

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Microbiologia

Iago José da Silva Domingos

**INVESTIGAÇÃO DA CIRCULAÇÃO SILENCIOSA DE ORTOPOXVÍRUS: estudo
em pequenos mamíferos em área endêmica para a vaccínia bovina, Minas Gerais, Brasil**

Belo Horizonte

2023

Iago José da Silva Domingos

**INVESTIGAÇÃO DA CIRCULAÇÃO SILENCIOSA DE ORTOPOXVÍRUS: estudo
em pequenos mamíferos em área endêmica para a vaccínia bovina, Minas Gerais, Brasil**

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

Orientadora: Profa. Dra. Giliane de Souza
Trindade

Coorientador: Prof. Dr. Danilo Bretas de
Oliveira

Belo Horizonte

2023

043

Domingos, Iago José da Silva.

Investigação da circulação silenciosa de ortopoxvírus: estudo em pequenos mamíferos em área endêmica para a vaccínia bovina, Minas Gerais, Brasil [manuscrito] / Iago José da Silva Domingos. – 2023.

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

Orientadora: Profa. Dra. Giliane de Souza Trindade. Coorientador: Prof. Dr. Danilo Bretas de Oliveira.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Orthopoxvirus. 3. Vírus Vaccinia. 4. Roedores. 5. Zoonoses. 6. Saúde Pública. 7. Doenças Negligenciadas. 8. Técnicas de Laboratório Clínico. I. Trindade, Giliane de Souza. II. Danilo Bretas de Oliveira. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 579



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: **IAGO JOSÉ DA SILVA DOMINGOS**

Nº REGISTRO: **2021662033**

Às 14:00 horas do dia **19 de abril de 2023**, reuniu-se de forma remota pela plataforma *Microsoft Teams*, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Jordana Graziela Alves Coelho dos Reis (Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG), Maurício Teixeira Lima (Instituto Rene Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Minas Gerais, Brasil e Laboratório Central de Saúde Pública do Estado de Minas Gerais, Fundação Ezequiel Dias, Brasil) e a Profa. Dra. Giliane de Souza Trindade (Orientadora), para julgar o trabalho final **“Investigação da Circulação Silenciosa de Orthopoxvírus: Estudo em Pequenos Mamíferos em Área Endêmica para a Vaccinia Bovina, Minas Gerais, Brasil”**, do aluno **Iago José da Silva Domingos**, 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, 19 de abril de 2023

Membros da banca:

Profa. Dra. Jordana Graziela Alves Coelho dos Reis

Dr. Maurício Teixeira Lima

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 24/04/2023, às 16:58, 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 **Maurício Teixeira Lima, Usuário Externo**, em 24/04/2023, às 22:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jordana Graziela Alves Coelho dos Reis, Membro de comitê**, em 25/04/2023, às 10:05, 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 Glória de Souza, Professora do Magistério Superior**, em 25/04/2023, às 14:30, 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 2176833 e o código CRC 0ECA2C27.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à minha família por todo o apoio durante este processo. Minha mãe Wilma, meus irmãos Rob, Vilmar, Iolanda, Meirinha e Polly, meus sobrinhos Raí, Marinara e Lucas: vocês sempre foram a base mais sólida da minha vida e é por vocês que eu estou aqui. Tem um pedacinho de cada um de vocês aqui comigo. Agradeço, também, à minha gata Mia, que foi o suporte emocional necessário para a conclusão deste trabalho.

Agradeço também aos meus amigos de longa data que, de uma forma ou outra, seguem me apoiando e orgulhosos do caminho que venho traçando. Aline, Vitória, Laura, Marcelle, Mara, Luiza e tantos outros que seguem ao meu lado: ter vocês em minha vida me dá todo gás que eu preciso pra continuar nessa jornada. Seguimos juntos.

Aos professores do Laboratório de Vírus, que coordenam o laboratório de uma forma tão acolhedora. O sucesso do laboratório não seria possível sem isso. Aos colegas de pesquisa no LabVírus, muito obrigado por tornarem o ambiente de trabalho tão prazeroso. Vocês têm carreiras lindas e eu tenho certeza do sucesso na vida de cada um de vocês.

Obrigado ao Matheus, Gabi, Thaís, Victória e Pedro, meus grandes amigos que fiz no laboratório que, mesmo à distância, quando eu estava em Diamantina, me apoiavam incondicionalmente. Eu sou grato demais por trilhar esse caminho ao lado de vocês e levaremos pra vida toda o apoio que temos uns com os outros.

Agradeço ao meu grupo de pesquisa, o EcoVir, que mais parece uma família. Ana Gabi Stoffella, Débora, Karol, Pedro, Iara e Gabriela, vocês são pesquisadores incríveis e estaremos juntos por mais alguns anos fazendo o EcoVir ser o EcoVir. Gostaria agradecer especialmente à Kamila, que esteve comigo durante todo o processo, desde as coletas em campo até a análise dos resultados. Muito obrigado por toda a ajuda, seu suporte foi fundamental.

Muito obrigado à equipe de campo, Natália, Wesley, Jéssica, Lara e Kamila. As expedições no Serro ficarão pra sempre na minha memória. Agradeço também ao meu co-orientador Danilo por todos os ensinamentos enquanto estivemos juntos.

Por fim, agradeço à minha orientadora Giliane que, antes mesmo de perguntar se eu terminei minhas obrigações, pergunta se eu estou feliz com o que estou fazendo. Sua orientação tem aquele toque especial que só uma mãe é capaz de ter.

RESUMO

O *Vaccinia virus* (VACV), pertencente ao gênero *Orthopoxvirus* (OPV), família *Poxviridae*, é a espécie causadora da vaccínia bovina (VB), zoonose viral emergente que afeta principalmente o gado leiteiro e ordenadores no Brasil. Desde os primeiros registros da doença no país, no final do século 20, diversas informações relevantes sobre o vírus foram desvendadas, porém, a forma que o VACV se estabelece no ambiente silvestre ainda é desconhecida. Por outro lado, estudos demonstram uma grande participação de roedores e marsupiais no ciclo epidemiológico desta e outras espécies zoonóticas do gênero. Neste contexto, o presente trabalho investigou a presença de OPV em amostras de pequenos mamíferos, capturados ao longo de quatro expedições em campo realizadas entre fevereiro e setembro de 2021, em fazendas leiteiras produtoras de queijo artesanal no município do Serro, situado em uma área endêmica para casos de infecções por VACV em Minas Gerais, Brasil. Os animais eram capturados, eutanasiados, tinham seus órgãos coletados e eram taxidermizados. Amostras de fígados e soros foram submetidas a extração de DNA viral e posteriormente a testes de qPCR para os genes C11R, A56L e E9L, que podem ser encontrados no genoma de OPV. Além disso, as amostras de soro foram submetidas ao teste de soroneutralização por redução de placa (PRNT) com objetivo de detectar anticorpos neutralizantes para OPV. Dos 210 animais capturados, foi possível coletar 107 amostras de fígado e 142 amostras de soro. Nos testes moleculares, as amostras testadas não apresentaram amplificação dos genes-alvo. Entretanto, 5 das 142 amostras de soro tiveram resultado positivo nos testes sorológicos, demonstrando potencial de neutralização para OPV. As amostras positivas foram coletadas de animais capturados em diferentes fazendas leiteiras, em diferentes ambientes e em diferentes épocas do ano. Além disso, o presente trabalho detecta, pela primeira vez, a presença de anticorpos neutralizantes anti-OPV em amostras de *Marmosops incanus*, uma espécie de marsupial. Os dados observados reforçam a participação de pequenos mamíferos no ciclo silvestre de VACV e discute a expansão do vírus para novas espécies de pequenos mamíferos, entretanto, o animal reservatório permanece desconhecido. Tais observações demonstram a demanda de maiores estudos de vigilância para elaboração de medidas preventivas de surtos de VB e melhor entendimento de como este vírus se mantém no ambiente.

Palavras-chave: ortopoxvírus; vaccínia vírus; vaccínia bovina; roedores; zoonoses; saúde pública; doenças negligenciadas; diagnóstico laboratorial.

ABSTRACT

Vaccinia virus (VACV), belonging to the genus *Orthopoxvirus* (OPV), family *Poxviridae*, is the causative species of bovine vaccinia (BV), an emerging viral zoonosis that mainly affects dairy cattle and milking cattle in Brazil. Since the first records of the disease in the country, at the end of the 20th century, several relevant information about the virus has been revealed, however, the way in which VACV establishes itself in the wild environment is still unknown. On the other hand, studies demonstrate a great participation of rodents and marsupials in the epidemiological cycle of this and other zoonotic species of the genus. In this context, the present work investigated the presence of OPV in samples of small mammals, captured during four field expeditions carried out between February and September 2021, in dairy farms producing artisanal cheese in the municipality of Serro, located in an endemic area for cases of VACV infections in Minas Gerais, Brazil. The animals were captured, euthanized, had their organs collected and taxidermized. Liver and serum samples were submitted to viral DNA extraction and subsequently to qPCR tests for amplification of the C11R, A56L and E9L genes, which can be found in the OPV genome. In addition, serum samples were submitted to the plaque reduction serum neutralization test (PRNT) in order to detect neutralizing antibodies to OPV. Of the 210 captured animals, it was possible to collect 107 liver samples and 142 serum samples. In molecular tests, the tested samples did not show amplification of these genes. However, 5 of the 142 serum samples tested positive in serological tests, demonstrating potential to neutralize OPV. Positive samples were collected from animals captured on different dairy farms, in different environments and at different times of the year. Furthermore, the present work detects, for the first time, the presence of anti-OPV neutralizing antibodies in samples of *Marmosops incanus*, a marsupial species. The observed data reinforce the participation of small mammals in the wild cycle of VACV and discuss the expansion of the virus to new species of small mammals, however, the reservoir animal remains unknown. Such observations demonstrate the demand for further surveillance studies to develop preventive measures for VB outbreaks and a better understanding of how this virus maintains itself in the environment.

Keywords: orthopoxvirus; vaccinia virus; bovine vaccinia; rodents; zoonosis; public health; neglected diseases; laboratory diagnosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Morfologia da partícula de vaccínia vírus.....	18
Figura 2. Representação esquemática do genoma dos poxvírus	19
Figura 3. Representação esquemática do ciclo de multiplicação de vaccínia vírus.	22
Figura 4. Diferentes manifestações clínicas de poxvírus.	23
Figura 5. Estágios evolutivos de infecção por ectromelia vírus.....	25
Figura 6. Ilustração de Edward Jenner vacinando uma criança contra a varíola no século XVIII.	28
Figura 7. Distribuição geográfica do surto de monkeypox vírus	30
Figura 8. Espécies de roedores potencialmente envolvidas no ciclo natural de monkeypox vírus.	31
Figura 9. Espécies de roedores envolvidas no ciclo natural de cowpox vírus na Europa..	33
Figura 10. Lesões nos pés e cauda de um roedor (<i>Apodemus flavicolis</i>) causadas pela infecção por akhmeta vírus.	34
Figura 11. Classificação filogenética de vaccínia vírus baseado no gene A56R.	36
Figura 12. Evolução de quadro de infecção por vaccínia vírus em paciente humano.....	40
Figura 13. Linha do tempo de identificação de hospedeiros para vaccínia vírus no Brasil	42
Figura 14. Rotas hipotéticas e reportadas de transmissão de vaccínia vírus.	45
Figura 15. Determinação dos locais de captura de pequenos mamíferos	53
Figura 16. Transectos e armadilhas para as capturas de pequenos mamíferos.....	54
Figura 17. Alterações de paisagem devido ao clima	67
Figura 18. Pequeno mamífero da espécie <i>Didelphis aurita</i> pós captura.	68

Figura 19. Resultados observados na análise da qPCR para o gene de β -actina murino.	70
Figura 20. Correlação entre animais soropositivos na PRNT e seus locais de captura	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação taxonômica da família <i>Poxviridae</i>	17
Tabela 2. Classificação taxonômica dos ortopoxvírus	26
Tabela 3. Sequência de primers para os genes C11R, A56R e E9L para ortopoxvírus e sequência de primers para β -actina murino	60
Tabela 4. Espécies de pequenos mamíferos capturados	64
Tabela 5. Distribuição de pequenos mamíferos por expedições, fazendas e transectos selecionados.....	66
Tabela 6. Distribuição de amostras de fígados e soros coletados dos pequenos mamíferos	69
Tabela 7. Resultados obtidos nos testes de PCR em tempo real para β -actina murino e genes-alvo de ortopoxvírus do estudo.....	71
Tabela 8. Pequenos mamíferos positivos para os testes sorológicos de PRNT	73

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

°C – Graus Celsius

a.C. – Antes de Cristo

AALAS – American Association for Laboratory Animal Science

AKMV – Akhmeta vírus

CDC – U.S. Centers for Disease Control and Prevention

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

cm – Centímetro(s)

CO₂ – Dióxido de carbono

CPXV – Cowpox vírus

CT – *Cycle Threshold*

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EV – Vírions extracelulares envelopados

HA – Hemaglutinina viral

IACUC – Institutional Animal Care and Use Committee

ICMBio – Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade

IPHAN – Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional

ITR – Repetições terminais invertidas

IV – Vírions imaturos

kg – Quilograma(s)

km – Quilômetro(s)

kpb – Quilolopares de bases

LADIP – Laboratório de Doenças e Infecções Parasitárias

MEM – Meio Essencial Mínimo Eagle

mg – Miligrama(s)

mL – Mililitro

MPXV – Monkeypox vírus

MV – Vírions maduros

NB-2 – Nível de biossegurança 2

Nº – Número(s)

OMS – Organização Mundial da Saúde

OPV – Ortopoxvírus

PBS – Solução tampão fosfato salina

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PFF2 – Peça facial filtrante tipo 2

PFU – Unidades formadoras de placa

pH – Potencial hidrogeniônico

PRNT – Teste de neutralização por redução de placa

rcf – Força centrífuga relativa

RNA – Ácido ribonucleico

SFB – Soro fetal bovino

UFVJM – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri

uL – Microlitro(s)

VACV – Vaccínia vírus

VACV-WR - *Vaccinia virus Western Reserve*

VARV – Varíola vírus

VB – Vaccínia bovina

VGf – Fator de crescimento viral

WV – Vírions envelopados

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. Família <i>Poxviridae</i>	17
1.1.1. Classificação taxonômica	17
1.1.2. Morfologia e estrutura da partícula viral.....	18
1.1.3. Genoma	19
1.1.4. Ciclo de multiplicação viral	20
1.1.5. Patogênese	23
1.2. Gênero <i>Orthopoxvirus</i>	26
1.2.1. Varíola vírus.....	27
1.2.2. Monkeypox vírus.....	29
1.2.3. Cowpox vírus	32
1.2.4. Akhmeta vírus	33
1.3. Vaccínia vírus	35
1.3.1. Histórico e diversidade genética	35
1.3.2. Diagnóstico laboratorial	37
1.4. Vaccínia Bovina.....	39
1.4.1. Histórico e características clínicas	39
1.4.2. Rotas alternativas de transmissão.....	40
1.4.3. Pequenos mamíferos na disseminação da vaccínia bovina	43
1.5. Ecoepidemiologia de pequenos mamíferos	45

1.6. Município do Serro	47
2. JUSTIFICATIVA.....	49
3. OBJETIVOS	51
3.1. OBJETIVO GERAL.....	51
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	51
4. METODOLOGIA.....	52
4.1. Treinamento profissional, biossegurança e comitê de ética.....	52
4.2. Métodos de apreensão de pequenos mamíferos e caracterização dos locais de captura	52
4.3. Anestesia, eutanásia e coleta de dados.....	56
4.4. Coleta dos órgãos e armazenamento.....	57
4.5. Ensaios de Biologia Molecular	58
4.5.1. Extração de DNA viral.....	58
4.5.2. Diluição das amostras de soro	59
4.5.3. PCR em tempo real	59
4.6. Ensaios sorológicos.....	61
4.6.1. Cultivo celular	61
4.6.2. Titulação de Vaccinia virus Western Reserve (VACV-WR).....	62
4.6.3. Teste de neutralização por redução de placa (PRNT)	62
5. RESULTADOS	64
5.1. Diversidade observada de pequenos mamíferos e amostragem por expedição, locais de captura e transectos selecionados.....	64

5.2. Condições climáticas, diversidade entre machos e fêmeas e observações complementares de pequenos mamíferos	66
5.3. N amostral de fígados e de soros de pequenos mamíferos e processamento para ensaios laboratoriais	69
5.4. Resultados observados em ensaios de PCR em tempo real	69
5.5. Resultados dos ensaios sorológicos de PRNT e descrição dos pequenos mamíferos positivos	71
6. DISCUSSÃO	74
7. CONCLUSÃO.....	81
8. REFERÊNCIAS	82
9. ANEXOS	98
9.1. Participação em eventos científicos	98
9.2. Organização de eventos científicos.....	98
9.3. Apresentações de trabalhos em eventos científicos	98
9.4. Cursos e atividades de extensão.....	100
9.5. Artigos publicados	100

1. INTRODUÇÃO

1.1. Família Poxviridae

1.1.1. Classificação taxonômica

A família *Poxviridae* é constituída de duas subfamílias, *Entomopoxvirinae* e *Chordopoxvirinae* (Tabela 1). A subfamília *Entomopoxvirinae* possui quatro gêneros e se caracteriza por possuir espécies virais que infectam animais invertebrados. A subfamília *Chordopoxvirinae*, por sua vez, possui dezoito gêneros e engloba vírus capazes de infectar animais vertebrados (ICTV, 2023). Nesta subfamília, destaca-se o gênero *Orthopoxvirus* (OPV), que apresenta espécies de alta relevância associadas a infecções em seres humanos (Fenner *et al.*, 1988).

Subfamília	Gênero	Nº de espécies
<i>Entomopoxvirinae</i>	<i>Alphaentomopoxvirus</i>	7
	<i>Betaentomopoxvirus</i>	16
	<i>Deltaentomopoxvirus</i>	1
	<i>Gammaentomopoxvirus</i>	6
	*	<i>Diachasmimorpha entomopoxvirus</i>
<i>Chordopoxvirinae</i>	<i>Avipoxvirus</i>	12
	<i>Capripoxvirus</i>	3
	<i>Centapoxvirus</i>	2
	<i>Cervidpoxvirus</i>	1
	<i>Crocodylidpoxvirus</i>	1
	<i>Leporipoxvirus</i>	4
	<i>Macropopoxvirus</i>	2
	<i>Molluscipoxvirus**</i>	1
	<i>Mustelpoxvirus</i>	1
	<i>Orthopoxvirus**</i>	12
	<i>Oryzopoxvirus</i>	1
	<i>Parapoxvirus**</i>	5
	<i>Pteropopoxvirus</i>	1
	<i>Salmonpoxvirus</i>	1
	<i>Sciuripoxvirus</i>	1
	<i>Suipoxvirus</i>	1
	<i>Vespertilionpoxvirus</i>	1
	<i>Yatapoxvirus**</i>	2

Tabela 1. Classificação taxonômica da família *Poxviridae*. *Sem gênero definido. **Gêneros que compreendem espécies capazes de causar doenças em seres humanos (ICTV, 2023).

1.1.2. Morfologia e estrutura da partícula viral

Imagens de reconstrução por criomicroscopia e eletro-tomografia demonstraram que os vírions desta família apresentam pleomorfismo em sua estrutura, podendo exibir o formato da partícula ovóide ou semelhante à um tijolo. As medidas da partícula são de aproximadamente 360 x 270 x 250 nm, com envelope constituído de uma bicamada lipídica revestida por proteínas de superfície (Cyrklaff *et al.*, 2005). Espécies virais de um mesmo gênero de poxvírus compartilham semelhanças morfológicas e algumas podem compartilhar também parte de seu espectro de hospedeiros (Moss, 2013). A figura 1 ilustra a partícula de vaccínia vírus (VACV), uma espécie pertencente à família *Poxviridae*.

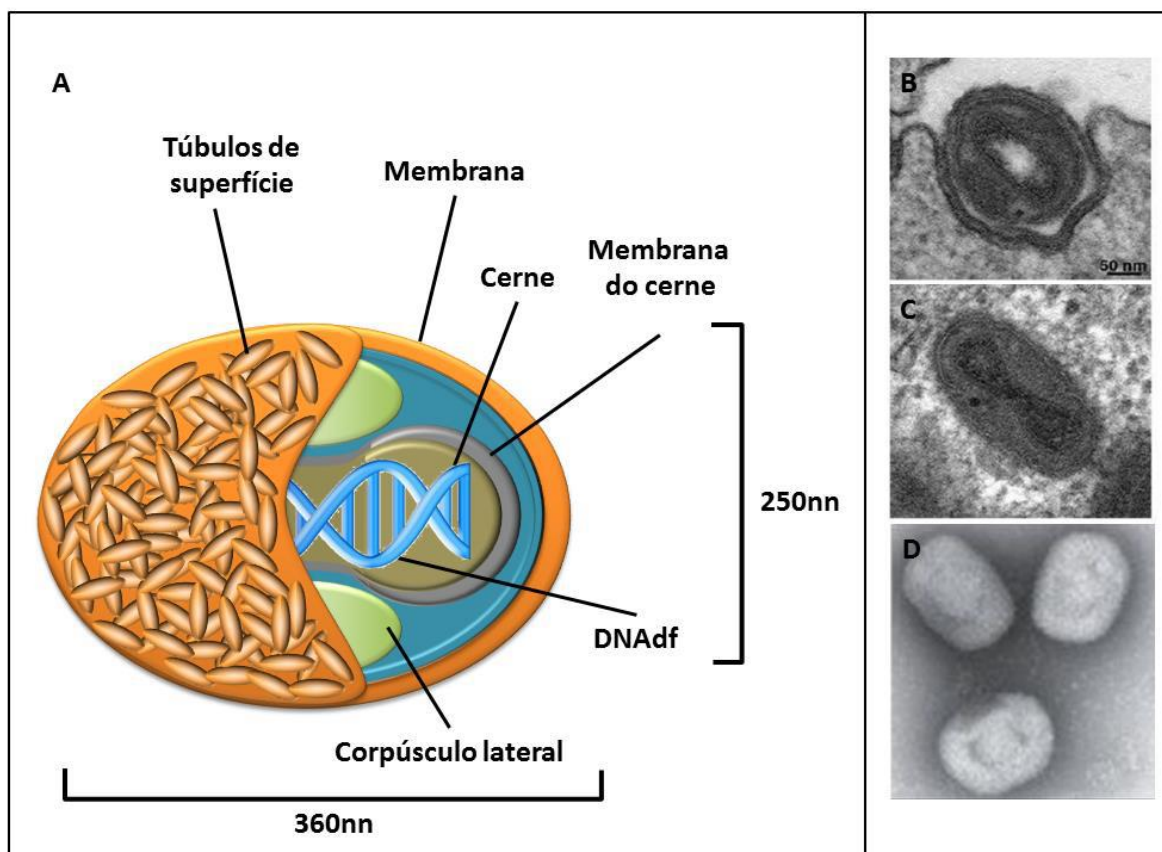


Figura 1. Morfologia da partícula de vaccínia vírus. A) Ilustração esquemática da partícula. B) Vírion envelopado extracelular (EV) em processo de fusão do envelope viral à membrana plasmática da célula hospedeira. C) Visualização de única partícula viral de vírion maduro (MV) no citoplasma da célula hospedeira. D) Vírions em forma de tijolo em microscopia eletrônica de coloração negativa (Moss, 2013; Vora *et al.*, 2015 – modificado por Laboratório de Vírus/UFGM).

A estrutura interna apresenta um cerne em formato bicôncavo ou de haltere, que contém seu material genético e um complexo nucleoprotéico, além de corpúsculos laterais entre este cerne e a membrana externa. Os corpúsculos laterais contêm proteínas imunomodulatórias

que são utilizadas imediatamente após a penetração do vírus na célula hospedeira (Greseth & Traktman, 2022; Moss, 2013). Além disso, vale ressaltar que a partícula viral carrega em seu cerne fatores transcricionais e uma RNA polimerase dependente de DNA (Fenner *et al.*, 1988; Moss, 2013).

1.1.3. Genoma

Os poxvírus apresentam seu material genético em forma de DNA dupla fita linear, com tamanhos variando entre 130 e 300 kpb, dependendo do gênero em que se encontram (Figura 2). Este genoma pode ser conceitualmente dividido em duas partes, sendo a porção central englobando genes mais conservados e as porções terminais contendo genes mais variáveis. Nestas, encontram-se sequências idênticas orientadas de forma oposta uma à outra, denominadas repetições terminais invertidas (ITRs), originalmente do inglês *inverted terminal repeats* (Czarnecki e Traktman, 2017; Moss, 2013; Smith & Mcfadden, 2002).

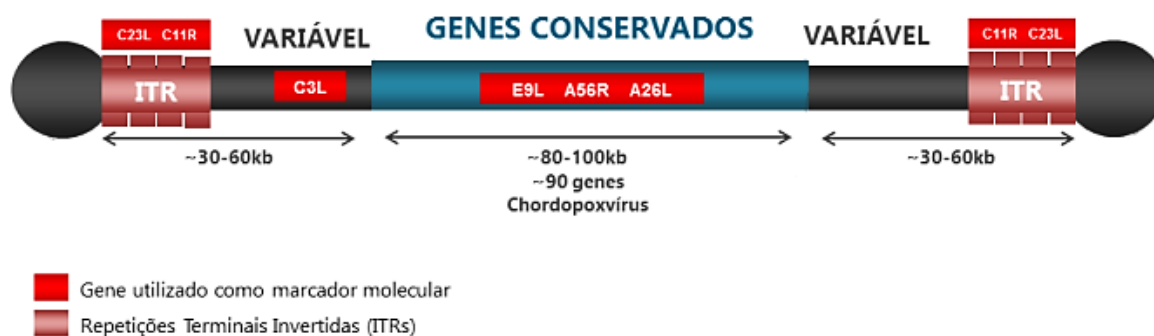


Figura 2. Representação esquemática do genoma dos poxvírus. Na região central se concentram genes mais conservados, e nas regiões terminais se concentram genes mais variáveis. O tamanho da região central é mais constante entre os poxvírus, mas as regiões terminais variam seu tamanho a depender da espécie viral analisada (Smith & Mcfadden, 2002 – modificado por Laboratório de Vírus/UFMG).

A porção central apresenta aproximadamente 100 kpb, onde são encontrados genes altamente conservados responsáveis por codificar proteínas relacionadas a replicação do material genético, proteínas estruturais e enzimas. Tais genes conservados são amplamente utilizados em técnicas de diagnóstico laboratoriais, como os genes E9L, A56R e C11R, alvos deste estudo (Czarnecki e Traktman, 2017; Moss, 2013).

As ITRs se conectam por sequências ricas em adenina e timina, responsáveis pela junção das duas fitas do DNA. Estas ITRs apresentam aproximadamente 50 kpb, onde se

concentram genes que codificam proteínas relacionadas à interação com hospedeiros, fatores de virulência e imunomodulação. Além disso, as ITRs apresentam deleções, repetições e transposições que variam entre as espécies (McFadden, 2005; Oliveira, 2015).

1.1.4. *Ciclo de multiplicação viral*

A multiplicação do vírus se dá no citoplasma da célula hospedeira (Figura 3). A partícula viral realiza a adesão na membrana celular por meio de interações entre um complexo de proteínas virais com proteínas de superfície da célula hospedeira. Nesta adesão, podem estar envolvidas partículas infecciosas que apresentam morfologias distintas: os vírions maduros (MV), que possuem um envelope externo único e são as formas mais abundantes do vírus, e os vírions extracelulares envelopados (EV), que são semelhantes aos MV, mas apresentam um envelope externo duplo e estão mais associadas com a infecção célula-a-célula (McFadden, 2005; Moss, 2013).

Após a adesão da partícula viral na superfície da membrana celular, ocorre o processo de fusão do envelope viral com a membrana e penetração do vírion na célula hospedeira. No caso dos MVs, o cerne viral é liberado diretamente no citoplasma celular, enquanto para os EVs a membrana mais externa do envelope é descartada, e sua membrana mais interna é envolvida no processo de fusão. Os MVs podem também penetrar na célula hospedeira pelo processo de macropinocitose (Burrell, Howard & Murphy, 2017; Moss, 2013). Posteriormente, o cerne viral migra para regiões perinucleares por meio da ação de microtúbulos. Os corpúsculos laterais, que contém proteínas de imunomodulação, se dispersam para diferentes regiões do citoplasma após o desarranjo do envelope viral (Greseth & Traktman, 2022).

Em seguida, após a penetração do vírion na célula hospedeira, genes precoces são transcritos ainda dentro do cerne por meio da ação da RNA polimerase viral, sendo estes genes responsáveis por codificar proteínas envolvidas em variados processos, como desnudamento, moléculas de evasão do sistema imune, enzimas, fatores de replicação do material genético e transcrição de genes intermediários. Após a transcrição destes genes precoces, ocorre o desnudamento completo do cerne, liberando o DNA viral no citoplasma, que se associam a proteínas virais e à membrana do retículo endoplasmático (Greseth & Traktman, 2022; Moss, 2013; Roberts *et al.*, 2008).

Com a expressão de genes intermediários iniciada em regiões do citoplasma da célula hospedeira sem a presença de organelas celulares, denominadas fábricas virais, ocorre

subsequentemente a tradução e síntese de proteínas relacionadas majoritariamente a fatores de transcrição dos genes tardios. Estes genes tardios, por sua vez, codificam proteínas responsáveis pela morfogênese, como proteínas estruturais, além de enzimas e outros fatores essenciais para a transcrição dos genes precoces nas partículas virais recém produzidas (Roberts *et al.*, 2008).

Tendo os genes tardios transcritos, as proteínas traduzidas e o DNA replicado, a morfogênese viral é iniciada (Moss, 2013). Neste processo, os concatâmeros são desfeitos e, então, o DNA é empacotado pelo cerne, dando origem aos vírions imaturos (IV). Os IVs recém produzidos no citoplasma passam por um processo proteolítico de maturação, dando origem aos vírions maduros (MV), que a partir deste momento da morfogênese já se tornam partículas infecciosas viáveis. Estes MVs podem ser liberados da célula hospedeira por meio do processo de lise celular (Figura 3). Ainda no citoplasma celular, parte destes vírions recém maturados são encaminhados ao complexo de Golgi, onde recebem uma membrana externa e são denominados vírions envelopados (WV). Estes WVs, por sua vez, migram para a periferia da célula por meio da ação de microtúbulos e saem da célula hospedeira por fusão de membrana. Neste processo, os WVs perdem sua membrana mais externa e deixam a célula por exocitose, sendo denominados vírions extracelulares envelopados (EV). Os vírions podem ficar associados à membrana celular hospedeira e são propulsionados a novas células hospedeiras por caudas de actina polimerizadas sob a partícula (McFadden, 2005; Moss, 2013; Roberts *et al.*, 2008).

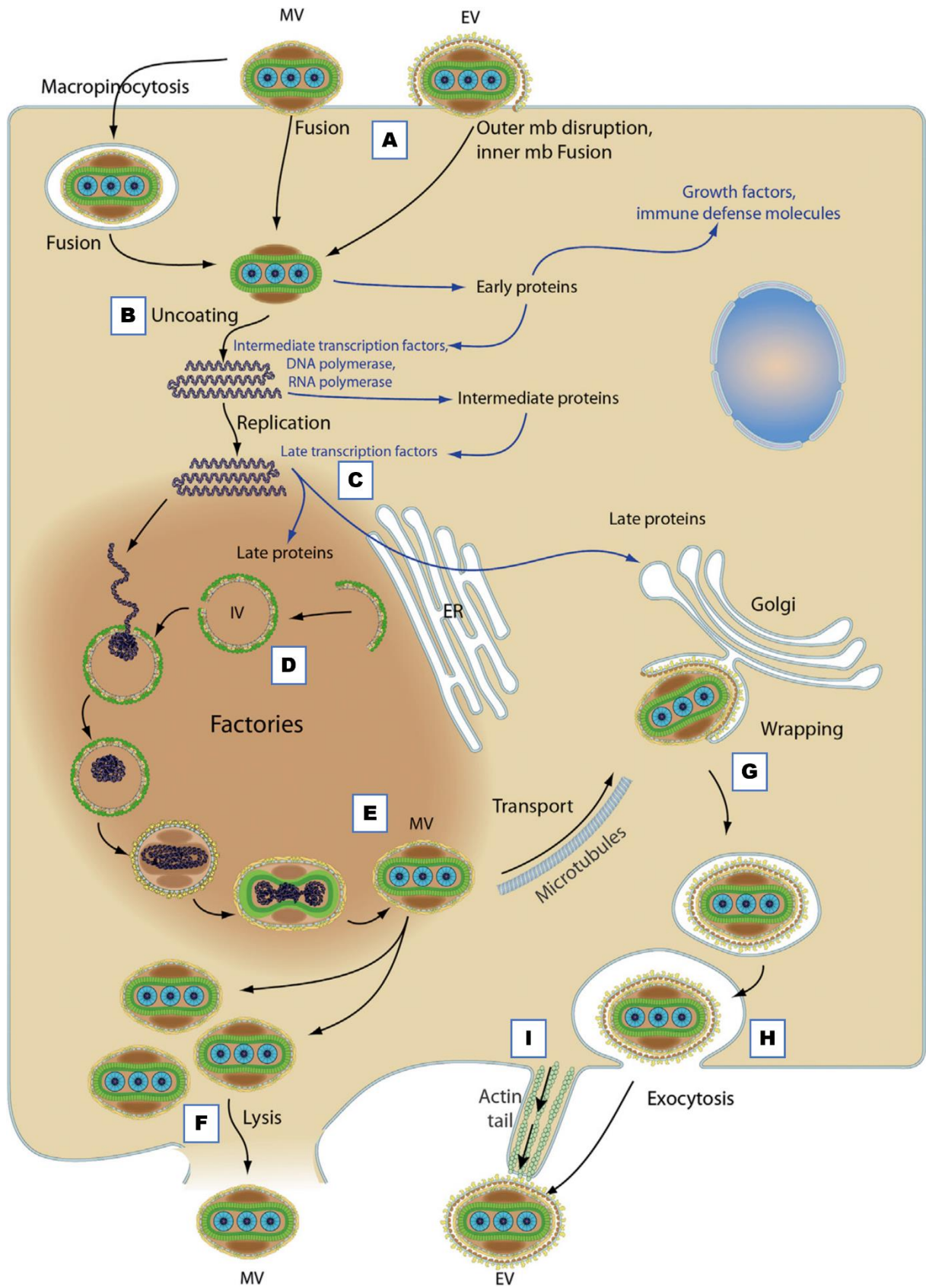


Figura 3. Representação esquemática do ciclo de multiplicação de vaccinia vírus. O processo de multiplicação se inicia na adesão à membrana da célula hospedeira (A), podendo ocorrer tanto pela fusão do envelope viral à membrana celular de vírions maduros (MV) ou de vírions extracelulares envelopados (EV). Os MVs podem

também penetrar por macropinocitose. Após a penetração, o cerne viral é liberado no citoplasma (**B**), e genes precoces são transcritos ainda dentro dele. Em seguida, o cerne é desnudado e o genoma é liberado no citoplasma. Desta forma, genes intermediários são transcritos e se inicia a replicação do DNA genômico (**C**). Assim, genes tardios são expressos e são produzidas proteínas estruturais do vírus (**D**). A progênie viral ocorre nas fábricas virais, onde há a formação de vírions imaturos (**IV**) e que darão origem aos novos MVs (**E**). Estes MVs podem ser liberados da célula por lise celular (**F**) ou também podem ser encaminhados ao complexo de Golgi (**G**), onde recebem uma membrana externa, dando origem aos EVs que serão liberados da célula por exocitose (**H**). Os EVs podem também ser projetados à novas células por filamentos de actina (**I**) (Burrell, Howard & Murphy, 2017).

1.1.5. Patogênese

Os poxvírus são vírus epiteliotrópicos que causam lesões exantemáticas características ao grupo (Figura 4). Algumas espécies do gênero *Orthopoxvirus*, como o *Ectromelia virus*, *Monkeypox virus* e o *Variola virus*, provocam infecções generalizadas no corpo do indivíduo infectado. Outras espécies, como o *Vaccinia virus* e o *Cowpox virus*, apresentam lesões mais localizadas (Burrell, Howard & Murphy, 2017).

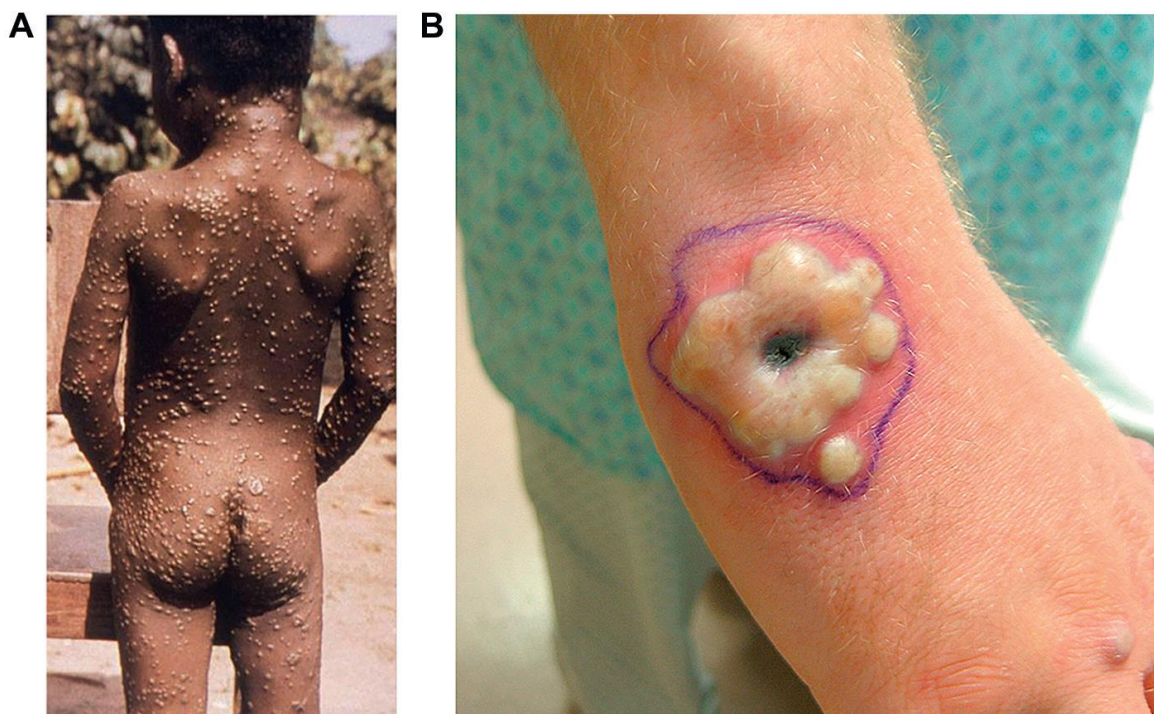


Figura 4. Diferentes manifestações clínicas de poxvírus. A) Lesões vesículo-pustulares características de um indivíduo infectado pelo variola vírus. B) Lesão localizada de um indivíduo infectado por cowpox vírus (Burrell, Howard & Murphy, 2017).

As infecções por OPVs normalmente se iniciam por via percutânea, por meio do contato próximo e contato direto entre indivíduos infectados (Figura 5). Entretanto, outras rotas

vêm sendo observadas para diversas espécies do gênero, como já foram observadas infecções via trato respiratório pelo varíola vírus em humanos, pelo monkeypox vírus também em humanos e pelo ectromelia vírus em camundongos (Elsayed, Bondy e Hanage, 2022; Fenner *et al.*, 1988; Moss, 2013).

Após a passagem inicial pelo sistema linfático, o vírus atinge o sangue, dando origem a viremia primária, na qual o vírus pode circular livremente no sangue ou associado a células e, a partir daí, se multiplicam em órgãos como o fígado, baço e outros órgãos reticuloendoteliais (Figura 5). Após a multiplicação, dá-se início a viremia secundária, onde o vírus se dissemina para órgãos como pulmões, rins, pele e intestino, levando ao aparecimento dos sinais clínicos característicos da doença. Estes sinais clínicos, que se iniciam com erupções na pele, seguidas de máculas, pápulas, vesículas, pústulas, crostas e, por fim, cicatrização, podem se manifestar no hospedeiro de forma localizada ou generalizada. Durante a infecção, os anticorpos começam a ser detectados a partir do sétimo dia, atingindo o pico no 14º dia, momento associado à redução da transmissibilidade do vírus. As lesões cutâneas e a evolução dos casos variam de acordo com a espécie causadora da infecção, resposta imunológica do hospedeiro e rota de entrada do vírus (Fenner *et al.*, 1988; Moss, 2013).

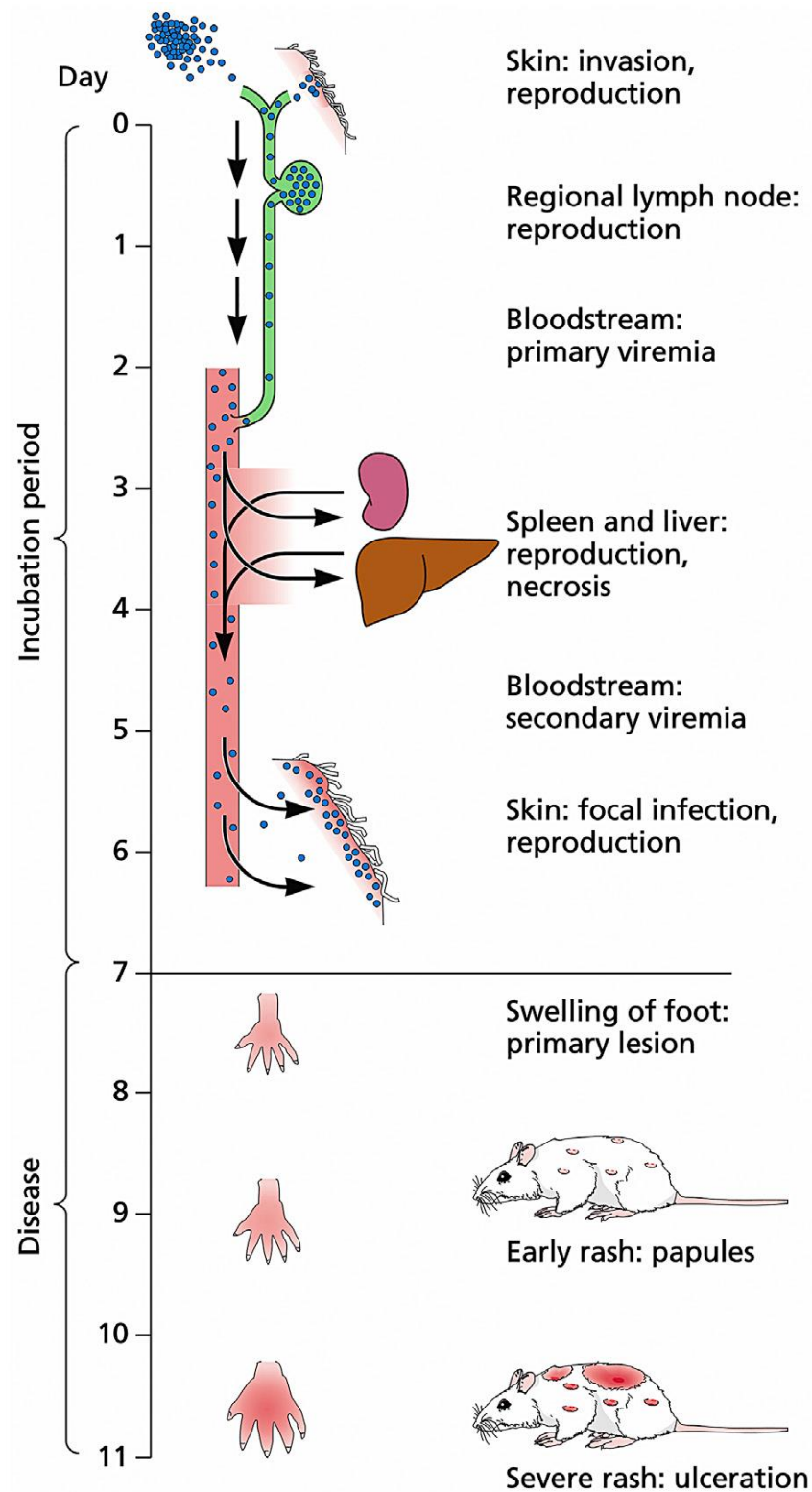


Figura 5. Estágios evolutivos de infecção por ectromelia vírus. A imagem apresenta os diferentes estágios do curso da infecção ao longo dos dias em modelo murino, desde o início da infecção com a invasão do vírus por via percutânea, até a geração dos efeitos característicos da doença causada por ele, como geração de ulceração na pele do indivíduo infectado (Burrell, Howard & Murphy, 2017).

1.2. Gênero *Orthopoxvirus*

O gênero *Orthopoxvirus* possui doze espécies em sua classificação, e as espécies deste gênero são normalmente nomeadas de acordo com o hospedeiro onde foram primariamente descritas (Tabela 2) (Fenner *et al.*, 1988; ICTV, 2023). Dentre os OPVs, apenas o varíola vírus não apresenta caráter zoonótico, infectando apenas seres humanos, enquanto outras espécies virais, como o *Akhmeta virus* (AKMV), *Monkeypox virus* (MPXV), *Cowpox virus* (CPXV) e *Vaccinia virus* (VACV) são capazes de infectar um amplo espectro de hospedeiros, sendo estes tanto seres humanos quanto outros animais vertebrados (Moss, 2013; Fenner *et al.*, 1988). A ampla capacidade dos vírus deste gênero de infectar seres humanos fez com que vírus pertencentes a este grupo recebesse maior notoriedade de estudos no âmbito científico, e o *Vaccinia virus*, por sua vez, é a espécie mais estudada entre os OPVs.

Gênero	Espécies
<i>Orthopoxvirus</i>	<i>Abatino macacapox virus</i>
	<i>Akhmeta virus</i> *
	<i>Camelpox virus</i>
	<i>Cowpox virus</i> *
	<i>Ectromelia virus</i>
	<i>Monkeypox virus</i> *
	<i>Raccoonpox virus</i>
	<i>Skunkpox virus</i>
	<i>Taterapox virus</i>
	<i>Vaccinia virus</i> *
	<i>Variola virus</i> *
	<i>Volepox virus</i>

Tabela 2. Classificação taxonômica dos ortopoxvírus. *Espécies de OPVs que causam doença em humanos, além de outros animais (ICTV, 2023).

Estudos envolvendo células de primatas do Velho Mundo, como pertencentes à linhagem VERO e à linhagem BSC-40 (ambas provenientes do epitélio renal de macacos da espécie *Cercopithecus aethiops*), demonstram a capacidade dos ortopoxvírus de causar efeito citopático nestas células, como na alteração da morfologia e lise celular. Tal característica é passível de ser explorada em diversos ensaios laboratoriais, como ensaios de isolamento viral, purificação de isolados de placa e detecção e quantificação de anticorpos neutralizantes (ATCC, 2023a; ATCC, 2023b; Moss, 2013).

Uma das características marcantes dos OPVs é a reatividade imunológica cruzada entre as espécies do gênero. Isto significa que caso um ser humano seja infectado por um

ortopoxvírus, este indivíduo desenvolverá uma resposta imunológica protetora contra a infecção por outras espécies deste grupo (Karem *et al.*, 2005; Hammarlund *et al.*, 2005). Um bom exemplo do uso deste atributo a favor da saúde humana é como a varíola foi erradicada no mundo, por meio da manipulação e uso do cowpox vírus e vaccínia vírus para produção de vacinas contra esta doença e seu agente infeccioso.

1.2.1. *Varíola vírus*

O vírus da varíola (VARV) é o representante de maior notoriedade dentro deste gênero. Isto se deve à doença causada por ele em seres humanos de manifestação clínica bastante severa e que ocasionou milhares de mortes ao decorrer da história. Estudos demonstraram registros da infecção pelo VARV na múmia do faraó Ramsés V, datada de 1148 a.C. no Egito Antigo, e estima-se que sua morte ocorreu devido à varíola, sendo este um dos registros mais antigos da doença. Com o avanço e crescimento das populações e movimentos migratórios crescentes, o vírus se espalhou ao redor do planeta, tornando a ocorrência da doença mundial (Fenner *et al.*, 1988; Thèves, Crubézy e Biagini, 2016).

A transmissão do vírus da varíola ocorria majoritariamente por meio do contato prolongado de face a face, mas a transmissão via fômites e contato com lesões cutâneas também eram descritas na literatura (Moss, 2013). As lesões surgiam em pessoas infectadas de forma generalizada pelo corpo. A gravidade dos casos estava relacionada a diferentes formas da doença, sendo elas denominadas varíola major e varíola minor. A varíola major foi a de maior circulação no mundo, além de ser a forma mais agressiva da doença, onde era observada uma taxa de letalidade entre 20% e 40% entre os infectados. Por outro lado, a varíola minor apresentava taxa de letalidade menor que 1% (Fenner *et al.*, 1988; Li *et al.*, 2007).

No século XVIII, observações do médico britânico Edward Jenner relatavam que pessoas infectadas pelo agente causador da varíola bovina ficavam imunes à ação do VARV e não desenvolviam a varíola. Posteriormente, foi constatado que o agente infeccioso causador da varíola bovina se tratava do cowpox vírus, outra espécie de OPV (Fenner *et al.*, 1988). Desta forma, pessoas eram inoculadas com amostras de CPXV para que se tornassem protegidas contra o VARV, e esta inoculação ocorria de uma pessoa à outra por meio de contato braço a braço. O método de imunização foi sendo aperfeiçoado ao longo dos anos, como por meio da troca de inoculação braço a braço pela inoculação pós-extração das amostras em bezerros

infectados experimentalmente. Desta forma, ao que se tem conhecimento, deu-se origem à primeira vacina na história humana, com um registro ilustrado na figura 6 (Fenner *et al.*, 1988).



Figura 6. Ilustração de Edward Jenner vacinando uma criança contra a varíola no século XVIII. Gravura de C. Manigaud segundo E. Hamman (Wellcome Collection Free Museum and Library).

Com o sucesso do método no decorrer dos séculos seguintes, a Organização Mundial da Saúde (OMS) decidiu iniciar, no século XX, extensos programas de vacinação ao redor do mundo para a extinção dos casos da doença. Em 1977, na Somália, país localizado no chifre do continente Africano, teve-se o último registro de varíola humana em uma infecção natural e, então, a doença foi declarada oficialmente erradicada no mundo no ano de 1980. Esta é a única doença infecciosa humana que se tem registro de erradicação na história, e esta conquista é considerada um dos maiores feitos já alcançados na saúde pública (Fenner *et al.*, 1988; Fernandes, 1999).

Em algum momento ainda desconhecido na história, o processo de vacinação onde se utilizava o CPXV como agente imunizante foi alterado e amostras de VACV passaram a ser utilizadas na vacinação contra a varíola. Isso se deve à uma provável falta de controle e

regulamento dos processos vacinais e, apesar de ainda ter sua origem desconhecida, estudos sugerem que a circulação do VACV pode ter emergido de diferentes formas, como por escape de uma linhagem vacinal ao ambiente ou que ele já circulava naturalmente e foi selecionado ao longo do tempo, infectando seres humanos e apresentando diferentes propriedades de outros OPVs já conhecidos (Damaso, 2018; Gubser *et al.*, 2004; Fenner *et al.*, 1988).

Com a erradicação da varíola e a observação de frequentes efeitos adversos da vacina em humanos, a vacinação contra a doença foi descontinuada e apenas alguns grupos de pessoas ainda são vacinados atualmente, como alguns trabalhadores da saúde e servidores militares nos Estados Unidos (Fenner *et al.*, 1988; Moss, 2013). Entretanto, a descontinuação do processo vacinal levou ao declínio progressivo da imunidade populacional contra os OPVs. Consequentemente, tais populações passaram a desenvolver doenças mediante o contato com outros OPVs que circulam na natureza e, entre eles, o vaccínia vírus majoritariamente no Brasil (Costa *et al.*, 2016; Meyer *et al.*, 2020; Oliveira *et al.*, 2017).

1.2.2. Monkeypox vírus

O monkeypox vírus (MPXV) é um ortopoxvírus de caráter zoonótico de grande relevância na saúde pública mundial. Este representante teve seu primeiro registro descrito em 1959, na Dinamarca, em macacos mantidos em cativeiro e que chegaram ao país transferidos de Singapura para um instituto de pesquisa, onde apresentaram lesões semelhantes às causadas por outros poxvírus. Em humanos, as infecções por MPXV se apresentam por meio de lesões de forma generalizada pelo corpo – de forma bastante semelhante ao que era observado em casos de infecção por VARV – e sintomas adicionais são comumente observados, como febre, dor de cabeça, mialgia e linfadenopatia (Burrell, Howard & Murphy, 2017; Kumar *et al.*, 2022; Moss, 2013). A transmissão é relatada por meio do prolongado de face a face, contato íntimo ou contato com lesões de pessoas infectadas, como lesões na pele e mucosas (Huang, Mu & Wang, 2022; Kumar *et al.*, 2022; WHO, 2023).

O primeiro caso de infecção humana ocorreu em 1970, na atual República Democrática do Congo. Desde então, os registros de circulação do vírus se disseminaram para diversos outros países do continente africano e se distribuindo, principalmente, pela região da África Central, bacia do Congo e países da África Ocidental. A detecção da circulação de MPXV também já foi realizada em outras nações fora deste continente, como em surtos registrados nos Estados Unidos em 2003, Israel em 2018, Reino Unido em 2018 e 2019 e Singapura em 2019 (Alakunle

et al., 2020; CDC, 2003; Durski *et al.*, 2018; Erez *et al.*, 2019; Simpson *et al.*, 2020). As infecções por MPXV em humanos se diferem geneticamente por dois clados distintos do vírus: o clado da África Ocidental, que está associado à uma manifestação menos severa da doença e com menor transmissão entre humanos. O clado da bacia do Congo, por sua vez, está mais associado à manifestação grave da doença, com maiores índices de letalidade em pacientes infectados, podendo chegar a taxas de 15% entre estes indivíduos (Hatami *et al.*, 2023; Kumar *et al.*, 2022; Likos *et al.*, 2005; Moss, 2013).

Atualmente, é observado um surto global de infecções por MPXV, com 86.746 registros de casos ao redor do mundo, tendo se tornado um problema de saúde pública de grande relevância mundialmente devido à severidade da doença (CDC, 2023). O surto atual se iniciou em maio de 2022 no continente europeu e, até o presente momento, já atingiu 110 países, sendo Estados Unidos, Brasil e Espanha os países com maior número de casos registrados, respectivamente (CDC, 2023; Philpott *et al.*, 2022). Ao todo, já foram registradas 112 mortes até o fim de março de 2023 ao redor do mundo desde o início deste surto (CDC, 2023). A figura 7 ilustra a distribuição mundial de registro de casos de MPXV.

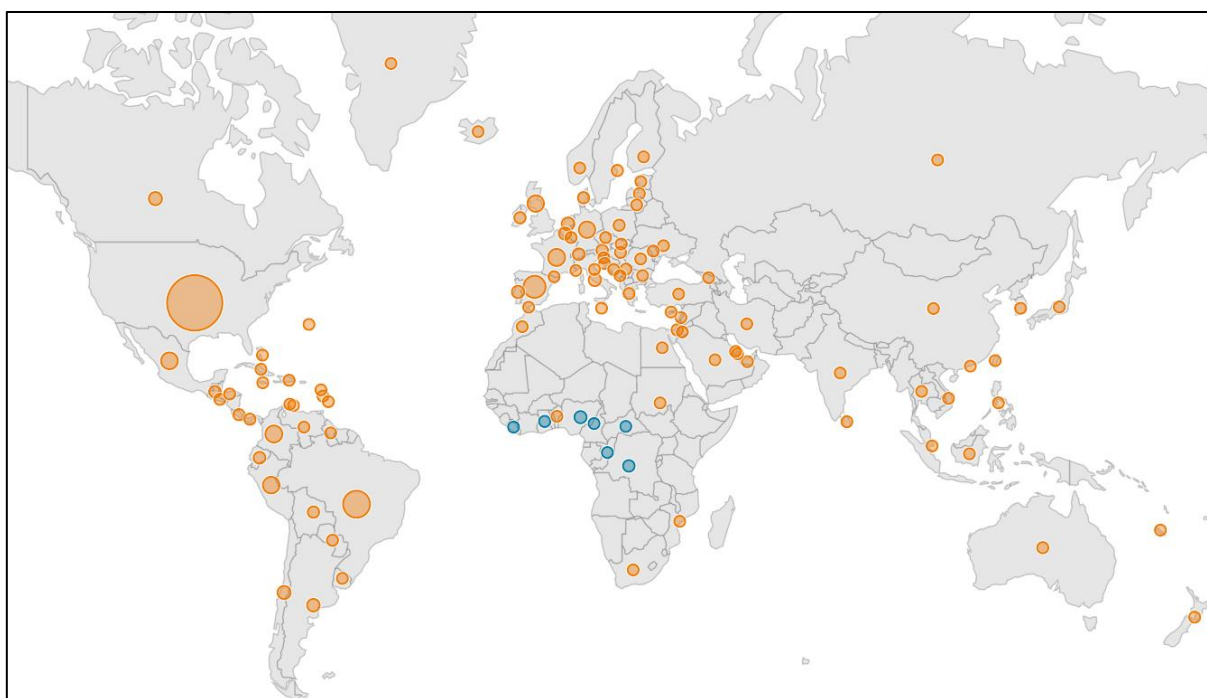


Figura 7. Distribuição geográfica do surto de monkeypox vírus. Em azul, estão indicados os países com histórico de surtos da doença e que também registram casos no surto atual. Em laranja, indicam-se os países com registros de casos no surto atual de monkeypox (CDC, 2023).

Os casos de infecção por MPXV vêm sendo registrados com mais frequência entre homens homossexuais, bissexuais e outros homens que fazem sexo com homens (Philpott *et al.*, 2022; WHO, 2023). Entretanto, é válido ressaltar que as infecções não se restringem a estes grupos de pessoas, e não estão diretamente relacionados à orientação sexual ou identidade de gênero. Estudos recentes relatam a detecção de MPXV em mulheres heterossexuais e crianças, além de profissionais de saúde infectados após acidente ocupacional (Aguilera-Alonso *et al.*, 2022; Carvalho *et al.*, 2022; Saunders *et al.*, 2022; Vallée *et al.*, 2023).

Desde a erradicação da varíola, infecções por MPXV são frequentes entre os OPVs em humanos e estima-se que as espécies reservatórias do vírus sejam roedores africanos. Já foi possível realizar o isolamento de MPXV a partir de amostras de esquilos silvestres africanos (*Funisciurus anerythrus*) infectados naturalmente, e outras espécies de roedores africanos (como o *Cricetomys gambianus*) já demonstraram potencial de amplificação e disseminação do vírus no ambiente (Figura 8) (Curaudeau *et al.*, 2023; Hutson *et al.*, 2015; Khodakevich *et al.*, 1986). Entretanto, novos estudos são necessários para descrever como a circulação natural deste vírus está estabelecida, principalmente entre estes animais (Brown e Leggat, 2016; Curaudeau *et al.*, 2023; Gomez-Lucia, 2022; Reynolds *et al.*, 2007).



Figura 8. Espécies de roedores potencialmente envolvidas no ciclo natural de monkeypox vírus. À esquerda, a espécie de roedor *Funisciurus anerythrus* (Betjes, iNaturalist, 2022), e à direita, a espécie *Cricetomys gambianus* (Wursten, 2018). Imagens obtidas por meio da plataforma Global Biodiversity Information Facility (gbif.org).

Dados os crescentes registros de infecções humanas pelo MPXV e a atividade de roedores silvestres na manutenção do ciclo zoonótico, a vigilância epidemiológica deste e de outros OPVs se mostra cada vez mais necessária (Curaudeau *et al.*, 2023; Gomez-Lucia, 2022; Mauldin *et al.*, 2020).

1.2.3. Cowpox vírus

Cowpox vírus (CPXV) é um dos representantes mais emblemáticos dentre os OPVs. Sua circulação entre os humanos e outros animais é observada há centenas de anos. Além disso, o CPXV tem grande relevância no estudo dos poxvírus por ser o vírus responsável pelo desenvolvimento da vacina contra a varíola, como mencionado anteriormente. Trata-se de um vírus de transmissão zoonótica, tendo suas primeiras observações de via de transmissão o contato direto principalmente entre ordenhadores e vacas leiteiras, entretanto, a transmissão em casos mais recentes está mais relacionada a gatos domésticos (Bruneau, Tazi & Rothenburg, 2023; Jungwirth *et al.*, 2018; Smith *et al.*, 1999; Tryland *et al.*, 1998). As lesões pustulares observadas em casos de infecção por CPXV são semelhantes ao que é observado para VARV e MPXV, entretanto, se manifestam de forma mais localizada no corpo do indivíduo infectado (Carroll *et al.*, 2011; Mauldin *et al.*, 2017). Estudos mais recentes demonstraram que o CPXV não se trata de apenas uma espécie, mas sim de um agrupamento de diversas linhagens virais geneticamente distintas, demonstrando que se trata de um grupo polifilético. Adicionalmente, este grupo se organiza com proximidade geográfica, além de necessitar de novos estudos de reclassificação taxonômica (Diaz-Cánova *et al.*, 2022; Carroll *et al.*, 2011; Mauldin *et al.*, 2017).

É estimado que este vírus seja endêmico na Europa e Ásia, apresentando ocorrência em diversos países europeus e com registro de casos de infecção crescentes em seres humanos, além de animais domésticos, como cães e gatos (Bruneau, Tazi & Rothenburg, 2023; Jungwirth *et al.*, 2018; Smith *et al.*, 1999; Tryland *et al.*, 1998) e animais mantidos em zoológicos (Baxby *et al.*, 1995; Meyer *et al.*, 1999; Rosone *et al.*, 2021; Stagegaard *et al.*, 2017). Como mencionado anteriormente, apesar de suas primeiras descrições terem sido feitas em gado leiteiro e ordenhadores, os registros de CPXV infectando gatos domésticos na Europa são os mais observados em surtos da doença atualmente. Desta forma, os animais domésticos têm papel fundamental na transmissão de cowpox vírus para os seres humanos (Bruneau, Tazi & Rothenburg, 2023; Jungwirth *et al.*, 2018; Zijlstra *et al.*, 2013).

Entretanto, estudos indicam que animais domésticos são apenas hospedeiros acidentais do vírus, e estudos ecológicos indicam que roedores silvestres são os reservatórios naturais do vírus, onde as espécies *Apodemus sylvaticus*, *Microtus agrestis*, and *Myodes glareolus* estão envolvidas na manutenção do ciclo natural do CPXV no ambiente (Figura 9), reforçando a

grande relação que envolve roedores e OPVs (Carroll *et al.*, 2011; Chantrey *et al.*, 1999; Meyer *et al.*, 2020; Sandvik *et al.*, 1998).



Figura 9. Espécies de roedores envolvidas no ciclo natural de cowpox vírus na Europa. No topo à esquerda, o roedor *Apodemus sylvaticus* (Weeda, 2022). No topo à direita, o roedor *Microtus agrestis* (Tjerri, 2022). Abaixo, o roedor *Myodes glareolus* (Rik, 2022). Imagens obtidas por meio da plataforma Global Biodiversity Information Facility (gbif.org).

1.2.4. Akhmeta vírus

O akhmeta vírus (AKMV) teve seu primeiro registro de infecção em humanos no ano de 2013, na Georgia, Europa Oriental, sendo um dos OPVs mais recentemente descritos (Vora *et al.*, 2016). Um ordenhador de vacas leiteiras apresentou lesões ulcerativas nas duas mãos e, dez dias depois, outro ordenhador apresentou lesões com o mesmo aspecto clínico. O primeiro estava com 24 anos e o segundo com 37, nenhum dos dois havia recebido a vacina contra a

varíola e as vacas que ambos ordenhavam apresentaram lesões nos úberes e queda na produção leiteira. Inicialmente, pensou-se que se tratava de uma infecção por cowpox vírus, mas testes moleculares e análises filogenéticas demonstraram que se tratava de um novo OPV (Vora *et al.*, 2016; Doty *et al.*, 2019).

Estudos filogenéticos demonstraram que o AKMV apresenta características de recombinação com outros OPV e possivelmente divergiu de algum representante mais recente do grupo (Vora *et al.*, 2016; Doty *et al.*, 2019). Posteriormente, estudos com pequenos mamíferos silvestres capturados no local onde ocorreu o primeiro surto de AKMV permitiram detectar a circulação viral (Figura 10), além de caracterizar os isolados por meio de testes sorológicos e moleculares. Tais resultados possibilitaram inferir que a emergência deste vírus estava associada a roedores silvestres e que estes animais podem ser os reservatórios de AKMV, o que levanta questões sobre a possibilidade de novos OPVs se adaptarem a hospedeiros mamíferos e os riscos que tais emergências apresentam à saúde pública (Doty *et al.*, 2019).

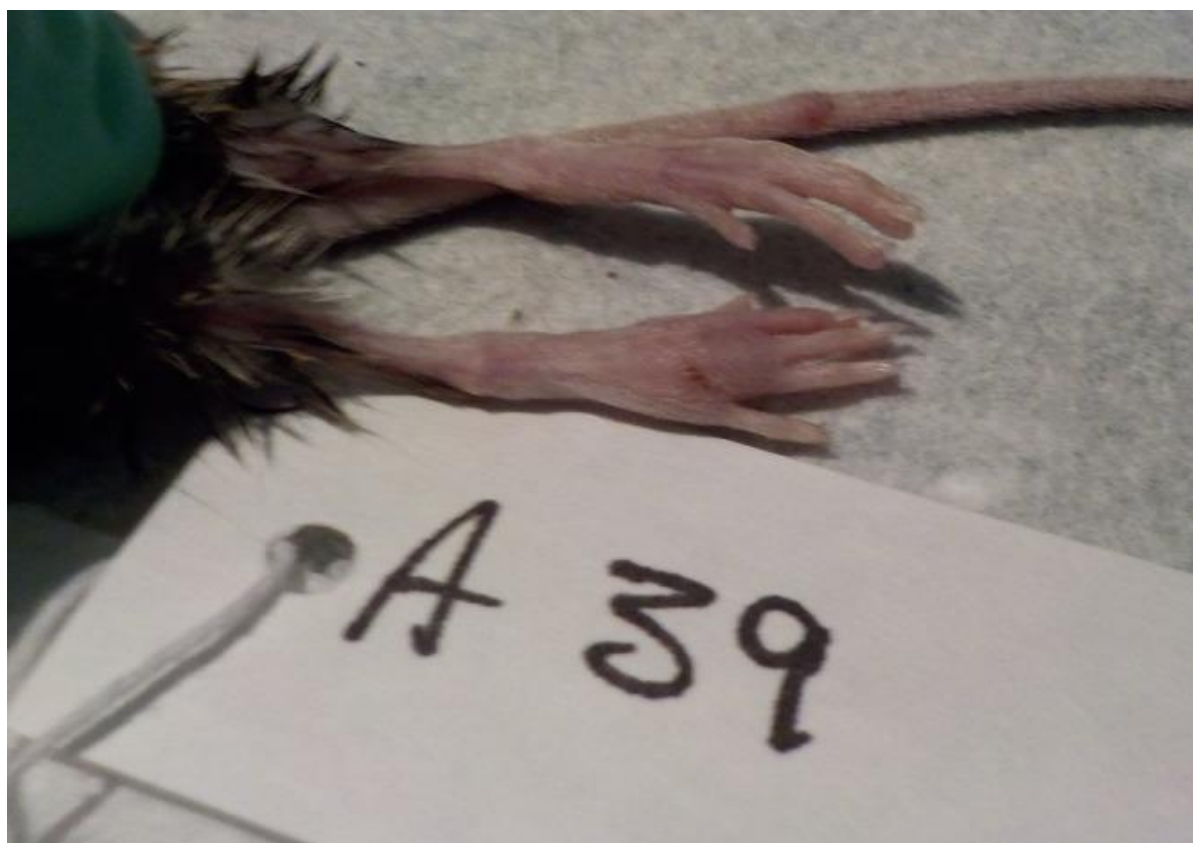


Figura 10. Lesões nos pés e cauda de um roedor (*Apodemus flavicollis*) causadas pela infecção por akhmeta vírus (Doty *et al.*, 2019).

1.3. *Vaccinia vírus*

1.3.1. *Histórico e diversidade genética*

O vaccinia vírus possui grande notoriedade dentro da família *Poxviridae*. Este é o representante dos OPVs que apresenta o maior número de estudos na atualidade, com o objetivo de elucidar os aspectos relacionados a diversos fatores que caracterizam os poxvírus, como seus aspectos de patogenia, resposta imunológica do hospedeiro, análises filogenéticas, dentre outros (Fenner *et al.*, 1988).

O VACV apresenta grande relevância na história da erradicação da varíola, uma vez que foi utilizado no processo de vacinação anti-varíola no século XX, como mencionado anteriormente. Apesar do importante papel desempenhado por este vírus, muitas perguntas sobre sua história natural ainda permanecem sem respostas, como por exemplo sua origem e seu reservatório natural no ambiente (Moss, 2013; Oliveira *et al.*, 2017). No Brasil, a circulação de VACV e a doença causada por ele, a vaccinia bovina, ainda são negligenciadas pelo Estado (Domingos *et al.*, 2021; Oliveira *et al.*, 2017).

A chegada de amostras vacinais no Brasil, supostamente contendo o VACV, é estimada que tenha ocorrido no início do século XIX, com o transporte de linhagens vacinais pelo método de braço a braço em povos escravizados de Lisboa, em Portugal, para o estado da Bahia, no Brasil. Estas pessoas foram levadas posteriormente ao estado do Rio de Janeiro, onde possivelmente ocorreu a vacinação dos habitantes deste estado (Fernandes, 1999). Anos depois, o Instituto Oswaldo Cruz, no Rio de Janeiro, foi o responsável por importar a linhagem vacinal de VACV propagada em bezerros utilizada em Paris, na França, e produzi-la no Brasil. Estima-se que esta seja a origem da linhagem conhecida como VACV-IOC. Entretanto, a linhagem vacinal mais utilizada no Brasil foi a VACV-Lister, originária do Instituto Lister, na Inglaterra, que foi importada ao país e posteriormente produzida pelo Instituto Butantan, no estado de São Paulo (Damaso, 2018; Drumond *et al.*, 2008; Fenner *et al.*, 1988; Moss, 2013; Trindade *et al.*, 2007).

No Brasil, estudos demonstram a circulação natural de diversos isolados de VACV, alguns deles isolados desde roedores silvestres e roedores sentinelas na década de 1960 até amostras de bovinos, equídeos e humanos nos últimos anos (Borges *et al.*, 2018; Brum *et al.*, 2010; Damaso *et al.*, 2000; Ferreira *et al.*, 2008a; Fonseca *et al.*, 2002; Fonseca *et al.*, 1998; Leite *et al.*, 2005; Lima *et al.*, 2018; Lima *et al.*, 2019; Trindade *et al.*, 2003; Trindade *et al.*,

2006; Trindade *et al.*, 2009; Trindade *et al.*, 2016). Os isolados obtidos até o momento não apresentavam diferenças de patogenicidade visíveis nos casos clínicos e veterinários. Contudo, estudos mais recentes demonstraram a existência da circulação de dois grupos filogeneticamente diferentes de VACV no Brasil que, por sua vez, apresentam características fenotípicas e padrões distintos de virulência quando inoculados em modelo murino (Drumond *et al.*, 2008; Ferreira *et al.*, 2008a; Trindade *et al.*, 2007; Trindade *et al.*, 2016).

Estas linhagens circulantes no Brasil foram classificadas em grupo I e grupo II, onde testes laboratoriais demonstraram as diferenças genéticas entre os representantes (Figura 11). O grupo I apresenta menor virulência em modelo murino e são mais frequentemente isolados em surtos no país, enquanto as linhagens pertencentes ao grupo II são mais virulentas e com menor índice de registro nos surtos documentados. Além disso, surtos envolvendo ambos os grupos foram registrados tanto de forma isolada quanto em co-circulação (Calixto *et al.*, 2017; Ferreira *et al.*, 2008a; Miranda *et al.*, 2017; Oliveira *et al.*, 2017; Trindade *et al.*, 2006).

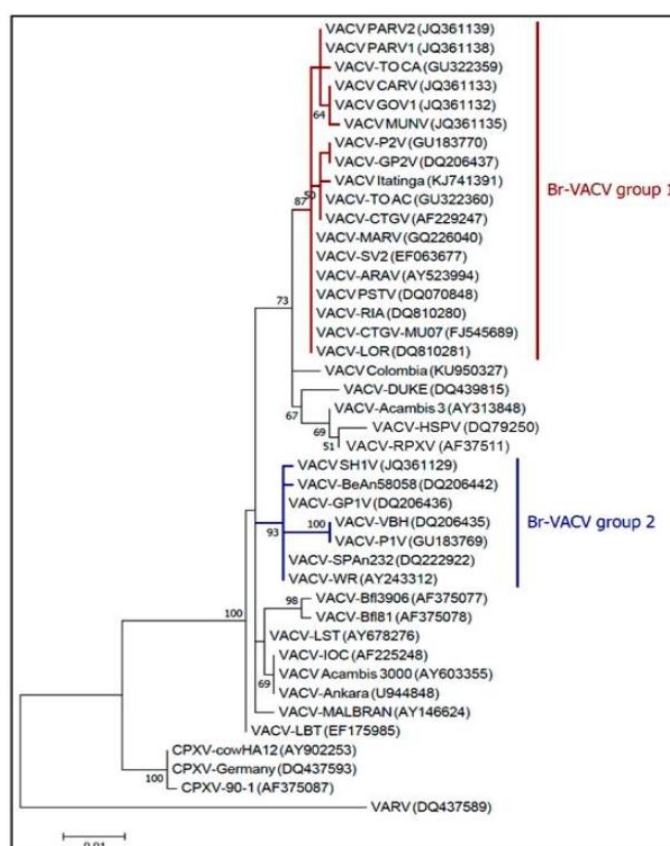


Figura 11. Classificação filogenética de vaccínia vírus baseado no gene A56R. Os representantes do grupo I estão destacados em vermelho, enquanto os representantes do grupo II estão destacados em azul (Oliveira *et al.*, 2017).

1.3.2. Diagnóstico laboratorial

Na biologia molecular, a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) é altamente sensível e específica, o que faz com que ela seja amplamente utilizada para diagnóstico rápido da circulação de OPV. Para isto, o gene C11R, responsável por codificar o fator de crescimento viral (VGF), é um marcador molecular que pode ser utilizado para caracterizar uma região altamente conservada entre os membros deste grupo (Abrahão *et al.*, 2010a; Kroon *et al.*, 2016). Sua utilização como marcador é realizada tanto para amplificação de fragmentos maiores de DNA em testes de PCR semi-nested quanto em testes de PCR quantitativa (qPCR). Entretanto, a detecção deste gene em testes de PCR apenas indica a presença do DNA de ortopoxvírus nas amostras, mas não é capaz de diferenciar entre as espécies do gênero (Abrahão *et al.*, 2010a; Kroon *et al.*, 2016).

Em relação ao VACV, um dos marcadores moleculares utilizados para o diagnóstico laboratorial no Brasil é o gene A56R. Por sua vez, este gene é responsável por codificar a hemaglutinina viral (HA), sendo esta uma glicoproteína de superfície do envelope viral. O grupo I dos VACVs brasileiros apresenta uma deleção de 18 nucleotídeos neste gene. Desta forma, a amplificação deste gene em testes de PCR é de grande valia, uma vez que permitem a diferenciação entre os grupos I e II de VACV circulantes no Brasil (Damaso *et al.*, 2000; Trindade *et al.*, 2006; Trindade *et al.*, 2008).

Outro marcador molecular importante dentre os OPVs é o C23L, responsável pela codificação da proteína de ligação à quimiocinas (Assis *et al.*, 2012; Leite *et al.*, 2011). As linhagens pertencentes ao grupo I dos VACV apresentam deleção de 10 nucleotídeos neste gene, que cria uma mudança por mutação da matriz de leitura e que gera um códon de parada na sequência de DNA (Assis *et al.*, 2012). Assim, testes de PCR tendo como alvo o gene C23L contribuem na caracterização do VACV e na diferenciação dos grupos I e II destas amostras brasileiras.

O gene E9L é responsável por codificar a DNA polimerase viral dentre os ortopoxvírus. Este gene é altamente conservado entre os OPVs, com exceção apenas do VARV, que apresenta uma diferença de três nucleotídeos em sua sequência genética. Deste modo, esta característica permite inferir que a amostra testada não tem correlação com o VARV, mas apenas com os outros OPVs (Czarnecki e Traktman, 2017; Li *et al.*, 2006; Reed *et al.*, 2004).

Ensaio molecular tendo como alvo o gene E9L permitem excluir a possibilidade de a amostra ser de origem variólica.

Além da amplificação de material genético, o uso da técnica de isolamento viral também pode ser utilizado para a caracterização de diversos OPVs. Com a possibilidade de replicação do VACV em diferentes linhagens celulares, como as linhagens VERO e BSC-40, a utilização desta técnica se demonstra essencial para melhor caracterizar os isolados (ATCC, 2023a; ATCC, 2023b). Com a obtenção destes isolados, torna-se possível a concepção de novas inferências filogenéticas, auxiliando no entendimento epidemiológico e evolutivo deste e de outros vírus. Adicionalmente, o isolamento viral permite a produção de estoques virais que podem ser utilizados em diversos outros experimentos laboratoriais que envolvam OPVs (Cotter *et al.*, 2017; Kroon *et al.*, 2016).

Além dos testes moleculares, os testes sorológicos também são de grande valia para o diagnóstico de infecções por OPVs. Como mencionado anteriormente, a característica de reatividade cruzada entre as espécies do gênero contribui para que testes laboratoriais sejam capazes de detectar anticorpos neutralizantes para OPVs, como é o caso do teste de neutralização por redução de placa (PRNT), que também possui características altamente específicas, sensíveis e de fácil reprodução na testagem de OPVs (Kroon *et al.*, 2016; Newman *et al.*, 2003). Além disso, o teste de PRNT para OPVs é considerado padrão-ouro no diagnóstico (Kroon *et al.*, 2016). A testagem e detecção destes anticorpos neutralizantes, associada ao diagnóstico molecular, contribui para análises mais robustas nos estudos.

O teste de ELISA (sigla do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) também é um teste sorológico que pode ser utilizado para diagnóstico laboratorial de OPVs. Este teste irá permitir a detecção e quantificação de anticorpos presentes nas amostras, o que auxilia na caracterização das classes de anticorpos ali presentes (como IgM ou IgG, por exemplo) e as implicações destes resultados para o indivíduo ou animal infectado. Desta forma, este ensaio permite, assim como o ensaio de PRNT, realizar inferências sobre a exposição ao VACV pelos indivíduos amostrados (Alhajj & Farhana, 2023; Karem *et al.*, 2005; Kroon *et al.*, 2016).

1.4. *Vaccínia Bovina*

1.4.1. *Histórico e características clínicas*

No Brasil, desde sua emergência nos estados de São Paulo e Rio de Janeiro em 1999 e em Minas Gerais no ano de 2000, o VACV é associado a uma doença exantemática que ocorre majoritariamente em ambientes rurais, apresentando sua patogenicidade em gado leiteiro e ordenhadores (Damaso *et al.*, 2000; Trindade *et al.*, 2003). Posteriormente, esta zoonose recebeu o nome de Vaccínia Bovina (VB) e, desde sua primeira descrição, são crescentes os relatos de casos no país (Domingos *et al.*, 2021; Oliveira *et al.*, 2017).

A VB vêm sendo investigada ao longo dos anos e, com ela, diversas informações sobre as manifestações clínicas da doença têm sido elucidadas. No gado leiteiro, por exemplo, a doença se manifesta por meio de lesões vesicopustulares localizadas nos úberes das vacas, desencadeando um processo inflamatório para os animais infectados, gerando mastite e abrindo espaço para infecções secundárias. Consequentemente, a capacidade de produção de leite destes animais infectados pode apresentar redução de 40% a 80% (Lobato *et al.*, 2005; Matos *et al.*, 2018). Tais manifestações no rebanho são de grande relevância, uma vez que, além das lesões serem dolorosas nos animais infectados, elas comprometem a capacidade de amamentação dos bezerros e, principalmente, geram grande perda econômica ao produtor rural (Matos *et al.*, 2018).

Em humanos, a principal via de transmissão das infecções ocorre por meio do contato direto com bovinos infectados, normalmente no momento da ordenha manual. Além de lesões exantemáticas nas mãos dos ordenhadores (Figura 12), as manifestações clínicas incluem dor de cabeça, febre, dores musculares e nas articulações (Schatzmayr *et al.*, 2009; Silva-Fernandes *et al.*, 2009; Trindade *et al.*, 2009). A doença evolui para cura aproximadamente 21 dias após o aparecimento dos sintomas e não há tratamento específico, sendo este realizado apenas por meio da supervisão dos sinais clínicos (Schatzmayr *et al.*, 2009; Silva-Fernandes *et al.*, 2009). A VB em ordenhadores é um problema de grande relevância, pois na maioria dos casos os trabalhadores infectados precisam se afastar de suas funções e, em alguns casos, pode resultar em sua exoneração (Domingos *et al.*, 2021; Oliveira *et al.*, 2017).



Figura 12. Evolução de quadro de infecção por vaccinia vírus em paciente humano. A) Início de lesão no dedo médio. B) Evolução da lesão para pústula e pequena necrose central em outros dedos. C) Imagem aproximada da lesão demonstrada em A. D) Imagem aproximada da lesão demonstrada em B. E) Linfangite periférica no braço esquerdo do paciente (Trindade *et al.*, 2009).

Desde as primeiras detecções de VACV no Brasil e a associação com a emergência da VB, diversos surtos foram registrados ao redor do país, sendo diagnosticada em diversos estados brasileiros (Franco-Luiz *et al.*, 2016; Lima *et al.*, 2019). Mais recentemente, há registro da circulação do vírus em outros países vizinhos ao Brasil na América do Sul, como Argentina, Colômbia e Uruguai, demonstrando a expansão da circulação do vírus e da doença – o que, por sua vez, acende o alerta para o estabelecimento do VACV em novas localidades (Franco-Luiz *et al.*, 2014; Franco-Luiz *et al.*, 2016; Styczynski *et al.*, 2019; Usme-Ciro *et al.*, 2017).

1.4.2. Rotas alternativas de transmissão

Os primeiros estudos de caracterização da VB no Brasil visaram entender melhor a dinâmica desta zoonose ocupacional emergente entre os principais acometidos pela doença, sendo estes o gado leiteiro e os trabalhadores da ordenha, como mencionado anteriormente (Damaso *et al.*, 2000; Trindade *et al.*, 2003). Tais trabalhos permitiram definir a via de transmissão principal do VACV para os seres humanos, mas diversas rotas alternativas vêm sendo observadas.

Estudos posteriores demonstraram, por meio de testes moleculares e de isolamento viral, que o leite proveniente de vacas infectadas em surtos de VB ou infectadas

experimentalmente pode conter partículas viáveis do vírus, o que levanta a hipótese do consumo de leite servir como uma rota de transmissão. Além desta hipótese, são discutidas outras diversas questões acerca dos riscos que esta resistência das partículas virais pode oferecer à saúde pública (Abrahão *et al.*, 2009b). Também já foi possível encontrar partículas viáveis de VACV em amostras de leite que foram submetidas a tratamento termal, como aquecimento e resfriamento. Adicionalmente, produtos lácteos – como queijo, por exemplo – derivados desse mesmo leite submetido a aquecimento e resfriamento também podem demonstrar a presença do vírus ou de seu material genético (Oliveira *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2018).

Estudos também demonstraram que queijos artesanais submetidos a extensos processos de maturação de 60 dias também apresentaram partículas virais em suas amostras com menor infectividade, entretanto, ainda viáveis, inclusive em amostras comercializadas em centros urbanos (Matos *et al.*, 2018; Rehfeld *et al.*, 2017). Todos estes estudos reforçam a hipótese de que o leite e seus derivados podem estar relacionados a uma nova rota alternativa na transmissão do VACV, demonstrando potencial risco para a saúde pública humana, entretanto, são necessários novos estudos envolvendo testes em leite e seus derivados para melhor elucidar este possível ciclo de transmissão.

Os estudos para a identificação e isolamento de VACV em leite contribuíram para a elaboração de trabalhos onde se discutia a possibilidade de uma infecção sistêmica pelo vírus, dada a escassez de informações relacionadas a como o VACV e a VB se manifestam sistemicamente no gado leiteiro. Desta forma, estudos moleculares foram capazes de detectar o DNA viral em amostras de fezes e de sangue de bovinos naturalmente ou experimentalmente infectados, além de estudos sorológicos que permitiram observar a presença de anticorpos anti-OPV em amostras de soro destes animais (Guedes *et al.*, 2013; Matos *et al.*, 2018; Peres *et al.*, 2018a).

O DNA de VACV também já foi detectado em amostras de fezes de vacas após um longo período pós infecção, sugere que a vaccínia bovina possa atuar de forma sistêmica nestes animais e que eles sejam capazes de eliminar partículas viáveis do vírus em seus excrementos (Rivetti *et al.*, 2013). Tais resultados reforçam a hipótese de que, além de poderem apresentar uma infecção sistêmica, estes animais são capazes de eliminar o vírus no ambiente, o que pode contribuir para a manutenção do ciclo do VACV na natureza e na disseminação para outras espécies de animais, como outros animais domésticos e não-domésticos, além de diversas espécies de animais silvestres circundantes de fazendas leiteiras.

Desta forma, diversos outros grupos de animais vêm sendo investigados, visando um melhor entendimento do ciclo epidemiológico da vaccínia bovina. Além da detecção em bovinos, a presença de anticorpos anti-OPV ou DNA de VACV foi observada em amostras coletadas de animais domésticos como cães e gatos, equinos – estes que, por sua vez, apresentaram resultados positivos durante um surto de VACV no sul do país (Borges *et al.*, 2018) – e animais silvestres como procionídeos, primatas não-humanos, marsupiais e, principalmente, roedores, por meio de abordagens sorológicas e moleculares (Abrahão *et al.*, 2009a; Abrahão *et al.*, 2010b; Costa *et al.*, 2015; Costa *et al.*, 2017; Costa *et al.*, 2018; Peres *et al.*, 2018a). Tais estudos têm permitido a ampliação do espectro de hospedeiros para o VACV, além do levantamento de diversas discussões sobre a capacidade deste vírus de se adaptar a novas espécies de animais, o que contribui significativamente para seu bom estabelecimento na natureza. O espectro de hospedeiros, descrito por meio de testes sorológicos, moleculares e de isolamento viral para o VACV no Brasil está ilustrado na figura 13.

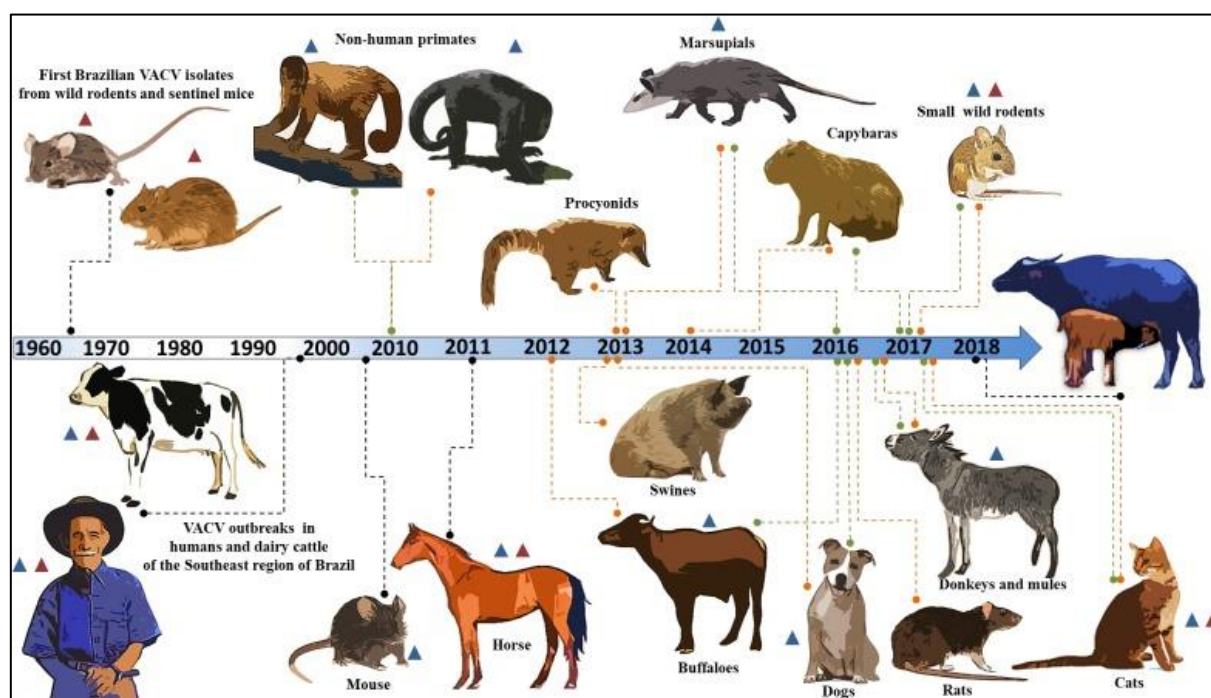


Figura 13. Linha do tempo de identificação de hospedeiros para vaccínia vírus no Brasil. As linhas em verde indicam diagnóstico por meio de testes sorológicos e as linhas em laranja indicam diagnóstico por meio de testes moleculares, respectivamente. As linhas em preto referem-se à isolamentos virais. Os triângulos azuis indicam infecção por VACV pertencente ao grupo I e os triângulos vermelhos indicam infecção por VACV do grupo II (Lima *et al.*, 2019).

1.4.3. Pequenos mamíferos na disseminação da vaccínia bovina

Roedores (Ordem Rodentia) e marsupiais (Ordem Didelphimorphia) recebem grande atenção nas pesquisas envolvendo representantes dos ortopoxvírus. Como citado anteriormente, várias das espécies deste gênero possuem transmissão de caráter zoonótico e, dentre estas, a maioria delas envolvem roedores em seu ciclo, como AKMV, CPXV e MPXV, com exceção apenas do VARV, que era transmitido no contato entre humanos (Carrol *et al.*, 2011; Doty *et al.*, 2019; Mauldin *et al.*, 2020). Desta forma, o envolvimento de pequenos mamíferos no ciclo eco-epidemiológico destes OPVs zoonóticos permite inferir que estes animais também possam atuar como reservatórios naturais de VACV, assim como ocorre para outras espécies (Abrahão *et al.*, 2009a; Antunes *et al.*, 2020; Essbauer *et al.*, 2010; Miranda *et al.*, 2017).

O contato de bovinos infectados com roedores e marsupiais peridomésticos pode servir como uma fonte de infecção para estes roedores que, por sua vez, seriam capazes de disseminar o vírus no ambiente silvestre e transmitindo a outros grupos de animais, como outras espécies de pequenos mamíferos (Abrahão *et al.*, 2009a; D’Anunciação *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2018). Esta hipótese é reforçada por meio de diversos outros estudos, como por exemplo o trabalho de infecções experimentais de VACV em modelo murino que permitiu a detecção de anticorpos anti-OPV no sangue e partículas virais infecciosas em amostras de fezes e urina, demonstrando a persistência da infecção viral nestes animais (Ferreira *et al.*, 2008b). A transmissão experimental de VACV para modelo murino por meio de leite contaminado também foi constatada experimentalmente, e neste estudo foi demonstrada a capacidade do leite atuar como uma rota de transmissão oral para estes roedores devido a detecção do DNA viral em amostras de fezes, sangue, swab oral e tecidos variados. Estes resultados, por sua vez, foram capazes de demonstrar uma infecção sistêmica nestes roedores, que não apresentavam sinais clínicos da doença, o que permitiu levantar discussões acerca da manutenção silenciosa do vírus em roedores infectados (Rehfeld *et al.*, 2015).

Testes moleculares também detectaram DNA viral em roedores e marsupiais naturalmente infectados, o que demonstra uma circulação natural do vírus no ambiente silvestre. Desta forma, é levantada a hipótese de que estes animais infectados podem transmitir o vírus a outros animais silvestres e, eventualmente, animais domésticos – e, dentre estes animais domésticos, o rebanho leiteiro, – estabelecendo a circulação do VACV de forma natural entre estes grupos de animais (Abrahão *et al.*, 2009a; Martins da Costa *et al.*, 2020; Miranda *et al.*, 2017; Oliveira *et al.*, 2017; Peres *et al.*, 2013). Além disso, estes roedores e marsupiais podem

atuar como elos de ligação entre diferentes ambientes, uma vez que estes animais podem se infectar no ambiente rural por meio do contato com excrementos de bovinos infectados e eliminar partículas viáveis do vírus por meio de suas fezes e urina. Assim, após o contato com estes excrementos, os roedores e marsupiais se infectam e transmitem o vírus a outros animais que circulam entre outros ambientes, podendo carrear o VACV para regiões urbanas e silvestres (Abrahão *et al.*, 2009a; Abrahão *et al.*, 2009c; Ferreira *et al.*, 2008b; D’Anunciação *et al.*, 2012; Guedes *et al.*, 2013; Peres *et al.*, 2018b). A esquematização ecológica de possíveis rotas de transmissão de VACV entre roedores e marsupiais silvestres, animais domésticos, humanos e também produtos lácteos está representada na figura 14 (Oliveira *et al.*, 2017).

Neste contexto, considerando a capacidade de pequenos mamíferos de serem infectados e excretarem partículas viáveis de VACV, além do envolvimento de roedores e marsupiais em surtos de vaccínia bovina no Brasil e em surtos de infecções de outros OPVs, a atuação dos pequenos mamíferos na manutenção do ciclo de VACV no ambiente necessita ser observada mais cautelosamente. Para estas observações, é preciso que sejam consideradas as diversas possíveis fontes de transmissão do vírus entre os animais envolvidos e seres humanos, a fim de que medidas de prevenção da doença e combate ao vírus sejam elaboradas da maneira mais proveitosa possível (Abrahão *et al.*, 2009; Miranda *et al.*, 2017; Oliveira *et al.*, 2017; Peres *et al.*, 2013).

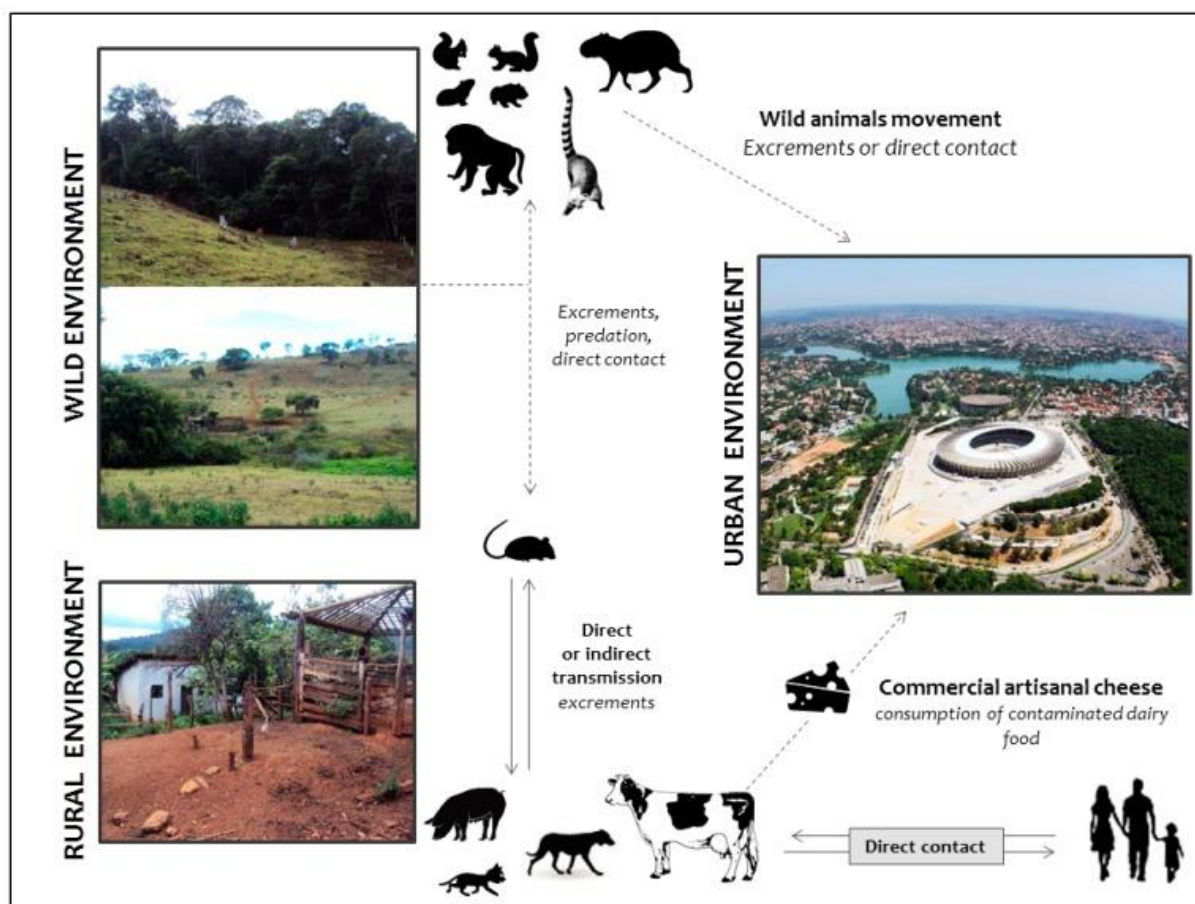


Figura 14. Rotas hipotéticas e reportadas de transmissão de vaccínia vírus. Na imagem, é possível observar a participação de diversos grupos de animais em diferentes ciclos de manutenção da VB, como na transmissão entre ambientes rurais, silvestres e urbanos. A transmissão envolve diferentes vias, como por meio de excrementos, predação, contato direto entre animais e consumo de produtos lácteos. Dentre os animais envolvidos, encontram-se os roedores e marsupiais (Oliveira *et al.*, 2017).

1.5. Ecoepidemiologia de pequenos mamíferos

Define-se como pequeno mamífero aquele animal que apresenta peso igual ou inferior a cinco quilos, mas o termo é reservado apenas para roedores e marsupiais, sendo estes considerados animais de pequeno porte (Chiarello *et al.*, 2008). Estes animais apresentam grande importância para a saúde pública, uma vez que estão diretamente relacionados a manutenção de doenças zoonóticas (Jones *et al.*, 2008).

Roedores e marsupiais são mamíferos de pequeno porte bastante biodiversificados. Podem apresentar uma amplitude de hábitos alimentares, variando de acordo com a estação do ano (verão, outono, inverno e primavera) devido a disponibilidade de recursos, o que faz com que estes animais circulem por amplas regiões em busca de alimento, principalmente em estações mais secas do ano (Chiarello *et al.*, 2008; Paglia *et al.*, 2012; Ramos, 2007).

Geralmente, as espécies de ambos os grupos apresentam altas taxas de reprodução e a presença de pequenos mamíferos é registrada em todos os biomas brasileiros e, dentre estes biomas, o Cerrado e a Mata Atlântica, que englobam o estado de Minas Gerais (Fonseca *et al.*, 1998; Fundação Nacional de Saúde, 2002).

O Cerrado é o segundo maior bioma do Brasil, estando atrás apenas do bioma amazônico. Este bioma está distribuído por diversos estados do país, incluindo Bahia, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Piauí, São Paulo e Tocantins, além do Distrito Federal. É considerado um dos biomas mais ameaçados do planeta, apesar de também se apresentar como um dos mais ricos do mundo, com grande biodiversidade de animais e plantas (IBGE, 2022; Vieira & Palma, 2005). A Mata Atlântica, por sua vez, se estende ao longo de dezessete estados brasileiros, sendo eles Alagoas, Bahia, Ceará, Espírito Santo, Goiás, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraíba, Paraná, Pernambuco, Piauí, Rio de Janeiro, Rio Grande do Norte, Rio Grande do Sul e Santa Catarina. A Mata Atlântica, assim como o Cerrado, apresenta grande biodiversidade de fauna e flora, e é considerado o bioma que mais sofre com a degradação ao longo da história do Brasil (IBGE, 2022; Campanili & Prochnow, 2006). Em ambos os biomas, a diversidade de roedores e marsupiais é de grande relevância na manutenção dos ecossistemas. Assim, a observação das condições de vida que estes biomas oferecem aos pequenos mamíferos é de grande valia, uma vez que se torna possível a análise ecológica sobre a capacidade destes pequenos mamíferos de se adaptarem a condições variadas para seu estabelecimento, reprodução e sobrevivência e, com isso, atuarem na manutenção de doenças zoonóticas (Chiarello *et al.*, 2008; Paglia *et al.*, 2012).

Grande parte dos pequenos mamíferos pode apresentar características sinantrópicas, convivendo em ambientes com seres humanos em busca de abrigo e também de alimento, como citado anteriormente. Entretanto, um fator preocupante é que estes pequenos mamíferos apresentam capacidade reservatória de uma ampla gama de patógenos, o que pode favorecer a transmissão de novos agentes infecciosos aos seres humanos (Jones *et al.*, 2008; Luis *et al.*, 2013). Dentre estes patógenos, encontram-se os OPVs.

Espécies representantes dos OPVs já foram detectadas em diversas espécies de pequenos mamíferos, principalmente roedores em estudos envolvendo CPXV (Carroll *et al.*, 2011; Mauldin *et al.*, 2017) e MPXV (Durski *et al.*, 2018; Li *et al.* 2006), além do próprio VACV (Abrahão *et al.*, 2009a; Miranda *et al.*, 2017). Em ambientes rurais, é comum observar a circulação de roedores e marsupiais em áreas de peridomicílio, áreas de pastagem do rebanho

e em áreas de mata nativa. Estudos prévios demonstraram a circulação de VACV em pequenos mamíferos capturados nestas três áreas distintas citadas anteriormente (Abrahão *et al.*, 2009a; Miranda *et al.*, 2017).

Considerando o indicativo de infecção sistêmica por VACV no gado leiteiro e sua possível excreção em leite e excrementos, com registros de detecção de partículas virais viáveis e de DNA viral em amostras de fezes, leite e queijos artesanais provenientes de rebanho infectado citados anteriormente, estudos já discutiram a hipótese onde pequenos mamíferos podem entrar em contato com esses excrementos e produtos lácteos contaminados e, assim, se infectarem com o vírus. Tendo os roedores e marsupiais se infectado pelo vírus, estes animais podem desenvolver a doença e, assim, transmitir o vírus para outros animais, fazendo com que o VACV se mantenha ativamente circulando na natureza. Desta forma, pode-se dizer que estes pequenos mamíferos podem ser responsáveis pela manutenção de um ciclo silvestre de VACV, conectando o ambiente rural e silvestre na disseminação natural do vírus. (Abrahão *et al.*, 2009; Guedes *et al.*, 2013; Martins da Costa *et al.*, 2020; Miranda *et al.*, 2017; Rehfeld *et al.*, 2017). Assim, novos estudos que contribuam com novos dados para esta hipótese são de grande valia para preencher lacunas do conhecimento acerca do VACV e sua relação com pequenos mamíferos, como ilustrado anteriormente na figura 14 (Oliveira *et al.*, 2017).

1.6. Município do Serro

O município do Serro (18°36'18"S 43°22'44"O), que possui tombamento do complexo urbano-paisagístico pelo Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional (IPHAN), está localizado a 329 km da capital Belo Horizonte, em Minas Gerais, e se encontra na região do Vale do Jequitinhonha, inserido em uma área de transição entre os biomas do Cerrado e da Mata Atlântica (IBGE, 2021). As principais formas de movimentação da economia local se dividem entre a agricultura familiar, o turismo (devido majoritariamente pelas belezas naturais preservadas e pela história da região) e, principalmente, a movimentação financeira gerada pela produção e venda do queijo minas artesanal a partir de leite cru, que possui reconhecimento cultural e imaterial para o estado (IPHAN, 2006; Prefeitura do Serro, 2023).

O queijo minas artesanal do Serro é de grande relevância na identidade cultural do município. Sua forma de produção confere características que fazem com que sua qualidade seja reconhecida nacional e internacionalmente, e ao longo de todo o território municipal estão distribuídas inúmeras fazendas leiteiras que realizam a produção de queijo artesanal a partir de

leite cru (Prefeitura do Serro, 2023; SEBRAE, 2022). Neste contexto, a manutenção da qualidade deste patrimônio do município é de grande interesse para os produtores do local, tanto pela importância econômica para o Serro quanto pela importância social e cultural que este produto exerce na vida dos moradores da região.

Desde as primeiras detecções de circulação de VACV em Minas Gerais, o município do Serro apresenta registros de surtos de vaccínia bovina ao longo dos anos, sendo possível identificar casos de infecção por OPV em diversos grupos de animais, como bovinos, roedores, marsupiais e humanos (Assis *et al.*, 2013; Trindade *et al.*, 2016; Miranda *et al.*, 2017). Desta forma, o município do Serro está inserido em um local endêmico para a circulação de VACV, com diversos registros da circulação do vírus em estudos ali conduzidos. Assim, a demanda de novos estudos acerca deste vírus nesta cidade é de grande valia, tanto para o desenvolvimento de métodos de prevenção contra a infecção por VACV e possíveis surtos de VB no município, quanto na contribuição para um melhor entendimento de como é desenvolvida ecoepidemiologia deste vírus em um ambiente de circulação natural.

2. JUSTIFICATIVA

Infecções por vírus pertencentes à família *Poxviridae* têm estado presentes entre os seres humanos por centenas de anos. O vírus causador da varíola, por exemplo, foi capaz de exterminar milhares de pessoas ao longo do tempo, e sua erradicação só foi possível em um período recente da história humana devido a um esforço internacional de vacinação coordenado pela Organização Mundial da Saúde, no século XX. Desde o encerramento dos programas vacinais anti-variólicos ao redor do mundo, há diversos registros de contatos entre humanos e espécies de *Orthopoxvirus* de caráter zoonótico. A circulação de outros vírus deste grupo é frequentemente identificada entre os seres humanos e outros organismos hospedeiros, como o cowpox vírus em países do continente europeu, e o monkeypox vírus que, devido ao surto global iniciado em 2022, atualmente é identificado em diversos países distribuídos por toda a América, Europa, África, Ásia e Oceania.

No Brasil, além da detecção de monkeypox vírus em humanos no surto atual, as infecções naturais por vaccínia vírus vêm sendo registradas desde o fim do século passado e estão, até o momento, diretamente associadas ao gado leiteiro e ordenhadores, nos quais causam uma doença conhecida como vaccínia bovina. Desta forma, infecções por VACV em rebanhos produtores de leite apresentam impacto direto na economia, visto que a produção leiteira é reduzida, gerando perda econômica tanto para os trabalhadores rurais quanto para os produtores. Além da queda de produção de leite, o desenvolvimento de medidas de prevenção é extremamente necessário, visto que os sinais clínicos da doença podem ser bastante severos tanto para humanos quanto para o gado leiteiro. Tendo isso em vista, o município do Serro pode ser considerado um local de grande importância para o desenvolvimento de estudos envolvendo o VACV e a VB, uma vez que tanto o vírus quanto a doença têm grande relação com a produção de leite e derivados, os impactos gerados por surtos da doença são significativos para os produtores locais e, além disso, está situado em uma região do estado de Minas Gerais que pode ser considerada endêmica para a circulação do vírus no país.

Muito se avançou acerca do conhecimento sobre o VACV no Brasil, tanto sobre sua patogênese, diversidade genética, distribuição geográfica no território brasileiro e, também, seu espectro de hospedeiros, que se amplia de forma considerável entre diversos grupos de animais. Tendo em vista que o VACV circula majoritariamente entre o gado leiteiro e ordenhadores e que, além disso, partículas virais viáveis foram detectadas em excrementos de bovinos e em produtos lácteos, a observação de como se mantém o ciclo de infecção entre o rebanho e os

humanos é cada vez mais necessária. Além de humanos e bovinos, o papel de pequenos mamíferos neste ciclo de transmissão é de grande relevância para melhor entendimento de como o VACV está estabelecido na natureza. Esta participação já foi demonstrada e reforça a capacidade destes animais de participar ativamente na cadeia epidemiológica do vírus, como observado em estudos prévios, onde roedores foram naturalmente infectados por VACV. Além disso, experimentos laboratoriais já demonstraram que roedores são capazes de excretar ativamente partículas viáveis do vírus em suas fezes e urina, e também de amplificar o vírus em seus organismos, o que gera preocupações sobre como este processo observado pode ocorrer naturalmente no ambiente rural e silvestre.

Entretanto, a elucidação sobre a(s) espécie(s) animal(is) reservatória(s) de VACV e sobre o fluxo viral entre diferentes ambientes (como o fluxo entre o ambiente rural e silvestre, por exemplo) ainda são desconhecidos ou pouco esclarecidos. Como mencionado anteriormente, estudos prévios demonstram que roedores e marsupiais podem ser naturalmente infectados por este vírus, o que pode contribuir na manutenção de um ciclo silvestre do VACV e possivelmente exercer papéis importantes em novos surtos no rebanho leiteiro e seus ordenhadores. Com a possibilidade do estabelecimento deste ciclo, se faz necessário observar se estes pequenos mamíferos circundantes de fazendas leiteiras e fazendas produtoras de produtos lácteos – como o queijo artesanal, importante para a economia do município do Serro – podem atuar ou não na manutenção de um ciclo silvestre da doença.

Desta forma, é notável que estudos envolvendo estes pequenos mamíferos silvestres são de grande relevância para elucidar questões acerca não somente do VACV, mas também sobre outros OPVs de caráter zoonótico. No presente trabalho, espera-se que a detecção de VACV nestes animais permita contribuir com dados eco-epidemiológicos que possam elucidar as lacunas ainda não preenchidas sobre o vírus, a doença e animais silvestres envolvidos neste ciclo.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a circulação de ortopoxvírus em pequenos mamíferos, capturados em fazendas leiteiras produtoras de queijo artesanal a partir de leite cru e localizadas em uma área endêmica para surtos de vaccínia bovina no estado de Minas Gerais, Brasil.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a circulação de pequenos mamíferos em áreas de peridomicílio, áreas de pasto e áreas silvestres de fazendas leiteiras produtoras de queijo artesanal a partir de leite cru;
- Caracterizar a diversidade de espécies de roedores e marsupiais circulantes em uma área endêmica para a circulação de VACV no Brasil;
- Avaliar marcadores virológicos para ortopoxvírus nos pequenos mamíferos capturados;
- Discutir o papel eco-epidemiológico dos animais capturados na manutenção do ciclo zoonótico dos ortopoxvírus no ambiente.

4. METODOLOGIA

4.1. *Treinamento profissional, biossegurança e comitê de ética*

Antes do início das expedições de campo, todos os pesquisadores envolvidos foram treinados para realizar o manejo de pequenos mamíferos de acordo com as recomendações da Associação Americana de Ciência em Animais de Laboratório (*American Association for Laboratory Animal Science – AALAS*) e do Comitê Internacional de Cuidado e Uso de Animais (*Institutional Animal Care and Use Committee – IACUC*), sob o protocolo 3183DOTMULX.

Durante os procedimentos de manipulação dos animais capturados, foram utilizados os equipamentos de proteção individual recomendados pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos (*U.S. Centers for Disease Control and Prevention – CDC*), tanto durante as expedições em campo (com o uso de luvas de contenção de animais, máscaras de proteção facial tipo PFF2, perneira de couro para trabalho em campo, dentre outros) quanto durante o tratamento laboratorial dos animais capturados (como o uso de luvas descartáveis de procedimento cirúrgico, máscaras de proteção facial tipo PFF2, jalecos descartáveis, óculos de proteção, dentre outros). Todos os procedimentos laboratoriais com os animais capturados foram autorizados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais sob o protocolo nº 217/2020. As capturas de pequenos mamíferos e as coletas das amostras foram realizadas sob autorização do ICMBio nº 129894.

4.2. *Métodos de apreensão de pequenos mamíferos e caracterização dos locais de captura*

O município do Serro foi o local selecionado para as capturas dos pequenos mamíferos deste trabalho. A escolha do município deve-se ao fato de que surtos da vaccínia bovina e da circulação de VACV vêm sendo registrados por diversas vezes ao longo dos anos, como mencionado no Item 1.6. Desta forma, foram selecionadas três fazendas cuja principal fonte de renda é por meio da ordenha e consecutiva produção de queijo minas artesanal a partir de leite cru, além de que cada localidade deveria apresentar uma região de mata preservada. Para preservar a identidade dos produtores, as fazendas foram renomeadas como A, B e C (Figura 15).

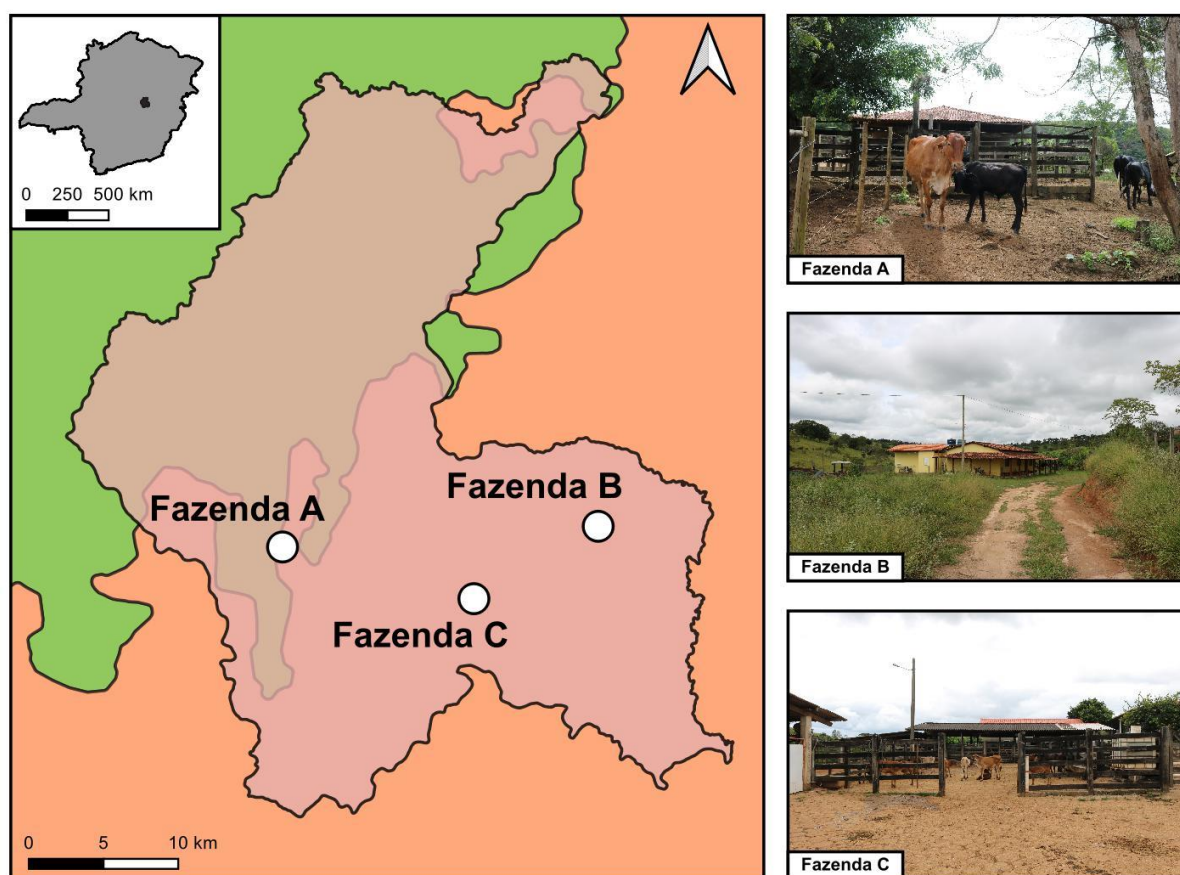


Figura 15. Determinação dos locais de captura de pequenos mamíferos. No canto superior à esquerda, o mapa de Minas Gerais, em cinza, e abaixo o mapa do município do Serro, em rosa, evidenciando sua sobreposição nos biomas Cerrado (em verde) e Mata Atlântica (em laranja). Os círculos na cor branca indicam as localizações georreferenciadas das três fazendas onde ocorreram as capturas de pequenos mamíferos. À direita, imagens ilustrativas das fazendas A, B e C, respectivamente. Imagem produzida por meio do software QGIS, versão 3.24.3. Fonte: Do próprio autor.

Após a determinação das fazendas, em cada uma delas foram selecionados três transectos para a captura dos pequenos mamíferos: o primeiro transecto na região de peridomicílio de cada fazenda, o segundo transecto na região de pastagem do gado leiteiro e, por fim, o terceiro transecto na região de mata preservada. A definição destes três transectos distintos tem como finalidade observar a diversidade de pequenos mamíferos capturadas em cada ambiente. Para cada transecto, foram determinados 15 pontos sequenciais de captura com 15 metros de distanciamento entre eles, totalizando 45 pontos por fazenda e, ao total, 135 pontos de captura nas três fazendas. Em cada transecto, foram alocadas 2 armadilhas em cada ponto de captura, sendo 15 armadilhas do tipo Tomahawk (25x25x40cm) e 15 armadilhas do tipo Sherman (9x9x22cm), totalizando 30 armadilhas por transecto, 90 armadilhas por fazenda e,

por fim, 270 armadilhas na somatória das três fazendas. A figura 16 ilustra a dinâmica de montagem dos transectos e as armadilhas utilizadas.

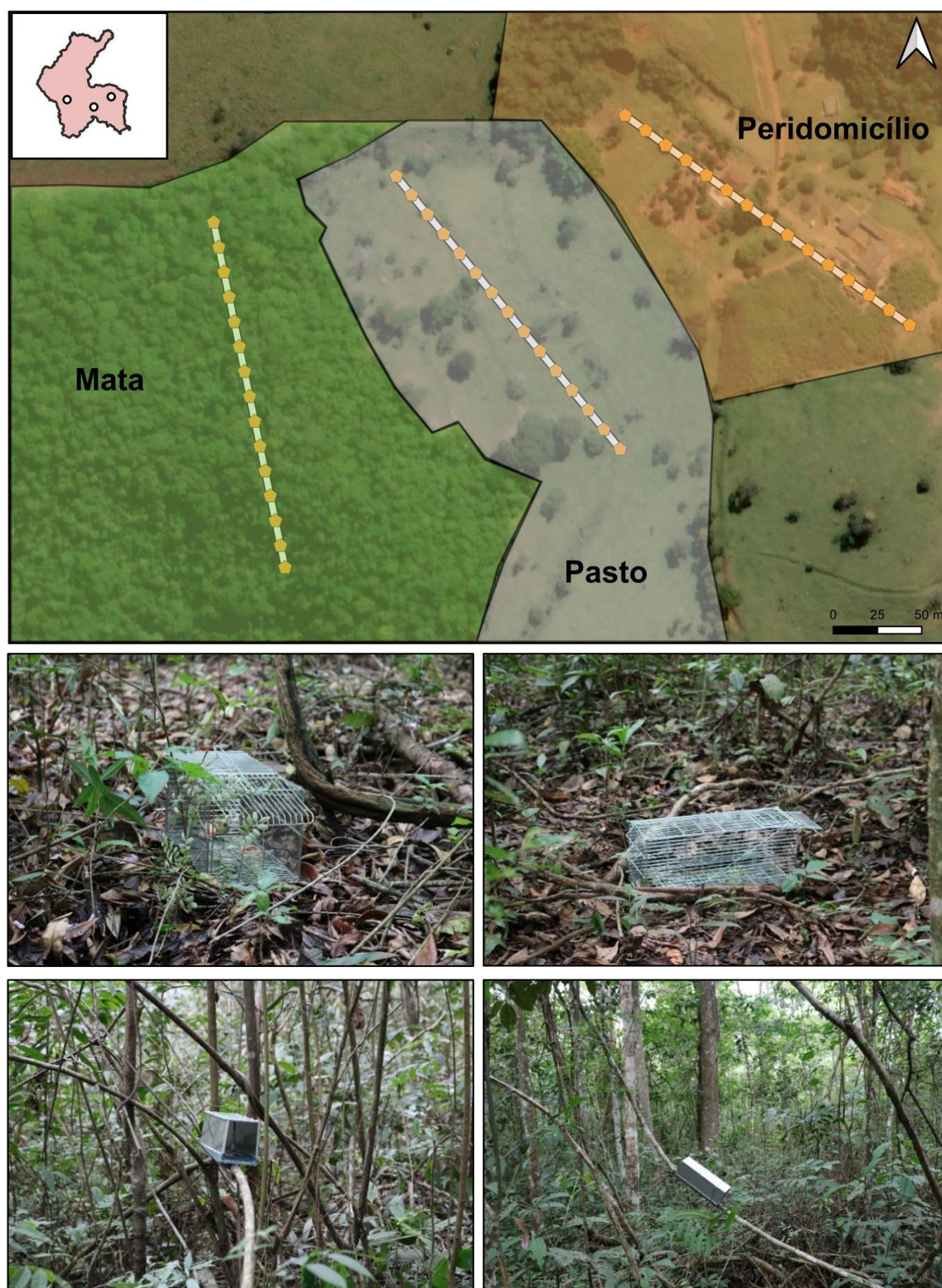


Figura 16. Transectos e armadilhas para as capturas de pequenos mamíferos. Acima, a visão via satélite de uma das fazendas do estudo, onde observa-se a divisão das regiões de mata, pasto e peridomicílio. Em cada região, há um transecto com os 15 pontos de captura determinados. Em cada ponto, há duas armadilhas, uma do tipo

Tomahawk (ilustradas ao centro) e outra do tipo Sherman (ilustradas abaixo). As fotografias foram registradas no ambiente de mata silvestre durante as expedições de campo. Imagem produzida por meio do software QGIS, versão 3.24.3. Fonte: Do próprio autor.

A dinâmica de captura ocorreu nos meses de fevereiro, maio, setembro e outubro de 2021, dividida em 4 expedições de 16 dias de duração ao longo desse período. Em cada expedição, as tentativas de captura dos pequenos mamíferos ocorreram durante 14 dias consecutivos, sendo que, diariamente, pela manhã, todas as 270 armadilhas eram conferidas para verificar a captura ou não de algum animal. O esforço amostral por expedição foi de 3.780 tentativas de captura, totalizando 15.120 tentativas ao fim das quatro expedições. As iscas utilizadas, que consistiam em um pequeno pedaço de banana e um pequeno pedaço de algodão embebido em um suplemento alimentar à base de óleo de fígado de peixe, eram trocadas de todas as armadilhas em dias alternados, para evitar a deterioração da isca e consequente redução da possibilidade de captura.

Por fim, todos os pequenos mamíferos capturados eram removidos das armadilhas e alocados em sacos de tecido limpos e estéreis para transporte ao laboratório montado no Serro e posterior eutanásia. Demais animais que não são englobados no estudo e que eventualmente foram capturados, como pequenas aves, eram removidos das armadilhas e libertos imediatamente ao ambiente.

Em relação à caracterização física das fazendas, todas as fazendas A, B e C deste estudo possuíam instalações semelhantes. Em todas elas, haviam setores da propriedade dedicados exclusivamente para o processamento do leite produção do queijo artesanal. As fazendas A e C dedicavam-se tanto à produção de queijos frescos quanto à produção de queijos maturados, com diferentes períodos de maturação variando entre 20 e 60 dias. A fazenda B, por sua vez, dedicava-se a produzir apenas queijos frescos para venda. Quanto ao tamanho do rebanho, a fazenda B apresentava a maior quantidade de vacas leiteiras, com aproximadamente 40 animais. Em seguida, encontrava-se a fazenda C, que apresentava entre 30 e 35 animais adultos e, por fim, a fazenda A, com cerca de 20 vacas produtoras de leite.

Quanto à outros animais domésticos, foi possível observar a presença de cães, gatos, equinos e aves em todas as fazendas. Entretanto, em diferentes proporções para estes grupos de animais. As fazendas A e B, por exemplo, possuíam cerca de 5 cães cada uma, já a fazenda C, por sua vez, apresentava aproximadamente 15 cães em sua propriedade. Em relação aos gatos, a fazenda A possuía apenas 1 gato, a fazenda B possuía 3 gatos e a fazenda C apresentava entre

12 a 15 gatos na propriedade. Quanto aos equinos, todas as fazendas apresentavam aproximadamente 3 a 5 animais em suas propriedades. Por fim, quanto às aves, as fazendas A e B apresentavam aproximadamente 10 animais, sendo apenas galináceos. A fazenda C, por sua vez, apresentava o maior número de aves e de diferentes espécies, atingindo aproximadamente 20 galináceos e 2 gansos domésticos.

Quanto aos estábulos para ordenha do rebanho leiteiro, nas fazendas A e C estes locais se encontravam anexos às instalações das propriedades, o que facilitava a manipulação do leite para a produção dos queijos artesanais. Já na fazenda B, o estábulo se encontrava a cerca de 100 metros de distância das outras instalações. Pequenas lagoas podem ser observadas nas proximidades das fazendas B e C, enquanto na fazenda A foi possível observar apenas a presença de um riacho.

4.3. Anestesia, eutanásia e coleta de dados

Após o transporte dos animais do campo para o laboratório, uma médica veterinária pertencente ao grupo de pesquisadores foi responsável pela anestesia e eutanásia dos roedores e marsupiais capturados. Primariamente, ainda no saco de tecido, os animais eram pesados para se realizar o cálculo da quantidade de anestésico a ser utilizada (peso em miligramas dos sacos de tecido previamente pesados subtraindo o peso total contendo o animal capturado dentro do saco). A contenção dos animais era realizada por um dos pesquisadores com maior experiência neste tipo de procedimento, de modo que o veterinário realizasse a anestesia com a combinação de ketamina e xilazina, sendo calculadas na proporção de 70 mg/kg de ketamina e 10 mg/kg de xilazina para cada animal (Leary *et al.*, 2020). A administração de anestésico ocorria por injeção intraperitonal para roedores e intramuscular para marsupiais.

A coleta de sangue ocorreu por punção cardíaca ou caudal, sendo retirado 10% do volume total de sangue corporal para os roedores e 8% para os marsupiais. A eutanásia ocorreu por administração via intracardíaca de uma dose de propofol na proporção de 10 mg/kg do animal (Leary *et al.*, 2020). Vale ressaltar que quaisquer pequenos mamíferos em processo de gestação e os marsupiais pertencentes ao gênero *Didelphis* tiveram amostras de sangue coletadas, mas não foram eutanasiados, salvo raras exceções onde o animal já se encontrava em situação precária de saúde, por exemplo. Todos estes animais que seriam devolvidos ao ambiente tiveram sua recuperação monitorada em uma gaiola do tipo Tomahawk mantida no laboratório com fornecimento de água e alimento. A soltura ocorria no dia seguinte à captura e

todos os animais receberam uma anilha/brinco com um número de identificação antes de sua libertação para registro e reconhecimento em casos de recaptura.

Com os animais eutanasiados ou sedados, foi realizado o registro individual dos dados, como atribuição de numeração da amostra/animal, data de coleta, condições climáticas na época da captura, tipo de armadilha que o capturou, análise taxonômica, localização específica no transecto de captura, estágio de vida, sexo, morfometria e outras observações gerais. Além disso, também era realizada a inspeção visual pelo corpo do animal em busca de lesões na pele que pudessem indicar uma infecção por OPV.

4.4. Coleta dos órgãos e armazenamento

Após coleta de amostras de sangue, a quantidade retirada foi centrifugada por 2 minutos a 8.000 rcf para a separação das porções de soro e coágulo. Após esta separação, o soro era transferido para um novo microtubo tipo Eppendorf estéril. Para a coleta de órgãos, a porção ventral externa dos animais foi desinfetada com etanol 70% para posterior abertura com pinças e tesouras cirúrgicas estéreis. Através deste pequeno corte foram retirados e colocados em placas de Petri descartáveis e estéreis os seguintes órgãos: gônadas, bexiga, intestinos, estômago, rins, baço, fígado, pulmão e coração. Quando presentes, amostras de urina foram coletadas utilizando agulhas e seringas de 1 mL e amostras de fezes foram coletadas da porção final do intestino grosso por impulsão.

Todas as amostras de órgãos foram fracionadas utilizando uma lâmina de bisturi e alocadas em dois microtubos de 2 mL identificados e estéreis, sendo o primeiro um microtubo criogênico e o segundo microtubo tipo Eppendorf contendo solução de RNA Later (Invitrogen, USA). As amostras de soro e de fezes foram alocadas somente em tubo criogênico e as amostras de coágulo e urina somente em tubo vazio. Demais porções do corpo dos animais eutanasiados (sistema esquelético e muscular) foram armazenadas em recipientes contendo etanol 70% e a pele foi imediatamente utilizada para taxidermia. Tais porções corporais e animais taxidermizados foram encaminhados à UFMG para descarte em local apropriado e para a deposição na coleção de mamíferos da Universidade, respectivamente.

Após a alocação em microtubos de criogênio, as amostras foram imediatamente armazenadas em um galão contendo nitrogênio líquido (-196°C) e as amostras em RNA Later foram armazenadas em sacos plásticos do tipo zip lock em freezers de temperatura -20°C. Todas as amostras foram mantidas nestas condições até o transporte para o Laboratório de Doenças e

Infecções Parasitárias (LADIP) na Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), em Diamantina, onde foram armazenadas em freezers de temperatura -80°C até o momento de seu processamento. O LADIP apresenta nível de biossegurança NB-2 e todos os ensaios ali desenvolvidos foram sob as condições que esta classificação laboratorial demanda dos pesquisadores.

4.5. *Ensaio de Biologia Molecular*

4.5.1. *Extração de DNA viral*

A amostra de fígado foi o órgão-alvo selecionado para a extração do material genético e diagnóstico de infecção por OPV. Caso alguma amostra apresentasse resultado positivo, novos órgãos do animal seriam submetidos ao mesmo procedimento, conforme determinação em protocolo específico. Para a realização do ensaio, as amostras foram retiradas do freezer a -80°C e descongeladas em uma caixa de isopor com gelo, a fim de evitar perda do material e descongelamento abrupto.

Uma porção de 25 mg do órgão selecionado foi cortada com lâmina de bisturi, alocada em um novo microtubo de 1,5 mL do tipo Eppendorf e pesada em balança de precisão. A maceração da amostra neste novo microtubo acontecia de forma mecânica com auxílio de uma ponteira de plástico P1000 livre de nucleases, sendo realizada após a adição de 200 uL de solução tampão fosfato salina – PBS (pH 7,2). Após este processamento inicial, as amostras foram submetidas ao procedimento de extração de DNA conforme orientações do fabricante (DNA extraction - PureLink™ Genomic DNA Mini Kit Invitrogen™). A digestão do órgão ocorre com a adição de 180 uL de Purelink Digestion Buffer e 20 uL de Proteinase K, além de incubação em aparelho termobloco a 55°C pelo período entre 1h e 4h. Após este tempo, os microtubos são centrifugados para coleta do sobrenadante e transferência para a coluna/tubo coletor do kit de extração, descarte do precipitado e adição dos demais reagentes, tais como 20 uL de RNase A, 200 uL de Purelink Genomic Lysis / Binding Buffer, 200 uL de etanol (96-100%), 500 uL de Wash Buffer 1 e 500 uL de Wash Buffer 2, todos fornecidos pelo kit e respeitadas as velocidades (variáveis entre 8.000 e 10.000 rcf), tempos de centrifugação (variável entre 1 e 3 minutos) e trocas de tubos coletores, também conforme orientação no manual do fabricante.

A eluição final do DNA extraído e purificado ocorreu utilizando 50 uL de Purelink Genomic Elution Buffer em um novo microtubo de 1,5 mL, e a quantidade obtida foi

armazenada em freezer a -20°C até o momento de sua utilização em teste de PCR em tempo real.

4.5.2. *Diluição das amostras de soro*

Além das amostras de fígado, as amostras de soro também foram selecionadas para submissão a testes moleculares, com objetivo de detectar o material genético do vírus em mais de uma fonte de amostra e verificar a possibilidade da circulação viral na corrente sanguínea dos animais. Diferentemente das amostras de fígado, o soro obtido dos pequenos mamíferos capturados não foi submetido a extração de DNA viral, mas sim diluído na proporção de 1:10, conforme determinado em protocolo específico (Kroon *et al.*, 2016).

Os microtubos contendo as amostras de soro, que estavam sendo mantidos em freezer a -80°C, foram retirados deste freezer somente no momento de processamento das amostras. Bem como as amostras de fígado, os soros também foram descongelados em caixas de isopor com gelo, sob o mesmo objetivo anterior de evitar descongelamento abrupto. Após o descongelamento, os tubos foram agitados em aparelho vortex, e 2 uL de soro foram transferidos para um novo microtubo de 0,6 mL do tipo Eppendorf, previamente identificado. Por fim, foram adicionados 18 uL de PBS nestes novos microtubos e uma nova agitação em aparelho vortex foi realizada. Os soros diluídos foram armazenados em freezer a -20°C até o momento de sua utilização em teste de PCR em tempo real.

4.5.3. *PCR em tempo real*

As amostras de DNA viral extraídas de fígado e as amostras de soro diluídas foram submetidas ao ensaio de PCR em tempo real tendo como alvo três diferentes genes: o gene C11R (VGF), o gene A56R (HA) e o gene E9L (DNA polimerase). O objetivo foi de verificar a presença ou não de material genético de OPV entre as amostras coletadas, conforme descrito no item 1.3.2. A seleção de mais um gene de OPV corresponde a abordagem multi-alvo comumente utilizada em trabalhos do grupo de Ecologia de Virose Emergentes no Laboratório de Vírus, onde na testagem de vários alvos é ampliada a possibilidade de detecção do material genético viral.

Para a manutenção e verificação da qualidade das reações, foi utilizado o gene de β -actina murino como controle endógeno, sendo este um gene constitutivo para roedores e que também pode ser utilizado para amplificação de DNA de marsupiais. Desta forma, as amostras

foram submetidas ao teste de qPCR para amplificação deste gene, além dos genes-alvo de OPV. Para os genes C11R, A56R e para o controle endógeno com o gene de β -actina murino foi utilizado o sistema SYBR® Green I Master Mix, enquanto que para o gene E9L foi utilizado o sistema TaqMan® Master Mix, conforme descrito em protocolos específicos. Os primers e os protocolos utilizados para os ensaios de PCR podem ser observados na tabela 3 abaixo:

Gene	Sequência	Referência
C11R Forward	5' CGCTACAACAGATATTCCAGCTATCAG 3'	Kroon <i>et al.</i> , 2016
C11R Reverse	5' AGCGTGGATACAGTCACCGTGTA 3'	
A56R Forward	5' CATCATCTGGAATTGTCACACTACTAAA 3'	Trindade <i>et al.</i> , 2008
A56R Reverse	5' ACGGCCGACAATATAATTAATGC 3'	
E9L Forward	5' TCAACTGAAAAGGCCATCTATGA 3'	Li <i>et al.</i> , 2006
E9L Reverse	5' GAGTATAGAGCACTATTTCTAAATCCCA 3'	
E9L-NVAR probe	5' TET-CCATGCAATATACGTACAAGATAGTAGCCAAC 3'	Laboratório de Vírus (não publicado)
β -actina Forward	5' AAATCGTGCGTGACATCAAAGA 3'	
β -actina Reverse	5' GCCATCTCCTGCTCGAAGTC 3'	

Tabela 3. Sequência de primers para os genes C11R, A56R e E9L para ortopoxírus e sequência de primers para β -actina murino. Fonte: Do próprio autor.

Todas as amostras, tanto de fígado quanto de soro, foram testadas em duplicata pelo equipamento e software de PCR em tempo real da StepOne® Applied Biosystems, versão 2.3, utilizando placas de 48 poços. Para o gene C11R, o gene A56R e o gene de β -actina murino foram utilizadas as seguintes configurações: desnaturação em um ciclo de 95°C por 20 minutos, seguido de anelamento e extensão em 40 ciclos de 95°C por 3 segundos e 60°C por 20 segundos e, por fim, para geração de curva de *melting*, o último ciclo de 95°C por 3 segundos e 60°C por 20 segundos, seguido de um aumento de 4°C até atingir 95°C por mais 15 segundos. Já para o gene E9L, por sua vez, foram utilizadas as ciclagens de desnaturação em 50°C por 2 minutos e 95°C por 10 segundos, seguido de anelamento e extensão em 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto.

Em todos os testes foram utilizados poços de controles positivos e negativos, também em duplicatas, nas placas de 48 poços utilizadas. Estes controles permitem garantir a qualidade do experimento, a possibilidade de análise comparativa com uma curva-padrão de amplificação e a ausência de contaminações no teste realizado. Como controle negativo, os poços selecionados não eram pipetados com amostras, mas sim com água livre de nucleases.

Para a utilização dos controles positivos, uma amostra de fígado proveniente de um roedor não infectado foi utilizada para a determinação da curva-padrão de amplificação. Desta forma, uma amostra de *Vaccinia virus Western Reserve* (VACV-WR, Laboratório de Vírus, Minas Gerais, Brasil) foi previamente titulada e diluída seriadamente. A amostra de fígado foi fracionada, e as alíquotas geradas receberam essas suspensões diluídas de VACV-WR. Em seguida, o DNA viral foi extraído conforme descrito nos protocolos utilizados neste estudo. Esses testes, além de gerar as amostras de controle positivos do experimento, permitiram indicar que não houve interferência do DNA tecidual em nossos resultados de extração de DNA viral e resultados de PCR.

Para a análise dos resultados dos genes C11R e A56R, foram consideradas positivas as amostras que apresentassem o valor de *Cycle Threshold* (CT) menor ou igual a 38 ou onde a curva de *melting* da amostra demonstrasse o mesmo valor observado para o controle positivo, salvo variações de 1°C para mais ou para menos. Já para a análise dos resultados referentes ao gene E9L, foram consideradas positivas as amostras com CT menor ou igual a 39. Amostras que amplificassem em apenas um poço foram submetidas novamente para confirmação do resultado final. Todos os resultados gerados foram analisados no software da StepOne® Applied Biosystems, versão 2.3.

4.6. Ensaios sorológicos

4.6.1. Cultivo celular

Para a realização do teste de titulação viral e do teste de neutralização por redução de placa (PRNT) de OPVs, é necessária a utilização de células do tipo BSC-40. Se trata de uma linhagem celular de origem animal, proveniente do epitélio de rim de *Cercopithecus aethiops*, uma espécie de primata do Velho Mundo. É uma linhagem celular aderente, apresentando condições ótimas de manutenção a 37°C e 5% de CO₂ e susceptível ao VACV (ATCC, 2023a). Desta forma, células BSC-40 eram mantidas sob estas condições de temperatura e atmosfera, com repiques periódicos, cultivadas em Meio Essencial Mínimo Eagle (MEM), suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB), 1% de anfotericina, 1% de penicilina-estreptomicina e 1% L-glutamina.

4.6.2. Titulação de *Vaccinia virus Western Reserve (VACV-WR)*

Para a realização do teste PRNT, foi necessário determinar o título viral das amostras de VACV-WR que foram utilizadas para o cálculo da quantificação de anticorpos neutralizantes anti-OPV nas amostras de soro dos animais. O VACV-WR é amplamente utilizado em ensaios sorológicos envolvendo OPVs, e sua titulação foi realizada conforme protocolo específico (Kroon *et al.*, 2016).

Desta forma, a alíquota a ser titulada foi submetida a três ciclos alternados de sonicação por 30 segundos e inserção do tubo em gelo também por 30 segundos. Após este processo, foram realizadas diluições seriadas do vírus, por dez vezes até a diluição de 10^{-10} , em MEM sem a adição de SFB. Cada uma destas diluições foi inoculada em monoplicata em placas de 6 poços, as quais continham células da linhagem BSC-40 preparadas previamente e mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Em seguida, foi realizada a adsorção das placas por 1 hora, em intervalos de 15 minutos.

Decorrido este tempo, adicionou-se 2 mL de MEM suplementado com 1% de SFB a cada poço, e as placas foram mantidas novamente em estufa sob as mesmas condições de temperatura e atmosfera por 48 horas. Em cada placa, foi mantido um poço de controle negativo, onde não houve inoculação de vírus, ocorrendo somente a manutenção das células com 2 mL de MEM. Após o período de 48 horas, as placas foram fixadas com formaldeído 3,7% por 30 minutos e coradas com cristal violeta a 1% por 15 minutos. Por fim, após a lavagem em água corrente e secagem das placas, o título viral foi calculado, sendo este realizado sob a seguinte fórmula:

$$\frac{\text{Número de placas de lise} \times \text{inverso da diluição do poço} \times 1000}{\text{Volume utilizado na infecção}}$$

Nesta fórmula, determina-se como “número de placas de lise” o número de placas contado em um único poço das placas infectadas. O “inverso da diluição do poço”, por sua vez, corresponde à diluição deste mesmo poço onde se contaram as placas de lise. O título foi determinado em unidades formadoras de placa por mililitro (PFU/mL).

4.6.3. Teste de neutralização por redução de placa (PRNT)

Este ensaio tem como objetivo principal detectar e quantificar o título de anticorpos neutralizantes em amostras de soro para o vírus de interesse. Para a realização desta técnica em

OPVs, o protocolo seguido corresponde ao que foi proposto por Newman *et al.* (2003) com modificações propostas por Kroon *et al.* (2016). As amostras de soro foram submetidas a banho-maria a 56°C por 30 minutos para inativação do sistema do complemento. Após isso, as amostras a serem testadas foram diluídas na proporção de 1:20 em meio MEM sem suplementação por soro fetal bovino (SFB). Seguidamente, as amostras diluídas receberam o mesmo volume de MEM contendo a diluição de VACV-WR previamente titulado para formação de 100 a 150 unidades formadoras de placas (PFU) – o vírus aqui utilizado recebeu o mesmo tratamento de sonicação descrito no item 4.6.2. Os controles de vírus utilizados na técnica receberam o mesmo tratamento das amostras de soro, substituindo a amostra de soro-teste por soro fetal bovino.

A mistura formada por “soro-teste e vírus” foi incubada em estufa de CO₂ a 5% na temperatura de 37°C por 16 horas. Decorrido este tempo, as amostras foram inoculadas em duplicata em placas de 6 poços contendo células BSC-40, adsorvidas por 1 hora com intervalos de 15 minutos e, então, os poços receberam a complementação de 2 mL de MEM suplementado a 1% com SFB. As placas são novamente incubadas em estufa de CO₂ a 5% e 37°C mas, desta vez, por 48 horas até que seja possível a observação do efeito citopático nas células. Após este período, as placas foram fixadas em formaldeído a 3,7% por 30 minutos e coradas com cristal violeta a 1% por 15 minutos. As placas de lise geradas foram contadas manualmente e foram consideradas positivas as amostras que apresentaram redução maior ou igual a 50% do número de placas de lise quando comparados ao número de placas de lise observadas nos poços de controle de vírus.

5. RESULTADOS

5.1. Diversidade observada de pequenos mamíferos e amostragem por expedição, locais de captura e transectos selecionados

Ao final das quatro expedições em campo, onde o esforço amostral foi de 15.120 tentativas no total, foram capturados 210 pequenos mamíferos, o que corresponde ao sucesso de 1,39% das tentativas realizadas. Destes 210 animais, 143 (ou 68,10%) pertenciam a Ordem Didelphimorphia e 67 (ou 31,90%) pertenciam a Ordem Rodentia. Dentre os animais capturados, foi possível observar uma significativa diversidade de espécies, tanto de roedores quanto de marsupiais, como está ilustrado na tabela 4:

Ordem	Gênero/Espécie	Nome Popular Brasileiro	Nº de indivíduos	
			<i>n</i>	%
Didelphimorphia	<i>Caluromys philander</i>	Cuíca lanosa	1	0,48
	<i>Didelphis albiventris</i>	Gambá de orelha branca	29	13,81
	<i>Didelphis aurita</i>	Gambá de orelha preta	67	31,90
	<i>Gracilianus sp.</i>	Cuíca graciosa	2	0,95
	<i>Marmosops incanus</i>	Cuíca cinza	40	19,05
	<i>Monodelphis americana</i>	Cuíca de três listras	1	0,48
	<i>Philander frenatus</i>	Cuíca de quatro olhos	3	1,43
Total de Marsupiais			143	68,10
Rodentia	<i>Akodon sp.</i>	Rato do chão	1	0,48
	<i>Calomys cf tener</i>	Camundongo do campo	2	0,95
	<i>Calomys cf expulsus</i>	Camundongo do campo	3	1,43
	<i>Calomys sp.</i>	Camundongo do campo	6	2,86
	<i>Cerradomys sp.</i>	Rato do mato	1	0,48
	<i>Cerradomys subflavus</i>	Rato do mato	1	0,48
	<i>Mus musculus</i>	Camundongo	7	3,33
	<i>Necomys lasiurus</i>	Rato do mato	18	8,57
	<i>Necomys sp.</i>	Rato do mato	1	0,48
	<i>Nectomys squamipes</i>	Rato d'água	1	0,48
	<i>Oligoryzomys nigripes</i>	Rato do mato	8	3,81
	<i>Oligoryzomys sp.</i>	Rato do mato	11	5,24
	<i>Rattus rattus</i>	Rato preto	3	1,43
	<i>Rhipidomys sp.</i>	Rato das árvores	2	0,95
	<i>Trinomys cf setosus</i>	Rato de espinho	2	0,95
Total de Roedores			67	31,90
Total de amostras			210	100,00

Tabela 4. Espécies de pequenos mamíferos capturados. Em “*n*”, indica-se o número total de indivíduos capturados pertencentes àquela espécie. Em “%”, indica-se o percentual que este “*n*” corresponde ao total de indivíduos capturados no estudo. Fonte: Do próprio autor.

A diversidade de roedores e marsupiais pode ser observada ao longo das quatro expedições realizadas em campo. Entre os 210 animais capturados, 51 (o que corresponde a 24,29% do total de animais) foram capturados na primeira expedição, onde 26 (12,38%) eram marsupiais e 25 (11,90%) eram roedores. Esta expedição, realizada em fevereiro de 2021, ocorreu durante o verão, onde o clima é tipicamente quente e úmido, com diversos registros de chuvas. Já a expedição seguinte, por sua vez, ocorreu durante o outono, uma estação onde o clima está menos quente e com menos registros de chuvas quando comparado ao verão. Nesta segunda expedição, que ocorreu em maio de 2021, 36 animais (17,14%) foram capturados, dos quais 22 (10,48%) eram marsupiais e 14 (6,67%) eram roedores.

63 animais (30,00%) tiveram sua captura na terceira expedição, sendo que, destes, 48 (22,86%) eram marsupiais e 15 (7,14%) eram roedores. Por fim, 60 animais (28,57%) foram capturados ao decorrer da quarta expedição, dos quais 47 (22,38%) eram marsupiais e 13 (6,19%) eram roedores. Tanto a terceira quanto a quarta expedições, realizadas em julho e agosto de 2021, respectivamente, ocorreram durante o inverno brasileiro, onde o clima se apresenta mais frio e seco, sem registros de chuvas.

Além do sucesso de captura ao longo de todas as expedições em campo, foi possível realizar a amostragem de pequenos mamíferos em todas as fazendas A, B e C. Na fazenda A, foram capturados 37 animais (correspondente a 17,62% dos 210 pequenos mamíferos do estudo), sendo que, destes, 17 (8,10%) eram marsupiais e 20 (9,52%) eram roedores. Na fazenda B, realizou-se a captura de 78 (37,14%) pequenos mamíferos, onde 76 (36,19%) eram marsupiais e apenas 2 (0,95%) eram roedores. Por fim, na fazenda C, 95 (45,24%) animais foram capturados, sendo estes 50 (23,81%) marsupiais e 45 (21,43%) roedores.

Em todos os três tipos de transectos selecionados (sendo estes o transecto montado em área de peridomicílio, o transecto montado em área de pastagem e o transecto montado em área de mata nativa) foi obtido êxito de amostragem de pequenos mamíferos. Na região de peridomicílio, foi possível realizar a captura de 63 (30,00%) animais, onde 22 (10,48%) eram marsupiais e 41 (19,52%) eram roedores. Na região de pastagem do gado leiteiro, 28 (13,33%) pequenos mamíferos foram capturados, sendo estes 14 (6,67%) marsupiais e 14 (6,67%) roedores. Por fim, na região de mata nativa, houve a captura de 119 (56,67%) animais, onde 107 (50,95%) eram marsupiais e 12 (5,71%) eram roedores. Estes dados de distribuição de roedores e marsupiais por expedições, fazenda e transectos podem ser melhor observados na tabela 5.

		Marsupiais		Roedores		Total	
		<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
Expedição							
	<i>Fevereiro de 2021</i>	26	12,38	25	11,90	51	24,29
	<i>Mai de 2021</i>	22	10,48	14	6,67	36	17,14
	<i>Julho de 2021</i>	48	22,86	15	7,14	63	30,00
	<i>Agosto de 2021</i>	47	22,38	13	6,19	60	28,57
	<i>Total</i>	143	68,10	67	31,90	210	100,00
Fazenda							
	<i>A</i>	17	8,10	20	9,52	37	17,62
	<i>B</i>	76	36,19	2	0,95	78	37,14
	<i>C</i>	50	23,81	45	21,43	95	45,24
	<i>Total</i>	143	68,10	67	31,90	210	100,00
Transecto							
	<i>Peridomicílio</i>	22	10,48	41	19,52	63	30,00
	<i>Pasto</i>	14	6,67	14	6,67	28	13,33
	<i>Mata nativa</i>	107	50,95	12	5,71	119	56,67
	<i>Total</i>	143	68,10	67	31,90	210	100,00

Tabela 5. Distribuição de pequenos mamíferos por expedições, fazendas e transectos selecionados. Em todas as três principais variáveis foi possível observar a captura tanto de roedores quanto de marsupiais. Fonte: Do próprio autor.

5.2. Condições climáticas, diversidade entre machos e fêmeas e observações complementares de pequenos mamíferos

Como mencionado anteriormente, as expedições em campo para captura dos pequenos mamíferos ocorreram em diferentes épocas/estações do ano. Desta forma, as condições de clima tiveram oscilações ao decorrer das expedições, com tentativas de captura ocorrendo em dias de temperatura mais quente, temperatura mais fria, além de dias chuvosos e ensolarados.

Ambos os fatores de temperatura e pluviosidade interferem na paisagem, como alterando as condições da vegetação e, assim, também interferem diretamente no comportamento dos pequenos mamíferos e sua busca por alimento. A dualidade observada na vegetação em duas expedições diferentes pode ser observada na figura 17.



Figura 17. Alterações de paisagem devido ao clima. À esquerda, uma fotografia registrada durante a primeira expedição, ocorrida no verão, em fevereiro de 2021, onde se nota a vegetação mais viva. À direita, uma fotografia registrada durante a terceira expedição, em julho de 2021, durante o inverno. Nesta, já é possível observar a vegetação mais seca. Fonte: Do próprio autor.

Na maioria dos casos, foi possível observar a relação entre machos e fêmeas capturados, além de estágio de vida em que se encontravam. Dos 210 animais capturados, foi observado um equilíbrio entre os gêneros, onde 92 (43,81%) eram machos, 92 (43,81%) eram fêmeas e em 26 (12,38%) animais não foi possível realizar a identificação. Além disso, a idade relativa da maioria dos animais também pode ser analisada, onde 123 (58,57%) dos animais se encontravam em estágio adulto, 45 (21,43%) em estágio juvenil, 3 (1,43%) eram infantes e, por fim, em 39 (18,57%) animais não foi possível determinar seu estágio de vida.

Durante as capturas dos pequenos mamíferos, diversos animais apresentavam características diferenciadas em relação a maioria dos outros animais. Em diversos casos, foi possível observar a presença de ectoparasitas aderidos a pelagem e de helmintos parasitos em seus sistemas digestórios. Desta forma, estes ectoparasitas e helmintos parasitos foram coletados e imersos em tubos do tipo Eppendorf contendo álcool absoluto para estudos posteriores de identificação e caracterização. Estes organismos não foram englobados por este trabalho.

Dentre as 210 capturas realizadas, 58 (27,62%) correspondiam a recapturas de pequenos mamíferos. Estas recapturas eram previstas no estudo, uma vez que animais que se encontrassem em período de gestação e todos os marsupiais do gênero *Didelphis* não seriam eutanasiados, mas seriam libertados novamente ao ambiente após coleta de amostras de sangue. Coincidentemente, todos os 58 animais recapturados pertenciam ao gênero *Didelphis* e, assim, receberam um número de identificação em uma anilha presa às suas orelhas antes de sua libertação (Figura 18). A coleta de sangue destes animais ocorria somente quando capturados pela primeira vez durante o estudo.



Figura 18. Pequeno mamífero da espécie *Didelphis aurita* pós captura. À esquerda, o animal ainda dentro da armadilha do tipo Tomahawk, onde é possível observar a anilha de identificação em sua orelha direita, indicando que este animal já havia sido capturado no estudo. Desta forma, o animal foi libertado ao ambiente, como é demonstrado na fotografia à direita. Fonte: Do próprio autor.

Além disso, alguns animais foram encontrados já falecidos nas armadilhas durante as expedições. Isto pode ter ocorrido por diversos fatores, como condições de saúde do próprio animal e baixa resistência ao clima frio durante a noite em que estavam aprisionados. Adicionalmente, alguns animais foram capazes de escapar das armadilhas no momento de transferência para o saco de tecido, sendo possível apenas sua identificação taxonômica, mas não a coleta de amostras. Desta forma, as amostras de sangue/soro e de órgãos coletados diferem

do número total de animais capturados no estudo. Nenhum dos animais amostrados apresentavam lesões na pele que pudessem indicar uma infecção por OPV.

5.3. N amostral de fígados e de soros de pequenos mamíferos e processamento para ensaios laboratoriais

A amostragem de fígados e de soros – sendo estas as amostras-alvo iniciais selecionadas para o estudo – foi possível de ser realizada para a grande maioria dos pequenos mamíferos capturados. Dentre as amostras de fígado, foi possível realizar a coleta a partir de 107 (50,95%) dos animais, sendo que 46 (21,90%) eram provenientes de marsupiais e 61 (29,05%) eram provenientes de roedores. Quanto as amostras de soro, 142 (67,62%) amostras foram coletadas, onde 88 (41,90%) eram provenientes de marsupiais e 54 (25,71%) eram provenientes de roedores.

As amostras de fígados e soros coletadas foram submetidas aos ensaios mencionados nos Itens 4.5 e 4.6, conforme determinado para cada tipo de amostra-alvo. A distribuição de amostras de fígados e soros coletados pode ser observada na tabela 6:

	Marsupiais		Roedores		Total	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
Amostra						
<i>Fígado</i>	46	21,90	61	29,05	107	50,95
<i>Soro</i>	88	41,90	54	25,71	142	67,62

Tabela 6. Distribuição de amostras de fígados e soros coletados dos pequenos mamíferos. Fonte: Do próprio autor.

5.4. Resultados observados em ensaios de PCR em tempo real

Após a extração do DNA das amostras de fígados e da diluição das amostras de soros dos pequenos mamíferos, as amostras foram submetidas, inicialmente, ao teste de PCR em tempo real para tentativa de amplificação do gene β -actina murino como controle endógeno das extrações de DNA. Este é um gene constitutivo de roedores e que também se mostrou eficaz quando utilizado na amplificação de DNA de amostras de marsupiais, como mencionado anteriormente. Realizada a PCR em tempo real com este gene-alvo, foram realizados os testes de PCR para os genes C11R, A56R e E9L, os quais são três genes de ortopoxvírus e que foram os genes selecionados neste estudo para investigação molecular.

Todas as 107 amostras de fígado e todas as 142 amostras de soro apresentaram resultados positivos no controle endógeno de β -actina murino, conforme ilustra a figura 19. Entretanto, nenhuma destas amostras de fígados ou soros testadas demonstraram resultados positivos para quaisquer dos três genes-alvo de ortopoxvírus. A tabela 7 ilustra alguns dos resultados obtidos nos ensaios moleculares.

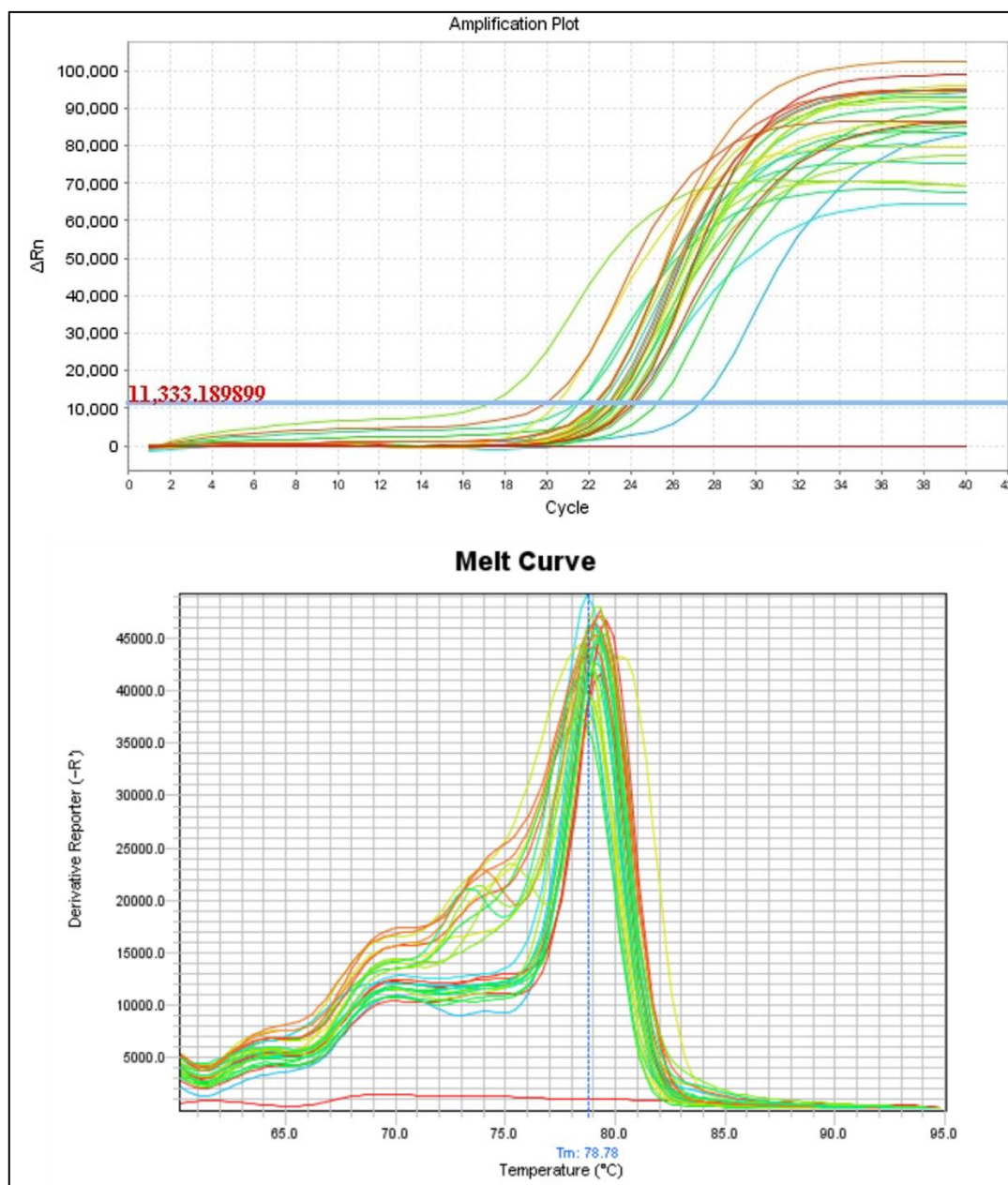


Figura 19. Resultados observados na análise da qPCR para o gene de β -actina murino. Na imagem acima, observa-se a curva de amplificação, com indicação do sinal fluorescente comparado ao número do ciclo. O CT médio desta reação foi de 22,35. O threshold desta reação também pode ser observado na imagem. Abaixo, encontra-se a curva de *melting*, onde é possível observar que a temperatura de *melting* (T_m) das amostras se alinha à temperatura do controle positivo. Nesta PCR, há resultados de amostras tanto de roedores quanto de marsupiais. Fonte: Do próprio autor.

	<i>n</i>	Genes-alvo para qPCR			
		β -actina murino (Gene constitutivo de roedores)	C11R (virus growth factor)	A56R (Hemaglutinina viral)	E9L (DNA polimerase)
Amostra					
Fígado	107	+	-	-	-
Soro	142	+	-	-	-

Tabela 7. Resultados obtidos nos testes de PCR em tempo real para β -actina murino e genes-alvo de ortopoxvírus do estudo. Em destaque na tabela, os resultados positivos para o gene de β -actina murino. Entretanto, nenhum dos genes-alvo de OPVs demonstraram amplificação de material genético. Fonte: Do próprio autor.

5.5. Resultados dos ensaios sorológicos de PRNT e descrição dos pequenos mamíferos positivos

Além das testagens moleculares, as amostras de soro foram também submetidas ao teste de neutralização por redução de placa (PRNT), visando avaliar a presença de anticorpos neutralizantes para OPVs. Desta forma, com a realização da testagem das 142 amostras de soro obtidas neste estudo, 5 amostras (ou o correspondente a 3,52% do total de soros testados) apresentaram resultados positivos, demonstrando percentual de neutralização maior que 50% quando comparadas ao controle de vírus utilizado.

Dentre as cinco amostras positivas, três amostras pertenciam a três espécies diferentes de roedores, sendo estas *Trinomys cf setosus*, *Nectomys squamipes* e *Oligoryzomys sp.*, enquanto as outras duas amostras pertenciam a uma única espécie de marsupial, o *Marmosops incanus*. A espécie de roedor *Trinomys cf setosus* apresentou percentual de soroneutralização para OPVs de 63,51%, enquanto a espécie *Nectomys squamipes* apresentou percentual de soroneutralização de 84,48%. A espécie *Oligoryzomys sp.*, por sua vez, apresentou percentual de soroneutralização de 55,45%. Quanto aos marsupiais, duas amostras diferentes de uma mesma espécie, o *Marmosops incanus*, apresentaram percentual de soroneutralização para OPVs em 70,54% e 60,00%, respectivamente.

Os animais positivos foram capturados em três expedições diferentes, sendo o roedor da espécie *Trinomys cf setosus* capturado na segunda expedição, ocorrida em maio de 2021. O roedor da espécie *Nectomys squamipes* e um marsupial da espécie *Marmosops incanus* foram capturados na terceira expedição, ocorrida em julho de 2021. Por fim, o roedor *Oligoryzomys sp.* e o segundo marsupial da espécie *Marmosops incanus* foram capturados na quarta e última expedição, ocorrida em agosto de 2021.

É válido ressaltar que foi possível capturar pelo menos um animal positivo por fazenda e pelo menos um animal positivo por tipo de transecto selecionado. O roedor *Oligoryzomys sp.* foi capturado na fazenda A em um transecto montado em área de pastagem. Já os roedores *Trinomys cf setosus* e *Nectomys squamipes* foram capturados na fazenda B em transectos montados em área de mata nativa e de peridomicílio, respectivamente. Quanto aos marsupiais da espécie *Marmosops incanus* com resultados positivos, ambos foram capturados na fazenda C, em armadilhas montadas num transecto selecionado na área de mata nativa.

Quatro destes cinco pequenos mamíferos positivos se encontravam em estágio adulto da vida. Três destes animais pertenciam ao sexo masculino (o roedor *Nectomys squamipes* e os dois marsupiais da espécie *Marmosops incanus*), enquanto um animal pertencia ao sexo feminino (*Trinomys cf setosus*). O quinto pequeno mamífero (*Oligoryzomys sp.*) não foi possível realizar a identificação de seu sexo e se encontrava em estágio juvenil. A correlação entre as principais características aqui descritas para cada animal positivo pode ser observada na tabela 8, e a demonstração dos animais positivos por fazenda pode ser observada na figura 20.

Amostra	Data de captura	Condições do clima	Ordem	Gênero/Espécie	Sexo	Idade	Fazenda	Transecto de captura	PRNT	
									Resultado	Percentual de soroneutralização
46	11/05/2021	Seco e frio	Rodentia	<i>Trinomys cf setosus</i>	Fêmea	Adulto	B	Mata nativa	+	63,51%
84	01/07/2021	Seco e frio	Didelphimorphia	<i>Marmosops incanus</i>	Macho	Adulto	C	Mata nativa	+	70,54%
111	07/07/2021	Seco e frio	Rodentia	<i>Nectomys squamipes</i>	Macho	Adulto	B	Peridomicílio	+	84,48%
142	03/08/2021	Seco e frio	Didelphimorphia	<i>Marmosops incanus</i>	Macho	Adulto	C	Mata nativa	+	60,00%
192	14/08/2021	Seco e frio	Rodentia	<i>Oligoryzomys sp.</i>	Não identificado	Jovem	A	Pasto	+	55,45%

Tabela 8. Pequenos mamíferos positivos para os testes sorológicos de PRNT. Fonte: Do próprio autor.

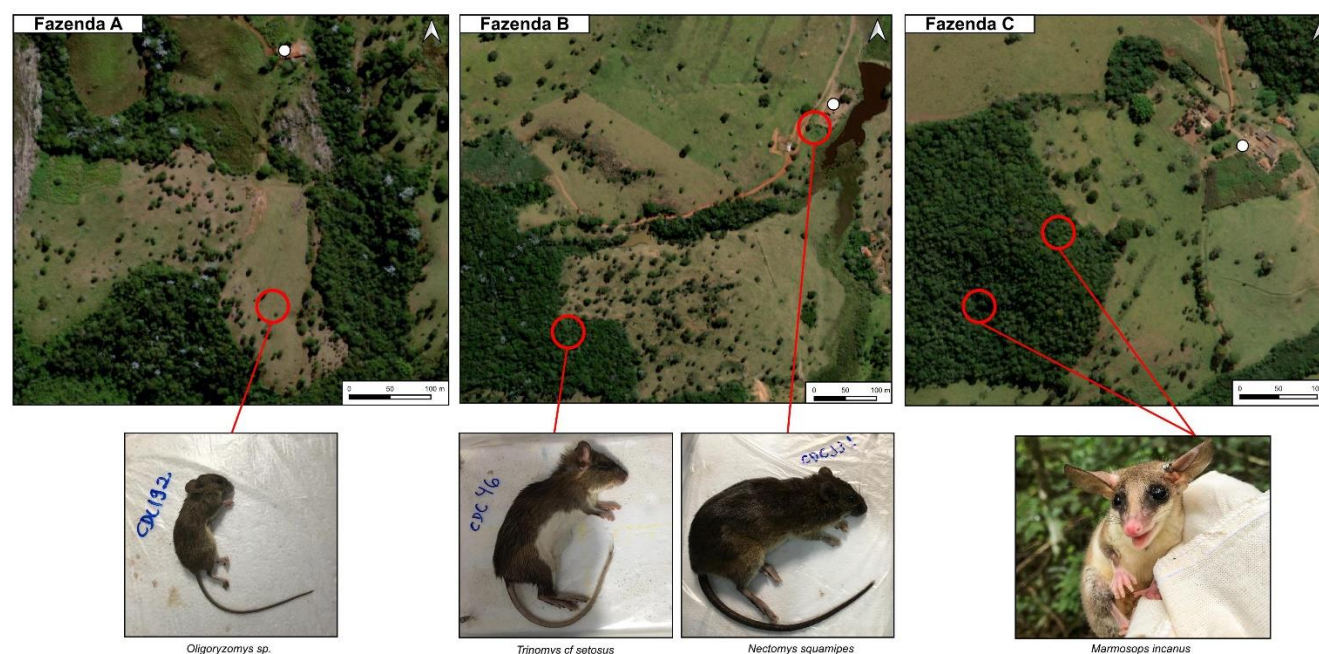


Figura 20. Correlação entre animais soropositivos na PRNT e seus locais de captura. Os pontos em branco indicam os locais das instalações das fazendas, e os círculos em vermelho indicam onde cada espécie de pequeno mamífero foi capturada. Imagem produzida por meio do software QGIS, versão 3.24.3. Fonte: Do próprio autor.

6. DISCUSSÃO

Doenças zoonóticas se apresentam como um grande problema para a saúde pública global. Atualmente, se tem conhecimento sobre uma ampla gama de patógenos transmitidos ao homem por meio de outros animais, sejam estes patógenos de origem bacteriana, fúngica, parasitária ou viral (Jones *et al.*, 2008). Preencher lacunas ainda não respondidas sobre os mais diversos organismos causadores de doenças tem se demonstrado como um dos melhores caminhos para evitar problemas futuros às populações mundiais.

Na virologia, a ciência tem sido capaz de discutir e desenvolver diversos métodos de combate e prevenção para diversos patógenos. Além de desenvolvimento de vacinas, fármacos e caracterização de diversas particularidades dos vírus, é de suma importância o entendimento sobre a epidemiologia de inúmeras espécies virais. Compreender sobre suas origens, espectro de hospedeiros, espécies reservatórias e perigos oferecidos aos seres humanos e outros animais contribui significativamente para que, assim, se possa definir quais as melhores alternativas nesse incessante combate a doenças causadas por vírus.

Dentre os vírus de caráter zoonótico e que ainda há muito a se responder sobre eles, as espécies do gênero *Orthopoxvirus* são grandes exemplos. No Brasil, circula majoritariamente o vaccínia vírus, infectando gado leiteiro e ordenhadores. A vaccínia bovina, doença de caráter exantemático que é causada por este vírus, vêm sendo estudada no país desde suas primeiras descrições ao final do século XX. Esta doença, que além do caráter zoonótico também possui caráter ocupacional, tem gerado impactos substanciais para produtores rurais e trabalhadores da ordenha, além de impactos diretos na economia leiteira ((Damaso *et al.*, 2000; Lobato *et al.*, 2005; Trindade *et al.*, 2003). Ao longo das duas últimas décadas, estudos envolvendo o VACV foram capazes de discutir sobre as mais diversas questões deste vírus e, assim, contribuir também com informações relevantes para a caracterização dos poxvírus em geral. Entretanto, mesmo após todos estes anos, as informações sobre como o VACV se mantém no ambiente permanecem pouco esclarecidas.

A presença de pequenos mamíferos em ambientes rurais, como em fazendas, é frequentemente observada. No município do Serro, que está situado em uma área endêmica para a circulação de VACV, a presença de roedores e marsupiais em fazendas leiteiras é um fator determinante para a condução de estudos envolvendo este vírus, uma vez que estes animais

podem estar diretamente relacionados à sua manutenção na natureza (Abrahão *et al.*, 2009a; Miranda *et al.*, 2017). No presente estudo, a seleção das três fazendas, dos diferentes tipos de transectos e as expedições em campo realizadas em diferentes épocas/estações do ano foram de grande importância para a amostragem dos pequenos mamíferos.

O município do Serro se encontra em uma região de transição entre os biomas do Cerrado e da Mata Atlântica, como mencionado anteriormente (IBGE, 2021). Desta forma, as fazendas A, B e C deste estudo estão inseridas nas condições ambientais que estes biomas oferecem, como composição de vegetação e índice de pluviosidade. Dentre estas características, a diversidade observada de roedores e marsupiais neste estudo está em alinhamento com o que é comumente observado em outros trabalhos envolvendo pequenos mamíferos silvestres destes biomas. Todas as espécies capturadas no presente trabalho já tiveram seu registro de circulação no Brasil, sejam elas endêmicas do país ou não. Além disso, não houve a captura de nenhuma espécie de pequeno mamífero com caráter exótico (Bonvicino *et al.*, 2008; Cerqueira, 2005; Paglia *et al.*, 2012).

As condições de clima também interferem diretamente na amostragem destes animais. Como o estudo foi conduzido em diferentes expedições e em diferentes épocas/estações do ano, esperava-se que a temperatura do ambiente, os índices de chuva e a condição da vegetação alterassem ao longo do tempo. Com isso, esperava-se também a alteração dos perfis de captura de pequenos mamíferos por expedição. Durante a primeira expedição, com o clima mais quente e chuvoso, a proporção entre roedores e marsupiais capturados foi semelhante, conforme descrito anteriormente no Item 5.1. Já nas três expedições seguintes, onde o clima se apresentava mais frio e seco, esta proporção foi alterada, e o número de captura de marsupiais capturados passou a se apresentar bem mais alto que o número de roedores.

Essa alteração observada corrobora com estudos de comportamento de pequenos mamíferos, onde foi demonstrado que durante períodos mais frios e secos, embora diversas espécies permaneçam por mais tempo em seus abrigos, seu forrageamento é aumentado e, assim, o espaço explorado por estes animais em busca de alimento também apresenta aumento, facilitando sua captura (Bergallo & Magnusson, 1999; Vickery & Bider, 1981). A alta taxa de animais adultos capturados neste estudo também pode estar relacionada ao forrageamento aumentado em diferentes expedições. Em pequenos mamíferos, é comum a observação de animais adultos explorando maiores distâncias no ambiente em busca de alimento do que

animais jovens ou infantes, que tendem a permanecer nos ninhos sob cuidado parental ou maternal (Cerqueira, 2005). No presente estudo, houve a captura de um maior número de indivíduos adultos quando comparados com o número de indivíduos juvenis e infantes, o que corrobora com as informações disponíveis na literatura.

Dentre os transectos montados em área de peridomicílio, área de pastagem do gado leiteiro e área de mata nativa, observou-se que esta última foi o local onde mais se obteve sucesso nas capturas de animais. Apesar de ser possível a observação de comportamento sinantrópico em algumas espécies capturadas neste estudo, como *Didelphis spp.*, *Akodon sp.*, *Calomys sp.*, *Mus musculus*, *Nectomys sp.*, *Oligoryzomys sp.*, *Rattus rattus*, *Rhipidomys sp.* e *Trinomys sp.*, diversos indivíduos destas espécies foram capturados em área de mata nativa (FUNASA, 2002; Paglia *et al.*, 2012). Esta observação pode estar relacionada às próprias condições do ambiente de mata nativa, onde os pequenos mamíferos se encontram em uma região mais protegida de predadores e outros fatores externos que possam oferecer riscos à eles e, assim, a amostragem observada neste tipo de transecto foi significativamente maior do que nos outros tipos de transectos montados (Paste & Voltolini, 2013).

Quanto às técnicas laboratoriais utilizadas no estudo, a técnica de PCR em tempo real é bastante utilizada para diversos fins, devido a sua fácil reprodutibilidade e acurácia nos resultados. Esta técnica permite que pequenas quantidades de material genético presente nas amostras sejam amplificadas milhares de vezes, permitindo sua detecção, quantificação e caracterização das amostras (Valasek & Repa, 2005). A utilização da PCR em tempo real para fins de diagnóstico neste trabalho contribuiu significativamente para as análises dos resultados do presente estudo.

A utilização da abordagem multi-alvo nos testes de qPCR neste estudo, onde diferentes genes-alvo foram selecionados para o diagnóstico das infecções, permitiu a ampliação da possibilidade de detecção com os genes selecionados. O gene C11R, responsável pela codificação do fator de crescimento viral em OPVs, é de grande valia em testes de diagnóstico via PCR devido à sua alta sensibilidade de detecção nos ensaios, uma vez que este gene é altamente conservado entre os OPVs e possui duas cópias no genoma dos vírus deste gênero (Abrahão *et al.*, 2010a). O gene A56R, responsável pela codificação da hemaglutinina viral, além de permitir o diagnóstico de infecção por OPVs também permite a diferenciação entre os VACVs pertencentes ao grupo I e ao grupo II, uma vez que este gene apresenta a deleção de 18

nucleotídeos que permite separar os isolados entre estes dois grupos (Trindade *et al.*, 2008). O gene E9L, responsável pela DNA polimerase viral e que também foi utilizado neste estudo, é um gene que se encontra presente em todos os OPVs, exceto o vírus da varíola. Desta forma, além de ser muito eficiente para o diagnóstico de infecções por espécies virais deste gênero, sendo bastante específico por utilizar as sondas de hidrólise TaqMan e amplificar somente o DNA alvo, sua utilização ainda permite que somente amostras de origem não-variólicas sejam amplificadas, auxiliando na caracterização do OPV presente na amostra (Li *et al.*, 2006).

No presente trabalho, não foi possível detectar o DNA viral em nenhuma das amostras de fígados e soros testadas. Uma hipótese que possa explicar a ausência de material genético nestas amostras pode estar relacionada a dificuldade de captura e amostragem de animais com infecções ativas por VACV. Não há muitos estudos sobre a persistência do VACV no organismo de roedores e marsupiais e por quanto tempo pós infecção estes animais ainda se mantêm infectados e excretando o vírus ou seu material genético. Entretanto, um estudo com roedores sentinela permitiu demonstrar que roedores apresentavam anticorpos anti-OPV em suas amostras de soro, e excretavam partículas infecciosas de VACV em suas fezes por aproximadamente 30 dias pós infecção, sugerindo que as partículas virais eliminadas nos excrementos desses animais podem atuar na manutenção do VACV no ambiente (Ferreira *et al.* 2008). Adicionalmente, um estudo semelhante envolvendo MPXV em roedores da espécie *Cynomys ludovicianus* demonstrou que estes animais mantêm a viremia e excretam partículas viáveis deste vírus em suas fezes por aproximadamente 12 dias pós infecção (Hutson *et al.*, 2009). Dessa forma, caso o VACV se comporte nestes pequenos mamíferos da mesma forma que já foi observado nos seres humanos e em bovinos, é pouco provável que estes animais mantenham esta infecção por um longo período e, após o período de infecção, também há pouca probabilidade de persistência do vírus em seus organismos (Assis *et al.*, 2012; Kroon *et al.*, 2011; Trindade *et al.*, 2016). Novos estudos para melhor entender como se dá a persistência de VACV em roedores e marsupiais se mostram necessários.

As amostras que apresentaram resultados positivos nos testes sorológicos são de grande valia para a discussão epidemiológica do VACV no ambiente silvestre. A captura de animais soropositivos em diferentes transectos (peridomicílio, área de pastagem e de mata nativa), como ocorreu para os animais da espécie *Oligoryzomys sp.* e onde um desses animais apresentou resultados positivos na PRNT, permite sugerir a circulação do vírus em diferentes ambientes (Abrahão *et al.*, 2009a; Miranda *et al.*, 2017; Peres *et al.*, 2018). Além disso, a

captura destes pequenos mamíferos nas diferentes fazendas amostradas permite discutir sobre a disseminação do vírus no município do Serro, visto que as fazendas possuem distâncias geográficas relativamente grandes entre si e não possuem conexão direta, como pode ser observado anteriormente na figura 15. Esta provável disseminação pode estar ocorrendo por meio do reservatório ainda desconhecido de VACV, que pode estar transitando por diferentes regiões, ou também por meio de animais amplificadores do vírus, como os bovinos, que são capazes de excretar partículas viáveis do vírus em suas fezes e, assim, eliminar o vírus no ambiente (Guedes *et al.*, 2013).

A relação do VACV com pequenos mamíferos pode ser observada em estudos realizados desde a década de 1960, onde o primeiro isolado do vírus no Brasil, a linhagem BeAn58058, é proveniente de amostras de um roedor do gênero *Oryzomys*, naturalmente infectado e capturado na floresta amazônica, e o segundo isolado, a linhagem SPAn232, é proveniente de um roedor sentinela capturado no estado de São Paulo (Fonseca *et al.*, 2002; Fonseca *et al.*, 1998). Além destes primeiros estudos, outros também foram capazes de realizar o isolamento e caracterização de linhagens de VACV, como o estudo onde foi descrito pela primeira vez a linhagem *Belo Horizonte virus* (VBH), obtida por meio de um roedor naturalmente infectado (Trindade *et al.*, 2004), e o estudo onde se foi possível realizar o isolamento de uma linhagem de VACV denominada *Mariana virus* (MARV). Este último, por sua vez, foi realizado a partir de amostras de um roedor da espécie *Mus musculus* capturado durante a ocorrência de um surto de vaccínia bovina, levantando a discussão sobre a possibilidade destes animais atuarem como um elo entre o gado leiteiro e a vida silvestre (Abrahão *et al.*, 2009a). Além deste isolamento, foram detectados anticorpos anti-OPV em outras duas amostras de *Mus musculus* neste mesmo estudo (Abrahão *et al.*, 2009a).

A detecção de DNA viral via testes de PCR e de anticorpos anti-OPV já foi observada em amostras de marsupiais do gênero *Didelphis* e da espécie *Caluromys philander* (Miranda *et al.*, 2017; Peres *et al.*, 2013; Peres *et al.*, 2016). Adicionalmente, outros estudos demonstraram a soroprevalência de anticorpos anti-OPV em outras espécies de roedores, como *Akodon cursor*, *Euryoryzomys russatus*, *Calomys sp.*, *Mus musculus*, *Nectomys squamipes*, *Necromys lasiurus*, *Oligoryzomys nigripes*, *Oligoryzomys flavescens* e *Sooretamys angouya* (Miranda *et al.*, 2017; Peres *et al.*, 2013; Schatzmayr *et al.*, 2011). DNA viral de VACV já foi observado em amostras das espécies de roedores *Calomys sp.*, *Necromys lasiurus*, *Trinomys setosus*, *Cerradomys subflavus* e *Mus musculus* (Miranda *et al.*, 2017). Roedores de grande porte, como as capivaras

(*Hydrochoerus hydrochaeris*), também já foram fonte de estudos, onde foi possível realizar a detecção de DNA viral em amostras provenientes destes animais (Barbosa *et al.*, 2014; Dutra *et al.*, 2017). Todos estes estudos ressaltam a capacidade destes pequenos mamíferos de participarem ativamente em ciclos naturais do VACV no ambiente, reforçando a necessidade de mais estudos que contribuam para entender como os roedores e marsupiais atuam no ciclo deste vírus.

Além de fomentar as hipóteses de estudos anteriores sobre a circulação do VACV no ambiente, a detecção de anticorpos anti-OPV em pequenos mamíferos silvestres neste estudo apresenta uma particularidade de grande relevância: ao nosso conhecimento, esta é a primeira vez em que se detecta anticorpos neutralizantes para OPVs em amostras provenientes de marsupiais da espécie *Marmosops incanus*. Este marsupial pode ser encontrado em diferentes biomas brasileiros, onde sua circulação é descrita nos biomas de Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica. Esta espécie possui hábitos noturnos e pode apresentar peso corporal entre 20 e 140 gramas, tem hábitos de alimentação insetívoros ou onívoros e se reproduzem durante estações chuvosas (Loretto & Vieira, 2008; Paglia *et al.*, 2012). Além destas características, a espécie apresenta baixo comportamento de locomoção, explorando regiões restritas do ambiente em que se encontram, e tem hábitos escansoriais, vivendo tanto no estrato arbóreo quanto no chão (Paglia *et al.*, 2012).

Considerando que estas amostras de *Marmosops incanus* soropositivas foram capturadas em áreas de mata da fazenda C, que estas referidas áreas estão distantes geograficamente das instalações das fazendas – o que reduz a possibilidade de contato entre estes animais e possíveis animais domésticos infectados por VACV – e, por fim, considerando os hábitos de vida de pouca locomoção característicos da espécie, a principal dúvida que se levanta é como estes animais podem ter sido infectados e soroconvertidos. Assim como foi proposto por estudos anteriores (Abrahão *et al.*, 2009a; Miranda *et al.*, 2017), é possível que alguma espécie de roedor atue na manutenção deste ciclo. Modelos hipotéticos discutidos nestes estudos permitem inferir que pequenos mamíferos peridomésticos, principalmente roedores, atuem como uma ponte de ligação entre diferentes ambientes, onde eles se infectam com o vírus nas instalações das fazendas durante surtos de VB e o carregam para a vida silvestre, infectando novas espécies de animais. Além disso, com o ciclo estabelecido na natureza, estes animais podem retro-alimentar esta circulação, carregando o vírus para o ambiente peridoméstico e, assim, infectar o gado leiteiro que, por sua vez, pode transmitir o vírus ao ser humano (Abrahão

et al., 2009a). É válido ressaltar que nenhum dos animais amostrados neste estudo, inclusive os animais soropositivos, apresentavam lesões ou cicatrizes pelo corpo que fossem indicativas de uma infecção prévia por VACV. A detecção de anticorpos anti-OPV em novas espécies de animais silvestres, como observado em amostras de *Marmosops incanus* neste estudo, fornecem informações adicionais sobre a circulação silenciosa do VACV na natureza.

Diversas informações sobre a relação do VACV e seu espectro de hospedeiros já foram elucidadas e contribuíram significativamente para descrever a cadeia ecoepidemiológica deste vírus. A cada novo estudo, é possível observar como este vírus tem se mantido bem estabelecido no país e como ainda há um vasto conhecimento a ser explorado. Conhecer as propriedades do VACV e como ele se estabelece em seus hospedeiros e em seu reservatório – este, por sua vez, permanece ainda desconhecido a todos – é de grande valia para a condução de estudos futuros, expandindo sobre nossa compreensão sobre este e outros OPVs cada vez mais presentes no nosso cotidiano. Assim, a condução de novos estudos de vigilância sobre o VACV e a vaccínia bovina em áreas endêmicas e não endêmicas permitirá a descrição de novos capítulos da história natural deste vírus no país.

7. CONCLUSÃO

A ausência de detecção do genoma viral nos ensaios moleculares de PCR em tempo real evidencia que, no momento da coleta, os animais amostrados não apresentavam infecção ativa. Além disso, estes resultados negativos podem estar relacionados à dificuldade técnica de capturar animais infectados ou com carga viral detectável. Por outro lado, a detecção de anticorpos anti-OPV em amostras de roedores e marsupiais sugere que estes possam ter sido expostos ao VACV anteriormente. A captura de animais soropositivos, principalmente em área de mata preservada, fomenta a hipótese de manutenção do VACV na natureza por meio de espécie(s) reservatória(s) ainda desconhecida(s). Por fim, ao que se tem conhecimento, o presente estudo detecta pela primeira vez anticorpos anti-OPV na espécie de marsupial *Marmosops incanus*, o que contribui para a discussão sobre a expansão do VACV para novas espécies de animais silvestres.

8. REFERÊNCIAS

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, 2009a.

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, 2009b.

ABRAHÃO, J. S. *et al.* Long-lasting stability of Vaccinia virus strains in murine feces: implications for virus circulation and environmental maintenance. **Archives of Virology**, v. 154, n. 9, p. 1551–1553, 1 set. 2009c.

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

ABRAHÃO, Jônatas S.; SILVA-FERNANDES, André T.; LIMA, Larissa S.; *et al.* Vaccinia Virus Infection in Monkeys, Brazilian Amazon. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 6, 2010b.

AGUILERA-ALONSO, D. *et al.* Monkeypox virus infections in children in Spain during the first months of the 2022 outbreak. **The Lancet Child & Adolescent Health**, v. 6, n. 11, p. e22–e23, 1 nov. 2022.

ALAKUNLE, Emmanuel; MOENS, Ugo; NCHINDA, Godwin; *et al.* Monkeypox Virus in Nigeria: Infection Biology, Epidemiology, and Evolution. **Viruses**, v. 12, n. 11, p. 1257, 2020.

ALHAJJ, M.; FARHANA, A. Enzyme Linked Immunosorbent Assay. Em: **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023.

ANTUNES, João Marcelo Azevedo de Paula; BORGES, Iara Apolinário; TRINDADE, Giliane de Souza; *et al.* Exposure of free-ranging capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) to the vaccinia virus. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 67, n. 2, p. 481–485, 2020.

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.

ASSIS, Felipe L.; BORGES, Iara A.; MESQUITA, Vaz S.; *et al.* Vaccinia Virus in Household Environment during Bovine Vaccinia Outbreak, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 19, n. 12, p. 2045–2047, 2013.

ATCC. **BSC40 [BSC-40] - CRL-2761**. Disponível em: <<https://www.atcc.org/products/crl-2761>>. Acesso em: 22 mar. 2023a.

ATCC. **Vero - CCL-81**. Disponível em: <<https://www.atcc.org/products/ccl-81>>. Acesso em: 22 mar. 2023b.

BAXBY, D.; CROUCH, A. C.; MCCracken, C. M.; *et al.* Serological evidence for the reservoir hosts of cowpox virus in British wildlife. **Epidemiology and Infection**, v. 115, n. 1, p. 185–191, 1995.

BERGALLO, H. G.; MAGNUSSON, W. E. Effects of Climate and Food Availability on Four Rodent Species in Southeastern Brazil. **Journal of Mammalogy**, v. 80, n. 2, p. 472–486, 20 maio 1999.

BETJES, K. *Funisciurus anerythrus* – iNaturalist. 2022. Disponível em: <<https://www.inaturalist.org/observations/144658224>>. Acesso em: 22 mar. 2023.

BONVICINO, C.R. *et al.* Guia dos roedores de Brasil: Com chaves para gêneros baseadas em caracteres externos. **Mastozoología neotropical**, v. 15, n. 2, p. 374–376, dez. 2008.

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, p. 402, 2018.

BROWN, Katy; LEGGAT, Peter A. Human Monkeypox: Current State of Knowledge and Implications for the Future. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 1, n. 1, p. 8, 2016.

BRUM, Mário C. S.; ANJOS, Bruno Leite Dos; NOGUEIRA, Carlos E. W.; *et al.* An outbreak of orthopoxvirus-associated disease in horses in southern Brazil. **Journal of Veterinary Diagnostic**

Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc, v. 22, n. 1, p. 143–147, 2010.

BRUNEAU, R. C.; TAZI, L.; ROTHENBURG, S. Cowpox Viruses: A Zoo Full of Viral Diversity and Lurking Threats. **Biomolecules**, v. 13, n. 2, p. 325, fev. 2023.

BURRELL, C. J.; HOWARD, C. R.; MURPHY, F. A. Chapter 16 - Poxviruses. In: **Fenner and White's Medical Virology**. 5. ed. London: Academic Press, 2017. p. 229–236.

CALIXTO, R. 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, 30 dez. 2017.

CAMPANILI, M.; PROCHNOW, M. Mata Atlântica – Uma Rede Pela Floresta. **RMA – Rede de ONGs da Mata Atlântica**. Fundação Biblioteca Nacional, Brasília, 2006.

CARROLL, Darin S.; EMERSON, Ginny L.; LI, Yu; *et al.* Chasing Jenner's Vaccine: Revisiting Cowpox Virus Classification. **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, p. e23086, 2011.

CARVALHO, L. B. et al. Monkeypox Virus Transmission to Healthcare Worker through Needlestick Injury, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 28, n. 11, p. 2334–2336, nov. 2022.

CDC – CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Mpox - 2022 Outbreak Cases and Data**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/poxvirus/mpox/response/2022/index.html>>. Acesso em: 22 mar. 2023.

CDC – CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Multistate outbreak of monkeypox--Illinois, Indiana, and Wisconsin, 2003. **MMWR. Morbidity and mortality weekly report**, v. 52, n. 23, p. 537–540, 2003.

CERQUEIRA, R. Fatores ambientais e a reprodução de marsupiais e roedores no leste do Brasil. **Arquivos do Museu Nacional**, Rio de Janeiro, v.63, n.1, p.29-39, 1 jan. 2005.

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

CHIARELLO, Adriano G; *et al.* Mamíferos Ameaçados de Extinção no Brasil *in: Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção*. 1a. reimp. Brasília, DF: Ministério do Meio Ambiente: Ministério da Educação, v. 2, p. 680-880, 2008.

COSTA, G. B. et al. Seroprevalence of Orthopoxvirus in rural Brazil: insights into anti-OPV immunity status and its implications for emergent zoonotic OPV. **Virology Journal**, v. 13, p. 121, 4 jul. 2016.

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.

COSTA, Galileu Barbosa; RIBEIRO DE ALMEIDA, Lara; CERQUEIRA, Aline Gabriele Ribeiro; *et al.* Vaccinia Virus among Domestic Dogs and Wild Coatis, Brazil, 2013-2015. **Emerging Infectious Diseases**, v. 24, n. 12, p. 2338–2342, 2018.

COTTER, C. A. et al. Preparation of Cell Cultures and Vaccinia Virus Stocks. **Current Protocols in Protein Science**, v. 89, p. 5.12.1-5.12.18, 1 ago. 2017.

CURAUDEAU, M. et al. Identifying the Most Probable Mammal Reservoir Hosts for Monkeypox Virus Based on Ecological Niche Comparisons. **Viruses**, v. 15, n. 3, p. 727, 11 mar. 2023.

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

CZARNECKI, M. W.; TRAKTMAN, P. The Vaccinia Virus DNA Polymerase and its Processivity Factor. **Virus research**, v. 234, p. 193–206, 15 abr. 2017.

D'ANUNCIAÇÃO, Lorena; GUEDES, Maria Isabel Maldonado; OLIVEIRA, Tércia Ludolfo; *et al.* Filling one more gap: experimental evidence of horizontal transmission of Vaccinia virus between

bovines and rodents. **Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)**, v. 12, n. 1, p. 61–64, 2012.

DAMASO, C. R. Revisiting Jenner's mysteries, the role of the Beaugency lymph in the evolutionary path of ancient smallpox vaccines. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 18, n. 2, p. e55–e63, 1 fev. 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.

DIAZ-CÁNOVA, D. *et al.* Genomic Sequencing and Phylogenomics of Cowpox Virus. **Viruses**, v. 14, n. 10, p. 2134, 28 set. 2022.

DOMINGOS, I.J.S. *et al.* Twenty Years after Bovine Vaccinia in Brazil: Where We Are and Where Are We Going? **Pathogens**, v. 10, n. 4, p. 406, 31 mar. 2021.

DOTY, Jeffrey B.; MAGHLAKELIDZE, Giorgi; SIKHARULIDZE, Irakli; *et al.* Isolation and Characterization of Akhmeta Virus from Wild-Caught Rodents (*Apodemus spp.*) in Georgia. **Journal of Virology**, v. 93, n. 24, p. e00966-19, 2019.

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.

DURSKI, Kara N.; MCCOLLUM, Andrea M.; NAKAZAWA, Yoshinori; *et al.* Emergence of Monkeypox - West and Central Africa, 1970-2017. **MMWR. Morbidity and mortality weekly report**, v. 67, n. 10, p. 306–310, 2018.

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

ELSAIED, S.; BONDY, L.; HANAGE, W. P. Monkeypox Virus Infections in Humans. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 35, n. 4, p. e00092-22, [s.d.].

EREZ, Noam; ACHDOUT, Hagit; MILROT, Elad; *et al.* Diagnosis of Imported Monkeypox, Israel, 2018. **Emerging Infectious Diseases**, v. 25, n. 5, p. 980–983, 2019.

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

FENNER, Frank; HENDERSON, Donald A.; ARITA, Isao; *et al.* **Smallpox and its eradication**. [s.l.]: World Health Organization, p. 1371-1409, 1988.

FERNANDES, T. The smallpox vaccine: its first century in Brazil (from the Jennerian to the animal vaccine). **Historia, Ciencias, Saude--Manguinhos**, v. 6, n. 1, p. 29–51, 1999.

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, 2008a.

FERREIRA, Jaqueline Maria Siqueira; ABRAHÃO, Jônatas Santos; DRUMOND, Betânia Paiva; *et al.* Vaccinia virus: shedding and horizontal transmission in a murine model. **Journal of General Virology**, v. 89, n. 12, p. 2986–2991, 2008b.

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

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

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.

FUNASA – FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. **Manual de Controle de Roedores**. 2002. Ministério da Saúde, Brasília, Brasil. Disponível em: <https://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_roedores1.pdf>. Acesso em: 06 abr. 2023.

GOMEZ-LUCIA, E. Monkeypox: Some Keys to Understand This Emerging Disease. **Animals**, v. 12, n. 17, p. 2190, jan. 2022.

GRESETH, M. D.; TRAKTMAN, P. The Life Cycle of the Vaccinia Virus Genome. **Annual Review of Virology**, v. 9, n. 1, p. 239–259, 29 set. 2022.

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

GUEDES, M. I. M. C.; REHFELD, I. S.; DE OLIVEIRA, T. M. L.; *et al.* Detection of Vaccinia virus in blood and faeces of experimentally infected cows. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 60, n. 6, p. 552–555, 2013.

HAMMARLUND, Erika; LEWIS, Matthew W.; CARTER, Shirley V.; *et al.* Multiple diagnostic techniques identify previously vaccinated individuals with protective immunity against monkeypox. **Nature Medicine**, v. 11, n. 9, p. 1005–1011, 2005.

HATAMI, H. *et al.* Demographic, Epidemiologic, and Clinical Characteristics of Human Monkeypox Disease Pre- and Post-2022 Outbreaks: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Biomedicine**, v. 11, n. 3, p. 957, mar. 2023.

HUANG, Y.; MU, L.; WANG, W. Monkeypox: epidemiology, pathogenesis, treatment and prevention. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 7, n. 1, p. 1–22, 2 nov. 2022.

HUTSON, C. L. *et al.* A prairie dog animal model of systemic orthopoxvirus disease using West African and Congo Basin strains of monkeypox virus. **The Journal of General Virology**, v. 90, n. Pt 2, p. 323–333, fev. 2009.

HUTSON, C. L. *et al.* Laboratory Investigations of African Pouched Rats (*Cricetomys gambianus*) as a Potential Reservoir Host Species for Monkeypox Virus. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 10, p. e0004013, 2015.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Atlas Nacional Digital do Brasil**. 2022. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/apps/atlas_nacional/#/home>. Acesso em: 6 abr. 2023.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Cidades | Minas Gerais | Serro | Panorama**. 2021. Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/mg/serro/panorama>>. Acesso em: 6 abr. 2023.

ICTV – International Committee on Taxonomy of Viruses. **Poxviridae**. Poxviridae - dsDNA Viruses - dsDNA Viruses (2011) – ICTV. Disponível em: <https://ictv.global/report_9th/dsDNA/poxviridae>. Acesso em: 16 mar. 2023.

IPHAN; MENEZES, José Coelho de. Queijo Artesanal de Minas: Patrimônio Cultural do Brasil. **Ministério da Cultura, Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional - IPHAN**, v. 1, p. 156, 2006.

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

JUNGWIRTH, N. et al. Atypical Cowpox Virus Infection in a Series of Cats. **Journal of Comparative Pathology**, v. 158, p. 71–76, 1 jan. 2018.

KAREM, Kevin L.; REYNOLDS, Mary; BRADEN, Zach; *et al.* Characterization of Acute-Phase Humoral Immunity to Monkeypox: Use of Immunoglobulin M Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Monkeypox Infection during the 2003 North American Outbreak. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 12, n. 7, p. 867–872, 2005.

KHODAKEVICH, L.; JEZEK, Z.; KINZANZKA, K. Isolation of monkeypox virus from wild squirrel infected in nature. **Lancet (London, England)**, v. 1, n. 8472, p. 98–99, 11 jan. 1986.

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.

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, p. 14A.5.1-14A.5.43, 2016.

KUMAR, N. et al. The 2022 outbreak and the pathobiology of the monkeypox virus. **Journal of Autoimmunity**, v. 131, p. 102855, jul. 2022.

LEARY, Steven; PHARMACEUTICALS, Fidelis; UNDERWOOD, Wendy; *et al.* AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2020 Edition. p. 121, 2020.

LEITE, J. A. et al. Passatempo virus, a vaccinia virus strain, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 12, p. 1935–1938, dez. 2005.

LEITE, Juliana Almeida; DA FONSECA, Flávio Guimarães; DE SOUZA TRINDADE, Giliane; *et al.* A-type inclusion bodies: a factor influencing cowpox virus lesion pathogenesis. **Archives of Virology**, v. 156, n. 4, p. 617–628, 2011.

LI, Y. *et al.* On the origin of smallpox: Correlating variola phylogenics with historical smallpox records. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 40, p. 15787–15792, 2 out. 2007.

LI, Yu; OLSON, Victoria A.; LAUE, Thomas; *et al.* Detection of monkeypox virus with real-time PCR assays. **Journal of Clinical Virology**, v. 36, n. 3, p. 194–203, 2006.

LIKOS, A. M. et al. A tale of two clades: monkeypox viruses. **Journal of General Virology**, v. 86, n. 10, p. 2661–2672, 2005.

LIMA, M. T. et al. Ocular Vaccinia Infection in Dairy Worker, Brazil. **Emerging Infectious Diseases journal - CDC**. V. 24(1), 2018.

LIMA, Mauricio Teixeira; OLIVEIRA, Grazielle 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, p. 3327, 2019.

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, p. 423–429, 2005.

LORETTO, D.; VIEIRA, M. V. Use of space by the marsupial *Marmosops incanus* (Didelphimorphia, Didelphidae) in the Atlantic Forest, Brazil. **Elsevier Mamm. Biol.** v. 73, p. 255–261, 2008.

LUIS, Angela D.; HAYMAN, David T. S.; O'SHEA, Thomas J.; *et al.* A comparison of bats and rodents as reservoirs of zoonotic viruses: are bats special? **Proceedings. Biological Sciences**, v. 280, n. 1756, p. 20122753, 2013.

MATOS, Ana Carolina Diniz; REHFELD, Isabelle Silva; GUEDES, Maria Isabel Maldonado Coelho; *et al.* Bovine Vaccinia: Insights into the Disease in Cattle. **Viruses**, v. 10, n. 3, p. 120, 2018.

MAULDIN, Matthew R.; ANTWERPEN, Markus; EMERSON, Ginny L.; *et al.* Cowpox virus: What's in a Name? **Viruses**, v. 9, n. 5, p. 101, 2017.

MAULDIN, Matthew R; MCCOLLUM, Andrea M; NAKAZAWA, Yoshinori J; *et al.* Exportation of Monkeypox Virus From the African Continent. **The Journal of Infectious Diseases**, n. jiaa559, 2020.

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

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

MEYER, Hermann; SCHAY, C; MAHNEL, H; *et al.* Characterization of orthopoxviruses isolated from man and animals in Germany. **Archives of virology**, v. 144, p. 491–501, 1999.

MIRANDA, Júlia B.; BORGES, Iara A.; CAMPOS, Samantha P.S.; *et al.* Serologic and Molecular Evidence of Vaccinia Virus Circulation among Small Mammals from Different Biomes, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 6, p. 931–938, 2017.

MOSS, Bernard. Poxviridae. In: **Fields Virology**. 6. ed. Philadelphia, USA: LWW, v. 1, p. 2129–2159, 2013.

NEWMAN, F. K. *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, jul. 2003.

OLIVEIRA, Tércia M. Ludoulfo; REHFELD, Isabelle 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.

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

OLIVEIRA, T. M. L.; GUEDES, M. I. M. C.; REHFELD, I. S.; *et al.* Vaccinia virus detection in dairy products made with milk from experimentally infected cows. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 65, n. 1, p. e40–e47, 2018.

PAGLIA, A.P., FONSECA, G.A.B. DA, RYLANDS, A. B., HERRMANN, G., *et al.* Lista Anotada dos Mamíferos do Brasil. 2ª Edição. **Occasional Papers in Conservation Biology**, No. 6. Conservation International, Arlington, VA. 76pp. 2012.

PASTE, R.; JÚLIO; VOLTOLINI, J. Associação entre a estrutura da vegetação e a abundância de marsupiais e roedores no Parque Estadual da Serra do Mar. **Revista Biociências**, Taubaté, v. 19, n.2, p. 72-82, 2013.

PERES, Marina G.; BACCHIEGA, Thais S.; APPOLINÁRIO, Camila M.; *et al.* Vaccinia Virus in Blood Samples of Humans, Domestic and Wild Mammals in Brazil. **Viruses**, v. 10, n. 1, p. 42, 2018a.

PERES, M. G. *et al.* Vaccinia virus in Feces and Urine of Wild Rodents from São Paulo State, Brazil. **Viruses**, v. 10, n. 2, p. 51, 23 jan. 2018b.

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.

PHILPOTT, D. *et al.* Epidemiologic and Clinical Characteristics of Monkeypox Cases — United States, May 17–July 22, 2022. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, CDC, v. 71(32), p. 1018-1022, 2022.

Prefeitura do Serro – MG. **Economia**. 2023. Disponível em: <<https://www.serro.mg.gov.br/portal/servicos/1005/economia>>. Acesso em: 6 abr. 2023.

RAMOS, Vanessa do Nascimento. **Ecologia alimentar de pequenos mamíferos de áreas de cerrado no Sudeste do Brasil**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2007.

REED, Kurt D.; MELSKE, John W.; GRAHAM, Mary Beth; *et al.* The Detection of Monkeypox in Humans in the Western Hemisphere. **New England Journal of Medicine**, v. 350, n. 4, p. 342–350, 2004.

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.

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.

REYNOLDS M.G., *et al.* Spectrum of Infection and Risk Factors for Human Monkeypox, United States, 2003. **Emerg Infect Dis.** v. 13(9), p. 1332-1339, 2007.

RIK. Bank Vole - *Myodes glareolus*. 2022. Disponível em: <<https://waarneming.nl/observation/232783317/>>. Plataforma Global Biodiversity Information Facility. Acesso em: 22 mar. 2023.

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

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

ROSONE, F. et al. Sero-Epidemiological Survey of Orthopoxvirus in Stray Cats and in Different Domestic, Wild and Exotic Animal Species of Central Italy. **Viruses**, v. 13, n. 10, p. 2105, 19 out. 2021.

SANDVIK, Tore; TRYLAND, Morten; HANSEN, Hilde; *et al.* Naturally Occurring Orthopoxviruses: Potential for Recombination with Vaccine Vectors. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 9, p. 2542–2547, 1998.

SAUNDERS, K.E., et al. Monkeypox in a Young Infant – Florida, 2022. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**, 2022. 71(38): p. 1220-1221.

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, p. 672–676, 2009.

SEBRAE – Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. **Queijo de Serro**. 2022. Disponível em: <<https://www.sebrae.com.br/sites/PortalSebrae/origens/queijo-de-serro,843cfe1c1e318710VgnVCM100000d701210aRCRD>>. Acesso em: 6 abr. 2023.

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: The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology**, v. 44, n. 4, p. 308–313, 2009.

SIMPSON, Karl; HEYMANN, David; BROWN, Colin S.; *et al.* Human monkeypox – After 40 years, an unintended consequence of smallpox eradication. **Vaccine**, v. 38, n. 33, p. 5077–5081, 2020.

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

SMITH, K. C.; BENNETT, M.; GARRETT, D. C. Skin lesions caused by orthopoxvirus infection in a dog. **The Journal of Small Animal Practice**, v. 40, n. 10, p. 495–497, 1999.

STAGEGAARD, J. et al. Seasonal recurrence of cowpox virus outbreaks in captive cheetahs (*Acinonyx jubatus*). **PloS One**, v. 12, n. 11, p. e0187089, 2017.

STYCZYNSKI, A. et al. Seroprevalence and Risk Factors Possibly Associated with Emerging Zoonotic Vaccinia Virus in a Farming Community, Colombia. **Emerging Infectious Diseases**, v. 25, n. 12, p. 2169–2176, dez. 2019.

THÈVES, C.; CRUBÉZY, E.; BIAGINI, P. History of Smallpox and Its Spread in Human Populations. **Microbiology Spectrum**, v. 4, n. 4, p. 10.1128/microbiolspec.poh-0004–2014, jul. 2016.

TJERRI. Short-tailed Field Vole - *Microtus agrestis*. 2022. Disponível em: <<https://waarneming.nl/observation/251312180/>>. Plataforma Global Biodiversity Information Facility. Acesso em: 22 mar. 2023.

TRINDADE, G.d.S; DA FONSECA, F.G.; MARQUES, J.T.; *et al.* Araçatuba virus: a vaccinia-like virus associated with infection in humans and cattle. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 2, p. 155–160, 2003.

TRINDADE, G. S. 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, G. S. et al. Short report: Isolation of two vaccinia virus strains from a single bovine vaccinia outbreak in rural area from Brazil: Implications on the emergence of zoonotic orthopoxviruses. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 75, n. 3, p. 486–490, set. 2006.

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

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.

TRINDADE, Giliane de Souza; EMERSON, Ginny L.; 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.

TRYLAND, M.; SANDVIK, T.; HANSEN, H.; *et al.* Characteristics of four cowpox virus isolates from Norway and Sweden. **APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica**, v. 106, n. 6, p. 623–635, 1998.

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, 2017.

VALASEK, M. A.; REPA, J. J. The power of real-time PCR. **Advances in Physiology Education**, v. 29, n. 3, p. 151–159, set. 2005.

VALLÉE, A. *et al.* Monkeypox Virus Infection in 18-Year-Old Woman after Sexual Intercourse, France, September 2022. **Emerging Infectious Diseases journal – CDC**, v. 29, n. 1, jan. 2023.

VICKERY, W. L.; BIDER, J. R. The Influence of Weather on Rodent Activity. **Journal of Mammalogy**, v. 62, n. 1, p. 140–145, 31 mar. 1981.

VIEIRA, E.; PALMA, A. Pequenos mamíferos de Cerrado: Distribuição dos gêneros e estrutura das comunidades nos diferentes habitats. **Cerrado: Ecologia, Biodiversidade E Conservação**, p. 265–282, 1 jul. 2005.

VORA, Neil M.; LI, Yu; GELEISHVILI, Marika; *et al.* Human Infection with a Zoonotic Orthopoxvirus in the Country of Georgia. **The New England journal of medicine**, v. 372, n. 13, p. 1223–1230, 2015.

WEEDA, S. Long-tailed Field Mouse - *Apodemus sylvaticus*. 2022. Disponível em: <<https://waarneming.nl/observation/232011579/>>. Plataforma Global Biodiversity Information Facility. Acesso em: 22 mar. 2023.

WHO – World Health Organization. **2022 Monkeypox Outbreak: Global trends. 2022**; Disponível em: https://worldhealthorg.shinyapps.io/mpx_global/#1_Overview. Acesso em 04 abr. 2023.

ZIJLSTRA, M.; OSTERHAUS, A.; HEIDEMA, J. A necrotising ulcer after rescuing a kitten. **BMJ Case Reports**, v. 2013, p. bcr2013010398, 2 set. 2013.

9. ANEXOS

9.1. Participação em eventos científicos

1. I Congresso de Ciências da Saúde da UFVJM e III Encontro de Medicina da FAMED. 2022. (Congresso).
2. IX Simpósio de Microbiologia da UFMG – ConectaSIM. 2022. (Simpósio).
3. IV Workshop on Inflammation & VII INFLAMMA. 2022. (Simpósio).
4. 1º Congresso Brasileiro de Evidências Clínicas na Covid-19. 2021. (Congresso).
5. Epidemiologia de viroses emergentes, com ênfase na disseminação do SARS-CoV-2 e suas variantes no mundo. 2021. (Seminário).
6. VIII Simpósio de Microbiologia da UFMG – ConectaSIM. 2021. (Simpósio).
7. XXXII Congresso Brasileiro de Virologia - Virologia em Casa. 2021. (Congresso).

9.2. Organização de eventos científicos

1. IX Simpósio de Microbiologia da UFMG – ConectaSIM. 2022. (Simpósio). Carga horária: 30h.

9.3. Apresentações de trabalhos em eventos científicos

1. **DOMINGOS, I. J. S.**; ROCHA, K. L. S.; GRACIANO, J. M.; PAGLIA, A. P.; OLIVEIRA, D. B.; DOTY, J. B.; NAKAZAWA, Y. J.; TRINDADE, G. S. *Prospecção de Orthopoxvírus Zoonóticos em Pequenos Mamíferos Não-Voadores no Município do Serro-MG, Brasil*. Em: IX Simpósio de Microbiologia da UFMG, 2022.
2. ROCHA, K. L. S.; **DOMINGOS, I. J. S.**; OLIVEIRA, D. B.; TRINDADE, G. S. *Circulação Silenciosa de Orthopoxvirus na Região Serro-MG: O VACV*. Em: IX Simpósio de Microbiologia da UFMG, 2022.

3. STOFFELLA-DUTRA, A.G; DE CAMPOS, B.H.; SILVA, P.H.B.; DIAS, K.L; **DOMINGOS, I.J.S.**; HEMETRIO, N.S.; XAVIER, J.; IANI, F.; FONSECA, V.; GIOVANETTI, M.; DE OLIVEIRA, L.C.; TEIXEIRA, M.M.; LOBATO, Z.I.P; FERREIRA, H.L.; ARNS, C.W.; DURIGON, E.; DRUMOND, B.P.; ALCANTARA, L.C.J.; DE CARVALHO, M.P.N.; TRINDADE, G.S. *Infecção Natural por SARS-CoV-2 em Quatis Inseridos em uma Área de Interface Silvestre-Urbana no Brasil*. Em: IX Simpósio de Microbiologia da UFMG, 2022.
4. OLIVEIRA, D. M. S.; DUTRA, A. G. S.; **DOMINGOS, I. J. S.**; DIAS, K. L.; SILVA, P. H. B; ALMEIDA, I. M.; ROCHA, K. L. S.; ABRAHÃO, J. S.; KROON, E. G.; TRINDADE, G. S. *Monkeypox: Conhecendo Para Prevenir*. Em: IX Simpósio de Microbiologia da UFMG, 2022.
5. SILVA, P.H.B.; DUTRA, A.G.S.; DE OLIVEIRA, J.S.; **DOMINGOS, I.J.S.**; TRINDADE, G.S.; IANNI, F.; SILVA, M.V.F. *Orthopoxvirus Circulantes no Brasil: Diagnóstico, Distribuição e Caracterização Biológica e Molecular*. Em: IX Simpósio de Microbiologia da UFMG, 2022.
6. ROCHA, K. L. S.; **DOMINGOS, I. J. S.**; OLIVEIRA, D. B.; TRINDADE, G. S. *Circulação Silenciosa do VACV em Propriedades da Região do Serro-MG Medidas para Minimizar o Impacto do Vírus Vaccinia na Economia Leiteira da Região*. Em: I Congresso de Ciências da Saúde da UFVJM e III Encontro de Medicina da FAMED, 2022.
7. **DOMINGOS, I. J. S.**; OLIVEIRA, JAQUELINE SILVA ROCHA, K. L. S.; OLIVEIRA, D. B.; KROON, ERNA GEESIEN; BARBOSA COSTA, GALILEU; TRINDADE, GILIANE DE SOUZA *Vinte Anos de Vaccinia Bovina no Brasil: Histórico, Perspectivas e Desafios*. Em: XVIII Simpósio de Microbiologia da UFMG, 2021.
8. ROCHA, K. L. S.; **DOMINGOS, I. J. S.**; OLIVEIRA, D. B.; TRINDADE, GILIANE DE SOUZA. *Avaliação da Circulação do VACV em Propriedades da Região do Serro-MG: Medidas para Minimizar o Impacto do Vírus Vaccinia na Economia Leiteira da Região*. Em: XVIII Simpósio de Microbiologia da UFMG, 2021.

9.4. Cursos e atividades de extensão

1. Minicurso: Working with the IACUC (CDC – Atlanta Version). Centers for Disease Control and Prevention, CDC, Estados Unidos. 2021. Carga horária: 4h.
2. Minicurso: Introduction to Mice. Centers for Disease Control and Prevention, CDC, Estados Unidos. 2021. Carga horária: 4h.
3. Integração ao Grupo de Trabalho da UFVJM para diagnóstico de COVID-19. Diamantina, Minas Gerais, Brasil. Período: Abril de 2021 a Dezembro de 2021.

9.5. Artigos publicados

1. **DOMINGOS, I. J. S.**, ROCHA, K.L.S.; GRACIANO, J.M.; ALMEIDA, L.R.; DOTY, J.B.; PAGLIA, A.P.; OLIVEIRA, D.B.; NAKAZAWA, Y.J.; TRINDADE, G.d.S. Orthopoxvirus Circulation in an Endemic Area in Brazil: Investigation of Infections in Small Mammals during an Absence of Outbreaks. *Viruses*, v. 15, n. 4, p. 842, abr. 2023.
2. STOFFELLA-DUTRA, A. G., DE CAMPOS, B. H., BASTOS E SILVA, P. H., DIAS, K. L., DA SILVA **DOMINGOS, I. J. S.**, HEMETRIO, N. S., XAVIER, J., IANI, F., FONSECA, V., GIOVANETTI, M., DE OLIVEIRA, L. C., TEIXEIRA, M. M., LOBATO, Z. I. P., FERREIRA, H. L., ARNS, C. W., DURIGON, E., DRUMOND, B. P., ALCANTARA, L. C. J., DE CARVALHO, M. P. N., & DE SOUZA TRINDADE, G. SARS-CoV-2 Spillback to Wild Coatis in Sylvatic-Urban Hotspot, Brazil. *Emerging infectious diseases*, 29(3), 664–667, mar. 2023.
3. **DOMINGOS, I. J. S.**; OLIVEIRA, J.S.; ROCHA, K.L.S.; OLIVEIRA, D.B.; KROON, E.G.; COSTA, G.B.; TRINDADE, G.d.S. Twenty Years after Bovine Vaccinia in Brazil: Where We Are and Where Are We Going?. *Pathogens* 10(4), 406, abr. 2021.

Communication

Orthopoxvirus Circulation in an Endemic Area in Brazil: Investigation of Infections in Small Mammals during an Absence of Outbreaks

Iago J. S. Domingos ^{1,*}, Kamila L. S. Rocha ¹, Jessica M. Graciano ¹, Lara R. Almeida ¹, Jeffrey B. Doty ², Adriano P. Paglia ¹, Danilo B. Oliveira ³, Yoshinori J. Nakazawa ^{2,*} and Giliane de S. Trindade ^{1,*}

¹ Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Antonio Carlos, 6627, Belo Horizonte 31270-901, Brazil

² U.S. Centers for Disease Control and Prevention, Poxvirus and Rabies Branch, 1600 Clifton Rd. NE, Atlanta, GA 30333, USA

³ Centro Integrado de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, MGC 367 Km 583, 5000, Diamantina 39100-000, Brazil

* Correspondence: iago.jsd@gmail.com (I.J.S.D.); inp7@cdc.gov (Y.J.N.); giliane@icb.ufmg.br (G.d.S.T.); Tel.: +55-(31)-3409-2755 (G.d.S.T.)

Abstract: Vaccinia virus (VACV) is the causative agent of an emerging viral zoonosis called bovine vaccinia (BV). Several studies have documented characteristics of VACV infections in Brazil; however, the manner in which this virus is maintained in wildlife remains unknown. This work investigated the presence of viral DNA and anti-orthopoxvirus (OPXV) antibodies in samples collected from small mammals in a VACV-endemic area in Minas Gerais, Brazil, in the absence of current outbreaks. Samples did not show amplification of OPXV DNA in molecular tests. However, 5/142 serum samples demonstrated the presence of anti-OPXV neutralizing antibodies in serological tests. These data reinforce the involvement of small mammals in the natural cycle of VACV, highlighting the need for further ecological studies to better understand how this virus is maintained in nature and to develop measures to prevent BV outbreaks.

Keywords: *Vaccinia virus*; epidemiology; animal diseases; public health; ecology



Citation: Domingos, I.J.S.; Rocha, K.L.S.; Graciano, J.M.; Almeida, L.R.; Doty, J.B.; Paglia, A.P.; Oliveira, D.B.; Nakazawa, Y.J.; Trindade, G.d.S. Orthopoxvirus Circulation in an Endemic Area in Brazil: Investigation of Infections in Small Mammals during an Absence of Outbreaks. *Viruses* **2023**, *15*, 842. <https://doi.org/10.3390/v15040842>

Academic Editor: Graciela Andrei

Received: 10 February 2023

Revised: 17 March 2023

Accepted: 23 March 2023

Published: 25 March 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Infectious diseases caused by viruses belonging to the *Orthopoxvirus* (OPXV) genus have been present among humans for thousands of years, including smallpox, caused by variola virus (VARV), which has been responsible for millions of deaths throughout human history [1]. The eradication of smallpox occurred thanks to other OPXVs, cowpox virus (CPXV) and later vaccinia virus (VACV), the latter was used in worldwide vaccination programs promoted by the World Health Organization [1,2]. Following the eradication of smallpox in 1980, infections by zoonotic OPXVs have emerged among humans in diverse geographic locations, such as CPXV infections in Europe, monkeypox virus (MPXV) historically mostly in Central and West Africa, and VACV, primarily in Brazil in South America [3–6].

Vaccinia virus was first described to cause natural infections in Brazil at the end of the 20th century and has since been associated with outbreaks of bovine vaccinia (BV), a disease affecting dairy cattle and milkers. In cattle, this disease is typically characterized by vesiculopustular exanthematic lesions on the udders and teats of milking cows. In humans, the lesions appear mostly on the hands of milkers which can lead to secondary infections, but systemic symptoms such as fever, myalgia, and headache are also common [7–9]. VACV is widely distributed in Brazil, and over the last twenty years, several characteristics of the virus and the disease it causes have been investigated and described [10,11]. The virus has been detected from several sources, such as lesion material, animal excrements, blood,

and milk and its derivatives, and previous studies have documented factors that have contributed to VACV spreading throughout the country [10–14]. Additionally, a wide range of hosts has been reported for this virus, such as humans, bovines, equines, and small mammals [6,10,12–14]. Viral DNA, viral isolates, and anti-OPXV neutralizing antibodies have been successfully detected in field and laboratory-based studies [15–18]. These reports filled important gaps in VACV epidemiology and provided insight about the circulation of this virus in animal hosts across the country. However, the natural reservoir(s) and maintenance of VACV in nature remain poorly understood [9–11].

Small mammals have been implicated as reservoirs for other OPXVs; serological and molecular studies have shown that three rodent species, *Apodemus sylvaticus*, *Microtus agrestis*, and *Myodes glareolus*, are involved in the natural circulation of CPXV [19]. Similarly, several small mammal species have been suggested as putative reservoirs of MPXV, including African rodents of the genera *Funisciurus*, *Cricetomys*, and *Graphiurus*, among others, but more studies are necessary to better describe the circulation of this virus in nature [20–22].

Beyond CPXV and MPXV, an extensive range of studies conducted in Brazilian natural and rural areas have detected evidence of VACV infection in several small mammal species (Rodentia and Didelphimorphia) using molecular and serological tests [13,15–17,23,24]. Viable VACV was detected in *Mus musculus* during a bovine vaccinia outbreak investigation [24]. In addition, anti-OPXV neutralizing antibodies have been detected in blood samples from naturally infected rodents and marsupials [16,25]. Viral isolates have also been obtained from rodent feces and urine [13]. These studies support the inclusion of small mammals in the host range of VACV and could contribute to the spread of the virus between different environments.

Serro county (18°36'21" S, 43°23'13" W) is located in an area of Brazil where VACV is known to be endemic and has recorded several BV outbreaks, with OPXV infections detected in bovines, equids, rodents, marsupials, and humans [14,16,26–28]. The city is located in Vale do Jequitinhonha, 329 km northeast from Belo Horizonte, the capital of Minas Gerais state [29,30]. Serro is in a transition area between Cerrado and Atlantic Forest in Brazil, and these biomes confer unique characteristics to the region. The savanna-like Cerrado biome is the second largest in the country and exhibits a large biodiversity with a diverse number of animal species [31,32]. Atlantic Forest is also an important biome in Brazil where a high diversity of rodents and marsupial species can be found and has been suffering from degradation for thousands of years [32]. The city of Serro is a well-known city in the country due to its traditional production of artisanal cheese from raw milk, which is a very important component in its economy [30]. Due to the potential harms VACV infections could cause to this industry, studies to understand VACV circulation in this region are needed.

The present work aims to detect evidence of the circulation of OPXV in small mammals captured in and around dairy farms producing artisanal cheese in the city of Serro-MG, Brazil. The study included the capture and sampling of wild animals, testing of liver and serum samples through molecular (quantitative polymerase chain reaction amplification—qPCR), and serological (plaque reduction neutralization test—PRNT) tests, respectively. Through this study, we aim to contribute to the understanding of VACV circulation in wild animals found in and around farms and how the virus is maintained in the environment. In addition, the results from this study may inform VACV prevention and control efforts in dairy farms by identifying animal species potentially involved in the circulation of this virus.

2. Materials and Methods

2.1. Small Mammal Sampling Procedures

A total of three farms were chosen in Serro county (Figure 1). The farms had an average distance of 14 km from each other. At each farm, three habitat types (peridomicile, pasture, and forest) were selected, and one sampling transect was established in each

habitat. Each transect consisted of 15 capture sites every 15 m; capture sites had two live-traps: a Tomahawk-like trap ($25 \times 25 \times 40$ cm) and a Sherman live-trap ($9 \times 9 \times 22$ cm) for a total of 30 traps per transect. Therefore, each farm had 45 capture sites and 90 traps for a total of 270 traps across the three farms. All traps were checked every day for 14 consecutive days during four field expeditions distributed in February, May, July, and August of 2021. The total sampling effort was 15,120 traps-nights. The baits used were a small cotton ball soaked in liver fish oil and a banana chunk, and these were switched on alternate days. Captured animals were transported alive to the local laboratory for sample collection.

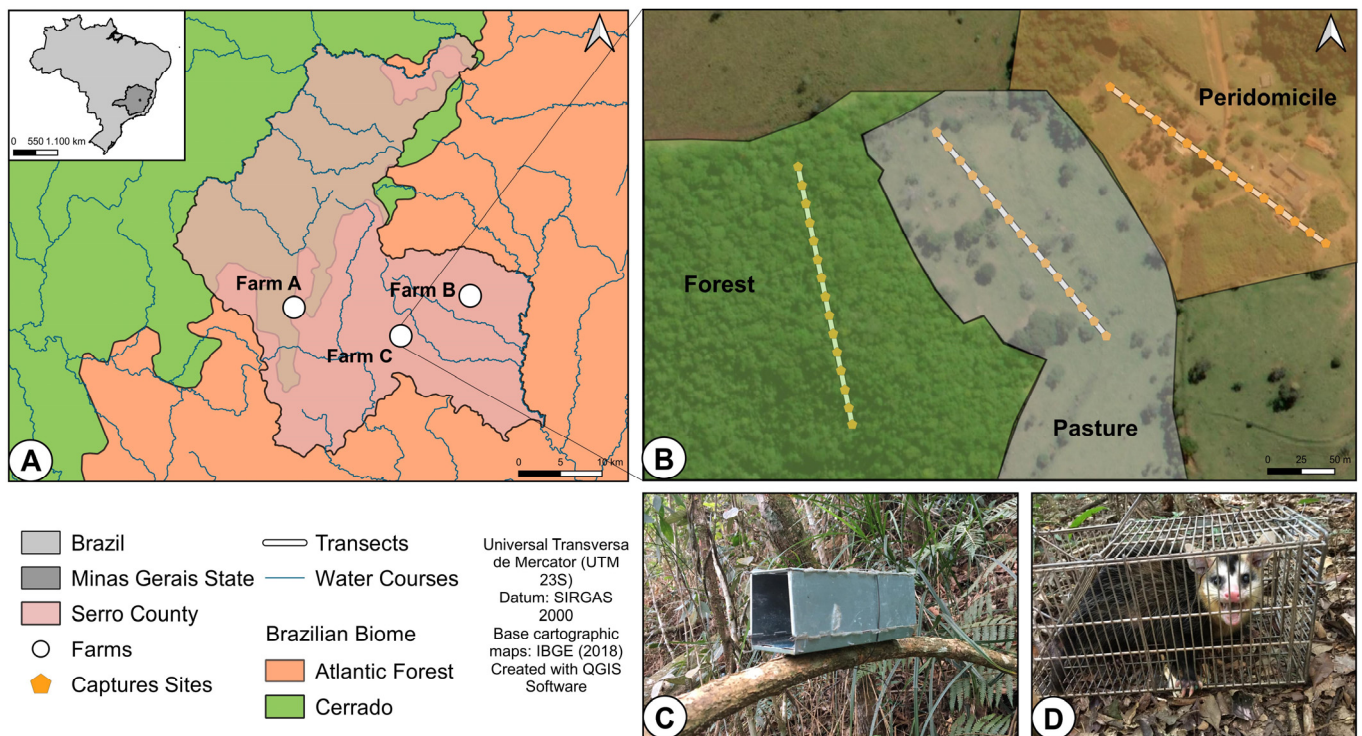


Figure 1. Geographic location, sampling design, and traps used during the study in Serro-MG, Brazil. (A) Map of Serro county (pink), water courses are blue lines and the Brazilian biomes intersecting in this region are depicted: Cerrado Biome in green and Atlantic Forest Biome in orange. Map inset at the top left shows the location of the State of Minas Gerais. Farms selected for the study are indicated by white circles. (B) Sampling design in one of the farms, showing three transects (white lines), with the fifteen capture sites each (yellow pentagons). (C) Sherman live-trap positioned on a tree branch. (D) Tomahawk-like cage positioned on the ground with a common opossum (*Didelphis aurita*) captured.

During animal manipulation, personal protective equipment was used as recommended by the U.S. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) [33]. All procedures with animals were authorized by the Ethics Commission on Animal Use (CEUA) of the Federal University of Minas Gerais under Protocol No. 217/2020 and the CDC Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) under protocol 3183DOTMULX. Small mammal sample collection was carried out under ICMBio Authorization No. 129894.

A veterinarian was responsible for anesthesia administration and euthanasia procedures for all captured animals. Animals were anesthetized with a combination of ketamine (70 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) prior to blood collection and euthanasia. Data were recorded from each animal including taxonomy, standard measurements, sex, and relative age (juvenile vs. adult). Marsupials belonging to the genus *Didelphis* and pregnant animals were not euthanized and were released at the site of capture following blood and data collection.

Blood samples were centrifuged at 8000 rcf for two minutes to separate the serum from the clot. Gonads, bladder, intestines, stomach, kidneys, spleen, liver, lungs, and heart were collected from each euthanized animal, and urine and feces samples were collected when present. Liver and serum samples were selected for OPXV screening, and if viral amplification was observed, additional sample types would be tested. Each tissue sample was collected in duplicate and stored in two different microtubes: a dry cryogenic microtube and an Eppendorf microtube with 400 µL of RNA Later (Invitrogen, Waltham, MA, USA) solution. Samples in cryogenic microtubes were stored in liquid nitrogen, while the RNA Later samples were stored in -20°C freezers until being transported to the BSL-2 laboratory in Diamantina city, Minas Gerais, Brazil, where all the samples were stored in a -80°C freezer until analysis.

2.2. Laboratory Analysis

DNA was extracted using the PureLink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, Waltham, MA, USA) following the manufacturer instructions, and the samples were not homogenized or processed prior to extraction. Serum diluted to 1:10 was used for real-time PCR without DNA extraction, as previously described [34]. Serum and liver DNA samples were tested for three different OPXV gene targets: the C11R gene [34], the A56R gene [35], and the E9L gene [36], which encode the virus growth factor (VGF), the viral hemagglutinin (HA), and the viral DNA polymerase, respectively (Table S1). The mouse β -actin gene was used as an endogenous control and a VACV Western Reserve strain (Laboratório de Vírus, UFMG, Belo Horizonte, Brazil) was used as a positive control. All three targets were tested in duplicate with a 10 µL final reaction volume using the StepOne® Applied Biosystems software version 2.3. The C11R and A56R assays used SYBR® Green I Master Mix with these cycling conditions: denaturation at $95^{\circ}\text{C}/20\text{ min}$, 40 cycles of $95^{\circ}\text{C}/3\text{ s}$ and $60^{\circ}\text{C}/20\text{ s}$, and a melting curve using $95^{\circ}\text{C}/3\text{ s}$ and $60^{\circ}\text{C}/20\text{ s}$, followed by an increase in temperature of 4°C until reaching $95^{\circ}\text{C}/15\text{ s}$. The E9L gene assay used TaqMan® Master Mix with cycling conditions of $50^{\circ}\text{C}/2\text{ min}$ and $95^{\circ}\text{C}/10\text{ s}$, followed by 40 cycles of $95^{\circ}\text{C}/15\text{ s}$ and $60^{\circ}\text{C}/1\text{ min}$.

In order to detect and quantify anti-OPXV neutralizing antibodies, all serum samples were analyzed by PRNT as previously described [37] and included previously published modifications [34]. BSC-40 cells for PRNT assays were cultivated in Eagle's minimum essential medium (MEM) supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS), 1% amphotericin, 1% penicillin-streptomycin solution, and 1% L-glutamine. A VACV Western Reserve strain was utilized as a positive control. The cytopathic effect in BSC-40 cells was analyzed and the samples were considered positive if at least a 50% reduction was observed when compared with the virus control plates, and the neutralizing titer per mL (IU/mL) of these samples was determined considering the final 1:40 dilution.

3. Results

3.1. Animal Collection

At the end of the four expeditions, a total of 210 small mammals were captured, with a capture success of 1.39%. Of these, 143 (68.10%) belonged to 7 species of the order Didelphimorphia, and 67 (31.90%) belonged to 15 species of the order Rodentia (Table S2). Liver was collected from 107 animals (50.95% of the total number of captures): 46 (42.99%) from marsupials and 61 (57.01%) from rodents. Serum was collected from 142 (67.62%) animals: 88 (61.97%) from marsupials and 54 (38.03%) from rodents. Tomahawk traps captured 148 animals (70.48%), while Sherman traps yielded 62 captures (29.52%). The sex of the captured animals was equally distributed, with 92 (43.81%) females, 92 (43.81%) males, and 26 (12.38%) unidentified. For the relative age, 123 (58.57%) animals were adult, 45 (21.43%) were juvenile, 3 (1.43%) were infant, and 39 (18.57%) were not possible to define. The forest was the most successful habitat type with 119 (56.67%) captures, followed by peridomicile with 63 (30%) captures, and pasture with 28 (13.33%) captures.

3.2. Laboratory Findings

While amplification was detected for the mouse β -actin gene in all samples and in all PCR positive control samples, none of the liver or serum samples showed amplification of any of the three OPXV gene targets, indicating that no viral DNA was present. Among the 142 serum samples tested, 5 (3.52%) showed the presence of anti-OPXV neutralizing antibodies in the PRNTs. All positive animals were captured during dry seasons but from three different field expeditions. Neutralizing antibodies were detected in samples from three rodent species (*Trinomys cf setosus*, *Nectomys squamipes*, and *Oligoryzomys* sp.) and from two animals of one marsupial species (*Marmosops incanus*) (Figure 2). At least one seropositive animal was captured from each farm and each habitat type (Table 1).

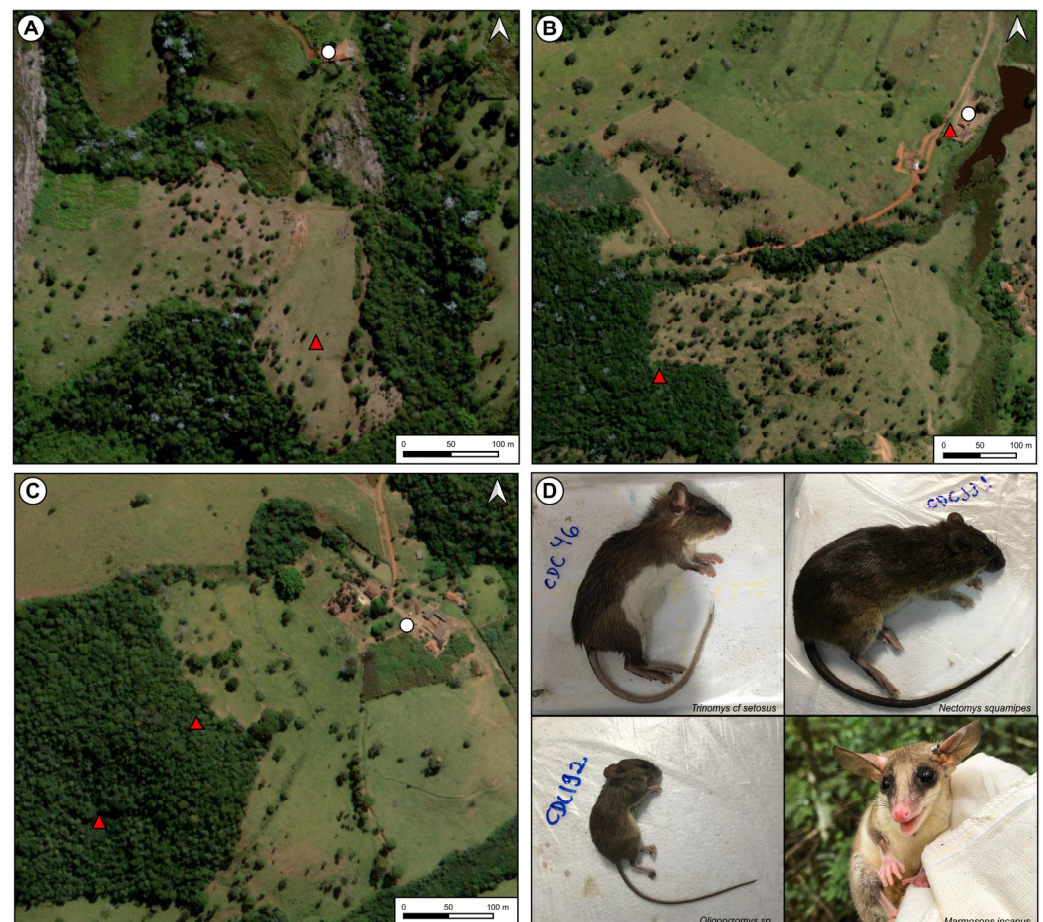


Figure 2. Capture location of seropositive species, Brazil, 2021. The (A–C) farm buildings are indicated by white circles and spots of seropositive animal capture by red triangles. *Trinomys cf setosus*, *Nectomys squamipes*, and *Oligoryzomys* sp. in panel (D) were photographed after anesthesia administration. *Marmosops incanus* in panel (D) was photographed after its capture in the field.

Table 1. Captured animals' data with positive results in PRNT assays.

Sample	Capture Date	Weather Conditions	Order	Genus/Species	Sex	Age	Farm	Site of Capture	PRNT *			PCR **		
									Result	Plaque Reduction Percentage	Neutralizing Units per mL	C11R Gene	A56R Gene	E9L Gene
46	11 May 2021	Dry	Rodentia	<i>Trinomys cf setosus</i>	Female	Adult	B	Forest	+	63.51%	100 NU/mL	-	-	-
84	1 July 2021	Dry	Didelphimorphia	<i>Marmosops incanus</i>	Male	Adult	C	Forest	+	70.54%	100 NU/mL	-	-	-
111	7 July 2021	Dry	Rodentia	<i>Nectomys squamipes</i>	Male	Adult	B	Peridomicile	+	84.48%	100 NU/mL	-	-	-
142	3 August 2021	Dry	Didelphimorphia	<i>Marmosops incanus</i>	Male	Adult	C	Forest	+	60.00%	100 NU/mL	-	-	-
192	14 August 2021	Dry	Rodentia	<i>Oligoryzomys</i> sp.	Unidentified	Juvenile	A	Pasture	+	55.45%	100 NU/mL	-	-	-

* All PRNT assays were performed from serum samples. The plaque reduction percentage and the neutralizing units per mL values represent the results observed in duplicate serum samples. NU/mL: neutralizing units per mL. ** All three PCR gene targets (C11R, A56R, and E9L) were tested in both liver and serum samples from the animals.

4. Discussion

Zoonotic diseases have major impacts on public health and small mammals have been directly related to their maintenance in nature and in transmission to people [38]. Rodents are one of the primary reservoirs for zoonotic pathogens, which indicates a need for intense surveillance efforts in order to prevent and mitigate the risks of zoonotic infections in human populations [39,40]. This includes OPXVs, some of which are associated with small mammals and have previously been shown to be very harmful to human health [41–43]. Identifying the role of rodents and marsupials in the spread and maintenance of VACV will allow the development of prevention strategies and improve public health preparedness.

The diversity of animals sampled in this study from the different sampling sessions is in line with the documented diversity of Cerrado and Atlantic Forest in Brazil [44–46]. During the first sampling session in February of 2021, the weather conditions were very rainy and hot—as usually seen during summer in Brazil. The next session occurred in May of 2021 during autumn, a dry and cold season. The third and fourth sessions, in July and August of 2021, respectively, occurred during winter, when the weather was dryer and colder than autumn. All these characteristics affect small mammal behavior; for example, during dry seasons it is common to observe low availability of food for small mammals, which can favor the abundance of these animals in peridomicile areas due to increased foraging [47]. Additionally, in many small mammal species, it is more likely to see adult animals foraging than juvenile animals [46], which may have contributed to the high proportion of adult animals captured in this study.

Liver samples spiked with VACV-WR as positive DNA extraction controls showed no inhibition for extraction or PCR. In addition, β -actin gene and positive control amplification in all PCR tests indicated the assays were performed as expected. In the present study, it was not possible to detect viral DNA in the tested samples. However, anti-OPXV neutralizing antibodies were detected in a small percentage of serum samples from rodents and marsupials collected from different habitats, different farms, and different months of the year. The negative results both in PCR tests and in PRNT assays suggest that most animals sampled had no exposure to VACV. In order to explain these results, it is important to consider the absence of VACV outbreaks in Serro in recent years, as this might be one of the causes of the low seroprevalence in the small mammals sampled in this study. Additionally, the difficulty of sampling an animal with an active infection likely impacted the lack of molecular detection. When a VACV infection occurs in small mammals, similar to what is usually observed in humans, it is unlikely that the animal stays persistently infected for a long period of time [11,26,27]. After the animal recovers, it is not expected to exhibit detectable VACV or viral DNA in samples, which highlights the low probability of sampling an infected animal.

The small number of PRNT-positive animals shows the presence of anti-OPXV neutralizing antibodies at low levels in the mammal community. The anti-OPXV neutralizing antibodies were detected in samples collected in the three different habitat types, suggesting the circulation of VACV in each of these areas. Previous studies have shown hypothetical routes of VACV circulation among small mammals found among farms, disturbed areas near farms, and forest areas [16,24]. The seropositive results in this study support these findings, reinforcing the need for additional studies to describe the zoonotic VACV cycle. Evidence of VACV infections in *Trinomys cf setosus* and *Nectomys squamipes* have been previously reported from Serro county, while *Oligoryzomys* sp. have been associated with VACV in other locations in Brazil [16,25]. To our knowledge, this is the first report of anti-OPXV neutralizing antibodies identified in *Marmosops incanus* samples. Interestingly, this animal is a semi-arboreal marsupial with low locomotory behavior and is commonly found in forest areas [48]. The seropositivity in these animals shows the need for additional research into the spread of VACV to new species.

Previous studies have suggested an epidemiological chain between wildlife and domestic animals, with small mammals playing a pivotal role in this cycle [18,23,25]. However, the mechanisms of viral circulation remain a mystery. The results presented here

provide additional insight into how VACV is maintained in endemic regions, as the positive serological results demonstrate that the virus is silently circulating in the environment. Ultimately, more longitudinal surveillance studies are needed to examine the natural history of VACV in Brazil.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/v15040842/s1>, Table S1: Primers and probe sequences from OPV genes C11R, A56R and E9L; Table S2: Small mammals' data from field expeditions.

Author Contributions: Conceptualization, I.J.S.D., K.L.S.R., J.M.G., L.R.A., A.P.P., J.B.D., Y.J.N., D.B.O. and G.d.S.T.; investigation, I.J.S.D., K.L.S.R., J.M.G. and L.R.A.; resources, A.P.P., J.B.D., Y.J.N., D.B.O. and G.d.S.T.; writing—original draft preparation, I.J.S.D. and G.d.S.T.; writing—review and editing, I.J.S.D., K.L.S.R., J.M.G., L.R.A., A.P.P., J.B.D., Y.J.N., D.B.O. and G.d.S.T.; visualization, I.J.S.D. and G.d.S.T.; supervision, G.d.S.T.; project administration, A.P.P., D.B.O. and G.d.S.T.; funding acquisition, A.P.P., J.B.D., Y.J.N., D.B.O. and G.d.S.T. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was funded by U.S. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) and in part by the Microbiology Department of the Federal University of Minas Gerais and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazil (CAPES), Process 88882.348380/2010-1. In addition, we are grateful for the financial support from Câmara Pox—405249/2022-5—Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações (MCTI) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais (FAPEMIG), and Programas Institutos Nacionais de Ciência e Tecnologia-INCT-406441/2022-7. A.P.P. and G.d.S.T. are CNPq researchers.

Institutional Review Board Statement: The animal study protocol was approved by the Ethics Commission on Animal Use (CEUA) of the Federal University of Minas Gerais under Protocol No. 217/2020 and the CDC Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) under Protocol 3183DOTMULX. Small mammal sample collection was carried out under ICMBio Authorization No. 129894.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available within the article and in the Supplementary Material.

Acknowledgments: We thank Natalia Boroni and Wesley Lopes on field expeditions support, and other colleagues in Laboratório de Vírus (ICB-UFMG) and Laboratório de Doenças Infecciosas e Parasitárias (UFVJM) for laboratorial help. We also thank Alírio, Chokito, and Maravilha who allowed the sample collection for this study at their farms.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The findings and conclusions in this report are those of the author(s) and do not necessarily represent the views of the Centers for Disease Control and Prevention.

References

1. Fenner, F.; Henderson, D.A.; Arita, I.; Jezek, Z.; Ladnyi, I.D.; World Health Organization. *History of International Public Health. Smallpox and Its Eradication*, 6th ed.; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 1988; pp. 209–314.
2. Kirby, T. WHO celebrates 40 years since eradication of smallpox. *Lancet Infect. Dis.* **2020**, *20*, 174. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Ferrier, A.; Frenois-Veyrat, G.; Schvoerer, E.; Henard, S.; Jarjavall, F.; Drouet, I.; Timera, H.; Boutin, L.; Mosca, E.; Peyrefitte, C.; et al. Fatal Cowpox virus Infection in Human Fetus, France, 2017. *Emerg. Infect. Dis.* **2021**, *27*, 2570–2577. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Durski, K.N.; Mccollum, A.M.; Nakazawa, Y.; Petersen, B.W.; Reynolds, M.; Briand, S.; Djingarey, M.H.; Olson, V.; Damon, I.K.; Khalakdina, A. Emergence of Monkeypox—West and Central Africa, 1970–2017. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **2018**, *67*, 306–310. [[CrossRef](#)]
5. Damaso, C.R.A.; Esposito, J.J.; Condit, R.C.; Moussatché, N. An Emergent Poxvirus from Humans and Cattle in Rio de Janeiro State: Cantagalo Virus May Derive from Brazilian Smallpox Vaccine. *Virology* **2000**, *277*, 439–449. [[CrossRef](#)]
6. Trindade, G.D.S.; Da Fonseca, F.G.; Marques, J.T.; Nogueira, M.; Mendes, L.C.N.; Borges, A.S.; Peiró, J.R.; Pituco, E.M.; Bonjardim, C.A.; Ferreira, P.C.P.; et al. Açaçatuba Virus: A Vaccinia-like Virus Associated with Infection in Humans and Cattle. *Emerg. Infect. Dis.* **2003**, *9*, 155–160. [[CrossRef](#)]

7. Lobato, Z.I.P.; Trindade, G.S.; Frois, M.C.M.; Ribeiro, E.B.T.; Dias, G.R.C.; Teixeira, B.M.; Lima, F.A.; Almeida, G.M.F.; Kroon, E.G. Outbreak of exantemal disease caused by *Vaccinia virus* in human and cattle in Zona da Mata region, Minas Gerais. *Arq. Bras. De Med. Vet. E Zootec.* **2005**, *57*, 423–429. [\[CrossRef\]](#)
8. Schatzmayr, H.G.; De Lemos, E.R.S.; Mazur, C.; Schubach, A.; Majerowicz, S.; Rozental, T.; Schubach, T.M.P.; Bustamante, M.C.; Barth, O.M. Detection of poxvirus in cattle associated with human cases in the State of Rio de Janeiro: Preliminary report. *Memórias Do Inst. Oswaldo Cruz* **2000**, *95*, 625–627. [\[CrossRef\]](#)
9. Matos, A.C.D.; Rehfeld, I.S.; Guedes, M.I.M.C.; Lobato, Z.I.P. Bovine Vaccinia: Insights into the Disease in Cattle. *Viruses* **2018**, *10*, 120. [\[CrossRef\]](#)
10. Lima, M.T.; Oliveira, G.; Afonso, J.A.B.; Souto, R.J.C.; De Mendonça, C.L.; Dantas, A.F.M.; Abrahao, J.S.; Kroon, E.G. An Update on the Known Host Range of the Brazilian *Vaccinia Virus*: An Outbreak in Buffalo Calves. *Front. Microbiol.* **2019**, *9*, 3327. [\[CrossRef\]](#)
11. Kroon, E.G.; Mota, B.E.F.; Abrahão, J.S.; da Fonseca, F.G.; Trindade, G.D.S. Zoonotic Brazilian *Vaccinia Virus*: From field to therapy. *Antivir. Res.* **2011**, *92*, 150–163. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. da Costa, P.S.P.M.; Oliveira, J.S.; Domingos, I.J.D.S.; e Silva, P.H.B.; Dutra, A.G.S.; Amaral, C.D.; Abrahão, J.S.; Pereira, V.B.R.; Kroon, E.G.; Costa, G.B.; et al. Circulation of *Vaccinia Virus* in Southern and Southeastern wildlife, Brazil. *Transbound. Emerg. Dis.* **2020**, *67*, 1781–1785. [\[CrossRef\]](#)
13. Peres, M.G.; Bacchiega, T.S.; Appolinário, C.M.; Vicente, A.F.; Mioni, M.S.R.; Ribeiro, B.L.D.; Fonseca, C.R.S.; Pelícia, V.C.; Ferreira, F.; Abrahão, J.S.; et al. *Vaccinia Virus* in Feces and Urine of Wild Rodents from São Paulo State, Brazil. *Viruses* **2018**, *10*, 51. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Borges, I.A.; Reynolds, M.G.; McCollum, A.M.; Figueiredo, P.O.; Ambrosio, L.L.D.; Vieira, F.N.; Costa, G.B.; Matos, A.C.D.; Almeida, V.M.D.A.; Ferreira, P.C.P.; et al. Serological Evidence of Orthopoxvirus Circulation Among Equids, Southeast Brazil. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 402. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Antunes, J.M.A.D.P.; Borges, I.A.; Trindade, G.D.S.; Kroon, E.G.; Cruvinel, T.M.D.A.; Peres, M.G.; Megid, J. Exposure of free-ranging capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) to the *Vaccinia Virus*. *Transbound. Emerg. Dis.* **2019**, *67*, 481–485. [\[CrossRef\]](#)
16. Miranda, J.B.; Borges, I.A.; Campos, S.P.S.; Vieira, F.N.; De Ázara, T.M.F.; Marques, F.A.; Costa, G.B.; Luis, A.P.M.F.; De Oliveira, J.S.; Ferreira, P.C.P.; et al. Serologic and Molecular Evidence of *Vaccinia Virus* Circulation among Small Mammals from Different Biomes, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* **2017**, *23*, 931–938. [\[CrossRef\]](#)
17. Peres, M.G.; Bacchiega, T.S.; Appolinário, C.M.; Vicente, A.F.; Mioni, M.D.S.R.; Ribeiro, B.L.D.; Fonseca, C.R.S.; Pelícia, V.C.; Ferreira, F.; Oliveira, G.P.; et al. *Vaccinia Virus* in Blood Samples of Humans, Domestic and Wild Mammals in Brazil. *Viruses* **2018**, *10*, 42. [\[CrossRef\]](#)
18. D’Anunciação, L.; Guedes, M.I.M.; Oliveira, T.L.; Rehfeld, I.; Bonjardim, C.A.; Ferreira, P.P.; Trindade, G.D.S.; Lobato, Z.P.; Kroon, E.G.; Abrahão, J.S. Filling one more gap: Experimental evidence of horizontal transmission of *Vaccinia Virus* between bovines and rodents. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **2012**, *12*, 61–64. [\[CrossRef\]](#)
19. Chantrey, J.; Meyer, H.; Baxby, D.; Begon, M.; Bown, K.J.; Hazel, S.M.; Jones, T.; Montgomery, W.I.; Bennett, M. Cowpox: Reservoir hosts and geographic range. *Epidemiol. Infect.* **1999**, *122*, 455–460. [\[CrossRef\]](#)
20. Khodakevich, L.; Jezek, Z.; Kinzanzka, K. Isolation of *Monkeypox virus* from wild squirrel infected in nature. *Lancet* **1986**, *327*, 98–99. [\[CrossRef\]](#)
21. Hutson, C.L.; Nakazawa, Y.J.; Self, J.; Olson, V.A.; Regnery, R.L.; Braden, Z.; Weiss, S.; Malekani, J.; Jackson, E.; Tate, M.; et al. Laboratory Investigations of African Pouched Rats (*Cricetomys gambianus*) as a Potential Reservoir Host Species for *Monkeypox virus*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2015**, *9*, e0004013. [\[CrossRef\]](#)
22. Reynolds, M.G.; Davidson, W.B.; Curns, A.T.; Conover, C.S.; Huhn, G.; Davis, J.P.; Wegner, M.; Croft, D.R.; Newman, A.; Obiesie, N.N.; et al. Spectrum of Infection and Risk Factors for Human Monkeypox, United States, 2003. *Emerg. Infect. Dis.* **2007**, *13*, 1332–1339. [\[CrossRef\]](#)
23. Essbauer, S.; Pfeffer, M.; Meyer, H. Zoonotic poxviruses. *Vet. Microbiol.* **2010**, *140*, 229–236. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Abrahão, J.S.; Guedes, M.I.M.; Trindade, G.S.; Fonseca, F.G.; Campos, R.K.; Mota, B.F.; Lobato, Z.I.P.; Silva-Fernandes, A.T.; Rodrigues, G.O.L.; Lima, L.S.; et al. One More Piece in the VACV Ecological Puzzle: Could Peridomestic Rodents Be the Link between Wildlife and Bovine Vaccinia Outbreaks in Brazil? *PLoS ONE* **2009**, *4*, e7428. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Peres, M.G.; Bacchiega, T.S.; Appolinário, C.M.; Vicente, A.F.; Allendorf, S.D.; Antunes, J.M.A.P.; Moreira, S.A.; Legatti, E.; Fonseca, C.R.; Pituco, E.M.; et al. Serological study of *Vaccinia virus* reservoirs in areas with and without official reports of outbreaks in cattle and humans in São Paulo, Brazil. *Arch. Virol.* **2013**, *158*, 2433–2441. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Trindade, G.D.S.; Emerson, G.L.; Sammons, S.; Frace, M.; Govil, D.; Mota, B.E.F.; Abrahão, J.S.; De Assis, F.L.; Olsen-Rasmussen, M.; Goldsmith, C.S.; et al. Serro 2 Virus Highlights the Fundamental Genomic and Biological Features of a Natural *Vaccinia virus* Infecting Humans. *Viruses* **2016**, *8*, 328. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
27. Assis, F.L.; Borges, I.A.; Ferreira, P.C.P.; Bonjardim, C.A.; Trindade, G.D.S.; Lobato, Z.; Guedes, M.I.M.; Mesquita, V.; Kroon, E.; Abrahão, J.S. Group 2 *Vaccinia virus*, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* **2012**, *18*, 2035–2038. [\[CrossRef\]](#)
28. Costa, G.B.; Augusto, L.T.S.; Leite, J.A.; Ferreira, P.C.P.; Bonjardim, C.A.; Abrahão, J.S.; Kroon, E.G.; Moreno, E.C.; Trindade, G.D.S. Seroprevalence of Orthopoxvirus in rural Brazil: Insights into anti-OPV immunity status and its implications for emergent zoonotic OPV. *Virol. J.* **2016**, *13*, 121. [\[CrossRef\]](#)
29. Brazilian Institute for Geography and Statistics—IBGE. Serro. 2017. Available online: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/mg/serro/panorama> (accessed on 1 August 2022). (In Portuguese)

30. Prefeitura do Serro: Aspectos Gerais. Available online: <https://www.serro.mg.gov.br/portal/servicos/1001/aspectos-gerais> (accessed on 1 August 2022). (In Portuguese)
31. Colli, G.R.; Vieira, C.R.; Dianese, J.C. Biodiversity and conservation of the Cerrado: Recent advances and old challenges. *Biodivers. Conserv.* **2020**, *29*, 1465–1475. [\[CrossRef\]](#)
32. Ribeiro, M.C.; Metzger, J.P.; Martensen, A.C.; Ponzoni, F.J.; Hirota, M.M. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biol. Conserv.* **2009**, *142*, 1141–1153. [\[CrossRef\]](#)
33. Mills, J.N.; Yates, T.L.; Childs, J.E.; Parmenter, R.; Ksiazek, T.G.; Rollin, P.E.; Peters, C.J. Guidelines for Working with Rodents Potentially Infected with Hantavirus. *J. Mammal.* **1995**, *76*, 716–722. [\[CrossRef\]](#)
34. Kroon, E.G.; Abrahão, J.S.; Trindade, G.D.S.; Oliveira, G.P.; Luiz, A.P.M.F.; Costa, G.B.; Lima, M.T.; Calixto, R.S.; de Oliveira, D.B.; Drumond, B.P. Natural *Vaccinia virus* Infection: Diagnosis, Isolation, and Characterization. *Curr. Protoc. Microbiol.* **2016**, *42*, 14A.5.1–14A.5.43. [\[CrossRef\]](#)
35. Trindade, G.D.S.; Li, Y.; Olson, V.A.; Emerson, G.; Regnery, R.L.; da Fonseca, F.G.; Kroon, E.G.; Damon, I. Real-time PCR assay to identify variants of *Vaccinia virus*: Implications for the diagnosis of bovine vaccinia in Brazil. *J. Virol. Methods* **2008**, *152*, 63–71. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Li, Y.; Olson, V.A.; Laue, T.; Laker, M.T.; Damon, I.K. Detection of *Monkeypox virus* with real-time PCR assays. *J. Clin. Virol.* **2006**, *36*, 194–203. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
37. Newman, F.K.; Frey, S.E.; Blevins, T.P.; Mandava, M.; Bonifacio, A., Jr.; Yan, L.; Belshe, R.B. Improved Assay To Detect Neutralizing Antibody following Vaccination with Diluted or Undiluted *Vaccinia* (Dryvax) Vaccine. *J. Clin. Microbiol.* **2003**, *41*, 3154–3157. [\[CrossRef\]](#)
38. Jones, K.E.; Patel, N.G.; Levy, M.A.; Storeygard, A.; Balk, D.; Gittleman, J.L.; Daszak, P. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* **2008**, *451*, 990–993. [\[CrossRef\]](#)
39. Han, B.A.; Schmidt, J.P.; Bowden, S.E.; Drake, J.M. Rodent reservoirs of future zoonotic diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, 7039–7044. [\[CrossRef\]](#)
40. Meerburg, B.G.; Singleton, G.; Kijlstra, A. Rodent-borne diseases and their risks for public health. *Crit. Rev. Microbiol.* **2009**, *35*, 221–270. [\[CrossRef\]](#)
41. Wolfs, T.F.; Wagenaar, J.A.; Niesters, H.; Osterhaus, A. Rat-to-Human Transmission of Cowpox Infection. *Emerg. Infect. Dis.* **2002**, *8*, 1495–1496. [\[CrossRef\]](#)
42. Campe, H.; Zimmermann, P.; Glos, K.; Bayer, M.; Bergemann, H.; Dreweck, C.; Graf, P.; Weber, B.K.; Meyer, H.; Büttner, M.; et al. Cowpox Virus Transmission from Pet Rats to Humans, Germany. *Emerg. Infect. Dis.* **2009**, *15*, 777–780. [\[CrossRef\]](#)
43. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Update: Multistate outbreak of monkeypox—Illinois, Indiana, Kansas, Missouri, Ohio, and Wisconsin, 2003. *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.* **2003**, *52*, 561–564.
44. Paglia, A.P.; Fonseca, G.A.B.d.; Rylands, A.B.; Herrmann, G.; Aguiar, L.M.S.; Chiarello, A.G.; Leite, Y.L.R.; Costa, L.P.; Siciliano, S.; Kierulff, M.C.M.; et al. Lista anotada dos mamíferos do Brasil [In Portuguese]. In *Occasional Papers in Conservation Biology*; Conservação Internacional: Belo Horizonte, Brazil, 2012.
45. Bonvicino, J.A.; Oliveira, P.S.D. *Guia dos Roedores do Brasil, com Chaves Para Gêneros Baseadas em Caracteres Externos*; Centro Pan-Americano de Febre Aftosa—Pan American Health Organization/World Health Organization: Rio de Janeiro, Brazil, 2008. (In Portuguese)
46. Cerqueira, R. *Fatores Ambientais e a Reprodução de Marsupiais e Roedores no Leste do Brasil*; Arquivos do Museu Nacional: Rio de Janeiro, Brazil, 2005; Volume 63, pp. 29–39. (In Portuguese)
47. Bergallo, H.G.; Magnusson, W.E. Effects of Climate and Food Availability on Four Rodent Species in Southeastern Brazil. *J. Mammal.* **1999**, *80*, 472–486. [\[CrossRef\]](#)
48. Loretto, D.; Vieira, M.V. Use of space by the marsupial *Marmosops incanus* (Didelphimorphia, Didelphidae) in the Atlantic Forest, Brazil. *Mamm. Biol.* **2008**, *73*, 255–261. [\[CrossRef\]](#)

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

SARS-CoV-2 Spillback to Wild Coatis in Sylvatic–Urban Hotspot, Brazil

Ana Gabriella Stoffella-Dutra, Bruna Hermine de Campos, Pedro Henrique Bastos e Silva, Karolina Lopes Dias, Iago José da Silva Domingos, Nadja Simbera Hemetrio, Joilson Xavier, Felipe Iani, Vagner Fonseca, Marta Giovanetti, Leonardo Camilo de Oliveira, Mauro Martins Teixeira, Zelia Ines Portela Lobato, Helena Lage Ferreira, Clarice Weis Arns, Edison Durigon, Betânia Paiva Drumond, Luiz Carlos Junior Alcantara Marcelo Pires Nogueira de Carvalho, Giliane de Souza Trindade

Author affiliations: Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil (A.G. Stoffella-Dutra, B.H. de Campos, P.H.B. e Silva, K.L. Dias, I.J.S. Domingos, J. Xavier, L.C. de Oliveira, M.M. Teixeira, Z.I.P. Lobato, B.P. Drumond, M.P.N. de Carvalho, G. de Souza Trindade); Fundação de Parques Municipais e Zoológica de Belo Horizonte, Belo Horizonte (N.S. Hemetrio); Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte (F. Iani); Organização Pan-Americana da Saúde, Brasília, Brazil (V. Fonseca); University of Campus Bio-Medico di Roma, Rome, Italy (M. Giovanetti); Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil (M. Giovanetti, L.C.J. Alcantara); Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil (H.L. Ferreira, E. Durigon); Universidade de Campinas, Campinas, Brazil (C.W. Arns)

DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2903.221339>

We tested coatis (*Nasua nasua*) living in an urban park near a densely populated area of Brazil and found natural SARS-CoV-2 Zeta variant infections by using quantitative reverse transcription PCR, genomic sequencing, and serologic surveillance. We recommend a One Health strategy to improve surveillance of and response to COVID-19.

By November 2022, the COVID-19 pandemic had resulted in >630 million cases of disease worldwide (1). During the outbreak, natural occurrence of SARS-CoV-2 infections in animals was a hallmark; infections have been reported mainly in companion, domestic, captive, and farmed animals but also in wildlife (2,3). As of September 2022, the World Organisation for Animal Health had recorded 26 animal species infected with SARS-CoV-2 in 36 countries (2), indicating that the virus is able to cross the species barrier, thereby increasing risk of new transmission cycles and animal reservoirs (2,3).

Coatis (*Nasua nasua*) from South America are small diurnal mammals (family Procyonidae) that are omnivorous, terrestrial, synanthropic, and opportunistic. Coatis interact easily with humans and are often seen foraging for human food, especially from trash (4,5). We investigated the transmission of SARS-CoV-2 to a coati population living in an urban park near a large anthropized area of Brazil.

We collected serum samples and anal and oral swab samples during February–August 2021 from 40 free-living coatis inhabiting Mangabeiras Municipal Park in Belo Horizonte, Brazil (Appendix Table, Figure 1, <https://wwwnc.cdc.gov/EID/article/29/3/22-1339-App1.pdf>). Trained professionals captured coatis during 4 periods (February, June, July, and August), using appropriate personal protective equipment (laboratory coats, gloves, N95 face masks, and face shields) in accordance with all biosafety guidelines. Ethics approval was obtained for this study (Appendix).

Coatis were captured in Tomahawk Live Traps (<https://www.livetrapp.com/index.php>) (70 cm × 35 cm × 40 cm) baited with banana pieces. Animals were anesthetized with Zoletil 100 (Virbac, <https://vet-uk.virbac.com>) by intramuscular injection (7–10 mg/kg body weight), clinically evaluated, identified, and marked with polypropylene earrings and microchips. After anesthesia recovery, each coati was released at their capture site.

We stored anal and oral swab specimens by using RNAlater (ThermoFisher Scientific, <https://www.thermofisher.com>) and extracted RNA by using QIAmp Viral RNA Mini Kits (QIAGEN, <https://www.qiagen.com>). We performed quantitative reverse transcription PCR targeting the nucleocapsid N1 and N2 regions (6) and sequenced PCR positive samples by using nanopore technology. We performed phylogenetic analysis by using IQ-TREE2 (7) and maximum-likelihood reconstruction.

We detected SARS-CoV-2 RNA in 2 (5%) female coatis that had no clinical signs of infection (Table). We obtained a complete genomic sequence from the anal swab specimen from coati 535 (99% average coverage). The genomic sequence of SARS-CoV-2 obtained from the anal swab specimen from coati 535 indicated this variant belonged to the Zeta lineage (B.1.1.28.2, P.2) (Figure). The P.2 variant was initially detected in the state of Rio de Janeiro, Brazil, in July 2020 and was considered a variant of interest (9).

We performed plaque reduction neutralization tests (PRNT) on serum samples from all captured coatis to detect SARS-CoV-2 neutralizing antibodies (8). We serially diluted serum samples to obtain 1:20,

Table. Specimens from 2 SARS-CoV-2 RNA–positive coatis in study of SARS-CoV-2 spillback to wild coatis in sylvatic–urban hotspot, Brazil*

Coati ID	Collection date	Sex	Sample	SARS-CoV-2†	N1 Count‡	N2 Count‡
C341	2021 Feb 17	F	Oral swab	Positive	33	37
			Anal swab	Negative	NA	NA
			Serum	Negative	NA	NA
C535	2021 Feb 18	F	Oral swab	Positive	20	24
			Anal swab	Positive	30	33
			Serum	Negative	NA	NA

*Oral and anal swab and serum samples were collected from 40 wild coatis inhabiting Mangabeiras Municipal Park in Belo Horizonte, Brazil. We performed quantitative reverse transcription PCR targeting the nucleocapsid N1 and N2 regions of SARS-CoV-2 RNA for each sample. ID, identification, NA, not applicable.

†Specimens positive or negative for SARS-CoV-2 RNA by PCR.

‡PCR cycle threshold count.

1:40, and 1:80 dilutions and measured 50% and 90% neutralizing activity against SARS-CoV-2. Twenty (50%) coatis had SARS-CoV-2 neutralizing antibodies in ≥ 1 dilution at the 50% level; at the 90% level, 13 (32.5%) coatis had detectable neutralizing antibodies in ≥ 1 dilutions and 7 (17.5%) coatis had SARS-CoV-2 neutralizing antibodies in all 3 dilutions. We observed neutralizing antibodies in all 3 serum dilutions for coati 535 (Appendix Figure 2).

We were unable to confirm the mode of SARS-CoV-2 transmission to the coati population. However, we found evidence for human-to-animal transmission; the P.2 genomic sequence from coati 535 was the same variant circulating in humans within the area during the study period. Furthermore, 50% of the coati population had antibodies against SARS-CoV-2, suggesting a cluster of natural exposure and infections within this population. Our results support indirect

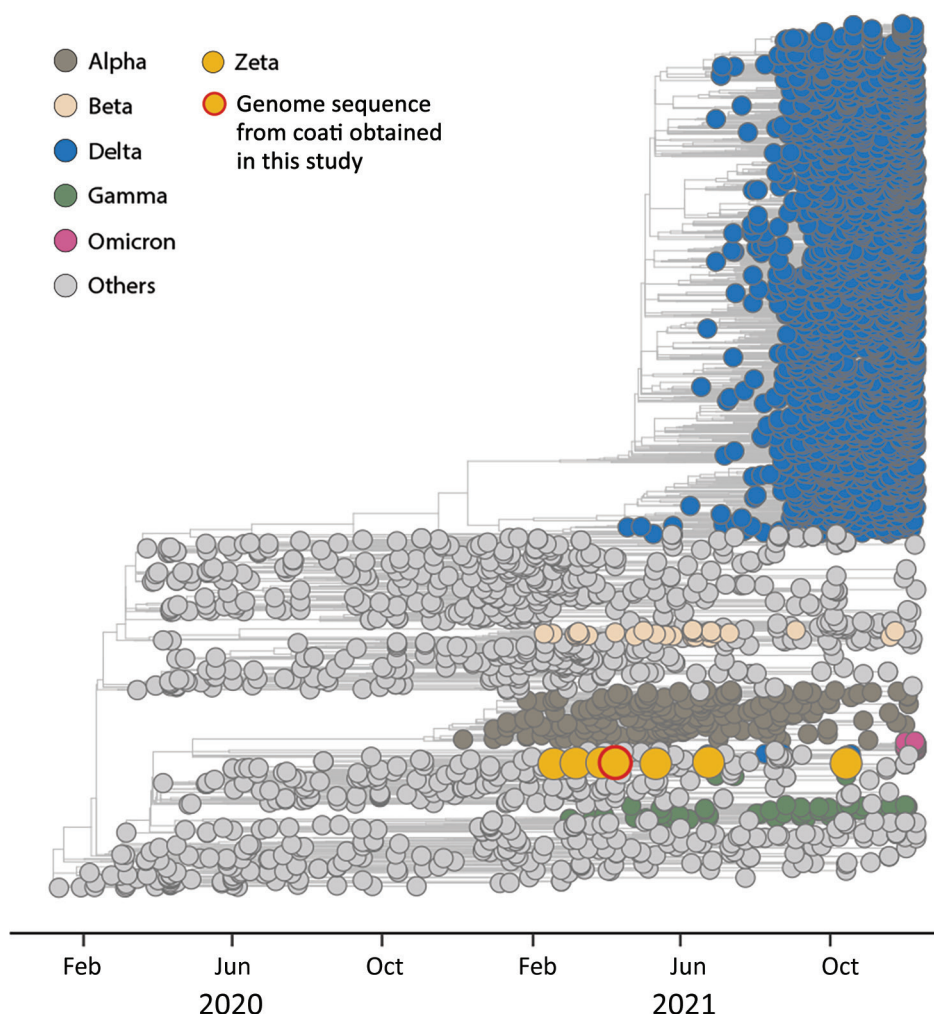


Figure. Time-scaled phylogenetic analysis of SARS-CoV-2 sequences, by variant type, in study of SARS-CoV-2 spillback to wild coatis in sylvatic–urban hotspot, Brazil. Maximum-likelihood method was used to compare the complete genomic sequence of SARS-CoV-2 obtained from coati (*Nasua nasua*) 535 (red-outlined yellow circle) and 3,441 SARS-CoV-2 reference genomic sequences (GISAID, <https://www.gisaid.org>) from around the world collected through October 2021. Colors represent clades corresponding to different SARS-CoV-2 variants of concern described by the World Health Organization; yellow indicates Zeta variant sequences. The SARS-CoV-2 sequence generated in this study was deposited in the GISAID database (accession no. EPI_ISL_8800460) and SisGen (Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético, <https://www.sisgen.gov.br>; no. A627307).

contact of coatis with contaminated human trash and food scraps in dumpsters and in the bordering urban areas of the park or potential direct close contact with infected human visitors (Appendix Figure 1).

Our findings agree with results from a zoo in Illinois, USA, that also confirmed SARS-CoV-2 in a coati by using molecular methods (2,10). Those results reinforce the susceptibility of coatis to SARS-CoV-2 infection and suggest possible virus shedding and transmission capacity of coatis. Viral RNA detection in both oral and anal swab specimens from coati 535 (Table) and presence of neutralizing antibodies indicate that viral replication occurred in this host. Therefore, our findings highlight possible SARS-CoV-2 enzootic maintenance in nature, including in fragmented green areas close to urban settings. Because of the potential for SARS-CoV-2 interspecies transmission, we recommend establishing a One Health strategy to improve surveillance and ability to respond to COVID-19 emergency health events.

Acknowledgments

We thank colleagues from the Laboratório de Vírus Instituto de Ciências Biológicas for their excellent technical support; Andrea Garcia de Oliveira, Marcelo Camargos, Kelly Nascimento, and Laboratório Federal de Defesa Agropecuária, Ministry of Agriculture Livestock and Food Supply (MAPA), for supporting our activities in the Biosafety Level Office International des Epizooties laboratory; Fundação de Parques Municipais e Zoobotânica of Belo Horizonte and Sérgio Augusto Domingues for allowing the field work; Augusto Gomes for coati photographs; Brazilian Post and Telegraph Company (Correios) for transporting our samples; and Jônatas Abrahão for excellent scientific discussions.

This study was funded by National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) (grant nos. 440593/2016-6 and 403761/2020-4); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), process no. 88882.348380/2010-1; DECIT (Departamento de Ciência e Tecnologia)/MS (Brazilian Ministry of Health) no. 14/2016, Prevenção e Combate ao vírus Zika, FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais); PRPq-UFMG (Pró Reitoria de Pesquisa) and Finep/RTR/PRPq/Rede (Financiadora de Estudos e Projetos) COVID-19 (no. 0494/20-0120002600). This work was partially funded by the Ministry of Science, Technology, and Innovation (MCTI-Brazil); US National Institutes of Health (grant no. U01 AI151698) for the United World Antiviral Research Network; CRP- ICGEB RESEARCH GRANT 2020 (project no. CRP/BRA20-03,

contract no. CRP/20/03); Oswaldo Cruz Foundation (no. VPGDI-027-FIO-20-2-2-30); and Brazilian Ministry of Health (no. SCON2021-00180). L.C.D.O. and M.M.T. were supported by a grant from MCTI/CNPQ/CAPES and FAPEMIG (project no. 465425/2014-3, Dengue and host-microbial interactions), M.G. and L.C.J.A. were supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), and M.G. was funded by PON “Ricerca e Innovazione” 2014–2020. Findings reported herein are the sole deduction, view, and responsibility of the researchers and do not reflect the official positions and sentiments of the funders.

G.S.T., B.P.D., M.G., M.M.T., H.L.F., C.W.A., and L.C.J.A. are CNPq researchers; M.M.T., C.W.A., and E.L.D. are members of the RedeVirus-MCTI; and H.L.F., Z.I.P.L., B.P.D., C.W.A., and E.L.D. are members of the Previr-MCTI.

About the Author

Ms. Stoffella-Dutra is a PhD student in microbiology at the Federal University of Minas Gerais. Her primary research interests focus on virology, viral zoonoses, epidemiology, and wildlife disease ecology.

References

1. World Health Organization. WHO coronavirus (COVID-19) dashboard, 2022 [cited 2022 Nov 1]. <https://covid19.who.int>
2. World Organisation for Animal Health. SARS-CoV-2 in animals—situation report 17, 2022 [cited 2022 Nov 1]. <https://www.woah.org/app/uploads/2022/10/sars-cov-2-situation-report-17.pdf>
3. Delahay RJ, de la Fuente J, Smith GC, Sharun K, Snary EL, Flores Giron L, et al. Assessing the risks of SARS-CoV-2 in wildlife. *One Health Outlook*. 2021;3:7. <https://doi.org/10.1186/s42522-021-00039-6>
4. Rodrigues DH, Calixto E, Cesario CS, Repoles RB, de Paula Lopes W, Oliveira VS, et al. Feeding ecology of wild brown-nosed coatis and garbage exploration: a study in two ecological parks. *Animals (Basel)*. 2021;11:2412. <https://doi.org/10.3390/ani11082412>
5. Projeto Quatis. Parque das Mangabeiras [cited 2022 Jun 6]. <https://sites.google.com/site/projetoquatis/parque-das-mangabeiras>
6. Centers for Disease Control and Prevention. CDC 2019-novel coronavirus (2019-nCoV) real-time RT-PCR diagnostic panel [cited 2022 Jun 8]. <https://www.fda.gov/media/134922/download>
7. Minh BQ, Schmidt HA, Chernomor O, Schrempf D, Woodhams MD, von Haeseler A, et al. IQ-TREE 2: new models and efficient methods for phylogenetic inference in the genomic era. *Mol Biol Evol*. 2020;37:1530–4. <https://doi.org/10.1093/molbev/msaa015>
8. Chaves DG, de Oliveira LC, da Silva Malta MCF, de Oliveira IR, Barbosa-Stancioli EF, Teixeira MM, et al. Pro-inflammatory immune profile mediated by TNF and IFN- γ and regulated by IL-10 is associated to IgG anti-SARS-CoV-2 in asymptomatic blood donors. *Cytokine*. 2022;154:155874. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2022.155874>
9. Voloch CM, da Silva Francisco R Jr, de Almeida LGP,

Cardoso CC, Brustolini OJ, Gerber AL, et al.; Covid19-UFRJ Workgroup, LNCC Workgroup, Adriana Cony Cavalcanti. Genomic characterization of a novel SARS-CoV-2 lineage from Rio de Janeiro, Brazil. *J Virol*. 2021;95:e00119-21. <https://doi.org/10.1128/JVI.00119-21>

10. US Department of Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Service. Confirmation of COVID-19 in a coatimundi at an Illinois zoo, 2021 [cited 2022 Jun 6]. https://www.aphis.usda.gov/aphis/newsroom/stakeholder-info/sa_by_date/sa-2021/sa-10/covid-coatimundi

Address for correspondence: Giliane de Souza Trindade, Universidade Federal de Minas Gerais, Av Antônio Carlos, 6627, Campus Pampulha, Belo Horizonte, 31270-901, Minas Gerais, Brazil; email: giliane@icb.ufmg.br

***Babesia microti* Causing Intravascular Hemolysis in Immunocompetent Child, China**

Jiafeng Yao,¹ Guoging Liu,¹ Yang Zou, Jin Jiang, Shaogang Li, Heng Wang, Xiaoling Cheng, Rui Zhang, Kaige Zhang, Chunyang Wei, Runhui Wu

Author affiliations: Beijing Children's Hospital, Beijing, China (J. Yao, G. Liu, J. Jiang, X. Cheng, R. Zhang, K. Zhang, R. Wu); Capital Medical University, Beijing (Y. Zou, S. Li); Peking Union Medical College School of Medicine, Beijing (H. Wang, C. Wei)

DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2903.220888>

We report a case of *Babesia microti* infection in an immunocompetent child <5 years of age that caused fever and severe intravascular hemolysis. Physicians in China should be aware of babesiosis, especially in the differential diagnosis of immune hemolytic anemia with negative results for antiglobulin tests.

Babesiosis, caused by tickborne zoonotic protozoa of the genus *Babesia*, is an emerging health risk to humans. Among the known *Babesia* species infecting humans, *B. microti* is the most common cause of

human babesiosis (1). In China, *B. microti* has caused >100 human cases of babesiosis (2), but nearly all have been reported in adults, particularly the elderly.

B. microti babesiosis has rarely been reported in immunocompetent children in China. We reported a case of severe intravascular hemolysis caused by *B. microti* infection in an immunocompetent preschooler from Shandong Province, China.

The patient, a girl 4 years and 9 months of age, had fever develop (highest temperature 39°C) on September 30, 2021. Antimicrobial drug treatment was not effective. Four days later, her urine became dark, and she had abdominal pain. On October 9, 2021, she was admitted to the hospital because of severe anemia and abnormal laboratory test results (Table). She had shock after a discharge of dark brown urine.

To stabilize her vital signs, we began repeated blood transfusion for supportive treatment. Azithromycin and immune regulatory treatment (high-dose methylprednisolone, 10 mg/kg/d for 3 days, and intravenous immunoglobulin, 1 g/kg/d for 2 d) were not effective. Her symptoms worsened, and her hemoglobin level remained at <60 g/L (Appendix Figure, panel A, <https://wwwnc.cdc.gov/EID/article/29/3/22-0888-App1.pdf>). On the basis of those findings, we excluded congenital hemolytic anemia and autoimmune hemolytic anemia.

We examined her blood smear and observed parasites in the erythrocytes (Appendix Figure, panel B). We used a genus-specific 18S rRNA PCR described previously (3) to confirm *Babesia* infection by amplification of a 515-bp fragment (Appendix Figure, panel C). Test results for malaria infection was negative. Subsequent sequencing of the fragment and BLAST analysis (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) of the nucleotide sequence showed 100% similarity with *B. microti* RI strain. Those results confirmed the diagnosis as a *B. microti* infection causing severe intravascular hemolytic anemia.

The girl's parents recalled that the child had been in a wild chestnut forest in a suburb of Zaozhuang City, Shandong Province, on September 14, 2021. They found ≈20 red papules and an itching sensation on the trunk and limbs. The papules subsided within 3 days. There were no other complications of babesiosis, such as splenic infarction, acute respiratory distress syndrome, or disseminated intravascular coagulation.

The child was given atovaquone and azithromycin (4) for 21 days, and the urine color became clear within 24 hours. The frequency of erythrocyte transfusion was reduced gradually, and the hemolysis was controlled (Appendix Figure, panel A). On the 10th day after the treatment began, molecular detection

¹These authors contributed equally to this article.

SARS-CoV-2 Spillback to Wild Coatis in Sylvatic–Urban Hotspot, Brazil

Appendix

Ethics Approval

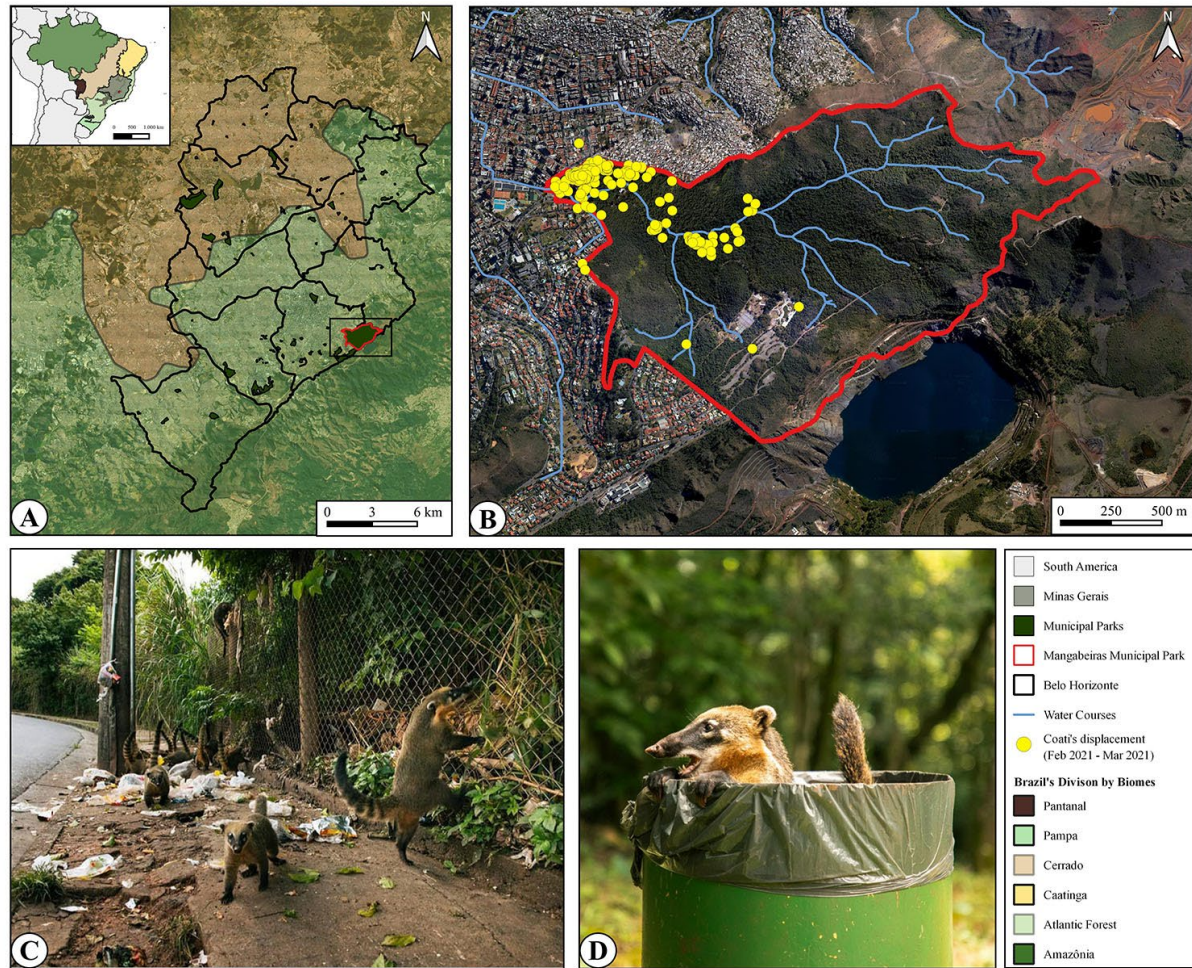
The study was approved by SISBIO (Sistema de Autorização e informação em Biodiversidade, license no. 75831), Ethical Committee on Animal Use (CEUA) of Universidade Federal de Minas Gerais (protocol nos. 158/2020 and 100/2021), SisGen (Sistema Nacional de Gestao do Patrimonio Genetico, no. A627307), and Fundação de Parques Municipais e Zoobotânica de Belo Horizonte (protocol no. FU 004–2020).

Appendix Table. Numbers of captured coatis categorized by collection date, sex, and age in study of SARS-CoV-2 spillback to wild coatis in sylvatic–urban hotspot, Brazil*

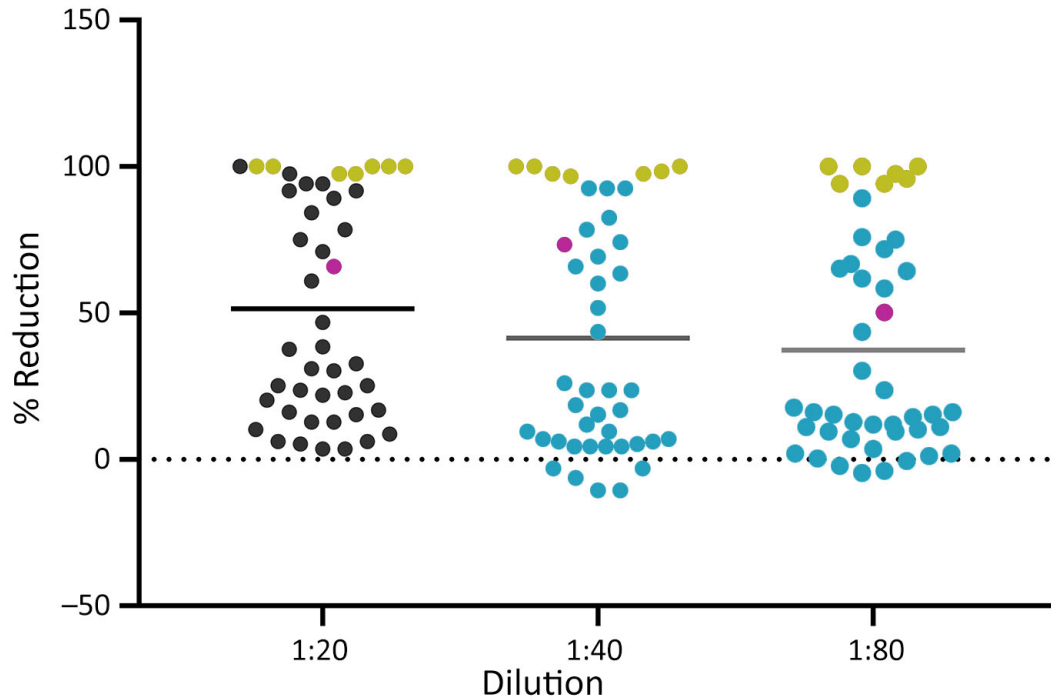
Capture month	Sex		Young	Age†		Total
	M	F		Immature adult	Adult	
February	3	5	3	3	2	8
June	4	6	3	3	4	10
July	6	9	3	1	11	15
August	4	7	1	2	8	11
Total no. animals	17	27	10	9	25	44

*Collection comprised 40 coatis (*Nasua nasua*) (62.5% female and 37.5% male) and 4 additional recaptures. Live traps (n = 25) were placed at 5 strategic points of passage for coatis (5 traps set per point) in Mangabeiras Municipal Park in Belo Horizonte, Brazil. The 5 capture points were: Caraça (n = 19 captured coatis), Casa de bonecas (n = 6), Mirante (n = 3), Praça das águas (n = 6), and Trilha 12 (n = 10).

†Biometrics analyses were performed to estimate age.



Appendix Figure 1. Overview of Mangabeiras Park in southeastern Brazil in study of SARS-CoV-2 spillback to wild coatis in sylvatic–urban hotspot, Brazil. A) Map of Brazil subdivided by its biomes and neighboring countries of South America, and municipal parks (dark green). Mangabeiras Municipal Park (19°56' S and 43°54' W) is surrounded by a red line. B) A satellite view of Mangabeiras Municipal Park (encircled by red line) in the city of Belo Horizonte highlighting the water courses (blue lines) and 341 coati displacements by georeferenced spots (global positioning system) (yellow circles) during February and March of 2021. Animal monitoring showed displacement throughout the park border areas that had residences and urban settings. C, D) Coatis in Mangabeiras Park in contact with human trash and food remnants. Photographer: Augusto Gomes. Maps were created with QGIS 3.24.3 software (https://www.qgis.org/pt_BR/site), using the coordinate reference system DATUM SIRGAS 2000 (UTM 23S).



Appendix Figure 2. Scatter plot of plaque reduction neutralization tests of serum samples from coatis. SARS-CoV-2 neutralizing antibodies were measured in serum samples by using the plaque reduction neutralization test. Samples were serially diluted to 1:20, 1:40, and 1:80. Solid lines represent the average reduction percentage of all tested samples and dotted line is 0% reduction. Solid circles represent all samples tested at each dilution ($n = 44$) (4 additional samples were from recaptures; 3 of those showed seroconversion when compared with the previous collection date). Magenta circles represent coati 535, which was positive for SARS-CoV-2 RNA by PCR. Green circles represent 7 coatis that had 90% plaque reduction (neutralizing activity) in all 3 dilutions.

Review

Twenty Years after Bovine Vaccinia in Brazil: Where We Are and Where Are We Going?

Iago José da Silva Domingos ^{1,†}, Jaqueline Silva de Oliveira ^{1,†}, Kamila Lorene Soares Rocha ², Danilo Bretas de Oliveira ², Erna Geessien Kroon ¹, Galileu Barbosa Costa ^{3,*}  and Giliane de Souza Trindade ^{1,*}

¹ Laboratório de Vírus, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brazil; iago.jsd@gmail.com (I.J.d.S.D.); jaquelinebmedica@hotmail.com (J.S.d.O.); kroone@icb.ufmg.br (E.G.K.)

² Laboratório de Doenças Infecciosas e Parasitárias, Faculdade de Medicina, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, MG 39100-000, Brazil; kamilalsr@yahoo.com.br (K.L.S.R.); danilo.bretas@ufvjm.edu.br (D.B.d.O.)

³ Departamento de Análise em Saúde e Vigilância de Doenças Não-Transmissíveis, Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, Brasília, DF 70719-040, Brazil

* Correspondence: galileu.costa@saude.com.br (G.B.C.); gittrindade@yahoo.com.br or giliane@icb.ufmg.br (G.d.S.T.); Tel.: +55-31-3409-2747 (G.d.S.T.)

† These authors contributed equally to this work.

Abstract: Orthopoxvirus (OPV) infections have been present in human life for hundreds of years. It is known that Variola virus (VARV) killed over 300 million people in the past; however, it had an end thanks to the physician Edward Jenner (who developed the first vaccine in history) and also thanks to a massive vaccination program in the 20th century all over the world. Although the first vaccine was created using the Cowpox virus (CPXV), it turned out later that the Vaccinia virus was the one used during the vaccination program. VACV is the etiological agent of bovine vaccinia (BV), a zoonotic disease that has emerged in Brazil and South America in the last 20 years. BV has a great impact on local dairy economies and is also a burden to public health. In this review, we described the main events related to VACV and BV emergence in Brazil and South America, the increase of related scientific studies, and the issues that science, human and animal medicine are going to face if we do not be on guard to this virus and its disease.

Keywords: *Vaccinia virus*; bovine vaccinia; public health; zoonosis; neglected disease; laboratory diagnosis



Citation: José da Silva Domingos, I.; Silva de Oliveira, J.; Lorene Soares Rocha, K.; Bretas de Oliveira, D.; Geessien Kroon, E.; Barbosa Costa, G.; de Souza Trindade, G. Twenty Years after Bovine Vaccinia in Brazil: Where We Are and Where Are We Going?. *Pathogens* **2021**, *10*, 406. <https://doi.org/10.3390/pathogens10040406>

Academic Editor: Cristiano Salata

Received: 4 February 2021

Accepted: 25 March 2021

Published: 31 March 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

For centuries in world history, humanity has faced a fatal disease named smallpox, which seemed impossible to fight. Throughout its existence, smallpox was responsible for the death of hundreds of millions of people worldwide. Its eradication in 1980 is considered one of the most outstanding achievements of human medicine and public health, reaching its 40th anniversary in 2020 [1,2]. The elimination of smallpox was only possible thanks to an eradication program developed and adopted for decades by the World Health Organization (WHO), which consisted of an extensive vaccination of the entire world population in the 20th century. After smallpox was declared eradicated, there was no need to keep vaccinating people once the Variola virus (VARV) was no longer circulating among the human population. Therefore, the worldwide vaccination was discontinued [3].

Historically, vaccinology started with the smallpox vaccination process developed by the British physician Edward Jenner at the end of the 18th century [4]. Jenner curiously observed that the injuries caused by the Cowpox virus (CPXV) in humans, due to the direct contact with infected cows during the milking process, were similar to the lesions caused by VARV [1,4–6]. Hence, the observation of CPXV infections was the preamble to the first vaccine produced worldwide.

Jenner used samples of CPXV collected from infected dairy cows, inoculated in humans, and found that these individuals did not develop smallpox later, confirming the hypothesis of cross-immunization between viruses belonging to the genus *Orthopoxvirus* (OPV) [7]. From this discovery, the technique was improved over the following years and gave rise to the first vaccine in history, which was distributed around the world through arm-to-arm transport, and a few years later would be produced by experimentally infected calves [1,4,6].

After several decades of vaccination, the CPXV isolate used in this vaccine distributed worldwide was supplanted by Vaccinia virus (VACV) [8]. The exact moment in history that it occurred is still unknown, but since the studies about this virus kept increasing throughout the years, VACV was used instead of CPXV in the 20th century in the WHO eradication program of VARV [9]. One of the exciting and useful features of the OPV is sharing an immunological cross-reactivity due to the antigenic similarity among its species [7,10]. The use of VACV and its effectiveness in the eradication of smallpox has made this virus extremely important in the history of virology and immunology. However, even presenting a tremendous scientific relevance and diversity of research on VACV worldwide, its origin and natural reservoir are still unknown [1]. In Brazil, in the last 20 years, there are records of the emergence of a disease directly related to VACV, the bovine vaccinia (BV), which causes natural infections in cattle herds and humans [11–13].

BV is an emerging viral zoonosis characterized by ulcerative lesions on the skin and mucous membranes, affecting mainly dairy cattle and milkers [14]. In dairy cattle, the lesions occur mostly on the teats and udders, are often accompanied by mastitis that can progress to the temporary commitment of the mammary glands. Consequently, it decreases milk production, causing a significant impact on the dairy economy, reducing profits [1,14–17].

In humans, the clinical manifestations of BV are mainly lesions located at the primary site of infection, usually on the fingers and hands of milkers who have a history of unprotected contact with infected animals [12,14,15,17]. However, additional lesions as a result of the self-inoculation process have also been described in other body sites such as the face, eyes, and genital region, and in humans, BV is associated with high morbidity [18–21]. The process between the onset of the initial symptoms and the healing of the ulcerative skin lesions takes approximately 21 days. Systemic symptoms such as fever, headache, malaise, myalgia, inguinal, and cervical lymphadenopathy are also present about three days after the initial symptoms [16–20].

The classic form of VACV transmission is through direct contact between the milkers and infected dairy cows, which characterizes BV as an occupational zoonosis [16]. Furthermore, the sick dairy workers are often removed from work, which results in disruption of the service in the affected rural properties, as well as additional expenses related to the replacement of human resources and decreases the familiar incomes of these affected milkers [13,20,22,23]. The following discussion of VACV and BV researches illustrates chronologically how they have become a very important part of virology and epidemiology history in Brazil during the past 20 years.

2. The Main Areas of BR-VACV Endemicity and the Epidemiological Profile

The first BV outbreaks were identified in the Southeastern region of Brazil, in the States of São Paulo and Rio de Janeiro in 1999, followed by Minas Gerais in 2000 [11,12]. After the initial records of BV outbreaks, VACV has quickly spread to other states and reported in all Brazilian territory. In the past few years, the occurrence of VACV has been reported for the first time in history in Brazil's neighboring countries. The current epidemiological scenario shows the circulation of VACV in an extensive area of the Brazilian territory and other South American countries such as Argentina, Uruguay, and Colombia (Figure 1) [17,24–28].

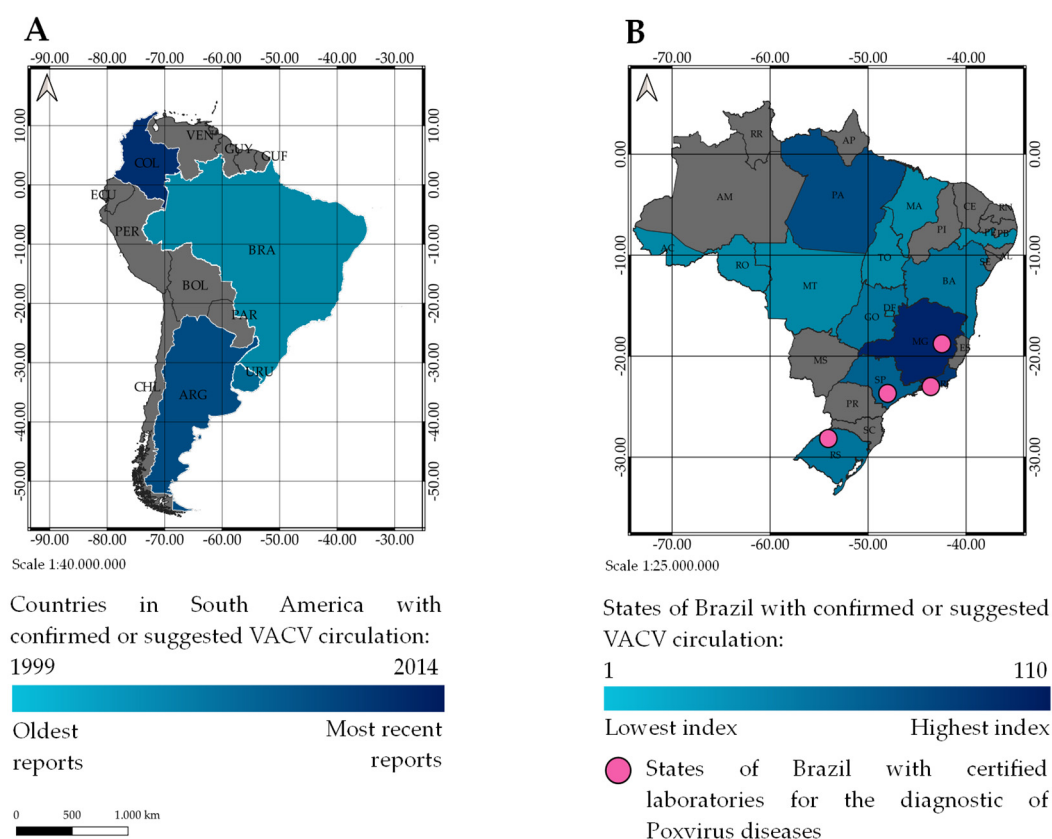


Figure 1. Characterization of vaccinia virus circulation in the South American continent. (A) Map of South America indicating the countries where VACV has been detected or suggested to be circulating. The countries in gray color have not recorded VACV detection or suggestion so far. The blue gradient in the left highlights the first records of VACV in Brazil starting in 1999 to the last one in 2014, in Colombia. (B) Map of Brazil indicating the States where VACV has been detected or suggested to be circulating. The states in gray color have not recorded VACV detection or suggestion so far. The blue gradient in the right highlights the States from the lowest to the highest index of records reported by scientific publications. Acre (AC), Maranhão (MA), Mato Grosso (MT), Pernambuco (PE), Rondônia (RO), Tocantins (TO), and the Federal District (DF) present only one record each. On the other hand, Minas Gerais (MG) is the state with the highest number of VACV cases (110 records). The pink circles indicate the States of Brazil where there are certified laboratories for the diagnosis of Poxvirus diseases. This map was made using the Free and Open Source QGIS program based on free shapefiles by Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) available at <https://www.ibge.gov.br/geociencias/downloads-geociencias.html> (accessed on 16 October 2020).

Outbreaks and/or VACV occurrences have been recorded in 11 Brazilian states over these 20 years [29–43]. However, only in the States of Minas Gerais and Goiás (Midwest region) BV is mandatory reported by the public health departments [44,45]. It is also interesting to note that there is a centralization of the diagnosis in the laboratory response network located in few research centers or governmental institutions. These reference centers are distributed in the States of Minas Gerais, São Paulo, and Rio de Janeiro (Southeast region), and in the State of Rio Grande do Sul (South region). With the increasing number of BV cases over time, this scenario reflects how BV and VACV occurrences are still neglected in Brazil. Therefore, forming a cooperative network with strategic actions to communicate, monitor, prevent, and improve research is very important and recommended. This network would be essential to increase partnerships and investments in health, agriculture, and environment research, for a prompt national and global response to reduce the impacts caused by VACV. However, as suggested by Zanella and co-workers, the surveillance of VACV is very scarce, creating more space for the virus to spread and increasing the burden related to its occurrence [46].

The first signs of the emergence of BV in Brazil prompted numerous relevant questions regarding VACV epidemiology, natural history, its hosts, and transmission chain [12,15,29]. Figure 2 shows the number of scientific publications related to the emergence of VACV in Brazil over the past 20 years and the discoveries regarding its natural history and other related fields. It is possible to observe a gradual increase in scientific publications related to VACV and BV until 2017. From that year on, the number of scientific publications decreased drastically until 2020. It is also important to highlight a massive reduction in the budget destined to science and public health in Brazil in the last four years [47,48]. Moreover, Brazil has experienced Dengue, Zika, Yellow Fever, and Chikungunya viruses threat, which have set up significant public health issues, compromising the financial support to study other viruses and pathogens of great public health interest.

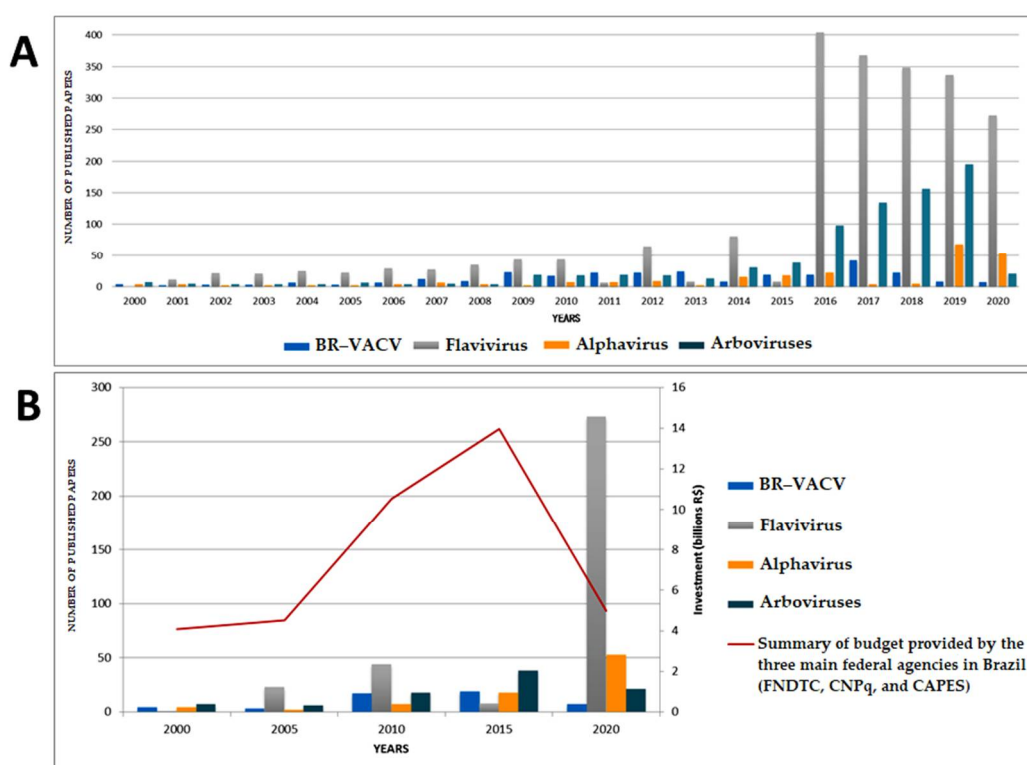


Figure 2. (A) Distribution of published scientific papers about Vaccinia virus and/or Bovine Vaccinia, Flavivirus, Alphavirus and Arboviruses during 2000–2020 in Brazil. We included a total of 3,511 publications identified by conducting electronic searches in PubMed platform, available at <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/> (accessed on 15 March 2021). Published studies were identified using the keywords Vaccinia virus, Bovine Vaccinia, and Brazil ($n = 281$); Flavivirus and Brazil ($n = 2,184$); Alphavirus and Brazil ($n = 243$); and Arboviruses and Brazil ($n = 803$). An average of 13.4 VACV publications per year were identified. (B) Analysis between the numbers of published papers in Brazil (according to the theme of interest) and the summary of scientific research investments over the past twenty years. Although the decrease in publications of BR-VACV is related to the reduction in funding for its research, the same is not valid for the research related to arboviruses.

After the emergence of VACV and the evolution of studies related to its natural circulation, several findings of great relevance have supported its epidemiology. The first studies associated with the seroprevalence of OPV in rural populations emerged in 2010. Mota and colleagues retrospectively analyzed individuals from Amazon rural villages in North Brazil, finding a seroprevalence of 27.9% [49]. Interestingly 23.4% of the individuals were not vaccinated against smallpox, suggesting they could be exposed to naturally circulating OPV [49]. In 2015, a report from Figueiredo et al. showed a seroprevalence of 9.8% in individuals from rural areas where BV cases have not been observed since the late 1990s [50]. The value of seroprevalence studies as surveillance tools for infectious diseases in the general population is significant. Hence, to better understand the burden of VACV

infections, to identify risk factors, target interventions, and monitor trends, Costa and colleagues designed the first epidemiological study in an endemic area of Brazil [43]. In that survey, almost 31% of studied individuals tested positive for neutralizing antibodies. Increasing of age and previous BV outbreak in the rural properties were independently associated with neutralizing antibodies [43].

Borges and colleagues described a seroprevalence of neutralizing antibodies against OPV in 75.7% of dairy cows sampled in rural communities of Minas Gerais State [22]. Furthermore, the presence of domestic felids on a property was significantly associated with diminished odds of a cow having OPV-neutralizing antibodies. Another study also conducted in Minas Gerais State revealed a seroprevalence of neutralizing antibodies against OPV in 20.6% was also described in equids, raising questions about the role of equids in the VACV epidemiological chain, as well as unrecognized infections and silent circulation [51].

3. Genetic Characterization of Brazilian Vaccinia Viruses (BR-VACV)

Over the past 20 years, the genetic characterization of the BR-VACV isolates is generally carried out by analyses of specific genetic markers. However, the absence of whole-genome sequences from isolates represents a significant gap to better understand the origin and evolutionary history of the viruses circulating in Brazil. Despite that, another significant discovery is the demonstration that BR-VACV is grouped into at least two different clusters based on genetic diversity: group I and group II [52–54].

Through histopathological and immunohistochemistry analysis in experimentally infected BALB/c mice, it was possible to identify the virulence patterns presented by different VACV isolates [52–58]. The isolates belonging to group I are less virulent in vitro and in the murine model, while the isolates belonging to group II exhibit great virulence [53,54,57]. Subsequent findings demonstrated that these two groups could co-circulate in the same geographic area and co-infect the same host [34,52]. Despite the existence of two VACV groups circulating in Brazil, the group I viruses have been more frequently isolated when compared to viruses from group II. However, the available laboratory methodology for isolation could be a bias [55].

The first isolation of two different VACV strains in the same BV outbreak was described among neighboring farms in the rural area of the state of Minas Gerais, in 2001. During this outbreak, the viruses named Guarani P1 virus (GP1V) and Guarani P2 virus (GP2V) were isolated and characterized [52]. It was observed that several conserved genes also present in other representatives of OPV genus were detected in both GP1V and GP2V. However, this study's main finding was to indicate that different isolates from different places could establish a natural circulation, demonstrating that VACV can have multiple origins and raise a new perspective to explain the genetic diversity observed in Brazil [14,53]. Future studies would reinforce the hypothesis of VACV coinfection in the same host during the same outbreak, showing the existence of a diversity of clones associated with viral infection [54,55,59]. Although these findings are essential in the VACV history, the knowledge regarding how the diversity of clones and genetic variety can interfere in BV outbreaks with different characteristics, different virulence patterns, and clinical presentation in animals and in humans still need to be better explored.

The approach of VACV genetic diversity in Brazil has expanded considerably. Some genes have been identified as useful markers to discriminate between the BR-VACV groups. Analysis of the A56R gene, that encodes for the viral hemagglutinin, revealed a molecular signature based into 18-nucleotide deletion in Group I of BR-VACV [11,12,14]. Another 18-nucleotide deletion in BR-VACV Group I was observed for the gene that encodes the A-type inclusion body protein (A26L), together with an additional 12-nucleotide deletion [60]. Furthermore, a 10-nucleotide deletion is also present for the gene that encodes the CC-chemokine-binding protein (C23L) [57] and a 15-nucleotide deletion for the serine protease inhibitor-3 gene (K2L) gene [54]. On the other hand, these molecular signatures are not detectable in group II, which is composed of several Brazilian isolates and the reference

sample VACV–Western Reserve [11,12,14,54,57,60]. These approaches are important, not only for sample identification but also to infer ancestry and to investigate hypothetical correlation of each sample or group with its unique epidemiological and biological features.

Many studies focused on identifying molecular targets in the following years allowed a better characterization of viral diversity. These efforts were also significant for the evolution of the VACV diagnosis, and several protocols for laboratory identification became available [57–63]. However, the evolution of the viral isolation, identification, and characterization protocols was not followed by its implementation in the country's reference laboratories, showing a gap between the scientific discoveries and sanitary agencies and responsible organs positioning or animal defense facing outbreak emergencies in Brazilian states.

The complete genome sequences of only two BR-VACV are available so far, Cantagalo and Serro viruses [56,64]. Phylogenetic analysis performed by Medaglia and colleagues showed evidence of a novel, independent cluster of VACV formed by the wild strains Cantagalo and Serro viruses, the Brazilian vaccinal strain IOC (VACV-IOC), and *Horsepox virus* (HSPV). These findings support the hypothesis that BR-VACV could be derived from an ancient smallpox vaccine sample related to *Horsepox virus* that escaped to nature, representing feral VACV that evolved independently of the Brazilian vaccinal strain used in the 1970s after splitting from a most recent common ancestor related to *Horsepox virus* [64]. However, the lack of additional genome sequences of wild BR-VACV samples hampers a conclusive statement about their origins.

Recently, the analysis of the complete genome of clinical isolates of the Cantagalo virus, collected in the early years and at the epicenter of the emergence of VACV in Brazil, revealed genetic characteristics not shared among the isolates. These data suggest different events of VACV spreading in the Southeastern region of Brazil, reflecting the complex genomic diversity of the isolates related to the first outbreaks [65]. The sequencing of more isolates would allow better identification of new genetic markers, elucidates the genetic diversity of BR-VACV that circulate throughout Brazil and probably in other South American countries. The whole-genome sequencing could also help shed light regarding the origins of BR-VACV.

4. Classic Transmission and Alternative Routes for Zoonotic BR-VACV Infections

The first studies related to VACV and BV in Brazil focused on describing outbreaks affecting bovines and humans to understand the transmission dynamic, identification, and biological and molecular characterization of the etiological agent [11,12,14].

After that, the identification of the host spectrum has also been one of the main themes investigated. The detection of VACV in wild rodents, non-human primates, marsupials, procyonids, and equids a few years after the registration of the first BV outbreak has contributed significantly to assessing the dynamics of virus circulation and maintenance in wild and rural environments [30–37,66]. Additionally, VACV circulation has also been detected among domestic animals (cats and dogs) in urban areas [67,68] (Supplementary Table S1).

Although many studies have been trying to elucidate the specific role of farming and wild animals in the VACV transmission chain, there are still many gaps to fill regarding the occurrence of BV outbreaks. However, once VACV was detected in a broad spectrum of hosts in rural and urban environments, it is possible to suggest that some of the particular species can contribute to the spread of VACV to new environments [32,67,68]. Some studies have shown that bovines have a crucial role as viral amplifiers due to the elimination of infectious viral particles through feces and milk in the environment [12,69,70]. These findings suggest that the infectious particles eliminated in the environment could be a source of contamination to other animals (e.g., rodents) in rural areas, spreading to wild areas and maintaining the viral dynamic in nature [33,68,70,71]. Thereby, further studies and the adoption of preventive measures are necessary to reduce the impact of VACV infections and BV outbreaks. Considering the clinical manifestations of BV, if there is no

knowledge for correct management during new and frequent outbreaks, it is not difficult to imagine the increasing burden of BV in the near future.

The establishment of protocols for the detection and characterization of circulating BR-VACV provided the expansion of studies related to the viral host spectrum knowledge. Thus, the detection and characterization of BR-VACV in wild and urban environments (besides rural) began to be conducted in Brazil around the decade of 2010. In the study conducted by Abrahão and colleagues, a VACV strain named Mariana virus (MARV) was isolated from a peridomestic rodent during a BV outbreak in a rural area of Minas Gerais State [33]. Additionally, the same virus was also isolated from humans and dairy cattle affected during that outbreak. This fact strengthens the hypothesis that other animals such as rodents, could be potentially related to the spread of VACV from the rural to wild environments and vice versa [33]. Further studies conducted in areas with history of BV outbreaks corroborated Abrahão's findings, demonstrating the circulation of VACV in wild and synanthropic rodents, reinforcing the hypothesis that wild rodents could be implicated as viral reservoirs [66,72,73].

The studies related to the VACV circulation in wild environments raised epidemiological questions regarding its transmission cycle. Hence, Abrahão et al. (2009) and Miranda et al. (2017) proposed hypothetical models for VACV transmission through different environments [33], and interaction networks highlighting the wild animals as links between natural and anthropic environments [66]. Furthermore, Costa and colleagues have also proposed a hypothetical model to explain the circulation of VACV in domestic dogs and wild coatis from a transitioning area between urban and wild environments [68]. Using a serological and molecular approach, it was found that the animals were exposed to VACV, and they can potentially work as bridges promoting the circulation of VACV throughout wild and urban environments and posing a threat to human health [68]. Another study detected the presence of VACV in urban domestic cats in Brazil, reinforcing the possibility of transmission of VACV to humans and veterinary professionals, similar to the cases of CPXV in Europe [67].

Another study showed molecular evidence of OPV circulation in capybaras that inhabit the Lagoa da Pampulha (part of the famous architectural complex of Pampulha in Belo Horizonte, Southeast region of Brazil) and surroundings, raising questions about these rodents in the VACV transmission cycle, as well as the presence of VACV in urban areas [73]. Further studies have also demonstrated VACV circulation in capybaras in the State of São Paulo, confirming the susceptibility of these large rodents to the virus [74]. Finally, the detection of VACV in other wild animals (rodents, marsupials, chiropterans, and cingulates) in the South and Southeast regions of Brazil, outside the context of BV outbreaks, revealed that these animals could potentially act as hosts in the epidemiological chain of VACV in urban environments, and possibly play a role in the transmission to humans [75].

The possibility of disseminating VACV in the urban environment and increasing BV cases should be better investigated to shed more light on the VACV emergence. It is estimated that, due to the discontinuation of smallpox vaccination, a large proportion of the population living in urban environments have never been exposed to OPV [3,76,77]. Moreover, there are more and more immunosuppressed individuals in a society due to chronic and acquired conditions, whose exposure to VACV could evolve into a severe form of infection. Furthermore, the potential establishment of the virus in urban domesticated animals can contribute significantly to the maintenance of an urban cycle [17,27,78,79]. Hence, further studies are necessary to better understand the potential entry of VACV into the urban environment.

As BV affects mainly dairy cattle and milkers, several queries regarding the transmission of VACV through milk and dairy products have been raised. Even during scientific conferences in Brazil and worldwide, questions such as "is there any chance someone could get infected with VACV by drinking milk from infected cows?" have emerged. Indeed, studies focused on the relationship between VACV transmission and dairy production have

grown significantly over these 20 years of VACV history in Brazil [20–22]. Figure 3 displays a timeline with chronological events related to the detection of VACV in dairy products. The first records of the presence of VACV in milk samples from naturally infected cows occurred during 2005–2008. Abrahão and colleagues detected and isolated viral particles on chicken egg chorioallantoic membranes (CAM) and also observed cytopathic effects on embryo fibroblasts (CEFs), in addition to molecular and phylogenetic analysis [80]. Hence, this study became one of the main references to raise questions about milk's risks as a potential alternative route of VACV transmission.

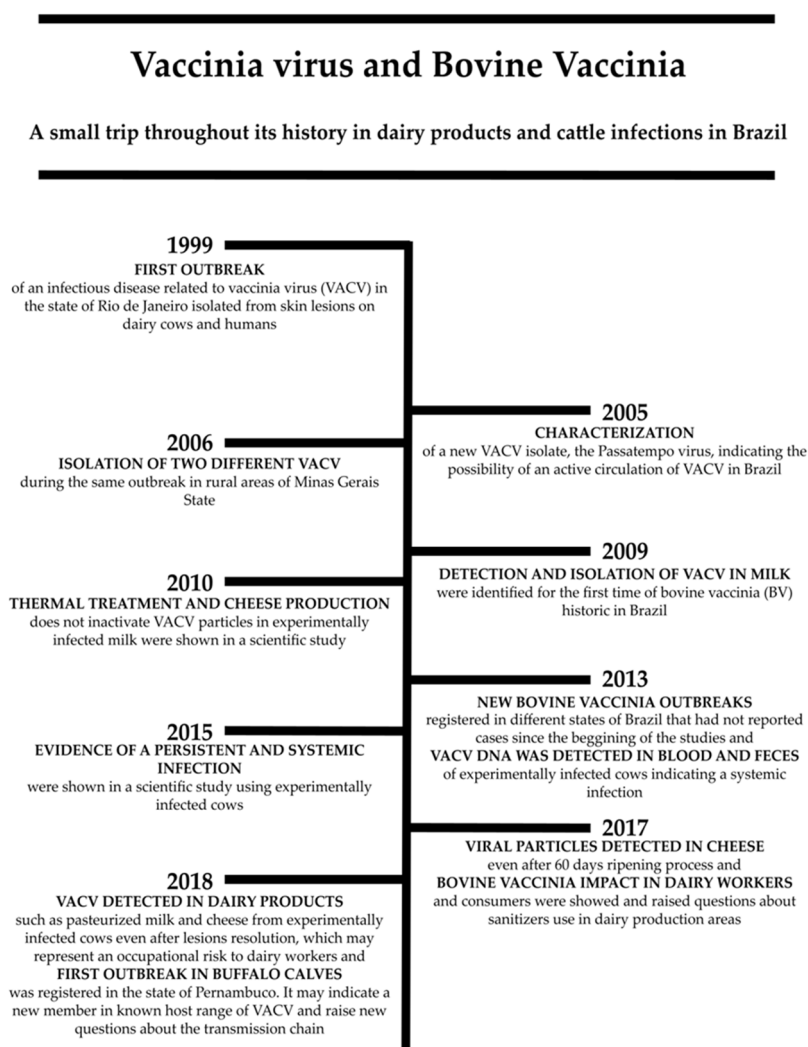


Figure 3. A vertical timeline of the main events regarding the Vaccinia virus occurrence dairy products and cattle in Brazil during 2000–2020.

In the following years, other correlated researches would appear, revealing that VACV viral particles could not be inactivated even after thermal treatments of milk and during cheese processing, both in their production and in their maturation period. The detection of infectious viral particles (from both groups I and II) in milk samples and dairy products confirmed this hypothesis [80–84].

It is noteworthy that serological and molecular evidence was detected in naturally and experimentally infected cows, and dairy products produced from the milk of these animals, raising the discussion about the persistence of systemic infection in these animals [13,84]. In addition to this evidence, Borges et al. demonstrated that even in rural properties with no record of BV outbreaks, dairy cattle could present neutralizing antibodies against VACV [22]. Furthermore, the practice of milking without properly sanitizing cows' udders

can directly affect cattle exposure and milkers [22]. All the studies conducted over the past few years reinforce the possibility that dairy products could work as vehicles for VACV dissemination and potential risks generated to public health [78,80–84].

5. The Transversal Impact of BR-VACV

In the last 20 years, milk and dairy products' production and consumption have grown significantly in Brazil. Data from Brazilian Agricultural Research Corporation (EMBRAPA) [85] have shown that the milk production in Brazil increased 139% between 1990 and 2019. Brazil ranks as fourth among 20 countries regarding total milk production and annual growth rates, being behind India, the United States, and Pakistan [85,86]. The State of Minas Gerais leads the ranking of the milk production, followed by Paraná and Rio Grande do Sul [85,86].

The tradition in milk production and its derivatives is a striking feature of Minas Gerais State, significantly impacting the Brazilian economy [85]. Historically, Minas Gerais has a tradition in dairy production and has been primarily affected by BV outbreaks. In addition to dairy farming, the State of Minas Gerais is internationally known for its production of artisanal cheeses prepared by local farms in the countryside, being registered as intangible and cultural heritage, showing great relevance to the State economy, as well as to the country [85–87]. Given this traditional feature, dairy products can also be considered as essential assets for tourism purposes. According to Kamimura et al., the State of Minas Gerais has lots of tourist regions and many tourists feel attracted by the artisanal cheese production, learning about the process during scheduled tours [88]. This recognition directly impacts the economy of Minas Gerais. Thus, all issues affecting dairy production in the local farms greatly affect the local economy and national.

The demonstration that these products can act as alternative routes for zoonotic VACV transmission, the demand for monitoring and developing preventive strategies for quality control of both milk and its derivatives are necessary. Furthermore, proper training emphasizing the importance of hygiene measures to milkers focused on milking activities and artisanal cheese production would be essential. Therefore, the awareness and training of milkers and farmers to acceptable dairy practices, the identification of any problems during production, and the supervision and orientation by trained professionals would be critical to result in excellent and safe products.

The quality control of milk and dairy products through the process of pasteurization is of great importance in preventing the transmission of VACV and other infectious agents, also preventing these products to potentially act as alternative routes of viral dissemination in the rural and also urban environments [17,22,25,87,88]. However, the impact of milk and dairy products as vehicles for VACV spreading is still poorly explored. In regions recognized by the production as artisanal cheese, the burden of VACV maybe even more significant since the artisanal cheeses are essentially made with crude milk (no thermal processes are applied) [89–91].

In Brazil, very few laboratories have the knowledge, tools, and capacity for BV diagnostics, despite many outbreaks have been described in the country (especially in the Southeast region). In addition, the increasing danger of potential establishment of VACV urban cycles and consequent outbreaks makes it extremely necessary to invest in research that can elucidate questions about the eco-epidemiological cycle in different areas, the origin of the virus, its natural reservoirs, and new therapies to control the burden of VACV infections. Furthermore, the investment in new, efficient, and rapid tools for VACV and other OPV detection and increasing the diagnostic capacity for other laboratories throughout Brazil would be valuable for the surveillance and monitoring of VACV and future BV outbreaks.

The consolidation of VACV infections in large populations can lead to problems for public health services. The undergraduate courses in Medicine and Nursing at the main public universities that are considered high-quality educational institutions and where most research is conducted in Brazil, sometimes do not include or dedicate a small portion of

the teaching load regarding Poxviruses in disciplines related to Microbiology and Virology (Supplementary Table S2). Thus, newly trained health professionals are not being prepared to deal with the burden of VACV occurrence and even with BV outbreaks.

The exclusion of teaching about Poxviruses in many undergraduate courses can be partially explained by the emergence of new viruses and new diseases that affect humans and are more present in the population's daily lives after the eradication of smallpox, as well as how health authorities still neglect VACV and BV. As a result, professionals do not know about the clinical symptoms characteristic of poxviruses, including VACV infection and its epidemiology. It has not been uncommon for cases in which health professionals offer incorrect treatment, with the false conception that this is another type of infection, which makes the epidemiological mapping of cases of BV in Brazil even more complex [92].

In 20 years, one study was conducted to evaluate the healthcare professionals' knowledge and perceptions about bovine vaccinia in Brazil and the results showed that 43.1% of healthcare professionals that work in an endemic area have never heard about the disease, which could be attributed to not being well-informed enough to recognize and therefore report clinical cases accurately [92]. The lack of knowledge of health professionals also reflects in the BV notification data across Brazil.

6. Where Are We Going with the BV and/or VACV Threat?

Despite the growing number of scientific publications and research on BV and VACV natural circulation in Brazil, many gaps in the knowledge of its epidemiology and natural history have not been filled yet. The sequencing and genetic characterization of new isolates are still needed to assess genetic relatedness and determine relationships among different BR-VACV strains and hosts. The reports of the expansion of BV in Brazil and in other South American countries have not been enough to establish epidemiological surveillance, being BV and VACV still neglected by health authorities. Because most of the research on VACV and BV was focused on describing the outbreaks and its consequences, there are still many gaps to explore in VACV epidemiology, such as its prevalence among milking cattle, other farms and domestic animals, dairy workers, and the general population.

The absence of a unified system and accurate records provided by the healthcare agencies are out of date and do not demonstrate VACV and/or BV epidemiology's actual situation. It is necessary to develop continuing education practices for all professionals working with VACV and/or BV. Hence, all kind of professionals dealing with VACV emergence, such as medical doctors, nurses, epidemiologists, veterinarians, laboratory workers, as well as public health authorities, people involved in fieldwork, and administrative personnel, could offer greater credibility in the registration of cases and data, thus providing better and efficient preventive actions.

Furthermore, future studies aiming to understand the prevalence of VACV and/or OPV infections in urban populations and monitor the levels of immunity against VACV are necessary. Additionally, routine disease surveillance through physicians and laboratories is also essential to better understand the presence of VACV and the emergence of outbreaks in vulnerable populations, monitoring the associated risk factors to guide better public health practices.

This review aimed to highlight the main findings in these 20 years of history of VACV in Brazil through studies relevant to the understanding of the situation that the virus and the disease are in the country. The lack of investment in research, the unpreparedness of health professionals and agencies to deal with the disease, and the dairy products showing aptitude as alternative routes of infection raise the question of how BV should be treated from this moment on. Thus, the need for further studies is clarified so that all gaps are filled to control and monitor the disease in Brazil.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/pathogens10040406/s1>, Table S1: List of hosts and susceptible animals to BR-VACV, and the association to transmission to humans; Table S2: List of the main Universities in Brazil that mention the teaching of Virology and Poxviruses in their undergraduate courses.

Author Contributions: Conceptualization, I.J.d.S.D., J.S.d.O. and G.d.S.T.; writing—original draft preparation, I.J.d.S.D. and J.S.d.O.; writing—review and editing, I.J.d.S.D., J.S.d.O., K.L.S.R., D.B.d.O., G.B.C., E.G.K. and G.d.S.T.; visualization, I.J.d.S.D. and J.S.d.O.; supervision, G.B.C. and G.d.S.T.; project administration, G.d.S.T.; funding acquisition, D.B.d.O., E.G.K. and G.d.S.T. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was developed in the context of projects supported by different agencies. EGK and GST are supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) (grant: Research fellowship). The authors acknowledge Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)—Finance codes CDS—APQ-01574-17 and APQ-04039-17, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—Brasil and CNPq. IJdSD acknowledges CAPES (graduate scholarship). JSO acknowledges CAPES—Finance code 001 (grant graduate scholarship). The funders had no role in study design, data collection, analysis, decision to publish, or manuscript preparation.

Acknowledgments: We are thankful to all the colleagues from the Laboratório de Vírus (ICB-UFMG) for their support. We thank the financial support provided by CNPq, CAPES, FAPEMIG, and PRPq. We are grateful to produce this work, and we hope this helps other researchers in the future.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Fenner, F.; Henderson, D.A.; Arita, I.; Jezek, Z.; Ladnyi, I.D. *Smallpox and Its Eradication*; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 1988.
2. Kirby, T. WHO celebrates 40 years since eradication of smallpox. *Lancet Infect. Dis.* **2020**, *20*, 174. [CrossRef]
3. Meyer, H.; Ehmann, R.; Smith, G.L. Smallpox in the Post-Eradication Era. *Viruses* **2020**, *12*, 138. [CrossRef]
4. Baxby, D. Jenner's Smallpox Vaccine: The Riddle of Vaccinia Virus and Its Origin. *Am. Hist. Rev.* **1981**, *87*, 1044–1045.
5. Jenner, E. An Inquiry into the Causes and Effects of the Variolae Vaccinae; a Disease Discovered in some of the Western Counties of England, Particularly Gloucestershire, and Known by the Name of The Cow Pox, London. In *Classics of Medicine and Surgery*; Camac, C.N.B., Ed.; Dover: Mineola, NY, USA, 1959; pp. 213–240.
6. Henderson, D.; Preston, R. Smallpox: The Death of a Disease—The Inside Story of Eradicating a Worldwide Killer. *J. Hist. Med. Allied Sci.* **2009**, *66*, 276–277.
7. Pickup, D.J. Understanding Orthopoxviruses interference with host immune responses to inform novel vaccine design. *Expert Rev. Vaccines* **2007**, *6*, 87–95. [CrossRef]
8. International Committee on Taxonomy of Viruses—ICTV. 2020. Available online: <https://talk.ictvonline.org/> (accessed on 23 August 2020).
9. Sánchez-Sampedro, L.; Perdiguero, B.; Mejías-Pérez, E.; García-Arriaza, J.; Di Pilato, M.; Esteban, M. The evolution of poxvirus vaccines. *Viruses* **2015**, *7*, 1726–1803. [CrossRef]
10. Miller, L.; Richter, M.; Hapke, C.; Stern, D.; Nitsche, A. Genomic expression libraries for the identification of cross-reactive Orthopoxvirus antigens. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e21950. [CrossRef]
11. Damaso, C.R.A.; Esposito, J.J.; Condit, R.C.; Moussatché, N. An emergent Poxvirus from humans and cattle in Rio de Janeiro State: Cantagalo virus may derive from Brazilian smallpox vaccine. *Virology* **2000**, *277*, 439–449. [CrossRef]
12. Trindade, G.S.; da Fonseca, F.G.; Marques, J.T.; Nogueira, M.L.; Mendes, L.C.N.; Borges, A.S.; Peiró, J.R.; Pituco, M.E.; Bonjardim, C.A.; Ferreira, P.C.P.; et al. Araçatuba virus: A vaccinia-like virus associated with infection in humans and cattle. *Emerg. Infect. Dis.* **2003**, *9*, 155–160. [CrossRef] [PubMed]
13. Matos, A.C.D.; Rehfeld, I.S.; Guedes, M.I.M.C.; Lobato, Z.I.P. Bovine Vaccinia: Insights into the Disease in Cattle. *Viruses* **2018**, *10*, 120. [CrossRef]
14. Leite, J.A.; Drumond, B.P.; Trindade, G.S.; Lobato, Z.I.P.; da Fonseca, F.G.; Santos, J.R.; Madureira, M.C.; Guedes, M.I.M.C.; Ferreira, J.M.S.; Bonjardim, C.A.; et al. Passatempo virus, a vaccinia virus strain, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* **2005**, *11*, 1935–1938. [CrossRef]
15. Lobato, Z.; Trindade, G.S.; Frois, M.C.M.; Ribeiro, E.B.T.; Dias, G.R.C.; Teixeira, B.M.; Lima, F.A.; Almeida, G.M.F.; Kroon, E.G. Outbreak of exantemal disease caused by Vaccinia virus in human and cattle in Zona da Mata region, Minas Gerais. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* **2005**, *57*, 423–429. [CrossRef]
16. Kroon, E.G.; Mota, B.E.F.; Abrahão, J.S.; da Fonseca, F.G.; Trindade, G.S. Zoonotic Brazilian Vaccinia virus: From field to therapy. *Antiviral. Res.* **2011**, *92*, 150–163. [CrossRef] [PubMed]
17. Oliveira, J.S.; Figueiredo, P.O.; Costa, G.B.; Assis, F.L.; Drumond, B.P.; da Fonseca, F.G.; Nogueira, M.L.; Kroon, E.G.; Trindade, G.S. Vaccinia virus Natural Infections in Brazil: The Good, The Bad, and The Ugly. *Viruses* **2017**, *9*, 340. [CrossRef]
18. Silva-Fernandes, A.T.; Travassos, C.E.; Ferreira, J.M.; Abrahão, J.S.; Rocha, E.S.; Viana-Ferreira, F.; dos Santos, J.R.; Bonjardim, C.A.; Ferreira, P.C.P.; Kroon, E.G. Natural human infections with Vaccinia virus during bovine vaccinia outbreaks. *J. Clin. Virol.* **2009**, *44*, 308–313. [CrossRef]

19. Silva, A.C.; Reis, B.B.; Ricci Junior, J.E.R.; Fernandes, F.S.; Correa, J.F.; Schatzmayr, H.G. Infecção em humanos por varíola bovina na microrregião de Itajubá, Estado de Minas Gerais: Relato de caso. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **2008**, *41*, 507–511. (In Portuguese) [[CrossRef](#)]
20. Schatzmayr, H.G.; Costa, R.V.C.; Gonçalves, M.C.R.; Barreto, D.F.; Batista, V.H.; Silva, N.E.V.; Brust, L.A.C.; Barth, O.M. Human infections caused by vaccinia-like poxviruses in Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **2009**, *42*, 672–676. [[CrossRef](#)]
21. Lima, M.T.; Oliveira, G.P.; Assis, F.L.; Bretas de Oliveira, D.; Vaz, S.M.; Trindade, G.S.; Abrahão, J.S.; Kroon, E.G. Ocular Vaccinia Infection in Dairy Worker, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* **2018**, *24*, 161–162. [[CrossRef](#)]
22. Borges, I.A.; McCollum, A.M.; Mehal, J.M.; Haberling, D.; Dutra, L.A.L.; Vieira, F.L.; Andrade, L.A.O.; Kroon, E.G.; Holman, R.C.; Reynolds, M.G.; et al. Dairy production practices and associated risks for bovine vaccinia exposure in cattle, Brazil. *New Microb. New Infect.* **2017**, *20*, 43–50. [[CrossRef](#)]
23. Rehfeld, I.S.; Fraiha, A.L.S.; Matos, A.C.D.; Costa, A.G.; Gallinari, G.C.F.; Costa, E.A.; Guedes, M.I.M.C.; Lobato, Z.I.P. Short communication: Parapoxvirus and Orthopoxvirus coinfection in milk of naturally infected cows. *J. Dairy Sci.* **2018**, *101*, 7801–7803. [[CrossRef](#)]
24. Franco-Luiz, A.P.; Fagundes-Pereira, A.; Costa, G.B.; Alves, P.A.; Oliveira, D.B.; Bonjardim, C.A.; Ferreira, P.C.; Trindade, G.S.; Panei, C.J.; Galosi, C.M.; et al. Spread of vaccinia virus to cattle herds, Argentina, 2011. *Emerg. Infect. Dis.* **2014**, *20*, 1576–1578. [[CrossRef](#)]
25. Franco-Luiz, A.P.; Paim, L.M.; Oliveira, G.P.; Pereira, A.F.; de Almeida, G.M.; Figueiredo, L.B.; Tanus, A.; Trindade, G.S.; Ferreira, P.P.; Kroon, E.G.; et al. Horizontal study of vaccinia virus infections in an endemic area: Epidemiologic, phylogenetic and economic aspects. *Arch. Virol.* **2015**, *160*, 2703–2708.
26. Franco-Luiz, A.P.; Oliveira, D.B.; Pereira, A.F.; Gasparini, M.C.; Bonjardim, C.A.; Ferreira, P.C.; Trindade, G.S.; Puentes, R.; Furtado, A.; Abrahão, J.S.; et al. Detection of Vaccinia Virus in Dairy Cattle Serum Samples from 2009, Uruguay. *Emerg. Infect. Dis.* **2016**, *22*, 2174–2177. [[CrossRef](#)]
27. Styczynski, A.; Burgado, J.; Walteros, D.; Usme-Ciro, J.; Laiton, K.; Farias, A.P.; Nakazawa, Y.; Chapman, C.; Davidson, W.; Mauldin, M.; et al. Seroprevalence and Risk Factors Possibly Associated with Emerging Zoonotic Vaccinia Virus in a Farming Community, Colombia. *Emerg. Infect. Dis.* **2019**, *25*, 2169–2176. [[CrossRef](#)]
28. Usme-Ciro, J.A.; Paredes, A.; Walteros, D.M.; Tolosa-Pérez, E.N.; Laiton-Donato, K.; Pinzón, M.D.; Petersen, B.W.; Gallardo-Romero, N.F.; Li, Y.; Wilkins, K.; et al. Detection and Molecular Characterization of Zoonotic Poxviruses Circulating in the Amazon Region of Colombia, 2014. *Emerg. Infect. Dis.* **2017**, *23*, 649–653. [[CrossRef](#)]
29. Schatzmayr, H.G.; Costa, R.V.; Gonçalves, M.C.; D’Andrea, P.S.; Barth, O.M. Human and animal infections by vaccinia-like viruses in the state of Rio de Janeiro: A novel expanding zoonosis. *Vaccine* **2011**, *29*, 65–69. [[CrossRef](#)]
30. Lima, M.T.; Oliveira, G.P.; Afonso, J.A.B.; Souto, R.J.C.; Mendonça, C.L.; Dantas, A.F.M.; Abrahão, J.S.; Kroon, E.G. An Update on the Known Host Range of the Brazilian Vaccinia Virus: An Outbreak in Buffalo Calves. *Front. Microbiol.* **2019**, *9*, 3327. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Brum, M.C.S.; dos Anjos, B.L.; Nogueira, C.E.W.; Amaral, L.A.; Weiblen, R.; Flores, E.F. An outbreak of orthopoxvirus-associated diseases in horses in southern Brazil. *J. Vet. Diagn. Investig.* **2010**, *22*, 143–147.
32. Peres, M.G.; Bacchiegam, T.S.; Appolinário, C.M.; Vicente, A.F.; Mioni, M.S.R.; Ribeiro, B.L.D.; Fonseca, C.R.S.; Pelícia, V.C.; Ferreira, F.; Oliveira, G.P.; et al. Vaccinia Virus in Blood Samples of Humans, Domestic and Wild Mammals in Brazil. *Viruses* **2018**, *10*, 42. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Abrahão, J.S.; Guedes, M.I.; Trindade, G.S.; Fonseca, F.G.; Campos, R.K.; Mota, B.F.; Lobato, Z.I.; Silva-Fernandes, A.T.; Rodrigues, G.O.; Lima, L.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* **2009**, *4*, e7428. [[CrossRef](#)]
34. Campos, R.K.; Brum, M.C.; Nogueira, C.E.; Drumond, B.P.; Alves, P.A.; Siqueira-Lima, L.; Assis, F.L.; Trindade, G.S.; Bonjardim, C.A.; Ferreira, P.C.P.; et al. Assessing the variability of Brazilian Vaccinia virus isolates from a horse exanthematic lesion: Coinfection with distinct viruses. *Arch. Virol.* **2011**, *156*, 275–283. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Peres, M.G.; Bacchiega, T.S.; Appolinário, C.M.; Vicente, A.F.; Allendorf, S.D.; Antunes, J.M.; Moreira, S.A.; Legatti, E.; Fonseca, C.R.; Pituco, E.M.; et al. Serological study of vaccinia virus reservoirs in areas with and without official reports of outbreaks in cattle and humans in São Paulo, Brazil. *Arch. Virol.* **2013**, *158*, 2433–2441. [[CrossRef](#)]
36. Abrahão, J.S.; de Souza Trindade, G.; Pereira-Oliveira, G.; de Oliveira Figueiredo, P.; Costa, G.; Moreira Franco-Luiz, A.P.; Lopes Assis, F.; Bretas de Oliveira, D.; Mattos Paim, L.R.; de Araújo Oliveira, C.E.; et al. Detection of Vaccinia virus during an outbreak of exanthemous oral lesions in Brazilian equids. *Equine Vet. J.* **2017**, *49*, 221–224. [[CrossRef](#)]
37. Abrahão, J.S.; Silva-Fernandes, A.T.; Lima, L.S.; Campos, R.K.; Guedes, M.I.M.C.; Cota, M.M.G.; Assis, F.L.; Borges, I.A.; Souza-Júnior, M.F.; Lobato, Z.I.P.; et al. Vaccinia virus infection in monkeys, Brazilian Amazon. *Emerg. Infect. Dis.* **2010**, *16*, 976–979. [[CrossRef](#)]
38. Sant’ana, F.J.F.; Leal, A.A.; Rabelo, R.E.; Vulcani, V.A.S.; Ferreira Junior, J.A.; Cargnelutti, J.F.; Flores, E.F. Outbreaks of vesicular diseases caused by Vaccinia virus in dairy cattle from Goiás State, Brazil (2010–2012). *Pesq. Vet. Bras.* **2013**, *33*, 860–866. [[CrossRef](#)]
39. Oliveira, D.B.; Assis, F.L.; Ferreira, P.C.; Bonjardim, C.A.; de Souza Trindade, G.; Kroon, E.G.; Abrahão, J.S. Group 1 Vaccinia virus Zoonotic Outbreak in Maranhão State, Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2013**, *89*, 1142–1145. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

40. De Assis, F.L.; Vinhote, W.M.; Barbosa, J.D.; de Oliveira, C.H.; de Oliveira, C.M.; Campos, K.F.; Silva, N.S.; de Souza Trindade, G.; Abrahão, J.S.; Kroon, E.G. Reemergence of Vaccinia Virus during Zoonotic Outbreak, Pará State, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* **2013**, *19*, 2017–2020. [CrossRef]
41. Quixabeira-Santos, J.C.; Medaglia, M.L.; Pescador, C.A.; Damaso, C.R. Animal movement and establishment of vaccinia virus Cantagalo strain in Amazon biome, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* **2011**, *4*, 726–729. [CrossRef]
42. De Souza Trindade, G.; Drumond, B.P.; Guedes, M.I.; Leite, J.A.; Mota, B.E. Zoonotic vaccinia virus infection in Brazil: Clinical description and implications for health professionals. *J. Clin. Microbiol.* **2007**, *4*, 1370–1372. [CrossRef]
43. Costa, G.B.; Augusto, L.T.S.; Leite, J.A.; Ferreira, P.C.P.; Bonjardim, C.A.; Abrahão, J.S.; Kroon, E.G.; Moreno, E.C.; Trindade, G.S. Seroprevalence of Orthopoxvirus in rural Brazil: Insights into anti-OPV immunity status and its implications for emergent zoonotic OPV. *Virol. J.* **2016**, *13*, 121. [CrossRef]
44. Resolução SES/MG N° 6.532, de 05 de Dezembro de 2018. Available online: <http://vigilancia.saude.mg.gov.br/index.php/download/resolucao-ses-mg-no-6-532-de-05-de-dezembro-de-2018/?wpdmdl=5990> (accessed on 12 November 2020). (In Portuguese)
45. Resolução Estadual SES/GO n° 004-Doenças de Notificação Compulsória Estadual. Available online: https://www.saude.go.gov.br/images/imagens_migradas/upload/arquivos/2015-11/resolucao-estadual-no_-004-2013-doe2.pdf (accessed on 12 November 2020). (In Portuguese)
46. Zanella, J.R.C. Zoonoses emergentes e reemergentes e sua importância para saúde e produção animal. *Pesq. Agropec. Bras.* **2016**, *51*, 510–519. [CrossRef]
47. Gibney, E. Brazilian science paralyzed by economic slump. *Nature* **2015**, *526*, 16–17. [CrossRef]
48. Escobar, H. In Brazil, Researchers Struggle to Fend Off Deepening Budget Cuts. Available online: <https://www.sciencemag.org/news/2017/10/brazil-researchers-struggle-fend-deepening-budget-cuts> (accessed on 25 November 2020).
49. Mota, B.E.F.; Trindade, G.S.; Diniz, T.C.; Silva-Nunes, M.; Braga, E.M.; Urbano-Ferreira, M.; Rodrigues, G.O.L.; Bonjardim, C.A.; Ferreira, P.C.P.; Kroon, E.G. Seroprevalence of orthopoxvirus in an Amazonian rural village, Acre, Brazil. *Arch. Virol.* **2010**, *155*, 1139–1144. [CrossRef]
50. Figueiredo, P.O.; Silva-Fernandes, A.T.; Mota, B.E.F.; Costa, G.B.; Borges, I.A.; Ferreira, P.C.P.; Abrahão, J.S.; Braga, E.M.; Kroon, E.G.; Trindade, G.S. Evaluating anti-Orthopoxvirus antibodies in individuals from Brazilian rural areas prior to the bovine vaccinia era. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **2015**, *110*, 804–808. [CrossRef]
51. Borges, I.A.; Reynolds, M.G.; McCollum, A.M.; Figueiredo, P.O.; Ambrosio, L.L.D.; Vieira, F.N.; Costa, G.B.; Matos, A.C.D.; de Andrade Almeida, V.M.; Ferreira, P.C.P.; et al. Serological Evidence of Orthopoxvirus Circulation Among Equids, Southeast Brazil. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 402. [CrossRef]
52. Trindade, G.S.; Lobato, Z.I.P.; Drumond, B.P.; Leite, J.A.; Trigueiro, R.C.; Guedes, M.I.M.C.; da Fonseca, F.G.; dos Santos, J.R.; Bonjardim, C.A.; Ferreira, P.C.P.; et al. Short report: Isolation of two vaccinia virus strains from a single bovine vaccinia outbreak in rural area from Brazil: Implications on the emergence of zoonotic orthopoxviruses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2006**, *75*, 486–490. [CrossRef]
53. Ferreira, J.M.S.; Drumond, B.P.; Guedes, M.I.M.C.; Pascoal-Xavier, M.A.; Almeida-Leite, C.M.; Arantes, R.M.E.; Mota, B.E.F.; Abrahão, J.S.; Alves, P.A.; Oliveira, F.M.; et al. Virulence in murine model shows the existence of two distinct populations of Brazilian Vaccinia virus strains. *PLoS ONE* **2008**, *3*, e3043. [CrossRef] [PubMed]
54. Drumond, B.P.; Leite, J.A.; da Fonseca, F.G.; Bonjardim, C.A.; Ferreira, P.C.; Kroon, E.G. Brazilian Vaccinia virus strains are genetically divergent and differ from the Lister vaccine strain. *Microbes Infect.* **2008**, *10*, 185–197. [CrossRef]
55. Oliveira, G.; Assis, F.; Almeida, G.; Albarnaz, J.; Lima, M.; Andrade, A.C.; Calixto, R.; Oliveira, C.; Diomedes Neto, J.; Trindade, G.S.; et al. From lesions to viral clones: Biological and molecular diversity amongst autochthonous Brazilian vaccinia virus. *Viruses* **2015**, *7*, 1218–1237. [CrossRef]
56. Trindade, G.S.; Emerson, G.L.; Sammons, S.; Frace, M.; Govil, D.; Fernandes Mota, B.E.; Abrahão, J.S.; de Assis, F.L.; Olsen-Rasmussen, M.; Goldsmith, C.S.; et al. Serro 2 Virus Highlights the Fundamental Genomic and Biological Features of a Natural Vaccinia Virus Infecting Humans. *Viruses* **2016**, *8*, 328. [CrossRef]
57. Assis, F.L.; Almeida, G.M.; Oliveira, D.B.; Franco-Luiz, A.P.; Campos, R.K.; Guedes, M.I.M.; Fonseca, F.G.; Trindade, G.S.; Drumond, B.P.; Kroon, E.G.; 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* **2012**, *7*, e50413. [CrossRef] [PubMed]
58. Calixto, R.; Oliveira, G.; Lima, M.; Andrade, A.C.; Trindade, G.S.; de Oliveira, D.B.; Kroon, E.G. A Model to Detect Autochthonous Group 1 and 2 Brazilian Vaccinia virus Coinfections: Development of a qPCR Tool for Diagnosis and Pathogenesis Studies. *Viruses* **2017**, *10*, 15. [CrossRef]
59. Abrahão, J.S.; Silva-Fernandes, A.T.; Assis, F.L.; Guedes, M.I.; Drumond, B.P.; Leite, J.A.; Coelho, L.F.L.; Turrini, F.; Fonseca, F.G.; Lobato, Z.I.P. Human Vaccinia virus and Pseudocowpox virus co-infection: Clinical description and phylogenetic characterization. *J. Clin. Virol.* **2010**, *48*, 69–72. [CrossRef]
60. Leite, J.A.; da Fonseca, F.G.; Trindade, G.S.; Abrahão, J.S.; Arantes, R.M.E.; Almeida-Leite, C.M.; Santos, J.R.; Guedes, M.I.M.C.; Ribeiro, B.M.; Bonjardim, C.A.; et al. A-type inclusion bodies: A factor influencing cowpox virus lesion pathogenesis. *Arch. Virol.* **2011**, *156*, 617–628. [CrossRef]

61. Trindade, G.S.; Li, Y.; Olson, V.A.; Emerson, G.; Regnery, R.L.; Fonseca, F.G.; Kroon, E.G.; Damon, I. Real-time PCR assay to identify variants of Vaccinia virus: Implications for the diagnosis of bovine vaccinia in Brazil. *J. Virol. Methods* **2008**, *152*, 63–71. [\[CrossRef\]](#)
62. Abrahão, J.S.; Lima, L.S.; Assis, F.L.; Alves, P.A.; Silva-Fernandes, A.T.; Cota, M.M.G.; Ferreira, V.M.; Campos, R.K.; Mazur, C.; Lobato, Z.I.P.; et al. Nested-multiplex PCR detection of Orthopoxvirus and Parapoxvirus directly from exanthematic clinical samples. *Virol. J.* **2009**, *6*, 140. [\[CrossRef\]](#)
63. Kroon, E.G.; Santos Abrahão, J.; de Souza Trindade, G.; Pereira Oliveira, G.; Moreira Franco Luiz, A.P.; Barbosa Costa, G.; Teixeira Lima, M.; Silva Calixto, R.; de Oliveira, D.B.; Drumond, B.P. Natural Vaccinia Virus Infection: Diagnosis, Isolation, and Characterization. *Curr. Protoc. Microbiol.* **2016**, *42*, 1–43.
64. Medaglia, M.L.G.; Moussatché, N.; Nitsche, A.; Dabrowski, P.W.; Li, Y.; Damon, I.K.; Lucas, C.G.O.; Arruda, L.B.; Damaso, C.R. Genomic Analysis, Phenotype, and Virulence of the Historical Brazilian Smallpox Vaccine Strain IOC: Implications for the Origins and Evolutionary Relationships of Vaccinia Virus. *J. Virol.* **2015**, *89*, 11909–11925. [\[CrossRef\]](#)
65. Souza, A.R.V.; Luques, M.N.; Damaso, C.R. Genomic diversity of vaccinia virus strain Cantagalo isolated in southeastern Brazil during the early years of the outbreak, 1999–2006. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **2020**, *115*, e200521. [\[CrossRef\]](#)
66. Miranda, J.B.; Borges, I.A.; Campos, S.P.S.; Vieira, F.N.; de Ázara, T.M.F.; Marques, F.A.; Costa, G.B.; Luiz, A.P.M.F.; Oliveira, J.S.; Ferreira, P.C.P.; et al. Serologic and Molecular Evidence of Vaccinia Virus Circulation among Small Mammals Serologic and Molecular Evidence of Vaccinia Virus Circulation among Small Mammals from Different Biomes, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* **2017**, *23*, 931–938. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
67. Costa, G.B.; Miranda, J.B.; Almeida, G.G.; de Oliveira, J.S.; Pinheiro, M.S.; Gonçalves, S.A.; Pimenta dos Reis, J.K.; Gonçalves, R.; Ferreira, P.C.; Bonjardim, C.A.; et al. Detection of Vaccinia virus in urban domestic cats, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* **2017**, *23*, 360–362. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
68. Costa, G.B.; Ribeiro de Almeida, L.; Cerqueira, A.G.R.; Mesquita, W.U.; Silva de Oliveira, J.; Miranda, J.B.; Saraiva-Silva, A.T.; Abrahão, J.S.; Drumond, B.P.; Kroon, E.G.; et al. Vaccinia virus among Domestic Dogs and Wild Coatis, Brazil, 2013–2015. *Emerg. Infect. Dis.* **2018**, *24*, 2338–2342. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
69. Ferreira, J.M.S.; Abrahão, J.S.; Drumond, B.P.; Oliveira, F.M.; Alves, P.A.; Pascoal-Xavier, M.A.; Lobato, Z.I.P.; Bonjardim, C.A.; Ferreira, P.C.P.; Kroon, E.G. Vaccinia virus: Shedding and horizontal transmission in a murine model. *J. Gen. Virol.* **2008**, *89*, 2986–2991. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
70. Guedes, M.I.; Rehfeld, I.S.; de Oliveira, T.M.; Assis, F.L.; Matos, A.C.; Abrahão, J.S.; Kroon, E.G.; Lobato, Z.I.P. Detection of Vaccinia Virus in Blood and Faeces of Experimentally Infected Cows. *Transbound. Emerg. Dis.* **2012**, *8*, 552–555.
71. Abrahão, J.S.; de Souza Trindade, G.; Ferreira, J.M.S.; Campos, R.K.; Bonjardim, C.A.; Peregrino Ferreira, P.C.; Kroon, E.G. Long-lasting stability of Vaccinia virus strains in murine feces: Implications for virus circulation and environmental maintenance. *Arch. Virol.* **2009**, *154*, 1551–1553. [\[CrossRef\]](#)
72. Peres, M.G.; Bacchiaga, T.S.; Appolinário, C.M.; Vicente, A.F.; Mioni, M.S.R.; Ribeiro, B.L.D.; Fonseca, C.R.S.; Pelícia, V.C.; Ferreira, F.; Abrahão, J.S.; et al. Vaccinia virus in Feces and Urine of Wild Rodents from São Paulo State, Brazil. *Viruses* **2018**, *10*, 51. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
73. Dutra, L.A.; de Freitas Almeida, G.M.; Oliveira, G.P.; Abrahão, J.S.; Kroon, E.G.; Trindade, G.S. Molecular evidence of Orthopoxvirus DNA in capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) stool samples. *Arch. Virol.* **2017**, *162*, 439–448. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
74. Antunes, J.M.A.P.; Borges, I.A.; Trindade, G.S.; Kroon, E.G.; Cruvinel, T.M.A.; Peres, M.G.; Megid, J. Exposure of free-ranging capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) to the vaccinia virus. *Transbound. Emerg. Dis.* **2020**, *67*, 481–485. [\[CrossRef\]](#)
75. Martins da Costa, P.S.P.; Oliveira, J.S.; Domingos, I.J.D.S.; Silva, P.H.B.; Dutra, A.G.S.; Amaral, C.D.; Abrahão, J.S.; Richini Pereira, V.B.; Kroon, E.G.; Barbosa Costa, G.; et al. Circulation of vaccinia virus in southern and south-eastern wildlife, Brazil. *Transbound. Emerg. Dis.* **2020**, *67*, 1781–1785.
76. Simpson, K.; Heymann, D.; Brown, C.S.; Edmunds, W.J.; Elsgaard, J.; Fine, P.; Hochrein, H.; Hoff, N.A.; Green, A.; Ihekweazu, C.; et al. Human monkeypox—After 40 years, an unintended consequence of smallpox eradication. *Vaccine* **2020**, *38*, 5077–5081. [\[CrossRef\]](#)
77. Nguyen, P.Y.; Ajisegiri, W.S.; Costantino, V.; Chughtai, A.A.; MacIntyre, C.R. Reemergence of Human Monkeypox and Declining Population Immunity in the Context of Urbanization, Nigeria, 2017–2020. *Emerg. Infect. Dis.* **2021**, *27*, 1007–1014. [\[CrossRef\]](#)
78. Costa, G.B.; Borges, I.A.; Alves, P.A.; Miranda, J.B.; Luiz, A.P.M.F.; Ferreira, P.C.P.; Abrahão, J.S.; Moreno, E.C.; Kroon, E.G.; Trindade, G.S. Alternative Routes of Zoonotic Vaccinia Virus Transmission, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* **2015**, *21*, 2244–2246. [\[CrossRef\]](#)
79. Laiton-Donato, K.; Ávila-Robayo, P.; Páez-Martínez, A.; Benjumea-Nieto, P.; Usme-Ciro, J.A.; Pinzón-Nariño, N.; Giraldo, I.; Torres-Castellanos, D.; Nakazawa, Y.; Patel, N.; et al. Progressive Vaccinia Acquired through Zoonotic Transmission in a Patient with HIV/AIDS, Colombia. *Emerg Infect Dis.* **2020**, *26*, 601–605. [\[CrossRef\]](#)
80. Abrahão, J.S.; Oliveira, T.M.L.; Campos, R.K.; Madureira, M.C.; Kroon, E.G.; Lobato, Z.I.P. Bovine Vaccinia Outbreaks: Detection and Isolation of Vaccinia Virus in Milk Samples. *Foodborne. Pathog. Dis.* **2009**, *6*, 1141–1146. [\[CrossRef\]](#)
81. Oliveira, T.M.L.; Rehfeld, I.S.; Siqueira, J.M.F.; Abrahão, J.S.; Campos, R.K.; Santos, A.K.R.; Cerqueira, M.M.O.P.; Kroon, E.G.; Lobato, Z.I.P. Vaccinia virus is not inactivated after thermal treatment and cheese production using experimentally contaminated milk. *Foodborne Pathog. Dis.* **2010**, *7*, 1491–1496. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

82. Rehfeld, I.S.; Fraiha, A.L.S.; Matos, A.C.D.; Guedes, M.I.M.C.; Costa, E.A.; de Souza, M.R.; Cavalcante, L.F.L.; Lobato, Z.I.P. Short communication: Survival of Vaccinia virus in inoculated cheeses during 60-day ripening. *J. Dairy Sci.* **2017**, *100*, 7051–7054. [CrossRef]
83. Rehfeld, I.S.; Guedes, M.I.M.C.; Fraiha, A.L.S.; Costa, A.G.; Matos, A.C.D.; Fiúza, A.T.L.; Lobato, Z.I.P. Vaccinia virus Transmission through Experimentally Contaminated Milk Using a Murine Model. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0127350. [CrossRef] [PubMed]
84. De Oliveira, T.M.L.; Guedes, M.I.M.C.; Rehfeld, I.S.; Matos, A.C.D.; Rivetti Júnior, A.V.; da Cunha, A.F.; Cerqueira, M.M.O.P.; Abrahão, J.S.; Lobato, Z.I.P. Vaccinia virus detection in dairy products made with milk from experimentally infected cows. *Transbound. Emerg. Dis.* **2017**, *65*, 40–47. [CrossRef]
85. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-EMBRAPA. Anuário Leite. 2020. Available online: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1124722/anuario-leite-2020-leite-de-vacas-felizes> (accessed on 9 September 2020). (In Portuguese).
86. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística—IBGE. 2018. Available online: <https://www.ibge.gov.br/> (accessed on 14 September 2020). (In Portuguese)
87. Instituto do Patrimônio Histórico Artístico e Artesanal—IPHAN; Departamento de Patrimônio Imaterial—DPI. Dossiê Do Queijo Artesanal. Minas Gerais. 2008. Available online: http://portal.iphan.gov.br/uploads/publicacao/Dossie_Queijo_de_Minas_web.pdf (accessed on 10 September 2020). (In Portuguese)
88. Kamimura, B.A.; Magnani, M.; Luciano, W.A.; Campagnollo, F.B.; Pimentel, T.C.; Alvarenga, V.O.; Sant’Ana, A.S. Brazilian artisanal cheeses: An overview of their characteristics, main types and regulatory aspects. *Comp. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2019**, *18*, 1636–1657. [CrossRef]
89. Abrahão, J.S.; Campos, R.K.; Trindade, G.S.; Guimarães da Fonseca, F.; Ferreira, P.C.; Kroon, E.G. Outbreak of Severe Zoonotic Vaccinia Virus Infection, Southeastern Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* **2015**, *21*, 695–698. [CrossRef] [PubMed]
90. Medeiros, M.D.L.; Horodyski, G.S.; Passador, J.L. Food souvenirs in the perception of the tourist: The case of the artisanal minas Serro cheese. *Rev. Bras. Pesq. Tur.* **2017**, *11*, 347–364.
91. Silva, T.G.; Lima, M.S.; Castro, A.M.M.G.; Martins, M.S.N.; Castiglioni, V.C.; Fava, C.D.; Pituco, E.M. Bovine Vaccinia in dairy cattle and suspicion of vesicular disease on milkers in Brazil. *Cienc. Rural.* **2018**, *48*, e20170723. [CrossRef]
92. De Oliveira, J.S.; Costa, G.B.; Luiz, A.P.M.F.; Leite, J.A.; Bonjardim, C.A.; Abrahão, J.S.; Drumond, B.P.; Kroon, E.G.; Trindade, G.S. Cross-sectional study involving healthcare professionals in a Vaccinia virus endemic area. *Vaccine* **2017**, *35*, 3281–3285. [CrossRef] [PubMed]