxvirus Infections. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 12, p. e1003756, 2013.

SHCHELKUNOVA, Galina A.; SHCHELKUNOV, Sergei N. Smallpox, Monkeypox and Other Human Orthopoxvirus Infections. **Viruses**, v. 15, n. 1, p. 103, 2022.

SILVA, Natalia Ingrid Oliveira; DE OLIVEIRA, Jaqueline Silva; KROON, Erna Geessien; *et al*. Here, There, and Everywhere: The Wide Host Range and Geographic Distribution of Zoonotic Orthopoxviruses. **Viruses**, v. 13, n. 1, p. 43, 2020.

SILVA-FERNANDES, André Tavares; TRAVASSOS, Carlos Eurico Pires Ferreira; FERREIRA, Jaqueline Maria Siqueira; *et al*. Natural human infections with Vaccinia virus during bovine vaccinia outbreaks. **Journal of Clinical Virology**, v. 44, n. 4, p. 308–313, 2009.

SIMPÓSIO SOBRE A BIOTA AMAZÔNICA BELÉM); LENT, Herman. **Atas do simpósio sobre a biota amazônica Belém, Pará, Brasil, Junho 6-11, 1966** . Rio de Janeiro: Conselho Nacional de Pesquisas (CNPQ), 1967. Disponível em: <https://www.biodiversitylibrary.org/item/194233>.

SKLENOVSKÁ, Nikola; VAN RANST, Marc. Emergence of Monkeypox as the Most Important Orthopoxvirus Infection in Humans. **Frontiers in Public Health**, v. 6, 2018.
SMITH, Geoffrey L.; MCFADDEN, Grant. Smallpox: anything to declare? **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 7, p. 521–527, 2002.

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

STAGEGAARD, Julia; KURTH, Andreas; STERN, Daniel; *et al*. Seasonal recurrence of cowpox virus outbreaks in captive cheetahs (Acinonyx jubatus). **PLOS ONE**, v. 12, n. 11, p. e0187089, 2017.

STANFORD, Marianne M; MCFADDEN, Grant; KARUPIAH, Gunasegaran; *et al*. Immunopathogenesis of poxvirus infections: forecasting the impending storm. **Immunology & Cell Biology**, v. 85, n. 2, p. 93–102, 2007.

THÈVES, Catherine; CRUBÉZY, Eric; BIAGINI, Philippe. History of Smallpox and Its Spread in Human Populations. **Microbiology Spectrum**, v. 4, n. 4, 2016.

TRINDADE, Giliane de Souza. Zoonotic Vaccinia Virus Infection in Brazil: Clinical Description and Implications for Health Professionals. **Journal of Clinical Microbiology**, 2007.

TRINDADE, Giliane de Souza; GUIMARÃES DA FONSECA, Flávio; MARQUES, João Trindade; *et al*. Araçatuba Virus: A Vaccinialike Virus Associated with Infection in Humans and Cattle. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 2, p. 155–160, 2003.

TRINDADE, Giliane de Souza; LI, Yu; OLSON, Victoria 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, Giliane; EMERSON, Ginny; SAMMONS, Scott; *et al*. Serro 2 Virus Highlights the Fundamental Genomic and Biological Features of a Natural Vaccinia Virus Infecting Humans. **Viruses**, v. 8, n. 12, p. 328, 2016.

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

TRINDADE, Giliane S.; DA FONSECA, Flávio G.; MARQUES, João 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. 2015–2021, 2004.

TRINDADE, Giliane S.; EMERSON, Ginny L.; CARROLL, Darin S.; *et al*. Brazilian Vaccinia Viruses and Their Origins. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 7, p. 965–972, 2007.

TRINDADE, Giliane S.; GUEDES, Maria I. C.; DRUMOND, Betânia P.; *et al*. Zoonotic Vaccinia Virus: Clinical and Immunological Characteristics in a Naturally Infected Patient. **Clinical Infectious Diseases**, v. 48, n. 3, p. e37–e40, 2009.

TU, Shin-Lin; NAKAZAWA, Yoshinori; GAO, Jinxin; *et al*. Characterization of Eptesipoxvirus, a novel poxvirus from a microchiropteran bat. **Virus Genes**, v. 53, n. 6, p. 856–867, 2017.

UEDA, Yoshiaki; MORIKAWA, Shigeru; WATANABE, Takahiro. Unclassified Poxvirus: Characterization and Physical Mapping of Cotia Virus DNA and Location of a Sequence Capable of Encoding a Thymidine Kinase. **Virology**, v. 210, n. 1, p. 67–72, 1995.

USME-CIRO, Jose A.; PAREDES, Andrea; WALTEROS, Diana M.; *et al*. Detection and Molecular Characterization of Zoonotic Poxviruses Circulating in the Amazon Region of Colombia, 2014. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 4, p. 649–653, 2017.

VOROU, Rengina M; PAPAVASSILIOU, Vassilios G; PIERROUTSAKOS, Ioannis N. Cowpox virus infection: an emerging health threat. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 21, n. 2, p. 153–156, 2008.

WOODAL, John P; SIMPÓSIO SOBRE A BIOTA AMAZÔNICA BELÉM). **Atas do simpósio sobre a biota amazônica Belém, Pará, Brasil, Junho 6-11, 1966** . [s.l.]: Rio de Janeiro Conselho Nacional de Pesquisas (CNPQ) 1967, 1967. Disponível em: <https://www.biodiversitylibrary.org/item/194233>. Acesso em: 28 Feb. 2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **2022 Mpox (Monkeypox) Outbreak: Global Trends**. Disponível em: <https://worldhealthorg.shinyapps.io/mpx_global/>. Acesso em: 1 Feb. 2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **2022-23 Mpox (Monkeypox) Outbreak: Global Trends**. Disponível em: <https://worldhealthorg.shinyapps.io/mpx_global/>. Acesso em: 6 Mar. 2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **History of smallpox vaccination**. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/spotlight/history-of-vaccination/history-of-smallpox-vaccination>. Acesso em: 27 Feb. 2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **ICD-10 Version:2019**. Disponível em: <https://icd.who.int/browse10/2019/en#/B08.0>. Acesso em: 6 Feb. 2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Mpox (monkeypox) outbreak 2022**. Global. Disponível em: <https://www.who.int/emergencies/situations/monkeypox-oubreak-2022>. Acesso em: 6 Mar. 2023.

YANG, Zhilong; REYNOLDS, Sara E.; MARTENS, Craig 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.

7 ANEXOS

7.1 Anexo A

Município	Ano	Fonte
Muriaé	2000	TRINDADE et al., 2007
Astolfo Dutra	2001	SES
Guarani	2001	TRINDADE et al., 2006
Piau	2001	SES
Piau	2001	SES
Tabuleiro	2001	SES
Passatempo	2003	LEITE et al., 2005
Bambuí	2005	IMA
Bambuí	2005	IMA
Bambuí	2005	IMA
Bambuí	2005	ABRAHÃO et al., 2009
Iguatama	2005	IMA
Jequeri	2005	IMA
Juiz de Fora	2005	IMA
Manhumirim	2005	IMA
Mariana	2005	IMA
Mariana	2005	ABRAHÃO et al., 2009
Medeiros	2005	IMA
Mercês	2005	IMA
Nova Era	2005	IMA
Nova Era	2005	IMA
Paraguaçu	2005	ABRAHÃO et al., 2009
Patrocínio do Muriaé	2005	IMA
Resplendor	2005	ASIS et al., 2012
Rio Pomba	2005	IMA
Sabinópolis	2005	IMA
Santo Antônio do Itambé	2005	IMA

Santo Antônio do Itambé	2005	IMA
Santo Antônio do Itambé	2005	IMA
Serro	2005	IMA
Serro	2005	IMA
Serro	2005	IMA
Serro	2005	TRINDADE et al., 2016
Acaiaca	2006	IMA
Antônio Prado de Minas	2006	IMA
Bambuí	2006	IMA
Bambuí	2006	IMA
Carlos Chagas	2006	IMA
Conceição do Mato Dentro	2006	IMA
Córrego Danta	2006	IMA
Córrego Danta	2006	IMA
Dom Silvério	2006	IMA
Guaraciaba	2006	IMA
Iguatama	2006	IMA
Iguatama	2006	IMA
Iguatama	2006	IMA
Itambacuri	2006	IMA
Itapagipe	2006	IMA
Jequeri	2006	IMA
Malacacheta	2006	IMA
Mariana	2006	IMA
Mariana	2006	IMA
Mariana	2006	IMA
Mariana	2006	IMA
Mariana	2006	IMA
Mariana	2006	IMA
Mariana	2006	IMA
Martins Soares	2006	IMA

Medeiros	2006	IMA
Medeiros	2006	IMA
Medeiros	2006	IMA
Mercês	2006	IMA
Pratinha	2006	IMA
Rio Vermelho	2006	IMA
Santo Antônio do Itambé	2006	IMA
São João Evangelista	2006	IMA
Serro	2006	IMA
Tiros	2006	IMA
Formiga	2007	IMA
Itajubá	2007	SILVA et al., 2008
Itamarandiba	2007	IMA
Mariana	2007	IMA
Nanuque	2007	IMA
Paulistas	2007	IMA
Pimenta	2007	IMA
Piranguçu	2007	IMA
Sabinópolis	2007	IMA
Wenceslau Braz	2007	IMA
Wenceslau Braz	2007	IMA
Além Paraíba	2008	SES
Argirita	2008	SES
Argirita	2008	SES
Argirita	2008	SES
Argirita	2008	SES
Argirita	2008	SES
Argirita	2008	SES
Argirita	2008	SES
Argirita	2008	IMA
Argirita	2008	IMA

Carlos Chagas	2008	IMA
Coromandel	2008	IMA
Estrela do Sul	2008	IMA
Gonçalves	2008	IMA
Luislândia	2008	IMA
Mariana	2008	ABRAHÃO et al., 2009
Monte Carmelo	2008	IMA
Paraguaçu	2008	IMA
Paraguaçu	2008	IMA
Paraisópolis	2008	IMA
Porteirinha	2008	IMA
Pratinha	2008	IMA
Recreio	2008	SES
Sapucaí-Mirim	2008	IMA
Sapucaí-Mirim	2008	IMA
Serro	2008	SES
Serro	2008	SES
Serro	2008	IMA
Andradas	2009	IMA
Andradas	2009	IMA
Areado	2009	IMA
Areado	2009	IMA
Areado	2009	IMA
Areado	2009	IMA
Argirita	2009	SES
Argirita	2009	SES
Argirita	2009	SES
Carmo do Paranaíba	2009	IMA
Conquista	2009	IMA
Doresópolis	2009	IMA
Doresópolis	2009	IMA

Doresópolis	2009	IMA
Doresópolis	2009	IMA
Doresópolis	2009	IMA
Grupiara	2009	IMA
João Pinheiro	2009	IMA
João Pinheiro	2009	IMA
Lagoa Formosa	2009	IMA
Matias Barbosa	2009	IMA
Paraisópolis	2009	IMA
Passos	2009	IMA
Patos de Minas	2009	IMA
Piumhi	2009	IMA
Sabinópolis	2009	IMA
Santa Rita de Jacutinga	2009	SES
Serra dos Aimorés	2009	IMA
Tapira	2009	IMA
Tapira	2009	IMA
Tiros	2009	IMA
Abadia dos Dourados	2010	IMA
Bandeira	2010	SES
Caranaíba	2010	IMA
Carangola	2010	BORGES et al., 2017
Carmo do Paranaíba	2010	IMA
Curvelo	2010	BORGES et al., 2017
Desterro do Melo	2010	IMA
Doresópolis	2010	ABRAHÃO et al., 2015
Felício dos Santos	2010	IMA
Frutal	2010	IMA
Ibiá	2010	IMA
Ibiá	2010	IMA
Itamarandiba	2010	IMA

Itapagipe	2010	SES
Itapagipe	2010	IMA
Jordânia	2010	SES
Jordânia	2010	SES
Lagoa Formosa	2010	IMA
Luz	2010	IMA
Luz	2010	IMA
Luz	2010	IMA
Luz	2010	IMA
Materlândia	2010	IMA
Medeiros	2010	IMA
Monte Carmelo	2010	IMA
Patos de Minas	2010	IMA
Patos de Minas	2010	IMA
Patos de Minas	2010	IMA
Patrocínio	2010	IMA
Pedrinópolis	2010	SES
Pedrinópolis	2010	SES
Pedrinópolis	2010	SES
Pedrinópolis	2010	SES
Pedrinópolis	2010	SES
Pedrinópolis	2010	SES
Pedrinópolis	2010	SES
Pedrinópolis	2010	IMA
Rio Doce	2010	IMA
Rio Vermelho	2010	IMA
Sacramento	2010	IMA
Sacramento	2010	IMA
São Geraldo do Baixio	2010	IMA
São Geraldo do Baixio	2010	IMA
São José do Jacuri	2010	IMA

São Roque de Minas	2010	IMA
Serro	2010	BORGES et al., 2017
Tapira	2010	IMA
Tiros	2010	IMA
Tombos	2010	IMA
Uberaba	2010	IMA
Vargem Bonita	2010	IMA
Vargem Bonita	2010	IMA
Vargem Bonita	2010	IMA
Vargem Bonita	2010	IMA
Vargem Bonita	2010	IMA
Vargem Bonita	2010	IMA
Veríssimo	2010	IMA
Veríssimo	2010	IMA
Veríssimo	2010	IMA
Açucena	2011	SES
Açucena	2011	IMA
Almenara	2011	SES
Alvorada de Minas	2011	SES
Areado	2011	IMA
Aricanduva	2011	IMA
Bandeira	2011	SES
Belo Vale	2011	IMA
Bonfim	2011	SES
Bonfim	2011	SES
Bonfim	2011	SES
Bonfim	2011	SES
Bonfim	2011	SES
Brumadinho	2011	IMA
Grão Mogol	2011	IMA
Guapé	2011	IMA

Guarda-mor	2011	IMA
Manhuaçu	2011	IMA
Maravilhas	2011	IMA
Marliéria	2011	IMA
Piedade do Rio Grande	2011	IMA
Prata	2011	IMA
Sabará	2011	MIRANDA et al., 2017
Santa Margarida	2011	IMA
Santana de Pirapama	2011	IMA
São Roque de Minas	2011	IMA
São Roque de Minas	2011	IMA
Serro	2011	SES
Serro	2011	SES
Serro	2011	SES
Serro	2011	SES
Serro	2011	SES
Serro	2011	SES
Serro	2011	SES
Serro	2011	IMA
Serro	2011	IMA
Serro	2011	IMA
Serro	2011	IMA
Serro	2011	ASIS et al., 2012
Serro	2011	REHFELD et al., 2018
Tapira	2011	IMA
Uberaba	2011	IMA
Vargem Bonita	2011	IMA
Belo Horizonte	2012	COSTA et al., 2017
Belo Horizonte	2012	DUTRA et al., 2017
Botelhos	2012	SES
Cabo Verde	2012	SES

Rio Pomba	2012	MIRANDA et al., 2017
Serro	2012	COSTA et al., 2015
Serro	2012	MIRANDA et al., 2017
Veríssimo	2012	SES
Belo Horizonte	2013	COSTA et al., 2018
Conceição da Barra de Minas	2013	SES
Ibertioga	2013	SES
Ibiá	2013	IMA
Mariana	2013	IMA
Santa Luzia	2013	IMA
Bom Jesus do Galho	2014	IMA
Carmésia	2014	IMA
Itaúna	2014	IMA
Pingo-D'água	2014	SES
Santa Rita de Ibitipoca	2014	SES
Santa Rita de Ibitipoca	2014	SES
Santa Rita de Ibitipoca	2014	SES
Santa Rita de Ibitipoca	2014	SES
Santa Rita de Ibitipoca	2014	SES
Santa Rita de Ibitipoca	2014	SES
Santa Rita de Ibitipoca	2014	SES
Santa Rita de Ibitipoca	2014	SES
Santa Rita de Ibitipoca	2014	SES
Santa Rita de Ibitipoca	2014	SES
Santa Rita de Ibitipoca	2014	SES
São Gonçalo do Pará	2014	IMA
São Pedro dos Ferros	2014	IMA
Veríssimo	2014	IMA
Abadia dos Dourados	2015	IMA
Bom Despacho	2015	IMA
Carangola	2015	LIMA et al., 2018

Douradoquara	2015	IMA
Igaratinga	2015	IMA
Ladainha	2015	IMA
Ladainha	2015	IMA
Mariana	2015	IMA
Pedra do Anta	2015	SES
Santa Rita de Minas	2015	SES
São Miguel do Anta	2015	IMA
Vermelho Novo	2015	IMA
Araguari	2016	IMA
Belo Horizonte	2016	SES
Carneirinho	2017	IMA
Carneirinho	2017	IMA
Paracatu	2017	SES
Santa Rita de Jacutinga	2017	IMA
Santa Rita de Minas	2017	SES
Santa Rita de Minas	2017	SES
Santa Rita de Minas	2017	SES
Santa Rita de Minas	2017	SES
Santa Rita de Minas	2017	SES
Santa Rita de Minas	2017	SES
Santa Rita de Minas	2017	SES
Santa Rita de Minas	2017	SES
Santa Rita de Minas	2017	SES
Santa Rita de Minas	2017	SES
Santa Rita de Minas	2017	SES
Francisco Sá	2018	SES
Salto da Divisa	2018	SES
Salto da Divisa	2018	SES
Salto da Divisa	2018	SES
Salto da Divisa	2018	SES

Salto da Divisa	2018	SES
Salto da Divisa	2018	SES
Teófilo Otoni	2018	SES
Teófilo Otoni	2018	SES
Teófilo Otoni	2018	SES
Araçuaí	2019	SES
Conceição da Barra de Minas	2019	SES
Conceição da Barra de Minas	2019	SES
Itamarandiba	2019	SES
Itamarandiba	2019	SES
Iturama	2019	SES
Novo Cruzeiro	2019	SES
Prados	2019	SES
Prados	2019	SES
Coronel Murta	2020	ABREU et al., 2022
Itaipé	2020	SES
Itaipé	2020	SES
União de Minas	2020	SES
Açucena	2021	SES
Joanésia	2021	SES
Joanésia	2021	SES
Joanésia	2021	SES
Joanésia	2021	SES
Joanésia	2021	SES
Joanésia	2021	SES
Joanésia	2021	SES
Joanésia	2021	SES
Joanésia	2021	SES
Joanésia	2021	SES
Joanésia	2021	SES
Juiz de Fora	2021	SES
Papagaios	2021	SES

Papagaios	2021	SES
Papagaios	2021	SES
Papagaios	2021	SES
Uberaba	2021	SES
Unaí	2021	ABREU et al., 2022

7.2 Anexo B

Estado	Ano	Município	Espécie	Amostra	Quantidade	Teste	Positivo	(%)
Bahia	2011	Mundo Novo	Bovino	Soro	31	PCR	17	54,83
				Crosta	6	PCR	1	16,67
				Soro	31	ELISA	24	77,41
					4	PCR	0	0
				Crosta	2	PCR	2	100
			Humano	Soro	1	PCR	0	0
				Raspado	2	PCR	2	100
		Anagé	Bovino	Soro	17	PCR	1	5,88
		Jacobina	Bovino	Soro	21	PCR	12	57,14
				Crosta	3	PCR	2	66,67
		Salvador	Bovino	Soro	9	PCR	4	44,44
				Crosta	7	PCR	3	42,86
				Swab	1	PCR	0	0
		Feira de Santana/ Cópula do Alto Alegre/ Baixa Grande	Bovino	Soro	7	ELISA	6	85,71
						PCR	0	0
				Crosta	6	PCR	2	33,33
				Swab	3	PCR	2	66,67
			Humano	Swab	1	PCR	1	100
		Piritiba/ Serrolândia/ Miguel Calmon/ Várzea do Poço/ Ipirá	Bovino	Soro	23	ELISA	23	100
						PCR	6	26,09
				Swab	9	PCR	9	100
	2012	Salvador	Bovino	Soro	3	ELISA	2	66,67
						PCR	0	0
		Eunápolis	Bovino	Soro	2	ELISA	2	100
						PCR	0	0
				Crosta	1	PCR	1	100

	Ipirá	Bovino	Soro	1	ELISA	1	100
					PCR	0	0
	Ipirá/ Euclides da Cunha	Bovino	Soro	13	ELISA	9	69,23
					PCR	7	53,85
			Crosta	1	PCR	1	100
	Itarantim	Bovino	Soro	4	ELISA	4	100
					PCR	0	0
			Crosta	4	PCR	2	50
	Santa Luz	Bovino	Soro	5	ELISA	5	100
					PCR	0	0
			Crosta	1	PCR	1	100
	Caatiba	Bovino	Soro	6	ELISA	4	66,67
					PCR	0	0
	Pintados	Bovino	Soro	13	ELISA	8	61,54
					PCR	0	0
			Crosta	3	PCR	1	33,33
	Pindobaçu	Bovino	Soro	7	ELISA	5	71,43
					PCR	0	0
	Lagoa Real	Bovino	Soro	9	ELISA	5	55,56
					PCR	0	0
			Crosta	2	PCR	2	100
	Pé de serra/ Eunápolis/ Itapetinga/ Itororó/ Amarjosa	Bovino	Soro	14	PCR	0	0
			Crosta	1	PCR	1	100
	Itambé/ Eunápolis	Bovino	Soro	11	PCR	5	45,45
			Crosta	5	PCR	4	80
		Humano	Soro	2	PCR	0	0
	Itambé	Bovino	Soro	5	PCR	3	60
2013	Caatiba	Bovino	Soro	3	PCR	0	0
	Harentim	Humano	Soro	1	PCR	0	0

				Soro	3	PCR	1	33,33
		Itambé/ Santo Amaro	Bovino	Crosta	1	PCR	1	100
				Líquido Vesicular	1	PCR	0	0
			Equídeo	Soro	9	PCR	9	100
	2014	Itiúba	Humano	Soro	1	PCR	0	0
						PRNT	0	0
	2008	-	Bovino	Soro	10	ELISA	10	100
				Crosta	2	PCR	2	100
	2009	Cachoeira do Itapemirim	Bovino	Soro	15	ELISA	15	100
		Ecoporanga	Bovino	Soro	2	ELISA	2	100
		Baixo Guandu	Bovino	Soro	2	PCR	1	50
				Crosta	1	PCR	1	100
	2010	Cachoeira do Itapemirim	Bovino	Soro	2	PCR	1	50
		Anchieta	Bovino	Soro	3	ELISA	3	100
Espírito Santo						PCR	3	100
		Pinheiros	Bovino	Soro	15	PCR	0	0
		Ecoporanga	Bovino	Soro	4	PCR	0	0
				Crosta	1	PCR	1	100
	2011	São Roque do Canaã	Bovino	Soro	2	ELISA	1	50
						PCR	1	50
		São José do Calçado	Bovino	Soro	2	PCR	0	0
				Crosta	1	PCR	0	0
	2012	Barra São Francisco/ Itaguaçu/ Rio Bananal/ São Gabriel da Palha	Bovino	Soro	6	ELISA	4	66,67
						PCR	1	16,67
				Crosta	6	PCR	6	100
Góias	2011	Vila Propício	Bovino	Soro	12	ELISA	10	83,33
						PCR	3	25

				Crosta	10	PCR	7	70
		Buriti Alegre/ São João da Caraúna	Bovino	Soro	12	PCR	6	50
				Crosta	10	PCR	9	90
		Jataí	Bovino	Soro	5	PCR	3	60
				Crosta	1	PCR	1	100
		Piracanjuba/ Teresina	Bovino	Soro	7	ELISA	6	85,71
						PCR	1	14,29
		Nova Veneza	Bovino	Crosta	4	PCR	0	0
				Crosta	4	PCR	2	50
	2012	Jaupaci/ Fazenda Nova	Bovino	Soro	2	ELISA	2	100
						PCR	0	0
		Jordânia	Bovino	Crosta	2	PCR	0	0
				Soro	5	PCR	0	0
				Crosta	5	PCR	1	20
Maranhão	2009	Açailândia	Bovino	Soro	4	ELISA	4	100
				Crosta	4	PCR	4	100
	2008	Argirita	Bovino	Soro	2	ELISA	0	0
				Líquido Vesicular	2	PCR	1	50
			Humano	Soro	4	ELISA	2	50
				Swab	4	PCR	3	75
Minas Gerais	2009	Lagoa da Prata	Bovino	Soro	1	ELISA	1	100
				Crosta	2	PCR	2	100
	2011	Cantagalo	Humano	Soro	1	PCR	0	0
				Swab	2	PCR	1	50
	2012	Carangola	Bovino	Soro	4	ELISA	0	0
						PCR	2	50
				Swab	6	PCR	3	50
	2015	Carangola	Humano	Sangue	2	PCR	1	50
				Swab	4	PCR	4	100

2017	Paracatu	Humano	Soro	1	PRNT	1	100
2018	Salto da Divisa	Humano	Soro	4	PRNT	3	75
					PCR	0	0
	Teófilo Otoni	Humano	Crosta	3	PCR	3	100
2019	Iturama	Humano	Soro	1	PRNT	1	100
					PCR	0	0
			Crosta	1	PCR	1	100
			Swab	1	PCR	1	100
	Araçuaí	Humano	Crosta	1	PCR	1	100
	Papagaios	Humano	Soro	4	PRNT	4	100
					PCR	4	100
2021	Joanésia	Humano	Soro	9	PRNT	8	88,89
					PCR	0	0
			Pele	1	PCR	1	100
			Secreção	1	PCR	1	100
	Santana do Deserto	Humano	Soro	1	PRNT	1	100