

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Microbiologia

Jaqueline Silva de Oliveira

**ESTUDOS TRANSVERSAIS SOBRE *VACCINIA VIRUS* EM MINAS GERAIS,
BRASIL: Circulação viral em população urbana e avaliação do conhecimento de
profissionais de saúde em área hiperendêmica.**

Belo Horizonte
2016

Jaqueline Silva de Oliveira

**ESTUDOS TRANSVERSAIS SOBRE *VACCINIA VIRUS* EM MINAS GERAIS,
BRASIL: Circulação viral em população urbana e avaliação do conhecimento de
profissionais de saúde em área hiperendêmica.**

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

Orientadora: Profª. Dra. Giliane de Souza
Trindade

Belo Horizonte
2016

043

Oliveira, Jaqueline Silva de.

Estudos transversais sobre Vaccinia virus em Minas Gerais, Brasil: circulação viral em população urbana e avaliação do conhecimento de profissionais de saúde em área hiperendêmica [manuscrito] / Jaqueline Silva de Oliveira. – 2016.

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

Orientação: Profa. Dra. Giliane de Souza Trindade.

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

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

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE JAQUELINE SILVA DE OLIVEIRA

Nº REGISTRO: 2015662019

Relator e Suplente: Dr. Fábio Pio Dormas

Às 14:00 horas do dia 06 de dezembro de 2016, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Jaqueline Maria Siqueira (UFSJ), Bruno Eduardo Mota (UFMG) e a Profa. Giliane de Souza Trindade - Orientadora, para julgar o trabalho final "Estudos transversais sobre o *Vaccinia virus* em Minas Gerais, Brasil: Circulação viral em população urbana e avaliação do conhecimento de profissionais de saúde em área hiperendêmica", da aluna **Jaqueline Silva de Oliveira**, requisito final para a obtenção do Grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Flávio Guimarães da Fonseca - Coordenador do Programa, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. A candidata foi considerada **APROVADA**. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 06 de dezembro de 2016.

Dra. Jaqueline Maria Siqueira

Jaqueline Maria Siqueira Ferreira
Bruno E. F. Mota

Dr. Bruno Eduardo Mota

Profa. Giliane de Souza Trindade (Orientadora)

Giliane de Souza Trindade

Flávio Guimarães da Fonseca
Prof. Flávio Guimarães da Fonseca
Coordenador

À minha família,
por todo amor, apoio incondicional e
pelos valores que me ensinaram,
meu mais profundo agradecimento.
Esta conquista é também de vocês,
meu alicerce, minha inspiração e minha
força.

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho não teria sido possível sem o apoio e a colaboração de muitas pessoas, às quais expresso aqui minha mais sincera gratidão.

À minha família, pelo amor incondicional, pela paciência nos momentos difíceis e por acreditarem em mim mesmo quando eu duvidava. Obrigada por serem minha base e meu porto seguro em todos os momentos.

À minha orientadora, Giliane, pela orientação cuidadosa, pelas valiosas contribuições acadêmicas e pelo incentivo contínuo ao longo desta jornada.

Aos professores e colegas do Laboratórios de Vírus, por cada troca de conhecimento, pelas discussões enriquecedoras e pelo companheirismo ao longo do mestrado.

Aos amigos que estiveram ao meu lado, oferecendo palavras de encorajamento, apoio emocional e tantos momentos de leveza que tornaram essa trajetória mais suportável e significativa.

A todas as instituições e profissionais que, de alguma forma, contribuíram para a construção desta pesquisa, seja com dados, experiências, apoio técnico ou científico.

Muito obrigada.

RESUMO

O gênero *Orthopoxvirus* (OPV) consiste em vírus emergentes que se destacam na medicina humana e veterinária, dentre eles o *Variola virus* (VARV) e o *Vaccinia virus* (VACV). O VACV na América do Sul causa surtos de vaccínia bovina (VB), uma zoonose ocupacional, cuja via clássica de transmissão é o contato direto entre humanos e bovinos infectados. Entretanto, a descrição de casos não relacionados a bovinos tem sugerido a existência de vias alternativas para a transmissão viral. Foram conduzidos dois estudos transversais pilotos; o primeiro avaliou a circulação de VACV na população urbana de uma área endêmica. Para isso, foram coletadas amostras de soro de 61 indivíduos da área urbana do Serro, área endêmica em Minas Gerais. Posteriormente, o soro foi submetido a ensaio imunoenzimático e teste de soroneutralização para a pesquisa de anticorpos IgG e do tipo neutralizantes, respectivamente. Além disso, foi realizado inquérito epidemiológico para investigação de fatores de risco. Dentre os 61 participantes, 20 apresentaram anticorpos IgG, representando uma prevalência global de 32,8% e 22 (36%) possuíam anticorpos neutralizantes. O fator de exposição “presença da marca vacinal” foi estatisticamente significativo quando comparado à presença de anticorpos ($p < 0,05$). O segundo estudo conduzido no Serro, avaliou o conhecimento dos profissionais de saúde sobre a VB. Cinquenta e um indivíduos (49,5% dos profissionais de saúde do Serro) foram incluído neste estudo, 22 participantes apresentaram anticorpos IgG, representando uma prevalência geral de 43,1%. E 12 indivíduos (23,5%) possuíam anticorpos neutralizantes com títulos de anticorpos variando de 100 a 6.400 unidades neutralizantes/ml. Vinte e nove (56,9%) dos participantes já haviam ouvido falar da VB. Onze indivíduos (21,6%) testemunharam algum surto de VB e apenas cinco (9,8%) disseram conhecer o agente etiológico. Estes dados revelaram o despreparo dos profissionais de saúde sobre a VB no Brasil e apontam para a necessidade de investimento em comunicação sobre a doença em áreas afetadas. Foi produzido

um material educativo com a finalidade de fornecer conhecimento sobre a VB. Acredita-se que a educação da população afetada, dos veterinários que atuam no campo e órgãos de defesa e pessoal de assistência de saúde pública sobre os diferentes aspectos da VB poderia reduzir o impacto sobre a saúde pública e veterinária. Além disso, seria fundamental para a contenção da emergência do VACV em áreas urbanizadas.

Palavras-chave: vaccínia bovina, vaccinia virus, profissionais de saúde, soroprevalência, epidemiologia.

ABSTRACT

The *Orthopoxvirus* (OPV) genus comprises emerging viruses of significant importance in both human and veterinary medicine, including *Variola virus* (VARV) and *Vaccinia virus* (VACV). In South America, VACV is responsible for outbreaks of bovine vaccinia (BV), an occupational zoonosis whose classical transmission route is direct contact between humans and infected cattle. However, reports of cases unrelated to cattle have suggested the existence of alternative routes of viral transmission. Two pilot cross-sectional studies were conducted. The first assessed VACV circulation in the urban population of an endemic area. For this, serum samples were collected from 61 individuals residing in the urban area of Serro, an endemic municipality in the state of Minas Gerais, Brazil. The serum samples were tested using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and a virus neutralization test (VNT) to detect IgG and neutralizing antibodies, respectively. In addition, an epidemiological survey was carried out to investigate potential risk factors. Among the 61 participants, 20 tested positive for IgG antibodies, corresponding to an overall seroprevalence of 32.8%, while 22 individuals (36%) had neutralizing antibodies. The exposure factor “presence of vaccination scar” was statistically significant in association with antibody presence ($p < 0.05$). The second study, also conducted in Serro, assessed healthcare professionals' knowledge of BV. Fifty-one individuals (49.5% of the town's healthcare workforce) participated in the study. Among them, 22 tested positive for IgG antibodies, corresponding to an overall prevalence of 43.1%, and 12 individuals (23.5%) had neutralizing antibodies with titers ranging from 100 to 6,400 neutralizing units/mL. Twenty-nine participants (56.9%) reported having heard of BV. Eleven (21.6%) had witnessed a BV outbreak, and only five (9.8%) reported knowing the etiological agent. These findings reveal a lack of preparedness among healthcare professionals regarding BV in Brazil and highlight the need for improved communication about the disease in affected areas. An

educational resource was developed to provide information on BV. It is believed that educating the affected population, field veterinarians, animal health authorities, and public health personnel on various aspects of BV could reduce its impact on human and animal health. Moreover, such education would be essential to contain the emergence of VACV in urbanized areas.

Key words: bovine vaccinia, vaccinia virus, serro, healthcare healthcare professionals', soroprevalence, epidemiology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –Manifestações clínicas decorrentes de infecção por CPXV	19
Figura 2 – Morfologia & Estrutura dos Poxvírus	23
Figura 3 – Representação Esquemática do Genoma dos Poxvírus	25
Figura 4 – Diagrama do Ciclo de Multiplicação de VACV	26
Figura 5 – Patogênese dos OPVs utilizado no estudo da patogênese dos poxvírus	29
Figura 6 – Lesões ulcerativas nos tetos das vacas e focinho dos bezerros infectados com VAC	35
Figura 7 – Lesões causadas por VACV nas mãos dos ordenadores infectados	36
Figura 8 – Lesões faciais e lesão vulvar decorrente de auto inoculação de VACV	36
Figura 9 – Distribuição de VACV na América do Sul e os Diferentes Tipos de Hospedeiros	42
Figura 10 – Principal Via de Transmissão do VACV	45
Figura 11 – Fluxograma de trabalho	51
Figura 12 – Localização geográfica do Serro-MG	52
Figura 13 – Localização dos profissionais de saúde amostrados no Serro-MG	54
Figura 14 – Distribuição dos profissionais de saúde amostrados e seus respectivos locais de trabalho	77
Figura 15 – Material educativo sobre Vaccinia Bovina para profissionais de saúde	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação dos Poxvírus	17
Tabela 2 – Orthopoxvirus com importância na medicina humana e veterinária: Espécies, hospedeiros e distribuição geográfica	22
Tabela 3 – Caracterização demográfica da população urbana amostrada no Serro-MG	63
Tabela 4 – Conhecimento da população urbana sobre a Vaccínia Bovina	64
Tabela 5 – Fatores de exposição ao VACV – contato com animais	65
Tabela 6 - Fatores de exposição ao VACV – consumo e manipulação de leite e derivados	67
Tabela 7 - Fatores de exposição ao VACV – ordenha	68
Tabela 8 – Variáveis demográficas e fatores de exposição associadas à presença de IgG	71
Tabela 9 – Variáveis demográficas e fatores de exposição associadas à presença de anticorpos neutralizantes	74
Tabela 10 – Caracterização demográfica dos profissionais de saúde amostrados no Serro	79
Tabela 11 – Conhecimento sobre a Vaccínia Bovina	81
Tabela 12 – Conhecimento geral dos profissionais de saúde sobre VB causada por VACV	82
Tabela 13 – Outros hospedeiros de VACV	82
Tabela 14 – Sinais clínicos e sintomas da infecção por VACV	84
Tabela 15 – Formas de transmissão da Vaccínia Bovina	85
Tabela 16 – Espécimes clínicos coletados para diagnóstico da Vaccínia Bovina	87
Tabela 17 – Medidas de prevenção da Vaccínia Bovina	89
Tabela 18 – Variáveis demográficas associadas à presença de IgG	95
Tabela 19 - Variáveis demográficas associadas à presença de anticorpos neutralizantes	97

LISTA DE ABREVIATURAS

μL – microlitro
ARAV – vírus Araçatuba
ATCC – *American Type Culture Collection*
ATI – proteína formadora do corpúsculo de inclusão do tipo acidófilo
BSA – (*bovine seric albumine*) albumina sérica bovina
CEF – complexo fusão-penetração
CEV – vírus envelopado associado à célula
CO₂ – dióxido de carbono
COEP – Comitê de Ética e Pesquisa
CGTV – vírus Cantagalo
CPXV – *Cowpox virus*
DNA – ácido desoxirribonucléico
dsDNA – DNA de dupla fita
ECTV – *Ectromelia virus*
EEV – vírus envelopado extracelular
EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
GAG - glicosaminoglicano
GP1V – vírus Guarani propriedade 1
GP2V – vírus Guarani propriedade 2
HA – hemaglutinina
ICTV – Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus
IEV – vírus envelopado intracelular
Ig – imunoglobulina
IL – interleucina
IMA – Instituto Mineiro de Agropecuária
IMV – vírus maduro intracelular
INF – Interferon
ITR – regiões terminais invertidas
kb – quilobase
MEM – meio mínimo essencial
ml – mililitro
MPXV – *Monkeypox virus*
MURV – vírus Muriaé
mRNA – RNA mensageiro
NK – *natural killer*
nm – nanômetro
OMS – Organização Mundial da Saúde
OPV – (*Orthopoxvirus*) ortopoxvírus
PAMP – padrão molecular associado à patógeno
PBS – tampão salina fosfato
PCR – (*polimerase chain reaction*) reação em cadeia da polimerase
pH – potencial hidrogeniônico
pb – pares de bases
PRNT – (*Plaque Reduction Neutralizing Test*) Teste de Neutralização por Redução de Placas
PSTV – vírus Passatempo

RNA – ácido ribonucleico
SFB – soro fetal bovino
TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TLR – (*toll like receptor*) receptor do tipo toll
TNF – fator de necrose tumoral
UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais
UN – unidades neutralizantes
VACV – *Vaccinia virus*
VACV-WR – *Vaccinia virus Western Reserve*
VARV – *Variola virus*
VB – Vaccínia Bovina
VBH – vírus Belo Horizonte
VGF – Fator de crescimento viral

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1. Poxvírus.....	15
1.1. Taxonomia.....	15
1.2. OPVs com Importância Médica e Veterinária	17
1.2.1. <i>Cowpox virus</i> (CPXV)	17
1.2.2. <i>Monkeypox virus</i> (MPXV)	18
1.2.3. <i>Vaccinia virus</i> (VACV).....	19
1.3. Morfologia.....	21
1.4. Genoma	23
1.5. Ciclo de Multiplicação	24
1.6. Patogênese.....	27
1.7. Resposta Imunológica do Hospedeiro.....	29
1.8. Vacinas Antivariólicas	31
2. Vaccínia Bovina	33
2. 1. Aspectos Gerais.....	33
2.2. Emergência e Epidemiologia da VB no Brasil.....	37
2.3. Impacto Econômico da Vaccínia Bovina	41
2.4. Impacto da Vaccínia Bovina na Saúde Pública.....	43
2.4. Transmissão.....	43
2.5. Diagnóstico laboratorial	45
2. JUSTIFICATIVA.....	47
3. OBJETIVOS	49
3.1. OBJETIVO GERAL	49
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	49
4. FLUXOGRAMA DE TRABALHO.....	50
5. METODOLOGIA	51
5.1. Delineamento do Estudo	51
5.2. Local do Estudo.....	51
5.3. Seleção dos Participantes	52
5.4. Seleção dos Profissionais de Saúde.....	52
5.5. Considerações Éticas.....	53
5.6. Instrumentos para Coleta de Informações	54

5.7. Plano de Análise.....	54
5.8. Amostras Clínicas	55
5.9. Avaliação Clínica	55
5.10. Metodologia Laboratorial.....	55
5.10.1. Células.....	55
5.10.2. Vírus	56
5.10.3. Soros Controles	56
5.10.4. Ensaio imunoenzimático (<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i> – ELISA)	56
5.10.5. Ensaio de soroneutralização (<i>plaque reduction neutralizing test</i> – PRNT)	57
CAPÍTULO I.....	60
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
6.1. Caracterização Populacional	61
6.2. Conhecimento da população urbana sobre Vaccinia Bovina	63
6.3. Análise dos Fatores de Exposição à <i>Othopoxvirus</i> (OPV).....	64
6.4. Avaliação sorológica	68
CAPÍTULO II	75
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO	76
7.1. Caracterização Populacional	76
7.2. Conhecimento sobre Vaccinia Bovina	79
7.3. Elaboração de material educativo.....	89
7.4. Avaliação sorológica	93
8. CONCLUSÕES.....	98
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	99
ANEXO 1 – QUESTIONÁRIO: POPULAÇÃO URBANA	119
ANEXO 2 – QUESTIONÁRIO: PROFISSIONAIS DE SAÚDE	121
ANEXO 3 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	124
LISTA DE TRABALHOS PUBLICADOS EM ANAIS DE EVENTOS.....	127
ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO	128
ARTIGO SUBMETIDO	1 ^o
ARTIGO PARA SUBMISSÃO	128

1. INTRODUÇÃO

1.Poxvírus

1.1.Taxonomia

A família *Poxviridae* é composta por vírus grandes e complexos, cuja informação genética é contida em um genoma de DNA dupla fita linear. Estes vírus se replicam no citoplasma da célula hospedeira e são capazes de infectar diversos tipos de hospedeiros, incluindo insetos, répteis, aves e mamíferos (Mcfadden, 2005). Os poxvírus são divididos em duas subfamílias, a *Entomopoxvirinae* e *Chordopoxvirinae*, que infectam invertebrados e vertebrados, respectivamente (**Tabela 1**) (ICTV, 2015). Nesta última, encontra-se o gênero *Orthopoxvirus* (OPV) que possui entre suas espécies, o *Variola virus* (VARV), patógeno humano estrito, declarado erradicado em 1980 após campanha de vacinação mundial promovida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (Fenner et al., 1989).

Recentemente, uma nova espécie de OPV foi isolada na Geórgia, a partir de criadores de gado com suspeita de infecção por *Cowpox virus* (CPXV), no entanto a nova espécie ainda não consta na classificação estabelecida pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) (Vora et al., 2015).

Tabela 1 – Classificação dos Poxvírus

SUBFAMÍLIA	GÊNERO	Nº DE ESPÉCIES	PROTÓTIPO
<i>Chordopoxvirinae</i>	<i>Avipoxvirus</i>	10	<i>Fowlpox virus</i>
	<i>Capripoxvirus</i>	3	<i>Sheeppox virus</i>
	<i>Cervidpoxvirus</i>	1	<i>Mule deerpox virus</i>
	<i>Crocodylidpoxvirus</i>	1	<i>Nile crocodilepox virus</i>
	<i>Leporipoxvirus</i>	4	<i>Myxoma virus</i>
	<i>Molluscipoxvirus</i>	1	<i>Molluscum contagiosum virus</i>
	<i>Orthopoxvirus</i>	10	<i>Vaccinia virus</i>
	<i>Parapoxvirus</i>	4	<i>Orf virus</i>
	<i>Suipoxvirus</i>	1	<i>Swinepox virus</i>
	<i>Yatapoxvirus</i>	2	<i>Yaba monkey tumor virus</i>
	Indeterminado	1	<i>Squirrelpox virus</i>
<i>Entomopoxvirinae</i>	<i>Alphaentomopoxvirus</i>	7	<i>Melolontha melolontha entomopoxvirus</i>
	<i>Betaeentomopoxvirus</i>	16	<i>Amsacta moorei entomopoxvirus</i>
	<i>Gammaentomopoxvirus</i>	6	<i>Chironomus luridus entomopoxvirus</i>
	Indeterminado	2	

Fonte: Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV), 2015.

1.2.OPVs com Importância Médica e Veterinária

O gênero OPV apresenta alguns vírus que se destacam pela importância na medicina humana e veterinária, dentre eles, o *Cowpox virus* (CPXV), o *Monkeypox virus* (MPXV) e o *Vaccinia virus* (VACV). Além disso, o VACV possui uma amostra denominada *Buffalopox virus* (BPXV), que circula na Índia e foi assim denominado por ter sido detectado em búfalos (Fenner et al, 1988; Shchelkunov, 2005; 2013; Fonseca et al., 2011; Gurav et al., 2011; Damon, 2013).

1.2.1. *Cowpox virus* (CPXV)

O CPXV ganhou destaque na história da medicina em 1798, a partir de uma publicação realizada por Jenner, um médico pesquisador responsável pelos primeiros estudos relacionados à prática da vacinação (Fenner et al., 1988; Riedel, 2005). Apesar do nome, a infecção por CPXV em bovinos é rara, sendo denominada varíola bovina e manifestando-se na forma de lesões em forma de pústulas nas tetas do gado e nas mãos dos ordenhadores (Fenner et al., 1989).

O CPXV circula principalmente em roedores silvestres, dentre eles *Clethrionomys glaeolus*, *Apodemus sylvaticus* e *Microtus agretis*, considerados hospedeiros naturais, na Europa e Oriente Médio. O CPXV apresenta, além dos roedores, amplo espectro de hospedeiros, vindo acidentalmente a infectar felinos, humanos e diversos outros mamíferos (**figura 1**), dentre eles, animais domésticos, como cães e cavalos; ou até mesmo animais que vivem em zoológicos, tais como, alguns carnívoros, rinocerontes e elefantes (Meyer, 1998; Pelkonen, 2003; Coras, 2005; Kurth et al., 2008; Möstl et al., 2013; McInerney et al., 2015).

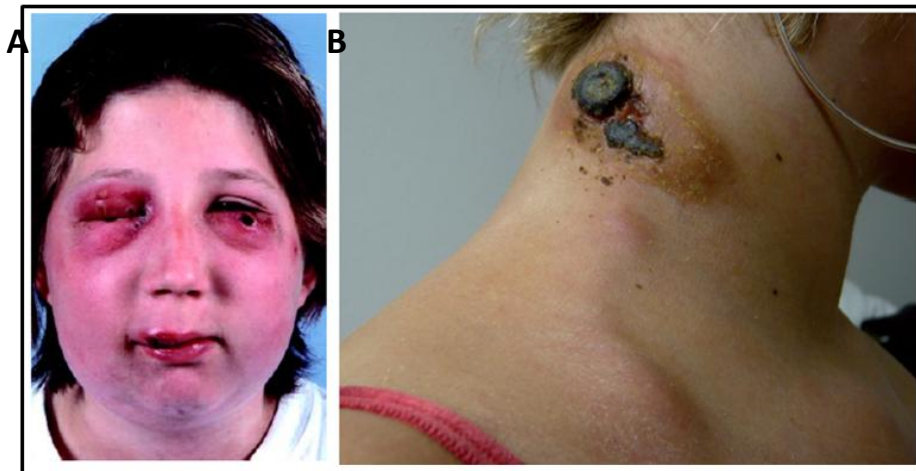


Figura 1: Manifestações clínicas decorrentes de infecção por CPXV (A) Lesões faciais após contato com roedor infectado **(B)** Lesão necrótica e linfangite causadas por CPXV transmitido por roedor. Fonte: *Wolfs, 2002; Vogel et al., 2012*.

A transmissão do CPXV para humanos pode se dar através do contato com roedores infectados, ou ainda, os felinos podem atuar como hospedeiro intermediário, possibilitando a transmissão do vírus de roedores para humanos e outros animais (*Coras et al., 2005; Wolfs, 2002; Kinnunen et al., 2011; Vogel et al., 2012; Ducournau et al., 2013;*)

1.2.2. *Monkeypox virus* (MPXV)

O *Monkeypox virus* (MPXV) é um importante vírus zoonótico emergente, endêmico em esquilos e outros roedores em florestas tropicais da África, podendo acometer primatas e humanos. A infecção em humanos ocorre a partir do contato com animais infectados ou a partir da exposição a tecidos desses animais. Os sintomas clínicos em humanos podem ser semelhantes aos da varíola, sendo caracterizados pelo desenvolvimento de mal-estar grave, febre e o aparecimento de lesões maculopapulares generalizadas, no entanto a taxa de letalidade é inferior, alcançando cerca de 10% em surtos africanos, enquanto que para a varíola major essa taxa atingia até 40% (*Dubois & Slifka, 2008; Essbauer et al, 2010; Estep et al, 2011; Fonseca et al., 2011*).

Em 2003 o MPXV foi responsável por um surto nos Estados Unidos após a importação de roedores africanos infectados, porém, a evolução clínica da infecção foi diferente dos surtos descritos na África, havendo poucos casos graves e nenhum óbito. Essa diferença pode ser explicada por dois fatores importantes: a amostra viral detectada no surto dos EUA é diferente da que é comumente detectada nos surtos africanos, principalmente os que foram descritos na região mais central do continente (*Likos et al., 2005*). Além disso, em contraste com as epidemias africanas, a maioria dos casos relatados nos EUA ocorreu em adultos. No entanto, mesmo sem o registro de casos graves no país, o potencial bioterrorista da infecção por MPXV passou a ser considerado (*Reed et al., 2004; Huhn et al., 2005; Levine et al., 2007; Reynolds, et al., 2012*).

1.2.3. *Vaccinia virus* (VACV)

O VACV é o protótipo do gênero *Orthopoxvirus*, sendo o protagonista da maioria dos estudos experimentais relacionados a esse gênero. Além disso, o VACV é reconhecido historicamente por ter sido utilizado na campanha mundial de vacinação contra a varíola. Após a erradicação da varíola em 1980, a vacinação em massa foi suspensa, no entanto, pesquisas que visam o desenvolvimento de novas vacinas têm sido realizadas devido ao temor associado ao possível uso de OPVs como arma biológica. Nesse campo de pesquisa, o vírus *Vaccinia Ankara* modificado (MVA), uma linhagem de VACV atenuado têm se mostrado bastante promissor devido à inexistência de efeitos adversos (*Fenner et al., 1988; Essbauer et al., 2010; Damon, 2013; ICTV, 2015*).

Infecções causadas por VACV podem decorrer de acidentes de trabalho envolvendo perfurocortantes em laboratórios de pesquisa ou resultar de manipulação incorreta de material contaminado, tais como o próprio vírus, células infectadas com VACV e até mesmo vírus recombinantes. Infecções ocupacionais foram relatadas em trabalhadores de laboratório

imunizados contra OPVs, sendo observado o aumento do título de IgG específico após sorologia pareada (*Openshaw et al., 1991; Moussatché et al., 2003; Wlodaver et al., 2004; Lewis et al., 2006; CDC, 2008; 2009; Macneil et al., 2009; Costa et al., 2013; Hsu et al., 2015*).

Além disso, existem complicações associadas ao processo de vacinação de militares nos Estados Unidos, que frequentemente resulta em auto inoculação ou transmissão por contato íntimo, ocorrendo o desenvolvimento de lesões em diferentes sítios anatômicos, tais como a face, as mãos, os braços, as pernas, os olhos e até mesmo na região genital (*Neff et al., 2002; Egan et al., 2004; Vora et al., 2008; Lederman et al., 2009; CDC, 2007a; 2007b; 2008; 2009; 2010; 2013*).

A circulação natural de VACV vem sendo detectada em diferentes regiões no território brasileiro desde 1999, acometendo principalmente o gado leiteiro e os ordenhadores. A doença possui um caráter ocupacional e é denominada Vaccínia Bovina (VB). No entanto, além da circulação em bovinos e nos seres humanos, evidências da circulação de VACV já foram identificadas em outros animais, tais como bubalinos, equinos, primatas, pequenos e grandes roedores, como as capivaras; felinos, caninos e procionídeos (**Tabela 2**) (*Kroon et al., 2011; Peres et al., 2013; 2016; Barbosa et al., 2014; Dutra et al., 2016; Costa, GB dados não publicados*). Além do Brasil, a circulação do vírus foi recentemente detectada em outros países da América do Sul, especificamente no Uruguai, Argentina e Colômbia (*Franco-Luiz, et al., 2014; 2016; Nakazawa et al., 2016*).

Uma amostra de VACV, denominada *Buffalopox virus (BPXV)*, tem sido detectada na Índia, no Paquistão, Rússia, Bangladesh, Indonésia, Itália e Egito, onde o vírus tem sido responsável por surtos de doença exantemática que atinge bubalinos, bovinos e humanos. Assim como a VB no Brasil, a zoonose é transmitida ao ser humano após contato com os animais infectados (*Singh et al., 2007; Venkatesan et al., 2010; Yadav et al., 2010; Damle et al., 2011; Gurav et al., 2011*).

Tabela 2 – *Orthopoxvirus* com importância na medicina humana e veterinária: Espécies, hospedeiros e distribuição geográfica.

<i>ORTHOPOXVIRUS</i>	HOSPEDEIROS	DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA
<i>Cowpox virus</i>	Bovinos, roedores silvestres, felino doméstico e seres humanos	Europa e Oriente Médio
<i>Monkeypox virus</i>	Primatas, roedores silvestres e seres humanos	África e América do Norte (surto em 2003)
<i>Vaccinia virus</i>	Bovinos, bubalinos, equinos, pequenos e grandes roedores (capivaras), felinos, caninos, procionídeos e seres humanos	América do Sul e Ásia

Fonte: *Fonseca et al., 2011* adaptado.

1.3. Morfologia

Os poxvírus possuem partículas virais com tamanho aproximado de 450nm, consideradas grandes, quando comparadas a outros vírus animais. São pleomórficos, apresentando-se na forma oval ou semelhante a um tijolo, com uma membrana externa de natureza lipídica tendo aproximadamente 5-6 nm de espessura (*Moss, 2013*). O interior da partícula é complexo, constituído pelo genoma de DNA dupla fita localizada na parte interna do nucleocapsídeo, um cerne em forma de haltere e corpúsculos laterais ancorados entre as duas concavidades e a membrana externa (*Moss, 2013*).

Esses corpúsculos laterais são constituídos pela abundante fosfoproteína F17; a fosfatase VH1 de dupla especificidade, exercendo função imunomoduladora através da neutralização da

resposta de interferon do tipo II na célula hospedeira; e a oxirredutase G4, expressa tardiamente durante a infecção e essencial para a morfogênese viral (*Schmidt et al., 2013*).

Durante a morfogênese do VACV, há formação de partículas virais distintas, apresentando diferentes números de membranas, sendo estes, os vírus maduros intracelulares (IMV), vírus envelopados intracelulares (IEV), vírus envelopados associados à célula (CEV) e vírus envelopados extracelulares (EEV) (*figura 2*) (*Roberts & Smith et al., 2008*).

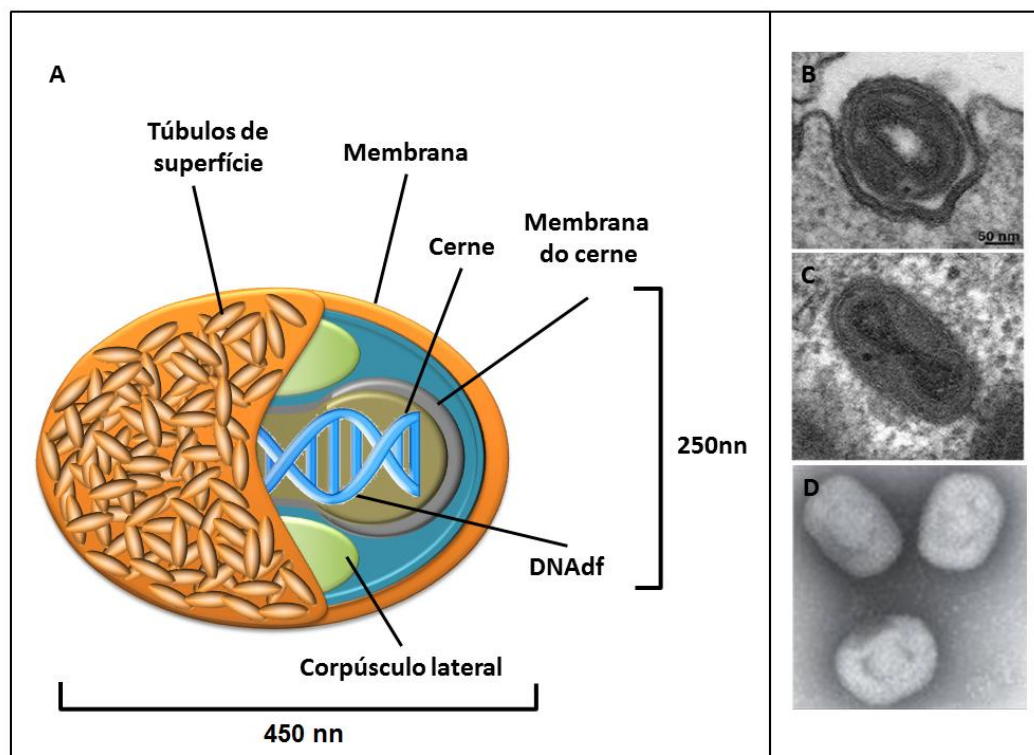


Figura 2: Morfologia & Estrutura dos Poxvírus (A) Representação esquemática da partícula de poxvírus (B) Microscopia eletrônica de transmissão (MET) do vírus envelopado extracelular (EV) (C) MET do vírus maduro intracelular (IMV) (D) Microscopia eletrônica de varredura mostra partículas em forma de tijolo. Fonte: Moss, 2001 – modificado por Laboratório do Vírus/ UFMG; Moss, 2013 – com modificações; Vora et al., 2015.

1.4. Genoma

O genoma dos poxvírus consiste em uma molécula de DNA fita dupla (dsDNA), com tamanho entre 140 a 300kpb, variando de acordo com a espécie viral. Nas extremidades do genoma, encontram-se as repetições terminais invertidas (ITRs), que consistem em sequências idênticas com orientações opostas, ricas em ligações A-T, formando um grampo responsável pela ligação das duas fitas de DNA (**figura 3**). Além disso, são importantes para a resolução dos concatâmeros durante a replicação do genoma que ocorre no citoplasma da célula hospedeira (Moss, 2013).

O genoma possui capacidade codificadora, sendo que elementos importantes para a multiplicação viral compõem a partícula madura, dentre eles a poli A polimerase, RNA polimerase dependente de DNA, enzima de metilação e fatores transcricionais. A região central do genoma dos *Chordopoxvirus*, e no gênero *Orthopoxvirus*, possui aproximadamente 100 genes altamente conservados, essenciais para a replicação. Nas regiões variáveis localizam-se predominantemente os genes responsáveis pelas interações do vírus com o hospedeiro, que codificam proteínas associadas à virulência e imunomodulação, essas sequências podem apresentar tamanhos variados devido à deleções, repetições e transposições (Gubser et al., 2004; Hendrickson et al., 2010; Moss, 2013).

O genoma dos poxvírus, por si, não é infeccioso, pois as enzimas virais, incluindo a RNA polimerase e os fatores transcricionais são necessários para a expressão gênica viral no citoplasma (Gubser et al., 2004; Mcfadden, 2005).

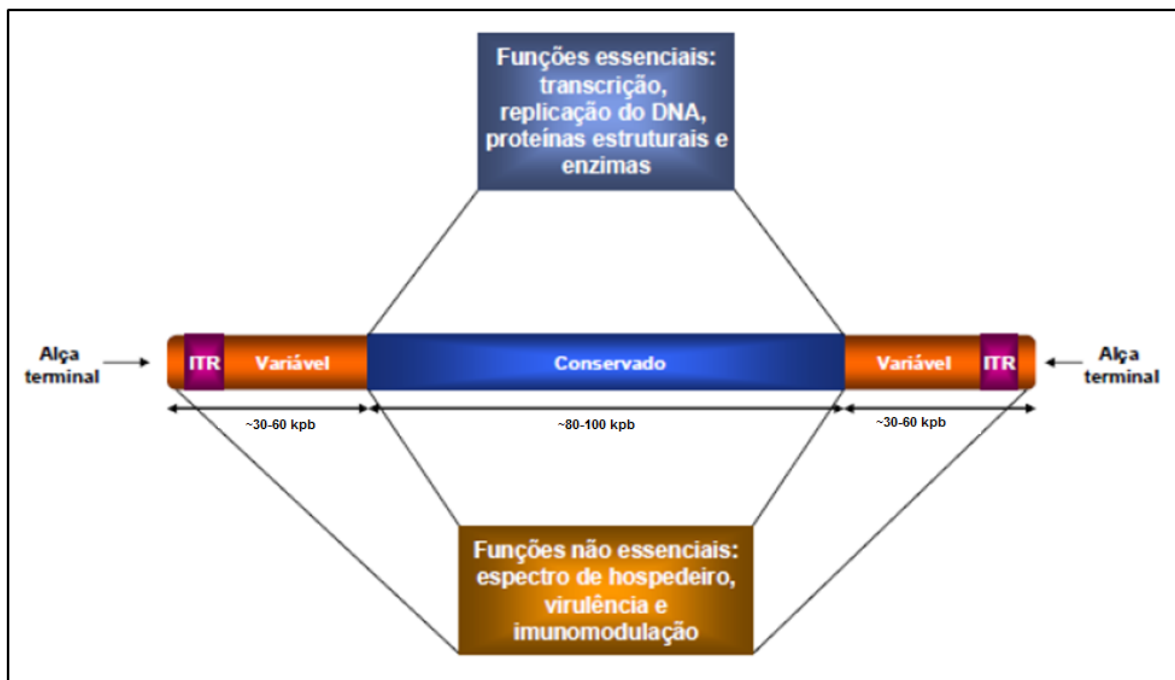


Figura 3: Representação Esquemática do Genoma dos Poxvírus. O genoma dos poxvírus possui uma região central conservada e extremidades contendo genes variáveis entre as espécies. ITR: região terminal invertida. Kpb: Mil pares de bases. Fonte: *Smith & Mcfadden, 2002* – modificado.

1.5. Ciclo de Multiplicação

O ciclo de multiplicação dos poxvírus ocorre inteiramente no citoplasma da célula hospedeira, peculiaridade compartilhada com as famílias *Asfarviridae* e *Mimiviridae* (ICTV, 2015). A síntese de fatores codificados pelo vírus promove o controle do ciclo de multiplicação, garantindo certo grau de autonomia viral em relação à célula hospedeira (Moss, 2013).

A penetração viral pode ocorrer por via endossomal ou pela fusão do envelope viral com a membrana da célula hospedeira. Ambas as vias podem ser utilizadas, dependendo do tipo de partícula e da célula relacionada, conferindo versatilidade ao vírus, o que corrobora com a capacidade de penetração em diferentes tipos de células (Shchelkunov *et al.*, 2005; Roberts & Smith, 2008; Schmidt *et al.*, 2011; Bengali *et al.*, 2013; Moss, 2013). São apontados como possíveis receptores celulares envolvidos na adsorção dos poxvírus, os glicosaminoglicanos

Em seguida, ocorre o desnudamento secundário, dando início à replicação do DNA. Os genes intermediários são transcritos e traduzidos, originando enzimas e fatores para a expressão dos genes tardios, que por sua vez, codificam fatores de transcrição precoces que são empacotados com a RNA polimerase e outros elementos nas novas partículas virais (*Broyles, 2003; Mcfadden, 2005; McLennan, 2007; Moss, 2013*).

A morfogênese ocorre nas fábricas virais e a primeira estrutura morfológicamente distinta são as crescentes virais constituídas pela membrana do retículo endoplasmático que é rompida por proteínas virais, originando uma membrana aberta estabilizada por proteínas (*Moss, 2013; Liu et al., 2014*). Estas estruturas dão origem a partículas esféricas, chamadas de vírus imaturos (IVs). Após clivagens proteolíticas de elementos do capsídeo e condensação do cerne viral, os IVs dão origem aos vírus maduros intracelulares (IMVs) (*Smith et al., 2002; Roberts & Smith, 2008; Moss, 2013*).

A partícula IMV será liberada apenas através da lise celular, no entanto podem ser transportadas através dos microtúbulos até o complexo de Golgi, onde adquirem duas membranas adicionais, originando os vírus envelopados intracelulares (IEV), que consiste em partículas virais não infecciosas. Os IEVs são direcionados para a periferia celular, através dos microtúbulos, onde se fundem à membrana plasmática, gerando os vírus envelopados extracelulares (EEVs) (*Smith et al., 2002; Moss, 2013*).

A liberação de EEV pode ocorrer por fusão entre a membrana externa da partícula e a membrana plasmática celular, resultando em vírus envelopados associados à célula (CEVs), estes podem induzir a formação de caudas de actina, responsáveis por propagar partículas virais a grandes distâncias, garantindo a rápida disseminação viral no organismo do hospedeiro (*Smith et al., 2002; Doceul et al., 2010; Moss, 2013*).

1.6. Patogênese

Os sintomas e a patogênese resultantes da infecção por *Orthopoxvirus* são influenciados pelo tropismo viral e pela respostas imune do hospedeiro. As manifestações dependem de alguns fatores como espécie de OPV envolvida na infecção, rota de entrada do patógeno, espécie do hospedeiro e estado imunológico do mesmo (Mcfadden, 2005; Damon, 2013).

A infecção geralmente ocorre através da entrada do vírus por microabrasões, pela via cutânea. Outra via, é o trato respiratório, como ocorre pelo VARV. As lesões desenvolvidas podem ser sistêmicas, decorrente da infecção por VARV, MPXV e *Ectromelia virus* (ECTV) ou localizadas, como ocorre com *Molluscum contagiosum virus* (MCV), o VACV e o CPXV (Fenner, 1988; Esteban & Buller, 2005).

ECTV foi utilizado como modelo para o estudo da patogênese dos poxvírus, sendo demonstrado que após a entrada do vírus no organismo hospedeiro, ocorre a multiplicação viral no sítio primário de infecção e o vírus alcança a corrente sanguínea, resultando em viremia primária, podendo então disseminar-se no organismo associado a células sanguíneas ou livres no plasma. A disseminação via corrente sanguínea favorece a infecção de diversos órgãos, dentre eles fígado, baço e linfonodos regionais que se caracterizam pela alta vascularização. Cerca de cinco dias depois, observa-se a viremia secundária com migração das partículas virais para a pele e desenvolvimento de lesões ulcerativas (**figura 5**) (Fenner, 1988; Esteban & Buller, 2005).

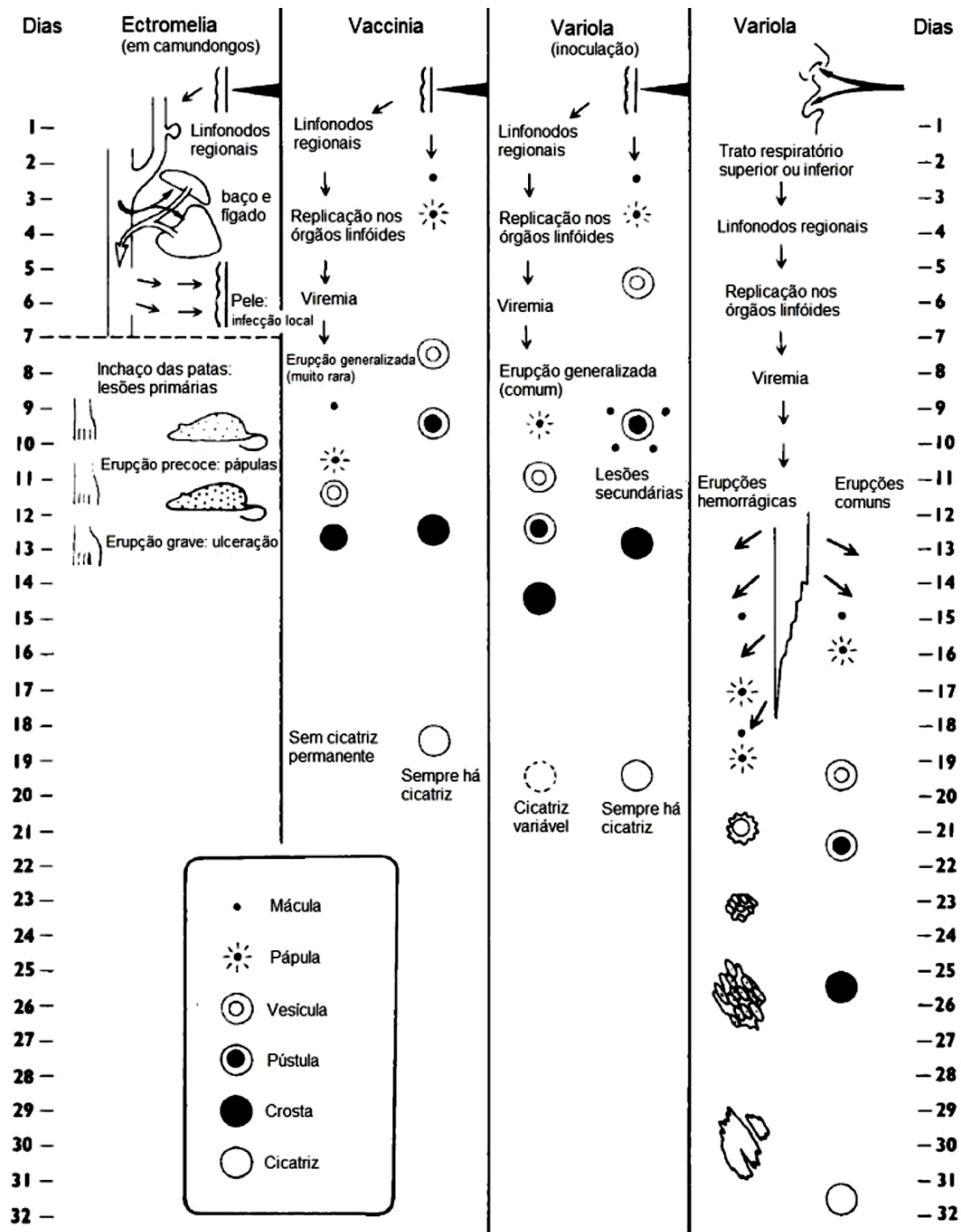


Figura 5: Patógenese dos OPVs utilizado no estudo da patógenese dos poxvírus Fonte: Fenner, 1988 – modificado.

Um estudo de patógenese utilizando bovinos experimentalmente infectados com VACV possibilitou a detecção do genoma viral nos órgãos linfáticos e nas fezes por um período de até 67 dias após a infecção, fornecendo novas evidências sobre a eliminação de VACV e sugerindo

que a VB poderia ser uma infecção sistêmica de evolução crônica, com eliminação viral através das fezes (*Rivetti Jr et al., 2013*).

1.7. Resposta Imunológica do Hospedeiro

A penetração da partícula viral inicia a ativação da produção de interferon responsável pela indução do estado antiviral nas células vizinhas, e outras citocinas que promovem o recrutamento de leucócitos e inflamação no local da infecção (*Smith & Kotwall, 2002; Esteban & Buller, 2005; Tian et al., 2009; Damon, 2013*).

As células dendríticas e os macrófagos, componentes da resposta imune inata, são responsáveis pelo reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), e a resposta primária à infecção consiste na produção de óxido nítrico e diversas citocinas pró-inflamatórias, dentre elas interleucina 1 (IL-1), IL-12, fator de necrose tumoral α (TNF- α) e IFN's do tipo I (α e β) que atuam estimulando a diferenciação das células T auxiliares (TCD4+) em células ativas produtoras de IFN- γ , promovendo o controle da multiplicação viral. A imunidade mediada pelas células TCD4+ e pelo MHC de classe II é essencial para eliminação do vírus durante a infecção aguda (*Smith & Kotwall, 2002; Tian et al., 2009; Damon, 2013*).

IFN's do tipo I e IL-12 também ativam células T citotóxicas (TCD8+), importantes na eliminação das células infectadas. As células *natural killers* – NK também atuam na resposta celular desencadeada contra o vírus. Ambas as células TCD4+ e TCD8+ podem persistir por décadas após a vacinação contra a varíola e são essenciais na proteção contra doença primária induzida por VACV (*Hammarlund et al., 2003; Damon, 2013*).

A resposta imune humoral mostra-se importante no processo de eliminação do vírus e pode atuar através de diferentes mecanismos, sendo relatado na literatura que camundongos

deficientes para linfócitos B não eliminam as partículas virais de maneira eficiente (*Smith & Kotwal, 2002; Xu et al., 2004*).

A imunidade humoral induz uma forte resposta de anticorpos neutralizantes que demonstra ser o principal mecanismo efetor responsável pela proteção contra a infecção secundária. As proteínas H3, B5, A33, A56 e A27, localizadas no envelope viral do VACV são importantes imunógenos, responsáveis pela ativação da resposta imune e produção de anticorpos neutralizantes (*Davies et al., 2005; Putz et al., 2005*).

Os anticorpos específicos anti-OPV atingem um pico um mês após a vacinação, diminuindo durante o primeiro ano e, em seguida, se mantêm constantes durante longos períodos pós-vacinais (*Amanna et al., 2006; Kennedy et al., 2009; Moss, 2013*).

Vale ressaltar que, o alto grau de conservação do genoma de OPV confere uma reatividade imunológica cruzada devido à presença de epítomos conservados nas proteínas de superfície virais (*Jacobs et al., 2009; Hendrickson et al., 2010; Miller et al., 2011; Moss, 2013*). Essa característica possibilitou o uso do VACV como vacina na campanha mundial de vacinação que culminou na erradicação da varíola (*Jacobs et al., 2009*).

A resposta imune protetora anti-OPV parece persistir por muitos anos (*Hammarlund et al., 2003; Hatakeyama et al., 2005; Karem et al., 2005; Putz et al., 2005; Viner & Isaacs, 2005; Kim et al., 2006; Liu et al., 2012; Tan et al., 2012*). Na Itália, a resposta imune desenvolvida após a vacinação permaneceu detectável após 10 anos (*Putz et al., 2005*). No Japão, um estudo semelhante demonstrou que o percentual de positividade para a presença de IgG específico contra VACV era de 98.6% em indivíduos nascidos antes de 1962 e até 1968, e de 66% em indivíduos nascidos entre 1969 e 1975. Além disso, em aproximadamente 80% das pessoas nascidas antes de 1969 e 50% daqueles nascidos entre 1969 e 1975 também foi detectada a presença de anticorpos neutralizantes, evidenciando a presença de resposta imune protetora

nesses indivíduos (*Hatakeyama et al., 2005*). Dessa forma, é demonstrada nessa população uma proporção considerável de indivíduos anteriormente vacinados que mantêm níveis significativos de imunidade anti-OPV. Porém, estudos realizados no território brasileiro, onde a circulação de OPV é ativa, demonstraram que pessoas com histórico de vacinação também apresentaram sinais e sintomas da doença. Um trabalho realizado no Serro-MG descreveu o caso de um indivíduo previamente vacinado que foi exposto ao VACV durante um surto de VB e manifestou a sintomatologia da doença (*Silva-fernandes et al., 2009; Costa, et al., 2015*).

A ineficácia da imunidade protetora em longo prazo pode estar relacionada com a diminuição da população de linfócitos T de memória, que apresentam uma meia-vida de 8-15 anos e são responsáveis pela estimulação de plasmócitos produtores de anticorpos (*Hammarlund et al., 2003*). Hammarlund e colaboradores relataram que o título médio de anticorpos induzido pela revacinação foi significativamente maior do que os títulos induzidos por apenas uma única vacinação, no entanto a revacinação não resultou no aumento da produção de anticorpos em longo prazo. Além disso, recentemente foi demonstrado que alguns indivíduos desenvolveram baixa resposta imune humoral e celular apesar da formação da marca vacinal característica da vacinação antivariólica (*Kennedy et al., 2016*).

1.8. Vacinas Antivariólicas

A vacinação contra a varíola representa um grande marco na história da saúde mundial, uma vez que culminou na erradicação de uma grave doença infecciosa, com alto índice de letalidade. Um importante fator que contribuiu para o sucesso da campanha de vacinação foi o tropismo apresentado pelo VARV. O fato desse vírus circular apenas em humanos e não possuir outros animais como reservatórios facilitou sua erradicação em 1980 (*Smith & Mcfadden, 2002; Mcfadden, 2005; Fonseca et al., 2011*).

A vacinação na Europa realizada por Edward Jenner foi iniciada a mais de 200 anos utilizando o CPXV derivado de bovinos infectados, inoculado a partir da escarificação das lesões. Posteriormente, o CPXV foi substituído pelo VACV, que ainda vem sendo utilizado em muitos laboratórios como um vetor vacinal expressando proteínas exógenas de vários agentes infecciosos (*Fenner et al., 1989; Wiser et al., 2006; Jacobs et al., 2009*).

A vacina utilizada na campanha mundial de vacinação contra a varíola correspondia à diferentes amostras de VACV, aplicadas em diferentes regiões do planeta, sendo elas a Dryvax® New York Board of Health [NYCBH], nas Américas; Lister, no Reino Unido e Índia; EM-63, uma variante derivada da NYCBH, utilizada na Rússia; Copenhagen na Dinamarca e Ankara, na Turquia. Essas amostras eram caracterizadas como vacina de primeira geração, sendo constituída do líquido extraído da lesão de bovino infectado, entretanto, essa prática poderia favorecer a transmissão de outras doenças infecciosas (*Fenner et al., 1988; Smith e Mcfadden, 2002; Wiser et al., 2006; Jacobs et al., 2009*).

A vacinação era administrada através da via percutânea e frequentemente poderia resultar no desenvolvimento de sinais clínicos, como surgimento de uma pápula que evoluía à vesícula, e subsequentemente uma pústula e crosta, acompanhadas de sintomalogia sistêmica como febre, mialgia, linfadenopatia e cefaléia. Tal quadro clínico funcionava como indicativo de uma vacinação bem sucedida (*Fenner et al., 1988; Rock et al., 2004*).

O desenvolvimento de novas tecnologias permitiu o aprimoramento das vacinas que evoluíram para vacinas de segunda e terceira geração, desenvolvida a partir de amostras de VACV atenuadas, um exemplo que vem sendo estudado é o *Vaccinia virus Ankara* Modificado (*Modified Vaccinia Ankara – MVA*). Por fim, tem sido estudadas vacinas de quarta geração, possuindo modificações genéticas, incluindo deleções, inserções ou bloqueio de genes essenciais para a multiplicação do vírus e supressores da resposta imune (*Wiser et al., 2006; Jacobs et al., 2009*).

Vale ressaltar que a vacinação em massa foi encerrada após a erradicação da varíola, devido às possíveis complicações que podem resultar do processo de vacinação. No entanto a prática ainda é realizada por militares nos Estados Unidos e frequentemente são descritos casos na literatura, nos quais é destacado o possível papel desses indivíduos como disseminadores da infecção (*Smith & Mcfadden, 2002; Vora et al., 2008; Lederman et al., 2009; Tack et al., 2013*).

2. Vaccinia Bovina

2. 1. Aspectos Gerais

A Vaccinia Bovina (VB) é uma zoonose viral emergente, tendo como agente etiológico o VACV. Acomete principalmente o gado leiteiro e os ordenadores e é caracterizada pela presença de lesões ulcerativas na pele e membranas mucosas. Em bovinos, essas lesões surgem principalmente nos tetos e úberes e frequentemente são acompanhadas de mastite que pode evoluir para a perda definitiva das glândulas mamárias, resultando na diminuição da produção de leite com impacto econômico significativo (**figura 6**). Além disso, os bezerros podem apresentar lesões no focinho após o contato direto com as tetas das vacas lactantes infectadas (*Trindade et al., 2003; Leite et al., 2005; Lobato et al., 2005;; Fonseca et al., 2011; Kroon et al., 2011*).



Figura 6: Lesões ulcerativas nos tetos das vacas e focinho dos bezerros infectados com VACV Fonte: Leite et al., 2005; Megid et al., 2008; Silva et al., 2008.

A infecção em humanos geralmente é relacionada com doença de evolução benigna, cujo processo entre o surgimento dos sintomas iniciais e a cicatrização total leva aproximadamente 21 dias. As manifestações clínicas da VB consistem principalmente em lesões localizadas no sítio primário da infecção, geralmente encontradas nos dedos e nas mãos de indivíduos que frequentemente apresentam histórico de contato com animais infectados apresentando lesões (**figura 7**) (Trindade et al., 2003; Leite et al., 2005; Lobato et al., 2005; Fonseca et al., 2011). No entanto, há relatos da presença dessas lesões características em áreas como o rosto, olhos,

mucosa, peito e na região genital possivelmente como resultado de auto-inoculação (*figura 8*) (*Silva et al., 2008; Schatzmayr et al., 2009*).

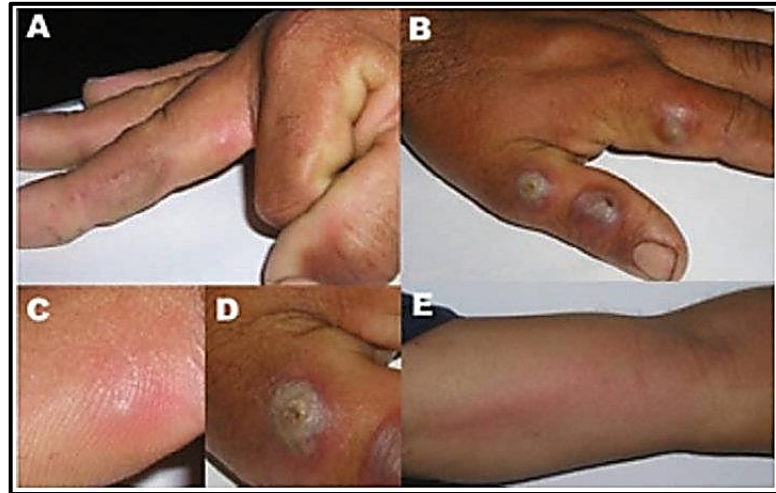


Figura 7: Lesões causadas por VACV nas mãos dos ordenadores infectados (A) Lesão papular inicial no dedo médio (B) Pápulas e pústulas evoluíram para úlceras com tecido focal necrosado (C) Área de inflamação pode ser vista em torno da lesão (D) Detalhe da figura B (E) Lesões coincidiram com o aparecimento de linfangite periférica no braço esquerdo do paciente. Fonte: *Trindade et al., 2009*



Figura 8: Lesões faciais e lesão vulvar decorrente de auto inoculação de VACV Fonte: *Silva et al., 2008; Schatzmayr et al., 2009*

As lesões causadas por VACV surgem como pontos focais na pele acompanhados de coceira, seguido pelo aparecimento do edema local e a formação de vesículas. Os sintomas sistêmicos

tais como febre, cefaléia, mal-estar, mialgia, linfadenopatia inguinal e cervical desenvolvem-se cerca de 3 dias após os sintomas iniciais. Posteriormente, as vesículas evoluem para pústulas umbilicadas com áreas focais de inflamação. Há o desenvolvimento de úlceras preenchidas com tecido necrótico, que tendem a cicatrizar, formando crostas negras e, finalmente, uma cicatriz permanente (*Silva-fernandes et al. 2009; Essbauer et al., 2010; Fonseca et al., 2011; Kroon et al., 2011*).

A via clássica de transmissão do VACV na VB é através do contato direto entre humanos e bovinos infectados, assim, a prática da ordenha é um importante fator de exposição. Uma vez que VB é uma zoonose que afeta principalmente o gado leiteiro, questiona-se sobre o papel do leite e seus derivados nesse contexto. Partículas virais e genoma do VACV foram detectados em amostras de leite durante surtos no estado de Minas Gerais (*Abrahão et al., 2009*). Através de contaminação experimental, foi demonstrado que as partículas dos VACV permanecem viáveis no leite cru e no queijo, após tratamento térmico com altas e baixas temperaturas (*Oliveira et al., 2010*).

Foi realizado um estudo para avaliar a eliminação de partículas virais através do leite de vacas infectadas experimentalmente, sendo detectado VACV no leite do 1º ao 81º d.p.i.. Além disso, o vírus foi detectado, tanto no leite de animais submetidos à ordenha manual, quanto naqueles em que foi introduzido um cateter em suas glândulas mamárias. Esses dados revelam a presença de VACV no leite e atenta para uma possível eliminação viral associada com uma infecção viral sistêmica (*de Oliveira et al., 2015*).

A transmissão de VACV a partir de leite contaminado em modelo murino foi avaliada, sendo observada disseminação viral sistêmica com detecção de genoma viral nas fezes e na mucosa oral, no entanto sem desenvolvimento de sinais clínicos (*Rehfeld et al., 2015*). Além disso, em um surto causado por BPXV na Índia, foi observada infecção de humanos com

desenvolvimento de lesões na boca em 10,2% dos afetados, sendo relacionadas ao consumo de leite *in natura* (Gurav *et al.*, 2011).

De fato, dados do nosso grupo apontam para possíveis novas vias de transmissão do VACV, uma vez que foram detectados casos de infecção no estado de Minas Gerais, onde os envolvidos não mantiveram contato direto com bovinos infectados (Costa *et al.*, 2015). Vale ressaltar que, as partículas virais do VACV são estáveis em condições ambientais adversas; em alimentos, incluindo leite e derivados; e em fezes de murinos infectados experimentalmente, essa estabilidade pode conferir ao VACV a capacidade de permanecer viável no ambiente, favorecendo sua transmissão (Essbauer *et al.*, 2007; Abrahão *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2010).

2.2. Emergência e Epidemiologia da VB no Brasil

Os primeiros VACV isolados no Brasil foram obtidos na década de 60 (**figura 9**), sendo esses o vírus Cotia SPAn 232 (SAV) isolado a partir de camundongos sentinelas na estação de Cotia (São Paulo) e o BeAn58058 (BAV) isolado a partir de um roedor silvestre do gênero *Oryzomys*, capturado na floresta de Utinga, em Belém (Pará) (Fonseca *et al.*, 1998; da Fonseca *et al.*, 2002). Posteriormente, já em 1993, foi isolado o Belo Horizonte vírus (VBH) em um surto de doença exantemática envolvendo camundongos suíços, no biotério da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO/UFMG) (Trindade *et al.*, 2004).

Até então, os isolados brasileiros eram provenientes de roedores, no entanto a partir de 1999 VACV passou a ser isolado em um novo cenário. O vírus passou a ser detectado durante surtos de doença exantemática acometendo principalmente bovinos leiteiros e ordenhadores, sendo isolado o *Cantagalo virus* (CTGV) na cidade de Cantagalo, estado do Rio de Janeiro (Damaso *et al.*, 2000) e *Araçatuba virus* (ARAV) na cidade de Araçatuba, estado de São Paulo (Trindade *et al.*, 2003).

Posteriormente foram isolados *Passatempo virus* (PSTV), *Muriae virus* (MURV), *Guarani P1* e *Guarani P2* (GP1V e GP2V) no estado de Minas Gerais, que por possuir inúmeras bacias leiteiras ainda é altamente afetado pela circulação do vírus (Leite et al., 2005; Trindade et al., 2006; Trindade et al., 2007).

A disseminação do VACV no território brasileiro foi evidenciada a partir da detecção do vírus em surtos no sudeste e centro-oeste brasileiro (Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro e Goiás) (Nagasse-Sugahara et al., 2004; Megid et al., 2008; Schatzmayr et al., 2011; Megid et al., 2012; Abrahão et al., 2015). Além disso, tem sido descrita co-infecção de VACV e *Parapoxvirus*, endêmico em diversas regiões do Brasil, associado à doença vesicular em bovinos (Abrahão et al., 2010; Sant'ana et al., 2013b).

A análise filogenética do gene A56R forneceu dados que possibilitou a divisão dos isolados brasileiros em dois grupos, onde o grupo 1 caracteriza-se pela deleção de 18 nucleotídeos no gene A56R, que codifica a hemaglutinina viral, sendo composto por ARAV, CTGV, GP2V e PSTV. Enquanto que, no grupo 2, composto por GP1V, VBH, BeAn 58058, SPAn323, essa deleção não existe e as amostras são agrupadas junto à amostra protótipo VACVWR (Trindade et al., 2007).

Durante um surto de VB ocorrido no município de Mariana, estado de Minas Gerais em 2005, foi detectada a circulação de VACV em roedor *Mus musculus*. O *Mariana virus* (MARV), detectado no roedor também foi encontrado infectando bovinos e humanos durante este surto (Abrahão et al., 2009a). Ainda no estado de Minas Gerais, em diversos surtos ocorridos na última década partículas virais foram isoladas de amostras de leite coletadas de rebanhos infectados nos municípios de Bambuí, Mariana e Paraguaçu (Abrahão et al., 2009b).

No sul do país, mais especificamente no estado do Rio grande do Sul, os primeiros registros da circulação do VACV foram obtidos a partir de um surto acometendo cavalos da raça crioula em

Pelotas (Rio Grande do Sul) (*Brum et al., 2010*). A partir deste surto foram isolados *Pelotas virus 1* e *Pelotas virus 2* (P1V e P2V), sendo demonstrada variabilidade genética entre as amostras, através de análise filogenética e estudos de patogênese (*Campos et al., 2011*).

Ainda em relação a outros hospedeiros, foi descrita evidência sorológica de circulação de VACV em bubalinos em um estudo que avaliou 48 amostras de soro de búfalo provenientes do estado de Minas Gerais, onde 15 (31,25%) continham anticorpos neutralizantes contra o OPV e 17 (35,41%) tiveram resultados positivos para a presença de IgG (*Assis et al., 2012b*). Posteriormente, a circulação viral foi demonstrada em bubalinos na Ilha de Marajó, estado do Pará (*Franco-Luiz et al., 2016a*).

Evidências sorológicas e moleculares de circulação de VACV têm sido detectadas em animais domésticos e silvestres, dentre eles roedores, suínos, felinos, caninos e procionídeos (*Peres et al., 2013; 2016; Dutra et al., 2016; Costa, GB dados não publicados*).

No município do Serro, estado de Minas Gerais, a circulação de VACV vem sendo detectada desde 2005 sendo que o último surto investigado pelo nosso grupo de pesquisa ocorreu em 2011 (*Trindade et al., 2009; Assis et al., 2012a*). Recentemente, um estudo de soroprevalência conduzido pelo nosso grupo nesta região, detectou 30.1% de soroprevalência entre a população rural analisada, sendo que destes 9.5% não foram vacinados para a varíola. Além disto, revelou-se a presença de genoma viral no soro e altos títulos de anticorpos neutralizantes anti-OPV em indivíduos que não se envolvem em qualquer atividade clássica de exposição ao VACV como, por exemplo, ordenhar bovinos, mas toda a família geralmente consome leite cru e queijo, sugerindo possíveis novas rotas de transmissão de VACV (*Costa, et al., 2015; 2016*).

Nos últimos anos têm-se observado a distribuição de VACV em outras regiões brasileiras, sendo detectada a circulação do VACV no centro-oeste, em Goiás (*Sant'ana et al., 2013a*); e

nordeste, nos estados do Pará (*Assis et al., 2013*), no Maranhão (*Oliveira et al., 2013*) e na Bahia (*Assis et al., 2015; Abrahão et al., 2016*).

Na região Norte, foi detectada circulação de VACV em macacos no Tocantins, sendo observada DNA viral no soro e uma alta prevalência de anticorpos neutralizantes (24.4%) nesses animais ($n = 344$) (*Abrahão et al., 2010*); Além disso, a circulação de VACV foi detectada nos estados de Rondônia e Mato Grosso, na região da Amazônia (*Quixabeira-santos et al., 2011*). No estado do Acre, foi conduzido um estudo soropidemiológico em uma população de humanos, envolvendo 294 indivíduos pertencentes a assentamentos rurais, sendo encontrada uma soroprevalência de 27,89% (*Mota et al., 2010*).

A circulação do VACV têm-se expandido para além do território brasileiro, já tendo sido detectada em outros países da América do Sul, sendo estes: o Uruguai, Argentina e Colômbia (*Nakazawa et al., 2016; Franco-Luiz, et al., 2014;2016;*).

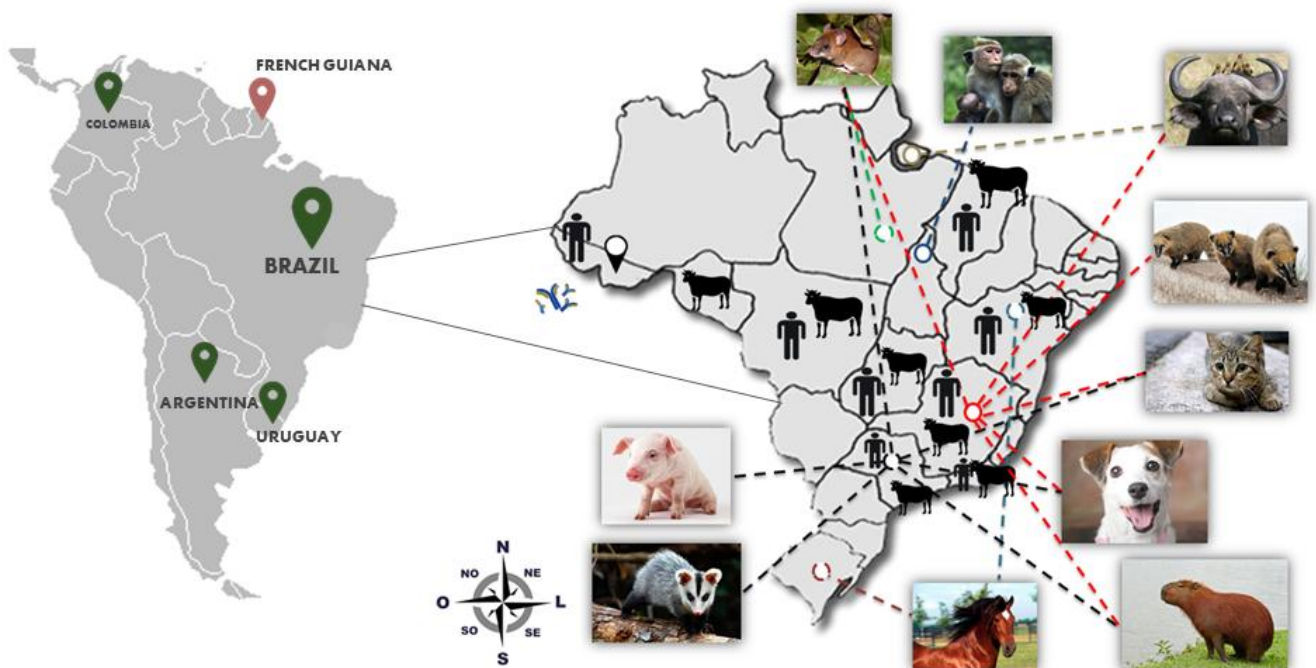


Figura 9: Distribuição de VACV na América do Sul e os Diferentes Tipos de Hospedeiros. Um mapa da América do Sul é mostrado à esquerda e os pinos verdes indicam os países onde o VACV foi detectado. O pino vermelho indica a ausência de detecção de VACV na Guiana Francesa; O mapa do Brasil destaca a distribuição do VACV em diferentes regiões e a detecção do VACV em um amplo espectro de hospedeiros. Os anticorpos (azul) indicam evidências sorológicas da circulação do VACV em humanos em áreas rurais do estado do Acre. Linhas tracejadas em cores diferentes representam a circulação do VACV no diferentes estados brasileiros, ou seja, linhas tracejadas vermelhas representam a circulação do VACV no estado de Minas Gerais e indica em quais hospedeiros a circulação de VACV foi detectada no estado Fonte: *de Oliveira, J.S. dados não publicados*.

2.3. Impacto Econômico da Vaccinia Bovina

No Brasil, a agropecuária consiste em uma das atividades econômicas mais rentáveis. No âmbito da produção de leite, o país ocupa o quarto lugar no ranking mundial. Em 2015, o Brasil produziu cerca de 35 bilhões de litros de leite, empregando 4 milhões de trabalhadores e movimentando 60 bilhões de reais (*EMBRAPA, 2015; IBGE, 2016*). O estado de Minas Gerais possui tradição na produção leiteira e lidera a produtividade nacional, sendo responsável por 25,5% do volume total de leite produzido (*IBGE, 2016*).

Como descrito anteriormente, a VB afeta principalmente o gado leiteiro e os ordenhadores, além disso, as pequenas propriedades que realizam ordenha manual correspondem a cerca de 90% dos casos, onde a taxa de ataque nos rebanhos é muito alta, variando de 80-100% (*Lobato et al., 2005*). Dessa forma, as pequenas propriedades, que representam a maioria dos casos e dependem exclusivamente da produção de leite, são amplamente afetadas, assim como os municípios cuja principal atividade econômica baseia-se na produção leiteira.

As manifestações clínicas apresentadas no curso da infecção por VACV compreendem principalmente o desenvolvimento de lesões exantemáticas acompanhadas de processo inflamatório e infecções bacterianas secundárias (*Leite et al., 2005; Lobato et al., 2005; Trindade et al., 2006; Trindade et al., 2007a*). O desenvolvimento de lesões no animal,

frequentemente resulta na diminuição da produção de leite; gastos com medicamentos e veterinários; e interrompe o processo de nutrição dos bezerros, levando ao emagrecimento destes. Além disso, uma vez que o ordenhador é infectado e desenvolve a doença, há perda temporária de recursos humanos nas propriedades afetadas, onde há o afastamento do trabalhador por determinado período e a necessidade de contratação de um novo empregado para suprir a falta do mesmo (*Trindade et al., 2003; Leite et al., 2005; Lobato et al., 2005; Trindade et al., 2006; Trindade et al., 2007a*).

Tendo em vista os problemas supracitados, o estado de Minas Gerais é significativamente afetado pelos surtos de VB, uma vez que consiste no maior produtor de leite do Brasil, sendo responsável por 1/3 da produção de leite no país. (*EMBRAPA, 2015*). O estado possui tradição na produção leiteira, um grande rebanho de animais, boas condições climáticas, grande uso de tecnologias de produção e boa nutrição dos rebanhos, o que culmina no sucesso da produtividade (*SEAB, 2016*). A análise por estrato de produção revela a importância de estabelecimentos com escalas de produção pequena e média na produção nacional de leite (*BNDES, 2016*).

O risco associado ao consumo de leite ainda é desconhecido, no entanto, já foram encontradas partículas infecciosas e DNA de VACV em amostras de leite de animais em três diferentes propriedades, nos municípios de Bambuí, Paraguaçu e Mariana, afetados pelos surtos de VB no estado, o que poderia resultar em embargo do produto, causando prejuízo aos produtores e consequentemente, ao estado (*Abrahão et al., 2009b*).

No estado de Minas Gerais, as propriedades apresentando surtos vigentes de VB geralmente são interditadas por órgãos públicos, como o Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA). Dessa forma, as pequenas propriedades, que representam a maioria dos casos e dependem exclusivamente da produção de leite, são amplamente afetadas, assim como os municípios cuja principal atividade econômica baseia-se na economia leiteira.

Outro problema associado é a dificuldade observada na área médica veterinária e na zootecnia, quanto à realização do diagnóstico diferencial, uma vez que VB frequentemente é confundida com outras doenças vesiculares de bovinos, como febre aftosa, estomatite vesicular, pseudovariola e mamilite herpética, podendo resultar em subnotificação de casos (*Abrahão et al., 2010; Sant'ana et al., 2013*).

2.4. Impacto da Vaccinia Bovina na Saúde Pública

Devido à forma de transmissão clássica do VACV que envolve o contato direto do ordenhador com o bovino infectado, a VB é caracterizada como uma doença zoonótica ocupacional e representa um problema de saúde pública. Uma vez que a vacinação foi suspensa após a erradicação da varíola, a pouco mais de 30 anos, têm-se uma população jovem susceptível à infecção por OPV (*Lobato et al., 2005; Shchelkunov et al., 2011*).

A infecção por VACV apresenta uma alta morbidade, sendo que em mais de 80% das propriedades afetadas por surtos de VB são detectados casos em seres humanos. Além disso, são frequentes os casos de lesões secundárias derivadas do processo de auto inoculação. Porém, a dificuldade existente por parte da equipe de saúde em reconhecer a doença, frequentemente resulta no tratamento inadequado da infecção. Devido à forma de transmissão do vírus por contato direto, o potencial de transmissão pessoa/pessoa deve ser considerado, assim como a possibilidade de infecção nosocomial e complicações em pacientes imunocomprometidos (*Lobato et al., 2005; Trindade et al., 2007; Vora et al., 2008; da Silva et al., 2008; Trindade et al., 2009*).

2.4. Transmissão

A via clássica de transmissão do VACV, no contexto da VB, consiste no contato direto do ser humano com o bovino infectado apresentando lesões (*figura 10*). Esse contato favorece a

infecção do indivíduo e a propagação do vírus dentro do rebanho ou até mesmo, entre propriedades (Trindade et al., 2003; Leite et al., 2005; Lobato et al., 2005; Kroon et al., 2011).



Figura 10: Principal Via de Transmissão do VACV – Contato entre humanos e bovinos infectados por VACV, sem uso de proteção Fonte: Lobato et al., 2005; Silva et al., 2008; Assis et al., 2013

No Brasil, VACV foi isolado a partir de utensílios domésticos no ambiente interno de uma propriedade afetada por surto de VB (Assis et al., 2013). Posteriormente, foi descrita transmissão de VACV intrafamiliar, a partir de um caso descrito em 2002 no estado do Rio de Janeiro, onde o pai ordenhador foi infectado pelo VACV e transmitiu a infecção ao filho adolescente, que não realizou a prática de ordenha manual e não mantivera contato com bovinos

(Pereira-oliveira *et al.*, 2014). Um estudo de soro prevalência realizado pelo nosso grupo no município do Serro, estado de Minas Gerais, detectou altos títulos de anticorpos neutralizantes anti-OPV e DNA no soro de indivíduos de um mesmo grupo familiar, no qual apenas um indivíduo manteve contato direto com animais, desconsiderando a ordenha como via de transmissão nos demais casos. No entanto, toda a família mantém o hábito de consumir leite cru e queijo, característica comum na região (Costa *et al.*, 2015). Esses dados sugerem possíveis novas rotas de transmissão do VACV e a infecção através do consumo de leite cru e de queijo não deve ser descartada, uma vez que essa relação foi descrita em surtos de BPXV e, além disso, o VACV foi isolado de amostras de leite durante surtos de VB no Brasil e de queijo artesanal, em propriedades com e sem surto de VB (Abrahão *et al.*, 2009; Gurav *et al.*, 2011; Rehfeld, I.S. dados não publicados).

2.5. Diagnóstico laboratorial

Frequentemente observa-se dificuldade quanto ao diagnóstico da infecção por VACV no Brasil, uma vez que as lesões e os sinais clínicos presentes nos animais e nos humanos infectados sobrepõem os sintomas de outras doenças que afetam bovinos, como febre aftosa, estomatite vesicular, pseudovariola e mamilitite herpética. Além disso, não raramente, o indivíduo acometido apresenta infecção bacteriana secundária que dificulta o diagnóstico clínico (Abrahão *et al.*, 2010; Sant'ana *et al.*, 2013).

O diagnóstico conclusivo de infecções causadas por *Orthopoxvirus* é sempre laboratorial, podendo ser sorológico, através da pesquisa de anticorpos IgG, IgM ou neutralizantes; ou através de metodologia molecular, por meio das técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR) (Damon, 2013).

Através da pesquisa de anticorpos neutralizantes é possível estimar infecções passadas. No entanto, devido ao alto grau de conservação do genoma dos OPVs, existe uma resposta imunológica cruzada contra os vírus deste gênero, permitindo que os anticorpos capazes de neutralizar a infecção pelo VACV, também possam neutralizar a infecção por VARV, MPXV e CPXV. Assim, a pesquisa de anticorpos não permite determinar qual OPV foi responsável pela imunização (*Jacobs et al., 2009; Miller et al., 2011*).

Os espécimes clínicos utilizados para diagnóstico molecular podem ser crostas ou swabs obtidos diretamente das lesões (ricas em partículas virais), o sangue ou até mesmo o soro dos pacientes e animais infectados (*Nitsche et al., 2007*). Vale ressaltar que o DNA viral já foi detectado nas fezes, na mucosa oral e no leite de animais infectados (*Abrahão et al., 2009a; Abrahão et al., 2009b; D'anunciação et al., 2012; Rivetti jr et al., 2013; Rehfeld et al., 2015*).

Os principais alvos moleculares são o gene C11R que codifica o fator de crescimento viral; A26L relacionado à proteína do corpúsculo de inclusão; e A56R gene relacionado à hemaglutinina viral. O alvo A56R permite não só a detecção de VACV, mas a diferenciação entre os dois grupos circulantes no Brasil (*Ropp et al., 1995; Meyer et al., 1997; Li et al., 2006; Drumond et al., 2008; Trindade et al., 2008; Abrahão et al., 2010; Assis et al., 2012*).

Através do isolamento viral é possível a recuperação de partículas virais envolvidas na infecção (*Lobato et al., 2005; Megid et al., 2008; Abrahão et al., 2009*). No entanto, essa metodologia é restrita a laboratórios de pesquisa, por ser uma técnica laboriosa e de alto custo. Após o isolamento é possível realizar outros estudos para melhor avaliar o vírus e sua relação com seus hospedeiros (*Ferreira et al., 2008; Abrahão et al., 2009; Campos et al., 2011*). A microscopia de alta resolução é de difícil execução e, apesar de ser uma metodologia que permite a visualização das partículas infecciosas, também é uma tecnologia restrita à pesquisa (*Fonseca et al., 1998; Damaso et al., 2000; Sant'ana et al., 2013*).

2. JUSTIFICATIVA

O *Vaccinia virus* (VACV) tem sido isolado frequentemente durante surtos de vaccínia bovina (VB) a partir do gado leiteiro e de seres humanos em diversos estados do Brasil. Dentre eles, Minas Gerais é responsável por 1/3 da produção de leite do país. A VB é apresentada-se como doença exantemática caracterizada pelo desenvolvimento de lesões principalmente nas tetas e úberes do gado leiteiro resultando na diminuição da produção de leite, o que afeta diretamente a economia leiteira. Além disso, as lesões são comumente associadas a infecções bacterianas secundárias que contribuem para o agravamento do quadro clínico dos animais, aumentando os custos veterinários extras do país.

A VB também representa um problema de saúde pública por ser uma zoonose ocupacional, sendo observado frequentemente o acometimento de ordenhadores após contato direto com as lesões durante a ordenha. Nos ordenhadores, o desenvolvimento das lesões características geralmente vem acompanhado de sintomas sistêmicos implicando no afastamento do trabalhador e em alguns casos na sua hospitalização. É observada uma alta frequência de infecção por VACV em seres humanos, mesmo entre indivíduos vacinados contra a varíola e que em tese deveriam estar protegidos contra qualquer infecção por OPV. Geralmente, o tratamento médico aplicado é impróprio devido à carência ou ausência de informação sobre a doença por parte dos profissionais de saúde. Por se tratar de uma zoonose, a doença é difícil de combater devido à existência de reservatórios silvestres e animais amplificadores da virose.

Os estudos sobre VACV no Brasil foram conduzidos, principalmente em populações rurais de áreas endêmicas, visando o acompanhamento de surtos. Contudo, pouco se sabe sobre a circulação viral em populações urbanas. Recentemente, VACV foi detectado em animais domésticos e silvestres de áreas urbanas em Minas Gerais. Considerando esses dados faz-se necessária a investigação da circulação viral em área urbanizada, assim como os possíveis

fatores de exposição associados, o que auxiliará no entendimento do ciclo epidemiológico do VACV no país. Além disso, aponta-se a demanda em avaliar o conhecimento em relação à doença, por parte de profissionais de saúde que atuam em área endêmica, ademais, o *status* imunológico desses indivíduos, frente ao VACV. Essas análises permitirão o desenvolvimento de medidas educativas em saúde, o que auxiliará na prevenção e controle da doença.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Investigar a circulação, os fatores de exposição associados ao *Vaccinia vírus* e o conhecimento sobre a vaccínia bovina em uma população urbana e profissionais de saúde de uma área endêmica do Estado de Minas Gerais.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1. Verificar a presença de anticorpos anti-OPV através de ensaio imunoenzimático e soroneutralização na população urbana e nos profissionais de saúde.

3.2.2. Avaliar fatores de exposição associados à circulação de VACV na população urbana do Serro, Minas Gerais.

3.2.3. Investigar a ocorrência de casos clínicos de VB na região urbana do Serro.

3.2.4. Examinar o nível de conhecimento dos profissionais de saúde sobre a doença.

3.2.5. Produzir material bibliográfico para subsidiar os profissionais de saúde no manejo clínico de pacientes infectados por VACV.

5. METODOLOGIA

5.1. Delineamento do Estudo

Foram realizados estudos transversais de base populacional para caracterização demográfica e sorológica de indivíduos e profissionais de saúde residentes em uma área urbana de uma região endêmica para VB no Estado de Minas Gerais. O inquérito epidemiológico foi realizado utilizando um questionário semi estruturado e pré-codificado (*anexo 1 e 2*), foram avaliados fatores de exposição relacionados à infecção com desenvolvimento de infecção assintomática ou doença clínica, abordando aspectos relacionados a história de infecções passadas, antecedentes vacinais e aspectos comportamentais dos participantes.

5.2. Local do Estudo

O estudo foi realizado na área urbana do município do Serro, região Norte do estado de Minas Gerais (*figura 12*). O município possui uma população de 20.833 habitantes, sendo 11.060 residentes em área urbana (IBGE, 2010). A região é endêmica para VACV (*Trindade et al., 2009; Assis et al., 2012; Costa, et al., 2015;2016*). O estudo foi conduzido em uma amostra aleatória de indivíduos dessa população.

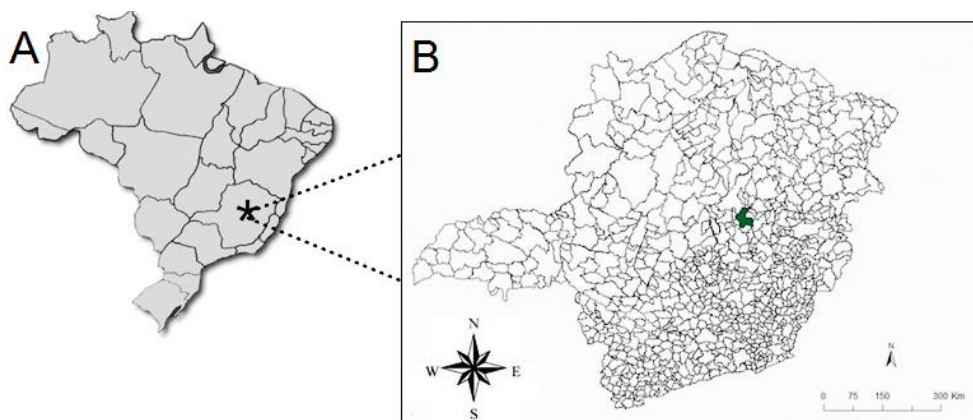


Figura 12: Localização Geográfica do Serro – MG (18° 36' 17" S 43° 22' 46" W) Fonte: de OLIVEIRA, J.S. dados não publicados.

5.3. Seleção dos Participantes

Durante agosto de 2015 foram realizadas visitas semanais ao município do Serro, sendo percorridos os bairros que compreendem a área urbana. Foram selecionados indivíduos de forma aleatória, distribuídos proporcionalmente entre os bairros percorridos. Nas propriedades onde o responsável concordou com a realização da pesquisa, indivíduos de todas as faixas etárias foram contatados e aqueles que aceitaram participar, responderam a uma entrevista e foi coletada uma amostra de sangue.

5.4. Seleção dos Profissionais de Saúde

O sistema de saúde pública do Serro consiste em um hospital, nove postos de saúde, uma policlínica municipal e um serviço de vigilância epidemiológica. No município atuam 103 profissionais da área da saúde (Dados da Secretaria de Saúde Municipal). Foram selecionados para participação no estudo, profissionais da área da saúde do Serro, que atuam como médico, técnico de enfermagem, auxiliar de enfermagem, enfermeiro, atendente de farmácia, farmacêutico, biomédico, secretário de laboratório, agente de saúde, dentista, auxiliar de serviços gerais, dentre outros que se relacionem ao serviço de saúde no município. Os profissionais foram abordados e convidados a participar da pesquisa durante visitas ao hospital do município, bem como a vigilância epidemiológica, aos postos de saúde distribuídos pelos bairros e região rural, nas clínicas e laboratórios particulares (*figura 13*).



Figura 13: Localização dos profissionais de saúde amostrados no Serro - MG Fonte: de OLIVEIRA, J.S. dados não publicados.

5.5. Considerações Éticas

A participação no estudo foi voluntária e a todos os indivíduos contatados foi apresentado um termo de consentimento pós-informado, oral e por escrito, com informações sobre o estudo, seus propósitos, procedimentos e riscos envolvidos. Após aceitar participar do estudo, cada voluntário assinou o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE – *anexo 3*) juntamente com uma testemunha. O documento assinado permaneceu em poder da equipe de pesquisadores envolvida no projeto, enquanto uma cópia foi entregue ao voluntário. Caso o participante não soubesse assinar, poderia optar por ter o termo de consentimento assinado por algum familiar ou ter a impressão digital coletada. Os participantes receberam os resultados dos exames individuais realizados, acompanhados da interpretação dos resultados e seu significado. Os questionários obtidos se destinaram exclusivamente ao projeto de pesquisa em questão, e como tal não serão disponibilizados para nenhum outro fim. Dados gerados na pesquisa e eventualmente publicados preservam a identidade dos voluntários. Ao final do estudo, um

relatório contendo os resultados gerais da pesquisa será disponibilizado para todos os órgãos ligados a saúde humana e animal do município. Esta proposta foi encaminhada para o Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP) com registro FR – 413704.

5.6. Instrumentos para Coleta de Informações

Foram utilizados questionários semi estruturados, pré-codificados, contendo perguntas sobre cada um dos participantes. Em relação à população urbana, foram investigadas as características demográficas, como sexo, idade, ocupação, escolaridade; e características comportamentais, como hábitos pessoais, prática da ordenha, consumo e manipulação de leite *in natura* e queijo artesanal, contato com animais domésticos e silvestres, histórico vacinal, ocorrência prévia da doença, etc. Para avaliar os profissionais de saúde, foram avaliadas as características demográficas e fatores associados à sua atuação como profissional da saúde, como tempo de profissão e conhecimento sobre VB no que diz respeito às manifestações clínicas, diagnóstico, transmissão e tratamento da doença. Foram estruturados bancos de dados utilizando o programa Epi-InfoTM versão 7.0 (Centers for Disease Control and Prevention, CDC, Atlanta, USA), para digitação dos dados coletados e codificados. Sendo realizada dupla digitação para garantir a confiabilidade dos dados.

5.7. Plano de Análise

A análise dos dados foi realizada utilizando o programa Epi-InfoTM versão 7.0. Foram realizadas as análises descritivas de todos os dados coletados. Foi realizada a análise univariada com comparação das frequências de cada variável nos diferentes grupos, utilizando o teste de qui-quadrado, teste exato de Fisher e cálculo da *odds* relativa bruta e intervalo de confiança de 95%.

5.8. Amostras Clínicas

Foram coletadas amostras de sangue (5 ml) para obtenção do soro, utilizando o sistema vacuntainer, após o consentimento livre e esclarecido dos participantes. Essas amostras foram estocadas a -20°C e transportadas até ao Laboratório de Vírus, ICB/UFMG onde foram processadas e analisadas.

5.9. Avaliação Clínica

Durante a coleta das amostras foi realizada uma inspeção visual para observar se havia lesões nos indivíduos e observou-se os braços dos indivíduos com idade igual ou acima a 38 anos, para verificação da marca vacinal. Uma vez que a campanha de erradicação da varíola foi encerrada em 1977 e no Brasil, a vacinação ocorreu até 1978, apenas indivíduos com mais de 38 anos podem ter sido vacinados.

5.10. Metodologia Laboratorial

As amostras biológicas foram analisadas através de abordagem sorológica, que compreende o ELISA para triagem de anticorpos IgG específicos e o teste de soroneutralização, para avaliação do estado imune dos indivíduos, estimativa de prevalência e contato prévio com o vírus. Vale salientar que o ensaio de soroneutralização é padrão ouro para o diagnóstico de infecção pelos membros do gênero *Orthopoxvirus*, sendo possível avaliar o grau de proteção do indivíduo (Storch & Wang, 2013).

5.10.1. Células

Células BSC-40 foram utilizadas nos testes de soroneutralização. Células de linhagem contínua BSC-40 são células epiteliais derivadas do rim de macaco verde africano (*Cercopithecus*

aethiopsis), obtidas da American Type Culture Collection (ATCC), Maryland, EUA. As células foram cultivadas em meio de cultura simples (meio mínimo de Eagle – MEM) (Gibco, USA), e acrescido soro fetal bovino (SFB) a 5% (Cultilab, Brasil) para o crescimento celular, antimicrobianos (gentamicina (140 mg/mL), penicilina (100 U/mL) e anfotericina B (2 ug/mL) para inibir o crescimento de bactérias e fungos, glutamina (aminoácido essencial), em estufa a 37°C suplementada com 5% de CO₂. O cultivo foi realizado em garrafas apropriadas e, posteriormente, as células foram transferidas para placas de 6 poços (Tapp) para a realização do teste de soroneutralização.

5.10.2. Vírus

Para os testes de soroneutralização foi utilizado o *Vaccinia virus* amostra Western Reserve. A amostra *Vaccinia virus* Western Reserve (VACV-WR) foi gentilmente cedida pelo Dr. C. Jungwirth (Universitat Wurzburg, Alemanha) e faz parte da coleção de vírus do Laboratório de Vírus, ICB, UFMG.

5.10.3. Soros Controles

Como soro controle positivo e negativo foram utilizados um pool de soros pertencentes à soroteca do Laboratório de Vírus da UFMG, previamente testados por ensaio de soroneutralização.

5.10.4. Ensaio imunoenzimático (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* – ELISA)

Todas as amostras de soro coletadas foram submetidas à triagem para presença de anticorpos IgG anti-OPV pelo método de ELISA (Kroon et al., 2016). Uma placa de fundo reto do tipo Nunc maxisorp (Apogent, USA) de 96 poços utilizada para o teste foi sensibilizada com antígeno (VACV-WR) a uma concentração aproximada de 10⁶ p.f.u. em tampão carbonato a

0,01M e pH 9,6; (1ul de vírus – 10ml de tampão), foi adicionado 100µl da diluição por poço, a placa foi exposta a luz Ultra Violeta por 15 minutos, com o objetivo de inativar as partículas virais. Posteriormente, permaneceu *over-night* à temperatura de 4°C, tempo este necessário para que ocorra a adesão das partículas virais ao fundo da placa. Após esse tempo, a placa foi lavada (três vezes) com PBS-Tween 0,05%-1% e a ela adicionada uma solução de bloqueio (BSA a 1% diluído em PBS-Tween a 0,05%) para cessar a adesão. A placa foi incubada a 37°C por duas horas. Em seguida, a placa foi lavada novamente com PBS-Tween 0,05%-1% (três vezes) e então 100µL do soro-teste e soros-controles diluídos na razão de 1:100 em solução de BSA a 1% diluído em PBS-Tween, foram adicionados a cada poço, seguido de incubação em estufa a 37°C por 1 hora.

Posteriormente, a placa foi lavada por três vezes com PBS-Tween e adicionados 100µL do conjugado específico (anti-IgG humano conjugado a peroxidase, Sigma) diluído na razão 1:10000 em BSA a 1% diluído em PBS-Tween. A placa foi incubada por 1 hora a 37°C, depois lavada mais cinco vezes com PBS-Tween e a ela acrescentado 100µL do substrato TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine + peróxido de hidrogênio) (BD OptEIATM ELISA, BD Biosciences) sob incubação de 10 minutos à temperatura ambiente. A reação foi interrompida pela adição de 40µL de ácido sulfúrico 1M e lida em espectofotômetro a 450nm. O ponto de corte foi determinado pela média dos cinco controles negativos, mais três vezes o desvio padrão. Todos os soros com valores maiores que o ponto de corte foram considerados positivos. A determinação do ponto de corte foi realizada em cada placa.

5.10.5. Ensaio de soroneutralização (*plaque reduction neutralizing test* – PRNT)

As amostras de soro foram submetidas ao ensaio de soroneutralização. O teste foi desenvolvido segundo protocolo de Newman (2003), com adaptações. Segundo o *Manual of Standard*

Techniques da OIE (2000), a soroneutralização é o método ouro para a detecção de anticorpos neutralizantes anti-OPV, relacionados com proteção.

Inicialmente, os soros foram triados em duplicata na diluição de 1:40. Essa diluição foi realizada em meio MEM sem adição de SFB e adicionado de igual volume de MEM contendo entre 30 e 300 unidades formadoras de placa (UFP) de VACV-WR. Antes da diluição, as proteínas do sistema do complemento foram desnaturadas através da incubação do soro a 56°C por 30 minutos em banho-maria. Para o controle de vírus, fundamental para a revelação da técnica, o mesmo processo foi adotado exceto pelo soro diluído, o qual foi substituído por um soro negativo para a presença de anticorpos anti-OPV ou SFB. As soluções de soro e vírus foram homogeneizadas e incubadas por aproximadamente 16 horas a 37°C em atmosfera suplementada com 5% CO₂. Essas soluções foram então inoculadas em placas de seis poços com monocamadas de BSC-40 entre 90 e 100% de confluência para adsorção. Durante esse processo, a placa foi incubada a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ e homogeneizadas a cada quinze minutos durante uma hora. Após a adsorção, MEM com 2% de SFB foi adicionado a cada um dos poços um volume suficiente para que a placa permanecesse por 48 horas a 37°C e suplementada 5% de CO₂ sem que a monocamada desidratasse. Decorridas 48 horas de incubação, as placas foram fixadas com solução de formalina a 10% (formaldeído 37%) e coradas com solução de cristal violeta a 1%. As placas de lise viral foram visualizadas e contadas. A partir da média do número de placas de cada duplicata, foram consideradas positivas as amostras que apresentaram média de redução maior ou igual a 50%, comparadas àquelas encontradas no controle de vírus.

Para a titulação, as amostras de soros positivas foram diluídas seriadamente na razão de dois iniciando-se pela diluição de 1:40 até a diluição de 1:5120 e a execução do teste ocorreu conforme mencionado anteriormente. Para calcular o título de anticorpos neutralizantes por mL (unidades neutralizantes por mL – UN/mL), foi dividido 1mL do volume da solução vírus/soro

pelo volume inoculado na monocamada celular e multiplicado esse valor pela última diluição onde foi encontrada redução maior ou igual a 50% do número de placas de lise em relação ao controle de vírus.

CAPÍTULO I

Circulação de VACV em população urbana

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Caracterização Populacional

Foram incluídos no estudo sessenta e um participantes. A caracterização demográfica populacional é demonstrada na *Tabela 3*. Participaram do estudo, quarenta e cinco mulheres (73,8%) e dezesseis homens (26,2%). A maioria da população corresponde a jovens adultos, possuindo até 37 anos de idade (52,5%). Os indivíduos que possuem idade igual ou superior a 38 anos (vinte e nove participantes) foram considerados vacinados segundo *o cut off* idade (47,5%). No entanto, apenas treze indivíduos (21,3%) possuem a marca vacinal característica da vacinação antivariólica.

Aqui, observa-se viés de seleção, uma vez que o maior público corresponde ao sexo feminino, isso pode ser justificado pela abordagem aplicada para coleta. Uma vez que foram visitados domicílios de forma aleatória durante o período diurno, justamente o momento em que os homens estão em seus respectivos locais de trabalho. No Brasil, a vacinação antivariólica ocorreu até 1978, portanto assume-se que indivíduos que possuem idade ≥ 38 anos foram vacinados, segundo recomendação da Organização Mundial de Saúde (OMS). Foi realizada uma inspeção visual no braço esquerdo desses indivíduos para verificação da presença da marca vacinal (*take*), sendo observado que, apenas metade dos participantes considerados vacinados possui a marca vacinal e, portanto, foram comprovadamente vacinados (*Fenner, 1988*).

Tabela 3 - Caracterização demográfica da população urbana amostrada no Serro-MG

CARACTERÍSTICA	FREQUÊNCIA	(%)
Gênero		
Feminino	45	73,8
Masculino	16	26,2
Idade (anos)		
≤ 18	8	13,1
19 a 37	24	39,4
≥38	29	47,5
Vacinado (Cut off idade)		
Sim	29	47,5
Não	32	52,5
Presença da Marca Vacinal		
Sim	13	21,3
Não	48	78,7
Cor/Etnia		
Branco	17	27,9
Preto	2	3,3
Pardo	41	67,2
Indígena	1	1,6
Zona		
Urbana	51	83,6
Rural	3	4,9
Urbana/Rural	7	11,5
Renda Familiar Mensal		
≤ 1 salário	18	29,5
Entre 1-2 salários	12	19,7
Entre 2-3 salários	8	13,1
Entre 3-4 salários	6	9,8
≥ 4 salários	17	27,9
Total	61	100

A maioria da população se classifica como parda (n=41, 67,2%), seguido de branco (n=17, 27,9%), preto (n=2, 3,3%) e indígena (n=1, 1,6%). Cinquenta e um indivíduos (83,6%) residem na área urbana do Serro, enquanto que três (4,9%) residem na área rural e sete (11,5%) transitam entre as duas regiões. Em relação à renda familiar mensal, os indivíduos estão bem distribuídos categoricamente, sendo que 29,5% recebem até 1 salário mínimo, enquanto que 27,9% recebem acima de 4 salários.

6.2. Conhecimento da população urbana sobre Vaccínia Bovina

Quando questionados sobre a doença Vaccínia Bovina, vinte e quatro participantes (39,3%) afirmaram já ter ouvido falar sobre a doença (*Tabela 4*). Dentre as fontes de informação sobre a doença, foram apontadas: a existência de surtos (n=3, 12,5%), meios de comunicação (n=7, 29,1%), fazendeiros (n=4, 16,7%), técnicos do Instituto Mineiro de Agropecuária (n=1, 4,2%) e outras fontes de comunicação que inclui outros profissionais como professores e profissionais da saúde (n=9, 37,5%).

Tabela 4 – Conhecimento da população urbana sobre a Vaccínia Bovina

FONTE DE CONHECIMENTO SOBRE VB	N	(%)
Surto	3	12,5
Fazendeiros	4	16,7
Técnicos do IMA	1	4,2
Meios de comunicação	7	29,1
Outros	9	37,5
Total	24	100,0

Esses dados revelam que 60,7% dos participantes desconhecem a doença, apesar de viverem em uma região endêmica. Surtos de VB vêm sendo descritos pelo nosso grupo, no Serro, desde 2005 (*Trindade et al., 2009; Assis et al., 2012; Costa, et al., 2015;2016*). A doença é uma zoonose, sendo os surtos identificados na área rural, acometendo bovinos e ordenhadores (*Trindade et al., 2003; Lobato et al., 2005; Kroon et al., 2011*) . No entanto, o VACV vem sendo detectado em outros hospedeiros, como animais domésticos e silvestres, inclusive no ambiente urbano (*Abrahão et al., 2009^a; Peres et al., 2013;Barbosa et al., 2014; Dutra et al., 2016; Costa, GB aceito para publicação no Emerging Infectious Diseases 2017*). Além disso, pode haver transmissão do vírus a partir de contato pessoa-pessoa ou por fômites (*Assis et al.,*

2013; Pereira-oliveira et al., 2014). Nesse sentido, acredita-se que o conhecimento da população acerca da VB é fundamental para garantir a prevenção da doença nessa população.

6.3. Análise dos Fatores de Exposição à *Orthopoxvirus* (OPV)

Foram avaliadas as características comportamentais dos participantes da pesquisa, que poderiam atuar como fatores de exposição aos *Orthopoxvirus* (OPV). Esses fatores são apresentados na Tabela 5. Quarenta e oito participantes (78,7%) possuem contato com animais domésticos, sendo que sete (11,5%) relataram a presença de lesões em seus pets. Dezesete indivíduos (27,9%) têm ou tiveram contato com animais silvestres. Quarenta e duas pessoas (68,9%) afirmaram que existem roedores junto a seus domicílios, sendo a maioria destes presentes no ambiente interno das propriedades.

Tabela 5 – Fatores de exposição ao VACV – Contato com animais

CARACTERÍSTICA	FREQUÊNCIA	(%)
Contato com Animais Domésticos		
Sim	48	78,7
Não	13	21,3
Animais com Lesões		
Sim	7	11,5
Não	54	88,5
Contato com Animais Silvestres		
Sim	17	27,9
Não	44	72,1
Presença de Roedores		
Sim	42	68,9
Não	19	31,1
Localização dos Roedores no Domicílio		
Interior	36	59,0
Exterior	6	9,8
Inexistência de Roedores	19	31,1
Total	61	100

Apesar do principal fator de exposição ao VACV no Brasil ser o contato com bovinos infectados, a circulação do vírus foi detectada em roedores do gênero *Oryzomys sp.*, *Cerradomys sp.*, *Trinomys sp.*, *Calomys sp.*, *Necromys sp.* e *Akodon sp.*; e das espécies *Mus musculus*, *Nectomys squamipes* e *Rattus rattus*. Esses roedores são amplamente distribuídos no Brasil, possuem hábitos peridomiciliares e podem atuar como disseminadores de zoonoses (Fonseca et al., 1998; Abrahão et al., 2009a; Miranda, JB dados não publicados). Aproximadamente 69% dos participantes têm contatos com roedores em suas residências, diante de tudo que foi abordado, esse contato pode indicar uma fonte de exposição ao VACV.

Além dos roedores, foi constatada a circulação de VACV em outros animais silvestres, como marsupiais das espécies *Didelphis albiventris* e *Didelphis aurita*, quatis, capivaras e primatas (Abrahão et al., 2010a; Peres et al., 2013; Barbosa et al., 2014; Dutra et al., 2016; Costa, GB dados não publicados). Da mesma forma, o contato com animais silvestres pode indicar exposição ao vírus.

É importante destacar o dado relacionado ao contato da população avaliada com animais domésticos. No Brasil, estudos relatam a exposição de animais domésticos dentre eles caninos, felinos e suínos ao VACV, esses animais foram amostrados em propriedades rurais com e sem histórico de surtos de VB, no entanto, não há relatos de desenvolvimento de lesões causadas por VACV nesses animais (Peres et al., 2013; 2016;). Além disso, outro estudo conduzido pelo nosso grupo detectou a circulação de VACV em caninos e felinos no contexto urbano, fora de áreas endêmicas (Costa, GB aceito para publicação no *Emerging Infectious Diseases* 2017; Costa, GB dados não publicados). Já é sabido que os felinos possuem um papel fundamental na transmissão de CPXV para humanos (Wolfs, 2002; Coras et al., 2005; Vogel et al, 2012). No entanto, o papel desses animais no ciclo epidemiológico da VB ainda é desconhecido, ademais, deve-se considerar a hipótese desses animais atuarem como amplificadores e disseminadores do vírus.

Em relação ao consumo e manipulação de leite e seus derivados, cinquenta e cinco integrantes da pesquisa (90,2%) realizam o consumo de leite (*Tabela 6*). Em relação à inserção de leite cru em suas dietas, doze pessoas (19,7%) a fazem. Enquanto que, trinta e seis (59%) consomem o queijo artesanal produzido a partir de leite cru. Em relação à manipulação de leite cru, dezessete indivíduos (27,9%) a fazem. Sendo que, destes, catorze pessoas (82,3%) comercializam o produto gerado.

Tabela 6 – Fatores de exposição ao VACV – Consumo e Manipulação de leite e derivados

CARACTERÍSTICA	FREQUÊNCIA	(%)
Consumo de Leite		
Sim	55	90,2
Não	6	9,8
Origem do Leite		
Próprio	12	19,7
Outra fazenda do município	16	26,2
Industrial	27	44,3
Não consome	6	9,8
Consumo de Leite Cru		
Sim	12	19,7
Não	49	80,3
Manipulação de Leite cru		
Sim	17	27,9
Não	44	72,1
Consumo de Queijo Artesanal		
Sim	36	59,0
Não	25	41,0
Total	61	100,0

A VB é uma zoonose que afeta principalmente o gado leiteiro e os ordenadores, portanto frequentemente questiona-se o papel do leite na transmissão da doença, particularmente o leite cru e seus derivados. A literatura relata o isolamento de VACV a partir de amostras de leite durante surtos de VB em Minas Gerais (Abrahão et al., 2009). No entanto, não houve a notificação de pacientes apresentando lesões orais durante a ocorrência desses surtos. Sabe-se também, que as partículas virais permanecem viáveis no leite cru e no queijo, após contaminação experimental, depois de submetidas a tratamento térmico com altas e baixas

temperaturas. Além disso, o vírus foi detectado em queijo artesanal em propriedades afetadas e não afetadas por surtos de VB, indicando que indivíduos podem estar sendo expostos ao VACV devido à manipulação e consumo desses alimentos (*Abrahão et al., 2009; Oliveira et al., 2010; Rehfeld, IS dados não publicados*).

Um estudo experimental foi conduzido com o objetivo de avaliar a transmissão do VACV a partir do consumo de leite contaminado, foi observado que por essa via de transmissão o vírus é amplamente disseminado no organismo do hospedeiro, sendo possível a detecção do genoma viral nas fezes e mucosa oral, no entanto não há o desenvolvimento de sinais clínicos. O impacto dessa via de transmissão em humanos ainda não foi avaliado (*Rehdeld et al., 2015*).

Em relação á pratica de ordenha manual, dez participantes (16,4%) realizam ordenha manual de bovinos (*Tabela 7*). Destes, 50% distribuem o leite retirado, comercializando-o na região. Sobre as práticas de higiene durante a ordenha, quatro pessoas (40%) realizam desinfecção dos tetos e cinco (50%) fazem a desinfecção das mãos.

Tabela 7 – Fatores de exposição ao VACV – Ordenha

CARACTERÍSTICA	FREQUÊNCIA	(%)
Realização da ordenha manual		
Sim	10/61	16,4
Não	51/61	83,6
Desinfecção dos tetos		
Sim	4/10	40,0
Não	6/10	60,0
Desinfecção das mãos		
Sim	5/10	50,0
Não	5/10	50,0
Distribuição do leite		
Sim	5/10	50,0
Não	5/10	50,0

Sabe-se que a prática da ordenha é um fator importante associado aos surtos de VB. Em um estudo realizado na Zona da Mata Mineira, em 92% das propriedades afetadas pela VB,

realizava-se a ordenha manual. Sendo que, a taxa de ataque em vacas submetidas a esse tipo de ordenha foi de 80-100% enquanto que, nas de ordenha mecânica era entre 25-30%. Nesse sentido, a desinfecção dos tetos dos animais e das mãos dos ordenadores é fundamental para a diminuição dessas taxas (Lobato *et al.*, 2005).

Além disso, a principal forma de transmissão do vírus para humanos é decorrente do contato desses indivíduos com bovinos infectados (Leite *et al.*, 2005; Trindade *et al.*, 2009; Schatzmayr *et al.*, 2009).

Sobre a distribuição do leite produzido, deve-se considerar que, se o leite estiver contaminado com VACV, como descrito por Abrahão e colaboradores (2009), a distribuição do produto, pode favorecer a exposição de outros indivíduos. No entanto, até o momento não foram descritos casos de infecções causadas por esse tipo de exposição. Portanto, o real impacto desse fator de exposição ainda é desconhecido.

6.4. Avaliação sorológica

Entre os 61 participantes, 20 apresentaram anticorpos IgG, que representa uma prevalência global de 32,8% (Tabela 8). A prevalência de anticorpos IgG entre os indivíduos classificadas como vacinados, de acordo com *cut off* idade foi de 69%, enquanto que, não foi detectado anticorpo IgG em nenhum indivíduo não vacinado, segundo esse critério. A prevalência de IgG em indivíduos com a marca vacinal foi de 69,2% e entre os não vacinados foi de 22,9%.

O fator de risco significativamente associado à presença de anticorpos IgG foi à marca vacinal (OR = 7,56; IC95% = 1,94 - 29,38), (p <0,001). De fato, um estudo que analisou a resposta imune contra OPVs em indivíduos vacinados, portadores da marca vacinal (*take*), revelou que há uma forte relação com a resposta imune detectável contra OPVs (Kennedy *et al.*, 2009). O consumo de queijo artesanal (OR = 2,85; IC95% = 0,87 - 9,32), (p 0,042) foi associado

significativamente, considerando-se o valor de P. Porém, o intervalo de confiança envolve o valor 1, indicador de não-associação. Portanto, essa não consiste em uma associação verdadeira nesse estudo. No entanto, abrem-se perspectivas quanto à melhor investigação desse fator de exposição. Um estudo anterior conduzido na área rural do Serro revelou a circulação do vírus em indivíduos não vacinados, que não praticavam ordenha ou mantinham contato com bovinos, no entanto, possuíam o hábito de consumir leite cru e queijo artesanal (*Costa et al., 2015*). De fato, sabe-se que a partícula viral não é inativada durante o processamento e produção de queijo artesanal (*de Oliveira et al., 2010*), o que faz do consumo desse produto, um possível fator de exposição ao VACV. Além disso, o vírus foi detectado em queijos artesanais produzidos em propriedades com e sem relato prévio de surtos no estado de Minas Gerais (*Rehfeld, I.S. dados não publicados*).

Tabela 8 – Variáveis demográficas e fatores de exposição associadas à presença de IgG

VARIÁVEIS	N (%)	ELISA IgG POSITIVO (%)	VALOR DE P	ODDS RATIO (CI 95%)
Gênero				
Feminino	45 (73,8)	13 (28,9)	0,149	
Masculino	16 (26,2)	7 (43,7)		
Idade (anos)				
< 38 anos	32 (52,5)	0 (0,0)	<0,001	<0,001-0,058
≥38 anos	29 (47,5)	20 (69,0)		
Marca vacinal				
Sim	13 (21,3)	9 (69,2)	<0,001	7,56 (1,94 – 29,38)
Não	48 (78,7)	11 (22,9)		
Contato com animais domésticos				
Sim	48 (78,7)	12 (25,0)	0,010	0,208 (0,057-0,760)
Não		8 (61,5)		
Animais com lesão				
Sim	7 (11,5)	3 (42,9)	0,283	
Não	54 (88,5)	17 (31,5)		
Contato com animais silvestres				
Sim	17 (27,9)	7 (41,2)	0,202	
Não	44 (72,1)	13 (29,5)		
Presença de roedores				
Sim	42 (68,9)	14 (32,6)	0,472	
Não	19 (31,1)	6 (32,3)		
Consumo de leite				
Sim	55 (90,2)	16 (29,1)	0,047	0,205 (0,034-1,23)
Não	6 (9,8)	4 (66,7)		
Consumo de leite cru				
Sim	12 (19,7)	3 (25,0)	0,277	
Não	49 (80,3)	17 (34,7)		
Manipulação de leite cru				
Sim	17 (27,9)	8 (47,0)	0,080	
Não	44 (72,1)	12 (27,3)		
Consumo de queijo artesanal				
Sim	36 (59,0)	15 (41,7)	0,042	2,857 (0,87-9,32)
Não	25 (41,0)	5 (20,0)		
Realização de ordenha				
Sim	10 (16,4)	4 (40,0)	0,303	
Não	51 (83,6)	16 (31,4)		
Total	61 (100.0)	20 (32,8)		

Alguns fatores foram significativamente associados como fatores de proteção em relação ao desfecho, apresentando intervalo de confiança <1 , dentre eles: a idade ($OR = <0,001$; $IC95\% = <0,001 - 0,058$), ($p <0,001$), onde se constatou que, indivíduos jovens, com idade < 38 anos, não apresentavam anticorpos IgG, que seria o desfecho resultante da exposição ao VACV. A vacinação antivariólica foi realizada no Brasil até 1978, com isso, assume-se que os indivíduos maiores de 38 anos foram vacinados (*Fenner et al., 1988*). De fato, os 20 participantes que apresentaram anticorpos IgG, são vacinados segundo o *cut off* idade.

O contato com animais domésticos ($OR = 0,20$; $IC95\% = 0,05 - 0,76$) e ($p 0,010$) também se comportou como um fator de proteção à presença de IgG, na análise univariada. Sendo que, 12 indivíduos soropositivos se enquadram no grupo que tem contato com esses animais ($n=48$) e oito soropositivos fazem parte do grupo que não tem contato com animais domésticos ($n=13$). Os principais animais citados foram cães ($n=41$, 85,4%) e gatos ($n=18$, 37,5%). No entanto, esses dados divergem de outro dado obtido pelo nosso grupo, no qual, a presença de cães domésticos foi associada com maior circulação de VACV (*Borges, I.A. dados não publicados*). Em relação aos gatos, esse dado pode indicar indiretamente a menor circulação de roedores, que são relacionados à circulação do VACV no Brasil (*Abrahão et al., 2009; Miranda, J.B. dados não publicados; Borges, I.A. dados não publicados*).

Por fim, o consumo de leite ($OR = 0,20$; $IC95\% = 0,034 - 1,23$), ($p 0,047$) foi um fator de proteção estatisticamente significativo, considerando o valor de p . Sendo observado que, dentre os 55 participantes que consomem leite, apenas 16 apresentam anticorpos neutralizantes. No entanto, vale ressaltar que, dentre aqueles que consomem leite, 29 pessoas (52,7%) consomem exclusivamente leite industrializado, prática que, de fato, poderia atuar como fator de proteção. E, dentre os 6 participantes que não consomem leite, 4 possuem anticorpos. Sendo que, 100% desses indivíduos que não consomem leite, fazem o consumo de derivados, incluindo o queijo artesanal. Sabe-se que o VACV já foi detectado em amostras de leite durante surtos de VB

(Abrahão *et al.*, 2009), além disso, recentemente foi demonstrado que, o bovino infectado elimina vírus no leite do 1º ao 81º d.p.i.. (de Oliveira *et al.*, 2015) e, ademais, o VACV não é inativado durante a produção de queijos artesanais (de Oliveira *et al.*, 2010). Portanto, deve ser considerada a hipótese do consumo de derivados, ser o real fator de exposição, considerando esses indivíduos. No entanto, mais uma vez, o intervalo de confiança do fator de exposição “consumo de leite”, envolve o valor 1 e portanto, não consiste em uma associação verdadeira nesse estudo.

A pesquisa de anticorpos neutralizantes resultou em 34 indivíduos soropositivos (55,7%), com títulos de anticorpos neutralizantes correspondentes a 100 unidades neutralizantes / ml (Tabela 9 e gráfico 1). A prevalência entre os classificados como indivíduos vacinados, considerando a idade ≥ 38 anos, foi 65,6%, enquanto que em indivíduos com idade < 38 anos, foi de 44,8%. Considerando a presença da marca vacinal (*take*) para identificação do grupo vacinado, as taxas de prevalência entre os vacinados foram de 46,1% e entre os não vacinados de 58,3%.

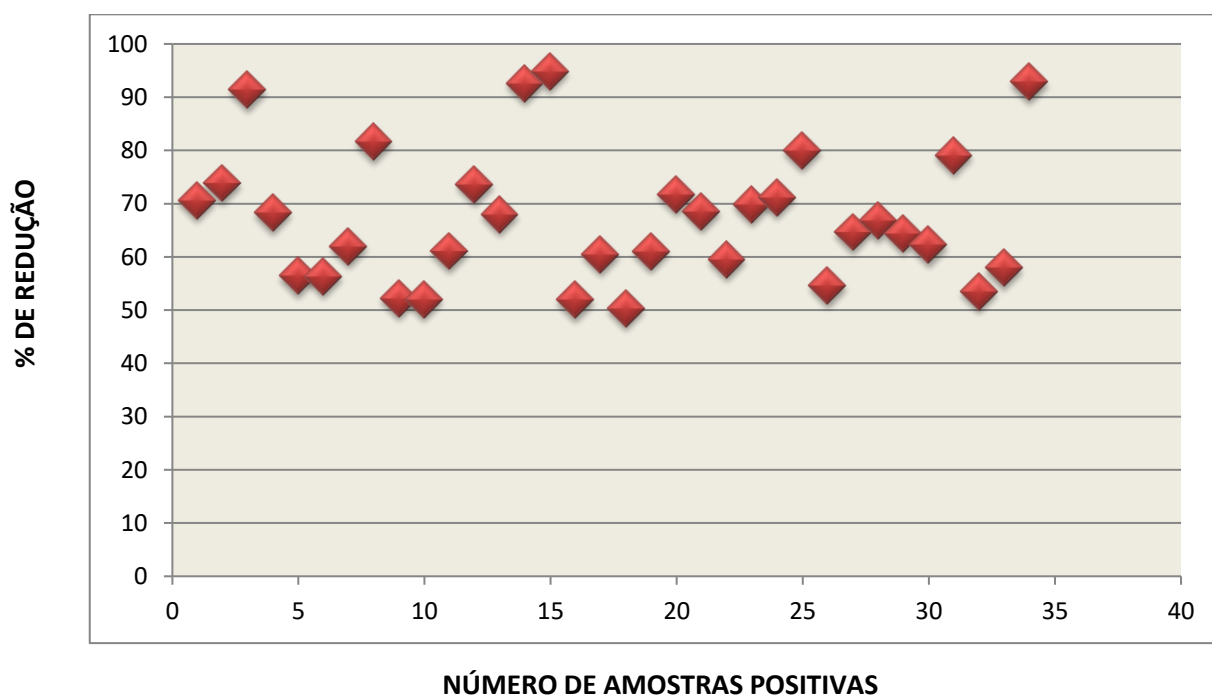


Gráfico 1: Amostras positivas para a presença de anticorpos neutralizantes anti-OPV na população urbana do Serro-MG: O gráfico mostra as 34 amostras positivas na PRNT e seus respectivos percentuais de redução no número de placas de lise.

Tabela 9 – Variáveis demográficas e fatores de exposição associadas à presença de anticorpos neutralizantes

VARIÁVEIS	N (%)	PRNT POSITIVO (%)	VALOR DE P	ODDS RATIO (CI 95%)
Gênero				
Feminino	45 (73,8)	25 (55,6)	0,483	
Masculino	16 (26,2)	9 (56,2)		
Idade (anos)				
< 38 anos	32 (52,5)	21 (65,6)	0,056	
≥38 anos	29 (47,5)	13 (44,8)		
Marca vacinal				
Sim	13 (21,3)	6 (46,1)	0,227	
Não	48 (78,7)	28 (58,3)		
Contato com animais domésticos				
Sim	48 (78,7)	27 (56,2)	0,439	
Não	13 (21,3)	7 (53,8)		
Animais com lesão				
Sim	7 (11,5)	3 (42,9)	0,249	
Não	54 (88,5)	31 (57,4)		
Contato com animais silvestres				
Sim	17 (27,9)	10 (58,8)	0,387	
Não	44 (72,1)	24 (54,5)		
Presença de roedores				
Sim	42 (68,9)	25 (58,1)	0,286	
Não	19 (31,1)	9 (50,0)		
Consumo de leite				
Sim	55 (90,2)	32 (58,2)	0,143	
Não	6 (9,8)	2 (33,3)		
Consumo de leite cru				
Sim	12 (19,7)	7 (58,3)	0,426	
Não	49 (80,3)	27 (55,1)		
Manipulação de leite cru				
Sim	17 (27,9)	12 (70,6)	0,080	
Não	44 (72,1)	22 (50,0)		
Consumo de queijo artesanal				
Sim	36 (59,0)	21 (58,3)	0,317	
Não	25 (41,0)	13 (52,0)		
Realização de ordenha				
Sim	10 (16,4)	5 (50,0)	0,351	
Não	51 (83,6)	29 (56,8)		
Total	61 (100,0)	34 (55,7)		

A análise estatística não revelou nenhum fator de exposição associado à presença de anticorpos neutralizantes. Um estudo de soroprevalência realizado na região rural do município do Serro

avaliou 240 indivíduos, revelando uma prevalência de 30,8%. Dentre as características demográficas associadas significativamente, foi identificada, a idade > 35 anos, o analfabetismo e a ocupação de trabalhadores rurais. Em relação aos fatores de risco associados à presença de anticorpos neutralizantes, aponta-se o contato com bovinos ou equídeos, ordenha, participação na produção de queijo, presença da marca vacinal (*take*) e histórico de surto na propriedade (Costa et al., 2016).

A prevalência de anticorpos neutralizantes encontrada na população urbana é maior do que a da população rural. Esse é um resultado inesperado, uma vez que a doença causada pelo VACV é uma doença rural e frequentemente são documentados surtos em propriedades rurais, principalmente na área do Serro. No entanto, o tamanho amostral utilizado no estudo foi menor do que o utilizado por Costa e colaboradores (2016), com o aumento da amostra, o número de indivíduos positivos seria redistribuído, o que poderia alterar a soroprevalência encontrada.

Vale a pena destacar que, indivíduos jovens, portanto não vacinados, apresentaram anticorpos neutralizantes (n=21, 65,6%), assim como, indivíduos que não possuem a marca vacinal (n=28, 58,3%). Esses dados indicam que tais indivíduos foram expostos ao VACV de alguma forma, que não a vacinação. Além disso, grande parte dos indivíduos soropositivos não realiza ordenha (n=29, 56,8%), que caracteriza a forma clássica de transmissão do VACV no Brasil e é um fator de exposição apontado como fator de risco para a soroprevalência na área rural do município.

Logo, esses dados são indicativos de que, esses indivíduos estão sendo expostos ao VACV de alguma forma alternativa, apontando a existência de rotas alternativas de transmissão do VACV, fazendo-se necessária a investigação dessas possíveis rotas, que não puderam ser esclarecidas nesse estudo.

CAPÍTULO II

**Avaliação do conhecimento de profissionais de saúde
e status imune em região endêmica para VACV**

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1. Caracterização Populacional

Um total de 51 indivíduos (49,5% dos profissionais de saúde do Serro) participou do estudo. Esses indivíduos foram amostrados em cinco postos de saúde, no hospital municipal, na policlínica e na vigilância epidemiológica (*Figura 14*).



Figura 14: Distribuição dos profissionais de saúde amostrados e seus respectivos locais de trabalho. Fonte: de OLIVEIRA, J.S. dados não publicados.

Houve a predominância do sexo feminino, que representa 92,1% dos participantes (*Tabela 10*). Um estudo que traça o perfil da enfermagem no Brasil avaliou cerca de 1,6 milhão de trabalhadores entre enfermeiros, técnicos e auxiliares de enfermagem, revelando que a equipe de enfermagem é composta por 84,6% de mulheres (Fundação Osvaldo Cruz – Fiocruz & Conselho Federal de Enfermagem – COFEN). Em alguns países, a proporção de mulheres ocupando cargos relacionados à enfermagem é superior a 90% (Organização Mundial de Saúde – OMS).

Em relação à etnia, 64,7% se autodeclararam pardos, enquanto que 21,6% dos indivíduos são pretos e 13,7% são brancos. Dezesete participantes (33,3%) possuem renda familiar mensal de até um salário mínimo e apenas cinco (9,8%) possuem renda maior que quatro salários. No Brasil, 27 mil profissionais da equipe de enfermagem (1,8%) recebem menos de um salário mínimo mensalmente (FIOCRUZ & COFEN).

Quando avaliado o nível de escolaridade dos participantes, trinta e dois indivíduos (62,8%) possuem a educação básica, quinze (29,4%) têm educação superior e quatro (7,8%) possuem pós-graduação. A grande maioria dos integrantes da pesquisa (n=42, 82,4%) reside na área urbana do Serro, cinco (9,8%) residem na área rural e alguns indivíduos (n=4, 7,8%) relataram que residem nas duas áreas.

A idade média foi 36 anos (variando entre 19 a 60 anos), sendo que 37,3% dos indivíduos possuem ≥ 38 anos, portanto caracterizam-se como vacinados segundo o *cut-off* idade. Nove participantes (17,6%) apresentam a marca vacinal característica da vacinação antivaricelica no braço esquerdo.

Tabela 10 - Caracterização demográfica dos profissionais de saúde amostrados no Serro

CARACTERÍSTICA	FREQUÊNCIA	(%)
Gênero		
Feminino	48	94,1
Masculino	3	5,9
Idade (anos)		
< 38 anos	32	62,7
≥38 anos	19	37,3
Cor/etnia		
Branco	7	13,7
Preto	11	21,6
Pardo	33	64,7
Zona		
Urbana	42	82,4
Rural	5	9,8
Urbana/Rural	4	7,8
Renda Familiar Mensal		
Até 1 salário	17	33,3
Até 2 salários	16	31,4
Entre 2-3 salários	9	17,6
Entre 3-4 salários	4	7,8
Acima de 4 salários	5	9,8
Nível de Escolaridade		
Educação básica	32	62,8
Educação superior	15	29,4
Pós graduação	4	7,8
Atuação Profissional		
Enfermeiro	8	15,7
Técnico de enfermagem	17	33,3
Auxiliar de enfermagem	2	3,9
Agente Comunitário de Saúde	18	35,3
Dentista	1	1,9
Atendente de farmácia	1	1,9
Secretário de laboratório	1	1,9
Auxiliar de serviços gerais	3	5,9
Tempo de trabalho		
≤ 10 anos	37	72,5
> 10 anos	14	27,5
TOTAL	51	100,0

Profissionais de enfermagem representam 53% dos indivíduos. Esse grupo inclui enfermeiros (n=8, 15,7%), técnicos de enfermagem (n=17, 33,3%) e auxiliar de enfermagem (n=2, 3,9%). Dezoito participantes são agentes comunitários de saúde (ACS) representando 35,4%. Outros profissionais da saúde (11,6%) compreendem dentistas (n=1) e prestadores de serviço que atuam em unidades de saúde como atendente de farmácia (n=1), secretário de laboratório (n=1) e auxiliar de serviços gerais (n=3). Trinta e sete participantes (72,5%) atuam na área da saúde por tempo ≤ 10 anos e catorze (27,5%) por > 10 anos.

7.2. Conhecimento sobre Vaccinia Bovina

Vinte e nove (56,9%) participantes já ouviram sobre VB (*Tabela 11*). Quanto à ocupação, esses indivíduos enquadram-se como enfermeiros (n=6, 20,7%), técnicos de enfermagem (n=10, 34,6%), agentes comunitários de saúde (n=11, 37,9%), dentista (n=1, 3,4%) e auxiliar de serviços gerais (n=1, 3,4%). Observa-se que, os técnicos de enfermagem e ACS que mantêm um contato mais direto com o paciente, muitas vezes fora do ambiente hospitalar, correspondem à grande maioria que apresenta um conhecimento prévio sobre a doença.

Quando questionados sobre a fonte de informação sobre a doença, quatro indivíduos (7,8%) conheceram a partir da existência de surtos, sete (13,7%) por meio de fazendeiros da região, seis (11,8%) devido ao contato com outros profissionais, dez (19,6%) através de meios de comunicação e dois (3,9%) ignoraram a resposta.

Tabela 11 – Conhecimento sobre a Vaccinia Bovina

FONTE DE CONHECIMENTO SOBRE VB	N	(%)
Surto	4	7,8
Fazendeiros	7	13,7
Outros profissionais	6	11,8
Meios de comunicação	10	19,6
Não conhece	22	43,1
Ignorado	2	3,9
Total	51	100,0

Sobre a ocorrência de surtos da VB no município em que trabalham, onze indivíduos (21,6%) revelaram a existência dos mesmos, enquanto que trinta e três (64,1%) afirmaram nunca haver ocorrido e sete (13,7%) não souberam responder. Esses dados refletem a falta de comunicação sobre VB entre os profissionais de saúde que trabalham no Serro. Surtos de VB vêm sendo descritos no Serro desde 2005 (*Trindade et al., 2009; Assis et al., 2012; Costa et al., 2015; 2016*) e o município é caracterizado como uma região endêmica, no entanto os dados obtidos nesse estudo revelam que um alto número de profissionais da saúde que trabalham no município ainda desconhecem a doença.

Quarenta e seis (90,2%) indivíduos não conhecem o agente etiológico da VB (*Tabela 12*). Trinta e seis (70,6%) pessoas disseram que a VB não acomete apenas humanos. No entanto, esta resposta pode ter sido induzida, uma vez que o nome da doença é sugestivo e indica que bovinos estejam envolvidos. Em relação a outros possíveis hospedeiros (*Tabela 13*), trinta e quatro (94,4%) apontaram bovinos, sete (19,4%) citaram equídeos, dez (27,8%) mencionaram roedores, dois (5,6%) citaram gatos e um (2,8%) apontou cães. Mais uma vez, a menção a bovinos pode ter provocada pelo nome da doença que indica o envolvimento de bovinos.

Tabela 12 – Conhecimento geral dos profissionais de saúde sobre Vaccínia Bovina (VB) causada por *Vaccinia vírus* (VACV)

CONHECIMENTO SOBRE VACCÍNIA BOVINA	RESPOSTA POSITIVA N (%)	RESPOSTA NEGATIVA N (%)
Já ouviu sobre VB	29 (56,9)	22 (43,1)
VB é causada por VACV	5 (9,8)	46 (90,2)
VACV infecta outros hospedeiros ^A	36 (70,6)	15 (29,4)
Sinais clínicos e sintomas de VB	29 (56,9)	22 (43,1)
Formas de transmissão de VB	34 (66,7)	17 (33,3)
Diagnóstico laboratorial de VB	8 (15,7)	43 (84,3)
Medidas de prevenção de VB	27 (52,9)	24 (47,1)
Tratamento aplicado para VB	16 (31,4)	35 (68,6)
Recebeu treinamento sobre VB	0 (0,0)	51 (100,0)
Foi ensinado durante formação	9 (17,6)	42 (82,4)

Tabela 13 – Outros hospedeiros de VACV

VARIÁVEL	SIM		NÃO	
	N	(%)	N	(%)
Hospedeiros de VACV				
Bovino	34/36	(94,4)	2/36	(5,6)
Equídeo	7/36	(19,4)	29/36	(80,5)
Roedor	10/36	(27,8)	26/36	(72,2)
Felino	2/36	(5,6)	34/36	(94,4)
Canídeo	1/36	(2,8)	35/36	(97,2)

De fato, é clara a associação entre VACV e bovinos. Desde 1999 o vírus passou a ser detectado causando doença, afetando principalmente bovinos e humanos. Inicialmente os surtos eram concentrados na região sudeste, havendo uma posterior ampliação da detecção para outros estados brasileiros e até mesmo outros países da América do Sul (*Trindade et al., 2003; Nagasse-Sugahara et al., 2004; Brum et al., 2010; Schatzmayr et al., 2011; Megid et al., 2012; Assis et al., 2013; Oliveira et al., 2013; Assis et al., 2015; Nakazawa et al., 2016; Franco-Luiz, et al., 2014;2016;*).

Além disso, o vírus já foi detectado em equídeos e roedores durante surtos de VB na área rural do Brasil (*Abrahão et al., 2009; Brum et al., 2010; Campos et al., 2011; Abrahão et al., 2016*). Foi proposto um modelo hipotético que indica que o roedor poderia atuar como carreador do vírus entre o ambiente silvestre e peridomiciliar rural (*Abrahão et al., 2009*).

Alguns indivíduos apontaram ligação entre VACV, cães e gatos. Realmente, anticorpos neutralizantes já haviam sido detectados em cães, em propriedades com e sem histórico de surtos (*Peres et al., 2013*). Recentemente, VACV foi detectado por meio de técnicas moleculares em cães durante um surto de VB, evidenciando a circulação de VACV nesses animais (*Peres et al., 2016*). Além disso, sabe-se que CPXV, um OPV de grande importância na medicina, circula em felinos e esses animais podem atuar como hospedeiros intermediários, facilitando a transmissão do vírus entre roedores, humanos e outros animais (*Coras et al., 2005; Schaudien et al., 2007; Möstl et al., 2013*). Recentemente, nosso grupo detectou a circulação de VACV, através de detecção sorológica e molecular, em gatos domésticos no ambiente urbano (*Costa, GB aceito para publicação no Emerging Infectious Diseases 2017*). No entanto, diante dos dados obtidos nesse trabalho, deve-se considerar a hipótese desses indivíduos terem mencionado esses animais devido à associação entre eles e outras doenças exantemáticas, como leishmaniose e micoses.

Em relação ao conhecimento sobre os sinais clínicos e sintomas da VB (*Tabela 14*), vinte e nove (56,9%) conhecem sintomas inespecíficos, sendo citados durante a pesquisa: febre (n=16, 55,2%), dor de cabeça (n=8, 27,6%), mialgia (n=8, 27,6%), náusea (n=2, 6,9%), icterícia (n=1, 3,4%), vômito (n=5, 17,2%), calafrios (n=1, 3,4%), lesões disseminadas (n=21, 72,4%) e linfadenopatia (n=1, 3,4%). O quadro clínico da VB é semelhante a outras infecções epiteliotrópicas, dentre elas leishmaniose, micoses e infecção por *Staphylococcus sp.*, fator que dificulta o diagnóstico clínico. Além disso, é relatado frequentemente o acompanhamento de infecções bacterianas secundárias, causadas por contaminantes de lesões cutâneas, o que pode mascarar o diagnóstico de VB (*da Silva et al., 2008; Silva-Fernandes et al., 2009; Trindade et al., 2009; Sant'ana et al., 2013*).

Tabela 14 – Sinais clínicos e sintomas da infecção por VACV

VARIÁVEL	SIM		NÃO	
	N	(%)	N	(%)
Sinais clínicos e sintomas da VB				
Febre	16/29	(55,2)	13/29	(44,8)
Cefaléia	8/29	(27,6)	21/29	(72,4)
Mialgia	8/29	(27,6)	21/29	(72,4)
Calafrio	1/29	(3,4)	28/29	(96,6)
Vômito	5/29	(17,2)	24/29	(82,8)
Linfadenopatia	1/29	(3,4)	28/29	(96,6)
Náuseas	2/29	(6,9)	27/29	(93,1)
Icterícia	1/29	(3,4)	28/29	(96,6)
Lesões disseminadas	21/29	(72,4)	8/29	(27,6)

Dezessete participantes (33,3%) disseram não conhecer a forma de transmissão da VB (*Tabela 15*). Dentre os fatores que contribuiriam para a transmissão do vírus, foram citados: contato

com bovinos (n=32, 94,1%), contato com equídeos (n= 3, 8,8%), contato com outros animais infectados (n=2, 5,9%), através de animais silvestres (n= 3, 8,8%), contato com humanos infectados (n= 8, 23,5%), consumo de leite cru (n= 3, 8,8%) e consumo de queijo cru (artesanal) (n= 2, 5,9%).

Tabela 15 – Formas de transmissão da Vaccínia Bovina

VARIÁVEL	SIM		NÃO	
	N	(%)	N	(%)
Transmissão da VB				
Contato com bovinos	32/34	(94,1)	2/34	(5,9)
Contato com equídeos	3/34	(8,8)	31/34	(91,2)
Contato com outros animais	2/34	(5,9)	32/34	(94,1)
Contato com animais silvestres	3/34	(8,8)	31/34	(91,2)
Contato com indivíduo infectado	8/34	(23,5)	26/34	(76,5)
Consumo de leite cru	3/34	(8,8)	31/34	(91,2)
Consumo de queijo cru (artesanal)	2/34	(5,9)	32/34	(94,1)

Realmente, a via clássica de transmissão da VB é através do contato direto entre o humano com o bovino infectado, sem uso de proteção. Esse contato é responsável pela transmissão do vírus para o homem e pode favorecer a disseminação do vírus entre o rebanho (*Trindade et al., 2003; Leite et al., 2005; Lobato et al., 2005; Simonetti et al., 2007; Trindade et al., 2007; Megid et al., 2008; Trindade et al., 2009; Schatzmayr et al., 2009; Abrahão et al., 2010; Fonseca et al., 2011; Kroon et al., 2011*). Uma vez que VACV já foi detectado em outros animais, como equídeos, animal doméstico e silvestre assume-se que o contato com esses animais, se infectados, pode permitir a transmissão do patógeno (*Abrahão et al., 2009; Brum et al., 2010; Campos et al., 2011; Peres et al., 2013; Abrahão et al., 2016; Peres et al., 2016; Costa, GB, dados não publicados*).

Além disso, pode ocorrer transmissão entre humanos, quer por contato direto ou por fômites. Nos Estados Unidos, onde é realizada a vacinação de militares, frequentemente são descritos casos de auto inoculação ou transmissão por contato íntimo (*Neff et al., 2002; Egan et al., 2004; Vora et al., 2008; Lederman et al., 2009; CDC, 2007a; 2007b; 2008; 2009; 2010; 2013*). No Brasil, já foi descrita a transmissão intrafamiliar durante surto de VB e o vírus já foi detectado em utensílios domésticos em uma propriedade afetada (*Assis et al., 2013; Pereira-Oliveira et al., 2014*).

Alguns indivíduos citaram a transmissão do VACV através do consumo de leite cru e queijo artesanal, porém, essa via de transmissão ainda não é bem estabelecida. O vírus já foi detectado a partir de amostras de leite durante um surto de VB (*Abrahão et al., 2009*) e de queijo artesanal em propriedades afetadas e não afetadas por surtos de VB (*Rehfeld, I.S. dados não publicados*). Foi realizado um estudo que avaliou a transmissão de VACV através da ingestão de leite contaminado, em modelo murino. Sendo observado que, através dessa via o vírus é transmitido eficientemente, no entanto não há desenvolvimento de sinais clínicos, mas o genoma viral pode ser detectado na mucosa oral e nas fezes dos animais (*Rehfeld, et al., 2015*). Nesse sentido, essa via de transmissão precisa ser mais bem investigada, para esclarecer se, de fato, humanos estão sendo expostos ao vírus ao consumir esses alimentos e qual o desfecho clínico associado.

Sobre o diagnóstico realizado, quarenta e três pessoas (84,3%) não sabem qual o diagnóstico laboratorial e oito (15,7%) citaram o diagnóstico sorológico. Quarenta e oito pessoas (94,1%) não sabem se a unidade de saúde onde trabalham tem acesso ao diagnóstico de VB. Alguns indivíduos (5,9%) indicaram que as amostras de pacientes suspeitos de VB são encaminhadas para o laboratório de referência estadual (Fundação Ezequiel Dias - Funed). De fato, amostras suspeitas de VB em Minas Gerais são encaminhadas à FUNED e a Fundação Osvaldo Cruz (Fiocruz) e o diagnóstico é realizado em parceria com o Laboratório de Vírus da Universidade Federal de Minas Gerais, sendo submetidas à abordagem molecular, sorológica e técnicas de

virologia básica como isolamento viral (*Lobato et al., 2005; Drumond et al., 2008; Trindade et al., 2008; Abrahão et al., 2010*).

Em relação aos espécimes clínicos coletados para o diagnóstico da VB (*Tabela 16*), trinta e oito (74,5%) participantes afirmaram conhecer, sendo citados: sangue (n= 38, 100,0%), swab de lesão (n=7, 18,4%), crosta (n=2, 5,3%) e swab de orofaringe (n=3, 7,9%). Como relatado pela maioria dos participantes da pesquisa, o sangue é um dos espécimes clínicos coletados para diagnóstico, sendo possível através dele a realização de técnicas sorológicas e moleculares. Além disso, durante a manifestação das lesões, podem ser coletados swab de lesão e crosta, material rico em partículas virais e ideais para abordagem molecular e tentativa de isolamento viral (*Nitsche et al., 2007*). Swabs da orofaringe são frequentemente coletados em estudos que avaliam a eliminação viral via oral em militares vacinados nos EUA, mas, apesar de ter sido citado por alguns profissionais de saúde, esse não é um espécime clínico coletado para diagnóstico no Brasil (*Donaldson et al., 2004; Klote et al., 2005; Cohen et al., 2007; Talbot et al., 2007*).

Tabela 16 – Espécimes clínicos coletados para diagnóstico da Vaccinia Bovina

VARIÁVEL	SIM		NÃO	
	N	(%)	N	(%)
Espécime clínico				
Sangue	38/38	(100,0)	0/38	(0,0)
Crosta	2/38	(5,3)	36/38	(94,7)
Swab de lesão	7/38	(18,4)	31/38	(81,6)
Swab de orofaringe	3/38	(7,9)	35/38	(92,1)

Trinta e cinco (68,6%) indivíduos desconhecem o tratamento aplicado a BV, seis (11,8%) disseram que é indicado o tratamento paliativo, oito (15,7%) apontaram o tratamento para

infecções secundárias e dois (3,9%) disseram que deve haver a combinação dessas duas formas de tratamento. De fato, o tratamento paliativo é o recomendado para a VB, além disso, a antibioticoterapia em casos de infecção bacteriana secundária (*da Silva et al., 2008*). Para tratamento de pacientes que desenvolvem a forma mais grave da doença, é indicado o uso de imunoglobulinas, além disso, diversos agentes terapêuticos capazes de controlar a infecção por OPVs vêm sendo estudados nos Estados Unidos, dentre eles o Cidofovir e ST-246, no entanto, esses fármacos são indisponíveis no Brasil (*da Silva et al., 2008; Lenderman et al., 2009; Kroon et al., 2011*). Tem sido relatado que, em locais de surtos, o tratamento comumente recomendado inclui a utilização de corticosteroides, o que é geralmente associado com o agravamento da condição dos pacientes, devido à sua ação imunossupressora (*da Silva et al., 2008; Trindade et al., 2009; Kroon et al., 2011*).

Os fatores relacionados à prevenção da doença também foram avaliados no estudo (*Tabela 17*). Vinte e sete (52,9%) pessoas conhecem medidas de prevenção, dentre elas: isolamento do trabalhador doente (n=6, 22,2%), uso de equipamento de proteção (n=20, 74,0%), uso de desinfetante (n=6, 22,2%) e limpeza periódica do ambiente (n=14, 51,9%). No entanto, vinte e quatro (47,1%) não sabem sobre a prevenção, o que pode facilitar a disseminação do vírus no ambiente hospitalar. Sendo assim, deve-se atentar para a possibilidade de infecção nosocomial, uma vez que os profissionais de saúde desconhecem as formas de transmissão e prevenção da doença e, portanto, poderiam atuar como carreadores do vírus no ambiente de trabalho.

Tabela 17 – Medidas de prevenção da Vaccinia Bovina

VARIÁVEL	SIM		NÃO	
	N	(%)	N	(%)
Formas de prevenção				
Isolamento do indivíduo doente	6/27	(22,2)	21/27	(77,8)
Uso de equipamentos de proteção	20/27	(74,0)	7/27	(26,0)
Uso de desinfetantes	6/27	(22,2)	21/27	(77,8)
Limpeza periódica do ambiente	14/27	(51,9)	13/27	(48,1)

Nesse sentido, foram relatados, em todo o mundo, pelo menos doze casos de infecção nosocomial envolvendo VACV entre 1907 e 1975, sendo dois destes casos no Brasil (*Sepkowitz et al., 2002*). Além disso, o tráfego de pacientes infectados com Buffalopox resultou em infecção nosocomial envolvendo 19 pacientes, havendo disseminação viral em cinco unidades de saúde no Paquistão durante os anos de 2004-2005 (*Zafar et al., 2007*).

Ainda nesse contexto, destacam-se os indivíduos imunocomprometidos, mais propensos a complicações associadas a infecções e, portanto grupo de maior risco associado à infecção nosocomial (*Zafar et al., 2007; Vora et al., 2008; Trindade et al., 2009*).

Todos os indivíduos entrevistados afirmaram não terem recebido treinamento sobre a VB no trabalho e quarenta e dois (82,3%) disseram que não foram ensinados sobre a VB durante sua formação. De fato, a VB é uma doença negligenciada, característica que despertou o interesse dessa pesquisa. A falta de conhecimento e preparo de profissionais de saúde para reconhecer e tratar adequadamente a doença já foi observado em outros estudos de VACV no Brasil (*Fonseca et al., 2011; Kroon et al., 2011*). Por se tratar de uma zoonose, existem reservatórios silvestres e animais amplificadores da virose, o que a torna difícil de combater, no entanto, acredita-se que o devido treinamento e conscientização da população e, principalmente dos profissionais

de saúde podem contribuir para o estabelecimento de medidas de prevenção e controle voltadas à doença.

7.3. Elaboração de material educativo

Os resultados mostram que a grande maioria dos profissionais de saúde, que atuam em uma área endêmica, não está preparada para lidar com a Vaccinia Bovina. Portanto, foi produzido um material educativo com o objetivo de fornecer o conhecimento sobre a doença. O material foi escrito na forma de folder, em Português, Inglês e Espanhol (*Figura 15*), uma vez que circulação do VACV tem se expandido para outros países da América do Sul. Acredita-se que educar a população afetada, os veterinários e equipe de assistência de saúde pública sobre os diferentes aspectos da VB pode reduzir o impacto dessa zoonose sobre a saúde pública e veterinária. Medidas educativas destinadas a profissionais de saúde são eficazes na vigilância de doenças emergentes. Na África, a intervenção comunitária estimulou a prevenção de *Monkeypox virus* e tem sido essencial para garantir o diagnóstico de casos suspeitos (*Roess et al, 2011.; Reynolds et al, 2013; Bass et al., 2013*).

A

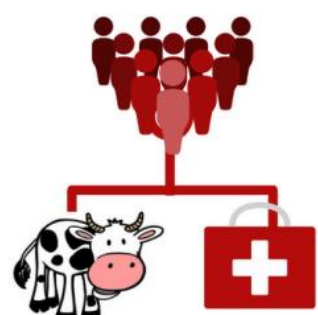
Apoio Financeiro:



VACCINIA BOVINA

CONHECER PARA CONTROLAR!

Texto: Trindade & Oliveira, 2016
Imagens: Trindade, 2007; da Silva, 2008; Abrahão, 2010; Madureira, 2010.
Laboratório de Vírus, Depto de Microbiologia, ICB-UFMG
Contato: giliane@icb.ufmg.br

B

O QUE É A VACCINIA BOVINA?

A Vaccinia bovina é uma zoonose ocupacional provocada por um vírus. Além do gado, podem adoecer o homem e outros animais.

COMO IDENTIFICAR A VACCINIA BOVINA?



A pessoa que tem Vaccinia Bovina pode ter dor no corpo e na cabeça, cansaço, febre e íngua, além disso vesículas ou feridas dolorosas em qualquer parte do corpo.

QUAIS AMOSTRAS PODEM SER COLETADAS PARA DIAGNÓSTICO?

Podem ser coletadas amostra de sangue e de lesões, como líquido vesicular e crosta.

COMO DEVO TRATAR O PACIENTE?

O paciente deve receber tratamento para a febre e dor. Em caso de infecção bacteriana secundária, deve ser administrado antibiótico.

O QUE NÃO FAZER?

Uso de corticosteróides e o debridamento das feridas pois podem agravar o quadro clínico do paciente

COMO POSSO PREVENIR?

Sempre usar proteção (uso de luvas) ao entrar em contato com animais e pessoas doentes.

OUTRAS DOENÇAS SE PARECEM COM A VACCINIA BOVINA?

Sim. A Vaccinia Bovina pode ser confundida com Leishmaniose, Micose, Infecções causadas por bactérias e outras doenças vesiculares que afetam o homem e o gado.

PARA SABER QUE SE TRATA DA VACCINIA BOVINA, DEVE SER FEITO O DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

ONDE PODE SER FEITO O DIAGNÓSTICO?

A secretaria de saúde local deve ser consultada a respeito do envio de amostras para laboratórios de referência.

Lesões características de Vaccinia Bovina



C

Financial support:



BOVINE VACCINIA

LEARN TO CONTROL!

Text: Trindade & Oliveira, 2016
 Images: Trindade, 2007; da Silva, 2008; Abrahão, 2010; Madureira, 2010.

Laboratório de Vírus, Microbiology Department, ICB-UFMG
 Correspondence: giliane@icb.ufmg.br




D

WHAT IS BOVINE VACCINIA?



Bovine Vaccinia is an occupational zoonosis, caused by Vaccinia virus. Besides dairy cattle, can become sick humans and other animals.

HOW CAN YOU IDENTIFY BOVINE VACCINIA?



Infected individuals can have myalgia, headache, fatigue, fever, and lymphadenopathy. Furthermore, blisters or painful lesions over the body.

WHAT CLINICAL SAMPLES CAN BE COLLECTED FOR LABORATORY DIAGNOSIS?



Must be collected sera, vesicular liquids and crusts samples.

HOW INFECTED INDIVIDUALS MUST BE TREATED FOR BOVINE VACCINIA?



Patients must receive medications for pain and headache. In the case of bacterial infections, antibiotics should be administered.

WHAT SHOULD NOT BE DONE?



The use of corticosteroids and debridement of wounds must be avoided. It can worsen the patient's clinical condition.

HOW CAN WE PREVENT BOVINE VACCINIA?



Always using individual protection equipment (i.e. gloves) when in contact with infected individuals or animals.

OTHER DISEASES LOOK LIKE BOVINE VACCINIA?

Yes. Bovine vaccinia can be misdiagnosis with leishmaniasis, mycosis, bacterial infections, and other vesiculopustular diseases that can affect humans and cattle.

TO CONFIRM BOVINE VACCINIA INFECTION, LABORATORY DIAGNOSIS MUST BE DONE



WHERE CAN LABORATORY DIAGNOSIS BE DONE?

Local health authorities must be consulted about laboratory diagnosis in reference laboratories.

Characteristic lesions of bovine vaccinia



E

Apoyo Financiero:



VACCINIA BOVINA

**APRENDER
A CONTROLAR!**

Texto: Trindade & Oliveira, 2016
Imágenes: Trindade, 2007; da Silva, 2008; Abrahão, 2010; Madureira, 2010.
Laboratório de Vírus,
Departamento de Microbiologia,
ICB-UFMG
Contacto: giliene@icb.ufmg.br



Desde 1942

LABORATÓRIO DE VÍRUS
UFMG

F

¿QUÉ ES VACCINIA BOVINA?

Vaccinia Bovina es una zoonosis ocupacional causada por un virus. Además de bovinos, puede afectar a seres humanos y otros animales.

¿CÓMO IDENTIFICAR LA VACCINIA BOVINA?



La persona que tiene Vaccinia Bovina puede tener dolor en el cuerpo y la cabeza, fatiga, fiebre y también ampollas o heridas dolorosas en cualquier parte del cuerpo.

¿QUÉ MUESTRAS PUEDEN SER TOMADAS PARA DIAGNÓSTICO?

Pueden obtenerse muestras de sangre y el líquido vesicular y la corteza de las lesiones.

¿CÓMO DEBO TRATAR AL PACIENTE?

El paciente debe recibir tratamiento para la fiebre y el dolor. En el caso de infección bacteriana secundaria, se debe administrar antibióticos.

¿QUÉ NO HACER?

El uso de corticosteroides y remover la costra de las heridas pueden empeorar la condición del paciente.

¿CÓMO SE PUEDE PREVENIR?

Siempre use protección (guantes) al entrar en contacto con animales y personas enfermas.

¿OTRAS ENFERMEDADES SE PARECEN CON LA VACCINIA BOVINA?

Sí. Vaccinia Bovina puede confundirse con leishmaniasis, micosis, infecciones bacterianas y otras enfermedades que producen pústulas y que afectan al hombre y al ganado.

PARA SABER QUE SE TRATA DE VACCINIA BOVINA, DEBE REALIZARSE EL DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

¿DÓNDE SE PUEDE HACER EL DIAGNÓSTICO?

El centro de salud local debe ser consultado con respecto al envío de muestras a los laboratorios de referencia.



Figura 15: Material educativo sobre VB para profissionais de saúde (A) Parte externa do folder em Português **(B)** Parte interna do folder contendo as informações educativas em Português **(C)** Parte externa do folder em Inglês **(D)** Parte interna do folder em Inglês **(E)** Parte externa do folder em Espanhol **(F)** Parte interna do folder em Espanhol

7.4. Avaliação sorológica

Entre os 51 participantes, 22 apresentaram anticorpos IgG, que representa uma prevalência global de 43,1% (*Tabela 18*). A prevalência de anticorpos IgG entre os indivíduos classificadas como vacinados, de acordo com *cut off* idade foi de 52,6%, enquanto que em não vacinados foi de 37,5%. A prevalência de IgG em indivíduos com a marca vacinas foi de 77,8% e entre os não vacinados foi de 35,7%.

Estes resultados indicam que os indivíduos não vacinados estão sendo expostos a VACV, corroborando outros estudos que indicam a existência de vias alternativas de transmissão de VACV (*Mota et al., 2010; Costa et al., 2015; 2016*). No entanto, essas supostas vias alternativas de transmissão do VACV no Brasil precisam ser identificadas e caracterizadas. Além disso, a negligência sobre VB pode aumentar as chances de exposição através de pacientes infectados e facilitar a disseminação do vírus no ambiente hospitalar.

Tabela 18 – Variáveis demográficas associadas à presença de IgG

VARIÁVEIS	N (%)	ELISA IgG POSITIVO (%)	VALOR DE P	ODDS RATIO (CI 95%)
Gênero				
Feminino	47 (92.1)	19 (40.4)	NS	
Masculino	4 (7.9)	3 (75.0)		
Idade (anos)				
< 38 anos	32 (62.7)	12 (37.5)	NS	
≥38 anos	19 (37.3)	10 (52.6)		
Marca vacinal				
Sim	9 (17.6)	7 (77.8)	0,02	6,3 (1,15 – 34,2)
Não	42 (82.4)	15 (35.7)		
Cor/etnia				
Branco	7 (13.7)	2 (28.6)	NS	
Preto	11 (21.6)	6 (54.5)		
Pardo	33 (64.7)	14 (42.2)		
Zona				
Rural	5 (9.8)	0 (0.0)	NS	
Urbana	42 (82.2)	18 (42.9)		
Urbana/Rural	4 (7.8)	4 (100.0)		
Tempo de trabalho				
≤ 10 anos	37 (72.5)	15 (40.5)	NS	
> 10 anos	14 (27.5)	7 (50.0)		
Total	51 (100.0)	22 (43.1)		

No que diz respeito à presença de anticorpos neutralizantes, 12 indivíduos foram positivos (23,5%), com títulos de anticorpos neutralizantes que variam entre 100 e 6.400 unidades neutralizantes / ml (*Tabela 19 e gráfico 2*). A prevalência entre os classificados como indivíduos vacinados, considerando a idade ≥ 38 anos, foi 63,2%, enquanto que nenhum dos não vacinados, <38 anos, tinha anticorpos neutralizantes detectáveis contra OPV. Considerando a presença da marca vacinal (take) para identificação do grupo vacinado, as taxas de prevalência entre os vacinados foram de 66,7% e entre os não vacinados de 14,3%.

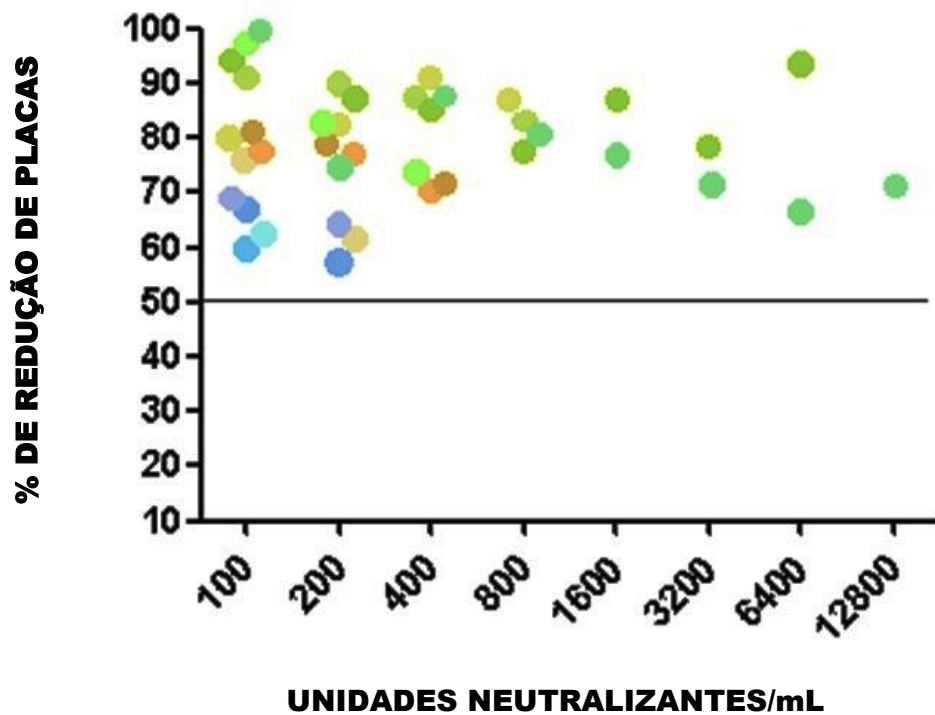


Gráfico 2: Título de anticorpos neutralizantes anti-OPV nos profissionais de saúde do Serro-MG: O gráfico mostra o percentual de redução e os níveis de anticorpos neutralizantes: 12 indivíduos foram positivos (representadas por cores diferentes) com títulos de anticorpos que variam de 100 a 6.400 unidades neutralizantes / ml. A linha preta indica o ponto de corte de 50% de redução de unidades de placa.

Tabela 19 – Variáveis demográficas associadas à presença de anticorpos neutralizantes

VARIÁVEIS	N (%)	PRNT POSITIVO (%)	VALOR DE P	ODDS RATIO (CI 95%)
Gênero				
Feminino	47 (92.1)	10 (21.3)	NS	
Masculino	4 (7.9)	2 (50.0)		
Idade (anos)				
< 38 anos	32 (62.7)	0 (0.0)	<0,001	< 0.001 (< 0.001 – 0.3)
≥38 anos	19 (37.3)	12 (63.2)		
Marca vacinal				
Sim	9 (17.6)	6 (66.7)	0,0007	12 (2,34 -61,4)
Não	42 (82.4)	6 (14.3)		
Cor/etnia				
Branco	7 (13.7)	3 (42.8)	NS	
Preto	11 (21.6)	4 (36.4)		
Pardo	33 (64.7)	5 (15.1)		
Zona				
Rural	5 (9.8)	0 (0.0)	NS	
Urbana	42 (82.2)	11 (26.2)		
Urbana/Rural	4 (7.8)	1 (25.0)		
Tempo de trabalho				
≤ 10 anos	37 (72.5)	5 (13.5)	NS	
> 10 anos	14 (27.5)	7 (50.0)		
Total	51 (100.0)	12 (23.5)		

As características demográficas significativamente associadas à presença de anticorpos neutralizantes foram: a idade < 38 anos ($OR = <0,001$; $IC95\% = <0,001- 0,3$), ($p <0,05$), apontada como fator de proteção, uma vez que nenhum indivíduo dessa faixa etária apresentou anticorpos detectáveis, que consiste no desfecho analisado no estudo. E a presença da marca vacinal ($OR = 12$; $IC95\% = 2,34-61,4$), ($p <0,05$) considerada um fator de risco, ou seja, os indivíduos que têm a marca vacinal possuem a maior chance de serem positivos para a presença de anticorpos, quando comparado àqueles que não a possui. Enquanto que, em relação à IgG, apenas a marca vacinal foi associada positivamente ($OR = 6,3$; $IC95\% = 1,15-34,2$), ($p <0,05$). Este resultado corrobora com a literatura, uma vez que a presença da marca vacinal é fortemente correlacionada com resposta imune detectável (*Kennedy et al., 2009*). Esses dados mostram que os indivíduos vacinados têm resposta imune protetora contra a OPV, enquanto os profissionais mais jovens, que não foram vacinados não têm essa imunidade e, portanto, pode ser exposto ao vírus no ambiente de trabalho. Nos Estados Unidos e em algumas partes da Europa, os profissionais de saúde e trabalhadores de laboratório ainda são submetidos à vacinação (*Isaacs et al., 2012*). A diferença nos resultados entre soroprevalência detectada no ELISA IgG e na PRNT pode ser explicada pela diferença na sensibilidade de cada ensaio, e do tipo de anticorpo detectado.

8. CONCLUSÕES

1. A partir de técnicas sorológicas, foi detectada a circulação de VACV em uma população urbana de uma área endêmica no estado de Minas Gerais. Foram detectados anticorpos em indivíduos não vacinados, revelando uma prevalência global de 32,8% em relação a anticorpos IgG e de 55,7% para a presença de anticorpos neutralizantes.
2. O fator de exposição associado positivamente à presença de anticorpos IgG na população urbana estudada foi a presença da *take* característica da vacinação antivariólica. No entanto, foi detectado anticorpos em indivíduos não vacinados, apontando a existência de algum outro fator de exposição.
3. Foi constatado que a população urbana do Serro, assim como os profissionais de saúde que trabalham no município, desconhece a doença e até mesmo a existência de surtos, que na verdade são frequentes no município. Este desconhecimento pode favorecer a emergência de novos casos.
4. A soroprevalência de IgG em profissionais de saúde do Serro corresponde a 43,1%, enquanto que anticorpos neutralizantes foram detectados em 23,5% dos indivíduos. Nesses indivíduos, o fator de exposição associado positivamente à presença de anticorpos foi a presença da marca vacinal.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHÃO, J. S.; GUEDES, M. I. M.; TRINDADE, G. S.; FONSECA, F. G.; CAMPOS, R. K.; MOTA, B. F., et al. One More Piece in the VACV Ecological Puzzle: Could Peridomestic Rodents Be the Link Between Wildlife and Bovine Vaccinia Outbreaks in Brazil? **PLoS One**, v.4, n.10, e7428, 2009a.
- ABRAHÃO, J. S.; LIMA, L. S.; ASSIS, F. L.; ALVES, P. A.; SILVA-FERNANDES, A. T.; COTA, M. M. G.; et al. Nested-multiplex PCR detection of *Orthopoxvirus* and *Parapoxvirus* directly from exanthematic clinical samples. **Virology Journal**, v.6, n.140, 2009b.
- ABRAHÃO, J. S.; OLIVEIRA, T. M. L.; CAMPOS, R. K.; MADUREIRA, M. C.; KROON, E. G.; LOBATO, Z. I. P. Bovine Vaccinia Outbreaks: Detection and Isolation of Vaccinia Virus in Milk Samples. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 13, n.7, p.1141-46, 2009c.
- ABRAHÃO, J. S.; TRINDADE G. S.; FERREIRA, J. M. S.; CAMPOS, R. K.; BONJARDIM, C. A.; FERREIRA, P. C. P.; et al. Long-lasting stability of *Vacciniavirus* strains in murine feces: implications for virus circulation and environmental maintenance. **Archives of Virology**, v.154, p.1551-53, 2009d.
- ABRAHÃO, J. S.; SILVA-FERNANDES, A. T.; LIMA, L. S.; CAMPOS, R. K.; GUEDES, M. I. M. C.; COTA, M. M. G.; et al. Vaccinia Virus Infection in Monkeys, Brazilian Amazon. **Emerging Infectious Diseases**, v.16, n.6, p.976-79, 2010a.
- ABRAHÃO, J. S.; SILVA-FERNANDES, A. T.; ASSIS, F. L.; GUEDES, M. I.; DRUMOND, B. P.; LEITE, J. A.; et al. Human *Vaccinia virus* and *Pseudocowpox virus* co-infection: Clinical description and phylogenetic characterization. **Journal of Clinical Virology**, v.48, n.1, p.69-72, 2010b.
- ABRAHÃO, J. S.; DRUMOND, B. P.; TRINDADE, G. S.; SILVA-FERNANDES, A. T.; FERREIRA, J. M. S.; ALVES, P. A.; et al. Rapid Detection of *Orthopoxvirus* by Semi-Nested PCR Directly From Clinical Specimens: A Useful Alternative for Routine Laboratories. **Journal of Medical Virology**, v.82, p.692-9, 2010c.
- ABRAHÃO, J.S.; CAMPOS, R.K.; TRINDADE, G.S.; DA FONSECA, F.G.; FERREIRA, P.C.P.; KROON, E.G. Outbreak of Severe Zoonotic Vaccinia Virus Infection, Southeastern Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, V. 21, N. 4, p. 695-8, 2015.

ABRAHÃO, J.S.; TRINDADE, G.S.; PEREIRA-OLIVEIRA, G.; FIGUEIREDO, P.O.; COSTA, G.B.; FRANCO-LUIZ, A.P.M.; ASSIS, F.L.; OLIVEIRA, D.B.; et al., Detection of Vaccinia virus during an outbreak of exanthemous oral lesions in Brazilian equids. **Equine Veterinary Journal**, ISSN 0425-1644, 2016.

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

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **J Mol Biol** 215, 403–410, 1990.

AITICHOU, M.; , SALEH, S.; KYUSUNG, P.; HUGGINS, J.; O’GUINN, M.; JAHRLING, P.; IBRAHIM, S. Dual-probe real-time PCR assay for detection of variola or other orthopoxviruses with dried reagents. **Journal of Virological Methods**, v.153, P.190–195, 2008.

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

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

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

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

ASSIS, F.L.; FRANCO-LUIZ, A.P.M.; PAIM, L.M.; OLIVEIRA, G.P.; PEREIRA, A.F.; DE ALMEIDA, G.M.F.; FIGUEIREDO, L.B.; TANUS, A.; TRINDADE, G.S.; et al. Horizontal study of vaccinia virus infections in an endemic area: epidemiologic, phylogenetic and economic aspects. **Archives of Virology**, DOI 10.1007/s00705-015-2549-1, 2015.

BANCO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO E SOCIAL (BNDES) – Disponível em < web.bndes.gov.br > acessado em 18/11/2016.

BARBOSA, A.; MEDAGLIA, M.; SOARES, H.; QUIXABEIRA-SANTOS, J.; GENNARI, S.; DAMASO, C. Presence of neutralizing antibodies to *Orthopoxvirus* in Capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) in Brazil. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v.8, n.12, p. 1646-49, 2014.

BASS, J.; TACK, D.M.; MCCOLLUM, A.M.; KABAMBA, J.; PAKUTA, E.; MALEKANI, J.; NGUETE, B.; BENJAMIN P. MONROE, B.P. et al., Enhancing health care worker ability to detect and care for patients with monkeypox in the Democratic Republic of the Congo. **Oxford University Press on behalf of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 5, p.237–243, 2013.

BAXBY, D.; SHACKLETO, W.; WHEELER, J.; TURNER, A. Comparison of Cowpox-Like Viruses Isolated From European Zoos Brief Report. **Archives of Virology**, v. 61, p. 337-340, 1979

BENGALI, Z.; SATHESHKUMAR, P.S.; MOSS, B. Orthopoxvirus species and strain differences in cell entry. **Virology**, V. 433(2). P.506–512, 2013

BORGES, I.A. FATORES DE RISCO E CADEIA DE TRANSMISSÃO DA VACCÍNIA BOVINA NO ESTADO DE MINAS GERAIS. 2014. 116 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 2014.

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

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

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

CAMPOS R. K.; BRUM, M. C. S.; NOGUEIRA, C. E. W.; DRUMOND, B. P.; ALVES, P. A.; SIQUEIRA-LIMA, L.; et al. Assessing the variability of Brazilian *Vaccinia virus* isolates from a horse exanthematic lesion: coinfection with distinct viruses. **Archives of Virology**, v.156, n.2, p.275-283, 2010.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Household Transmission of Vaccinia Virus from Contact with a Military Smallpox Vaccinee – Illinois and Indiana, 2007b. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.56, n.17, p.417-9, 2007b.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Laboratory Acquired-Vaccinia Exposure and Infections – United States, 2005-2007. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.57, n.15, p. 401-3, 2008.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Laboratory Acquired-Vaccinia Virus Infection – Virginia, 2008. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.58, n.29, p. 797-800, 2009.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Secondary and Tertiary Transmission of Vaccinia Virus After Sexual Contact with a Military Smallpox Vaccine – San Diego, California, 2012. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.62, n.8, p.145-6, 2013.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Vaccinia Virus Infection After Sexual Contact with a Military Smallpox Vaccine – Washington, 2010. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.59, n.25, 2010a.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Vulvar Vaccinia Infection After Sexual Contact With a Military Smallpox Vaccinee – Alaska, 2006. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.56, n.19, 2007a.

CHIU, W.; LIN, C.; YANG, M.; TZOU, D.; CHANG, W. Vaccinia Virus 4c (A26L) Protein on Intracellular Mature Virus Binds to the Extracellular Cellular Matrix Laminin. **Journal Of Virology**, Vol. 81, No. 5, P. 2149–57, 2007.

CHUNG, C.; HSIAO, J.; CHANG, Y.; CHANG, W. A27L Protein Mediates Vaccinia Virus Interaction with Cell Surface Heparan Sulfate. **Journal Of Virology**, V.72, N.2, p. 1577–85, 1998.

COHEN, J.I.; HOHMAN, P.; PREUSS, J.C.; LI, L.; FISCHER, S.H.; FEDORKO, D.P. Detection of Vaccinia Virus DNA, but not Infectious Virus, in the Blood of Smallpox Vaccine Recipients. **Vaccine**, V.25 (23): P.4571–4574, 2007.

COSTA, G.B.; MORENO, E.C.; TRINDADE, G.S. Neutralizing antibodies associated with exposure factors to Orthopoxvirus in laboratory workers. **Vaccine**, v.31 p. 4706– 9, 2013.

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. **Emerging Infectious Diseases** Vol. 21, No. 12, 2015.

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. **Virology Journal** 13:121 DOI 10.1186/s12985-016-0575-6, 2016.

COSTA, G.B.; MIRANDA, J.B.; ALMEIDA, G.G.; DE OLIVEIRA, J.S.; PINHEIRO, M.S.; GONÇALVES, S.A.; DOS REIS J.K.P.; FERREIRA, P.C.P.; BONJARDIM, C.A.; ABRAHÃO, J.S.; KROON, E.G.; TRINDADE, G.S. Detection of *Vaccinia virus* in urban domestic cats, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, EID-16-1341.R3 aceito para publicação, 2017.

CORAS, B.; ESSBAUER, S.; PFEFFER, M.; MEYER, H.; SCHRÖDER, J.; STOLZ, W.; LANDTHALER, M.; VOGT, T. Cowpox and a cat. **The Lancet**, Vol.365(9457), pp.446-446, 2005.

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

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

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

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

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

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

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

DE OLIVEIRA, T.M.L.; GUEDES, M.I.M.; REHFELD, I.S.; MATOS, A.C.D.; RIVETTI JR, A.V.; ALVES, P.A.; GALINARI, G.C.F.; CERQUEIRA, M.M.O.P.; ABRAHÃO, J.S.; LOBATO, Z.I.P. Detection of Vaccinia Virus in Milk: Evidence of a Systemic and Persistent Infection in Experimentally Infected Cows. **Foodborne Pathogens And Disease**, V. 12, N. 11, 2015

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

DONALDSON, K.A.; KRAMER, M.F.; LIM, D.V. A rapid detection method for Vaccinia virus, the surrogate for smallpox virus. **Biosensors and Bioelectronics**, V.20, P.322–327, 2004.

DONATELE, D. M.; TRAVASSOS, C. E. P. F.; LEITE, J. A.; KROON, E. G. Epidemiologia da poxvirose bovina no Estado do Espírito Santo, Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.44, n.4, p.275-282, 2007.

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

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

DUBOIS, M.; SLIFKA, M. Retrospective Analysis of Monkeypox Infection. **Emerging Infectious Diseases**, v.14, n.4, p.592-9, 2008.

DUCOURNAU, C.; FERIÉ-REMBERT, A.; FERRARIS, O.; JOFFRE, A.; FAVIER, A.L.; FLUSIN, O.; et al., Concomitant Human Infections with 2 Cowpox Virus Strains in Related Cases, France, 2011. **Emerging Infectious Diseases**, V. 19, N. 12, 2013.

DUTRA, L.A.L.; ALMEIDA, G.M.F.; OLIVEIRA, G.P.; ABRAHÃO, J.S.; KROON, E.G.; TRINDADE, G.T. Molecular evidence of Orthopoxvirus DNA in capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) stool samples. **Arch Virol**, DOI 10.1007/s00705-016-3121-3, 2016.

EGAN, C.; KELLY, C.; WILSON, K.; DAVIS, S.; SAMSONOFF, W.; PFEIFFER, H. et al. Laboratory Confirmed Transmission of Vaccinia Virus Infection through Sexual Contact with a Military Vaccinee. **Journal Of Clinical Microbiology**, V. 42, N.11, p. 5409–11, 2004.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA) – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em <[http:// www.embrapa.br](http://www.embrapa.br) > Acesso em 17/09/2015.

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

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

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

ESTEP, R.; MESSAOUDI, I.; O’CONNOR, M.; LI, H.; SPRAGUE, J. et al. Deletion of the Monkeypox Virus Inhibitor of Complement Enzymes Locus Impacts the Adaptive Immune Response to Monkeypox Virus in a Nonhuman Primate Model of Infection. **Journal Of Virology**, V.85, N.18, p.9527–42, 2011.

FEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO ESTADO DE MINAS GERAIS (FAEMG) – Disponível em <www.faemg.org.br> acessado em 18/11/2016.

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

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

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

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

FRANCO-LUIZ, A.P.M.; FAGUNDES-PEREIRA, A.; COSTA, G.B.; ALVES, P.A.; OLIVEIRA, D.B.; BONJARDIM, C.A.; FERREIRA, P.C.P.; TRINDADE, G.S.; et al., Spread of *Vaccinia* Virus to Cattle Herds, Argentina, 2011. **Emerging Infectious Diseases**, V. 20, N. 9, 2014.

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

GURAV, Y.; Raut, C.; Yadav, P.; Tandale, B.; Sivaram, A.; Pore, M.; et al. Buffalopox outbreak in humans and animals in Western Maharashtra, India. **Preventive Veterinary Medicine**, V. 100, P. 242– 247, 2011.

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

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

HENDRICKSON, R.; WANG, C.; HATCHER, E.; LEFKOWITZ, E. Orthopoxvirus Genome Evolution: The Role of Gene Loss. **Viruses**, V.2, p.1933-67, 2010.

HUHN, G.D.; BAUER, A.M.; YORITA, K.; GRAHAM, M.B.; SEJVAR, J.; LIKOS, A.; DAMON, I.K.; REYNOLDS, M.G.; KUEHNERT, M.J. Clinical Characteristics of Human

Monkeypox, and Risk Factors for Severe Disease. **Clinical Infectious Diseases**, V. 41, P.1742–51, 2005.

HSU, C.; FARLAND, J.; WINTERS, T.; GUNN, J.; CARON, D.; et al. Laboratory-Acquired Vaccinia Virus Infection in a Recently Immunized Person – Massachusetts, 2013. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.64, n.16, p.435-8, 2015.

INTERNACIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES (ICTV). Master Species List 2015. Disponível em <<http://www.ictvonline.org>> Acesso em 25/10/2016.

ISAACS, S.N; Working Safely with Vaccinia Virus: Laboratory Technique and Review of Published Cases of Accidental Laboratory Infections. *Vaccinia Virus and Poxvirology: Methods and Protocols*, **Methods in Molecular Biology**, vol. 890, DOI 10.1007/978-1-61779-876-4_1, © Springer Science+Business Media, LLC 2012

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

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

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

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

KENNEDY, R. B.; POLAND, G. A.; OVSYANNIKOVA, I.G.; OBERG, A.L.; ASMANN, Y.W.; GRILL, D.E.; VIERKANT, R.A.; JACOBSON, R. M. Impaired innate, humoral, and cellular immunity despite a take in smallpox vaccine recipients. **Vaccine**, doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.05.005, 2016.

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

KINNUNEM, P.M.; HENTTONEN, H.; HOFFMANN, B.; KALLIO, E.R.; KORTHASE, C.; LAAKKONEN, J. et al., Orthopox Virus Infections in Eurasian Wild Rodents. **Vector-Borne And Zoonotic Diseases**, V.11, N. 8, 2011.

KLOTE, M.M.; LUDWIG, G.V.; ULRICH, M.P.; BLACK, L.A.; HACK, D.C. Absence of oropharyngeal vaccinia virus after vaccinia (smallpox) vaccination. **Annals Of Allergy, Asthma & Immunology**, V.94: P.682–685, 2005.

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

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

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

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

LEVINE, R.; PETERSON, A.; YORITA, K.; CARROLL, D.; DAMON, I.; REYNOLDS, M. Ecological Niche and Geographic Distribution of Human Monkeypox in Africa. **PLoS ONE**, e176. doi:10.1371/journal.pone.0000176, 2007.

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

LI, Y.; OLSON, V.A.; LAUE, T.; LAKER, M.T. DAMON, I.K. Detection of *monkeypox virus* with real-time PCR assays. **Journal of Clinical Virology**, v. 36, p. 194–203, 2006.

LI, Y.; ZHAO, H.; WILKINS, K.; HUGHES, C.; DAMON, I.K. Real-time PCR assays for the specific detection of monkeypox virus West African and Congo Basin strain DNA. **Journal of Virological Methods**, v.169, p. 223–227, 2010.

LIKOS, A.M.; SAMMONS, S.A.; OLSON, V.A.; FRACE, A.M.; LI, Y.; OLSEN-RASMUSSEN, M.; DAVIDSON, W.; GALLOWAY, R.; KHRISTOVA, M.L.; REYNOLDS, M.G. et al., A tale of two clades: monkeypox viruses. **Journal of General Virology**, V.86, P. 2661–2672, 2005.

LIN, C.; CHUNG, C.; HEINE, H.; CHANG, W. Vaccinia Virus Envelope H3L Protein Binds to Cell Surface Heparan Sulfate and Is Important for Intracellular Mature Virion Morphogenesis and Virus Infection In Vitro and In Vivo. **Journal Of Virology**, V. 74, N. 7, p. 3353–65, 2000.

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

LIU, L.; COOPER, T.; HOWLEY, P.M.; HAYBALL, J.D. From Crescent to Mature Virion: Vaccinia Virus Assembly and Maturation. **Viruses** v.6, p.3787-3808, 2014.

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

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

MARENNIKOVA, S.; SELUHINA, E.; MAL'CEVA, N.; LADNYJ, I. Poxviruses isolated from clinically ill and asymptotically infected monkeys and a chimpanzee. **Bulletin of the World Health Organization**, V.46, P.613-620, 1972.

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

MCINERNEY, J.; PAPASOULIOTIS, K.; SIMPSON, K.; ENGLISH, K.; COOK, S.; MILNE, E.; GUNN-MOORE, D.A. Pulmonary cowpox in cats: five cases. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, DOI: 10.1177/1098612X15583344, 2015.

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

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

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

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

MEYER, H.; SCHAY, C.; MAHNEL, H.; PFEFFER, M. Characterization of orthopoxviruses isolated from man and animals in Germany. **Archives of virology**, v.144, p.491–501, 1998.

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

MIRANDA, J.B. AVALIAÇÃO DA CIRCULAÇÃO DE ORTHOPOXVIRUS EM PEQUENOS MAMÍFEROS DE ÁREAS URBANAS, SILVESTRES E RURAIS DE MINAS GERAIS, BRASIL. 2016. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 2016.

MOSS, B. Poxviridae: The Viruses and Their Replication. *In*: FIELDS, B. N., *et al.* (Eds). **Virology**. 6.ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 2013. p.2129-2159.

MÖSTL, K.; ADDIE, D.; BELÁK, S.; BOUCRAUT-BARALON, C.; EGBERINK, H.; FRYMUS, T.; GRUFFYDD-JONES, T. Cowpox virus infection in cats: ABCD guidelines on prevention and management. **Journal of Feline Medicine and Surgery**. V. 15(7), p. 557-9, 2013.

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

MOUSSATCHÉ, N.; TUYAMA, M.; KATO, S. E. M.; CASTRO, A. P. V.; NJAINE, B.; PERALTA, R. H.; *et al.* Accidental Infection of Laboratory Worker with Vaccinia virus. **Emerging Infectious Diseases**, v.9, n.6, p.724-26, 2003.

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

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

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

NITSCHKE, A.; KURTH, A.; PAULI, G. Viremia in human Cowpox virus infection. **Journal of Clinical Virology**, V.40, P.160–2, 2007.

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

OLIVEIRA, 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.P. Vaccinia Virus Is Not Inactivated After Thermal Treatment and Cheese Production Using Experimentally Contaminated Milk. **Foodborne Pathogens And Disease**, V.7, N.12, 1491-6, 2010.

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

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

PELKONEN, P.; TARVAINEN, K., HYNINEM, A.; KALLIO, E.; HENTTONEN, H.; PALVA, A. *et al.* Cowpox with Severe Generalized Eruption, Finland. **Emerging Infectious Diseases**, v.9 , n.11, p 1458- 61, 2003.

PEREIRA-OLIVEIRA, G.; FERNANDES, A.T.S.; ASSIS, F.L.; ALVES, P.A.; FRANCO LUIZ, A.P.M.; FIGUEIREDO, L.B.; DE ALMEIDA, C.M.C.; et al. Short Report: Intrafamilial Transmission of Vaccinia virus during a Bovine Vaccinia Outbreak in Brazil: A New Insight in Viral Transmission Chain. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90(6), p. 1021–3, 2014.

PERES, M. G.; BACCHIEGA, T. S.; APPOLINÁRIO, C. M.; VICENTE, A. F.; ALLENDORF, S. D.; ANTUNES, J. M. A. P.; et al. Serological study of Vaccinia virus reservoirs in areas with and without official reports of outbreaks in cattle and humans in São Paulo, Brazil. **Archives of Virology**, 2013.

PERES, M. G.; BARROS, C.B.; APPOLINÁRIO, C. M.; ANTUNES, J. M. A. P.; MIONI, M.S.R.; BACCHIEGA, T.S.; ALLENDORF, S.D.; VICENTE, A.F.; FONSECA, C.R.; MEGID, J. Dogs and Opossums Positive for Vaccinia Virus during Outbreak Affecting Cattle and Humans, São Paulo State, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, V. 22, N. 2, 2016.

PUTZ, M. M.; ALBERINI, I.; MIDGLEY, C. M.; MANINI, I.; MONTOMOLI, E.; SMITH, G. L. Prevalence of antibodies to Vaccinia virus after smallpox vaccination in Italy. **Journal of General Virology**, v.86, p.2955-60, 2005.

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

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

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**, DOI:10.1371/journal.pone.0127350, p.1-13, 2015.

REYNOLDS, M.G.; CARROLL, D.S.; KARE, K.L. Factors affecting the likelihood of monkeypox's emergence and spread in the post-smallpox era. **Current Opinion in Virology**, V.2, P.335–343, 2012.

REYNOLDS, M.G.; EMERSON, G.L.; PUKUTA, E.; KARHEMERE, S.; MUYEMBE, J.J.; BIKINDOU, A.; MCCOLLUM, A.M. et al., Short Report: Detection of Human Monkeypox in the Republic of the Congo Following Intensive Community Education. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 88(5), pp. 982–985, 2013.

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

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

ROESS, A.A.; MONROE, B.P.; KINZONI, E.A.; GALLAGHER, S.; IBATA, S.R.; BADINGA, N.; MOLOUANIA, T.M.; MABOLA, F.S. et al., Assessing the Effectiveness of a Community Intervention for Monkeypox Prevention in the Congo Basin. **PLoS neglected tropical diseases**, V. 5, I. 10, e1356, 2011.

ROCK, M.T.; YODER, S.M.; TALBOT, T.R.; EDWARDS, K.M.; CROWE, JR, J.E. Adverse Events after Smallpox Immunizations Are Associated with Alterations in Systemic Cytokine Levels. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 189, p. 1401–10, 2004.

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

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning : a laboratory manual, 2nd ed. **New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 1989.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc Natl Acad Sci U S A** 74, 5463–5467, 1977

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

SCHATZMAYR, H. G.; COSTA, R. V. C.; GONÇALVES, M. C. R.; BARRETO, D. F.; BATISTA, V. H.; SILVA, M. E. V.; et al. Infecções humanas causadas por poxvirus

relacionados ao vírus vaccinia no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.42, n.6, p.672-76, 2009.

SCHATZMAYR, H.G.; COSTA, R.V.C.; GONÇALVES, M.C.R.; D'ANDRÉA, P.S.; BARTH, O.M. Human and animal infections by vaccinia-like viruses in the state of Rio de Janeiro: A novel expanding zoonosis. **Vaccine**, v. 29, p.65-59, 2011.

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

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

SECRETARIA DE ESTADO DA AGRICULTURA E DO ABASTACIMENTO (SEAB) - Disponível em <<http://www.agricultura.mg.gov.br/>> Acesso em 17/09/2015.

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

SENKEVICH, T.G.; OJEDA, S.; TOWNSLEY, A.; NELSON, G.E.; MOSS, B. Poxvirus multiprotein entry–fusion complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n.51, p. 18572–18577, 2005.

SEPKOWITZ, K.A. How Contagious Is Vaccinia? **The new england journal of medicine**, 348; 5, 2002.

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

SHCHELKUNOV, S. Emergence and reemergence of smallpox: The need for development of a new generation smallpox vaccine. **Vaccine**, doi:10.1016/j.vaccine.2011.05.037, 2011.

SHCHELKUNOV, S. An Increasing Danger of Zoonotic Orthopoxvirus Infections. **PLOS Pathogens**, , v.9, p1-4, 2013.

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

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

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

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

SMITH, G.; MCFADDEN, G. Smallpox: Anything To Declare?. **Nature Reviews Immunology**, V.2, P. 521-7, 2002.

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

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

TACK, D.M.; KAREM, K.L.; MONTGOMERY, J.R.; COLLINS, L.; BRYANT-GENEVIER, M.G.; TIERNAN, R. et al. Unintentional transfer of vaccinia virus associated with smallpox vaccines. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v.9:7, p. 1489–96, 2013.

TALBOT, T.R.; PETERS, J.; WRIGHT, P.F.; EDWARDS, K.M. Absence of pharyngeal shedding of vaccinia following smallpox vaccination. **Am J Infect Control**, v. 35(7): p.486-8, 2007.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S.; MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using

Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, V. 28, I. 10 P. 2731-9, 2011.

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

TIAN, T.; LIU, L.; FREYSCHMIDT, E.J.; MURPHY, G.F.; KUPPER, T.S.; FUHLBRIGGE, R.C. Overexpression of IL-1a in Skin Differentially Modulates the Immune Response to Scarification with Vaccinia Virus. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 129, p.70-78.

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

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

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

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

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

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

TRINDADE, G. S.; LI, Y.; OLSON, V. A.; EMERSON, G.; REGNERY, R. L.; da FONSECA, F. G.; et al. Real-time PCR assay to identify variants of *Vaccinia virus*: Implications for the

diagnosis of bovine vaccinia in Brazil. **Journal of Virological Methods**, v.152, n.1-2, p.63-71, 2008.

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

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

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

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

VLIET, K. V.; MOHAMED, M. R.; ZHANG, L.; VILLA, N. Y.; WERDEN, S. J.; LIU, J.; et al. Poxvirus Proteomics and Virus-Host Protein Interactions. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.73, n.4, p.730-49, 2009.

VOGEL, S.; SÁRDY, M.; GLOS, K.; KORTING, H.C.; RUZICKA, T.; WOLLENBERG, A. The Munich Outbreak of Cutaneous Cowpox Infection: Transmission by Infected Pet Rats. **Acta Derm Venereol**, V. 92: P. 126–131, 2012.

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

VORA, N.M.; LI, Y.; Geleishvili, M.; Emerson, G.L.; Khmaladze, E.; Maghlakelidze, G.; et al., Human Infection with a Zoonotic Orthopoxvirus in the Country of Georgia. **The new england journal of medicine**, V. 372;13 P. 1223-30, 2015.

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

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

WOLFS, T.F.W. et al. Rat-to-Human Transmission of Cowpox Infection. **Emerging Infectious Diseases**. v. 8, n. 12, p. 1495-1496, dec., 2002.

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

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

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

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

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

ANEXO 1 – QUESTIONÁRIO: POPULAÇÃO URBANA



Projeto: Estudos transversais sobre *Vaccinia virus* em Minas Gerais, Brasil: Circulação viral em população urbana e Avaliação do conhecimento de profissionais de saúde em área ~~hiper~~endêmica

Data da Investigação: ____/____/____

Ficha nº: _____

1. DADOS PESSOAIS

Nome: _____

Nascimento: ____/____/____ Idade: ____ Sexo: ____

Endereço: _____

Cidade e Bairro: _____ CEP: _____

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

Profissão: _____

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

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

Qual a sua faixa de renda familiar bruta mensal? 1. Até 1 salário (); 2. Até 2 salários (); 3. De 2 a 3 salários (); 4. De 3 a 4 salários (); 5. Acima de 4 salários (); 6. Ignorado ().

2. DADOS CLÍNICOS-EPIDEMIOLÓGICOS

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

2. Tem animal em casa? 1. Sim () 2. Não () Quais: _____

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

4. Contato com animais silvestres? 1. Sim () 2. Não () Quais: _____

5. Presença de roedores na casa/propriedade? 1. Sim () 2. Não () Quais: _____

6. Caso a propriedade tenha roedores, onde estes animais são normalmente vistos? 1. Dentro de casa ()
2. Quintal () Outros, _____

7. Faz Controle de Ratos: 1. Sim () 2. Não () Caso sim, como e com qual periodicidade: _____

8. Já ouviu falar da Vaccinia Bovina? 1. Sim () 2. Não ()

9. Como ficou conhecendo a doença? 1. Ocorrência de surto (); 2. Rádio (); 3. TV (); 4. Outro proprietário (); 5. Técnico do IMA (); 6. Jornal ou revista (); 7. Internet (); 8. Outro _____
10. Já ocorreu surto de Vaccínia Bovina na propriedade? 1. Sim (); Não ()
Quando? _____
11. Teve a Vaccínia Bovina? 1. Sim () 2. Não () 9. Ignorado () Se sim, quais sintomas apresentou?
1. Febre (); 2. Cefaléia (); 3. Mialgia (); 4. Conjuntivite (); 5. Dor abdominal (); 6. Calafrios (); 7. Vômitos (); 8. Linfadenopatia (); 9. Náuseas (); 10. Icterícia (); 11. Lesões Disseminadas (); Outros _____
12. Ocorrência de lesões visíveis? 1. Sim () 2. Não () 9. Ignorado ()
Local da lesão: _____
Duração (dias): _____
13. Tipo da lesão: 1. Pápula (); 2. Vesícula (); 3. Pústula (); 4. Úlcera (); 5. Eritema periférico (); 6. Infecção bacteriana (); Mais lesões: _____
14. Presença de cicatriz? 1. Sim () 2. Não () 9. Ignorado () Onde: 1. Mãos (); 2. Braço (); 3. Antebraço (); 4. Face (); 5. Pernas (); 6. Outra () _____
15. Mais alguém na propriedade adoeceu? 1. Sim (); 2. Não () Se sim, em que regiões do corpo apareceram lesões características? 1. Mãos (); 2. Braço (); 3. Antebraço (); 4. Face (); 5. Boca (); 6. Pernas (); 7. Outras _____

3. ANTECEDENTE VACINAL

1. Vacinado para a varíola? 1. Sim (); 2. Não (); 9. Ignorado ()
2. Marca Vacinal no braço esquerdo? 1. Sim (); 2. Não (); 9. Ignorado ()

4. CONSUMO E MANIPULAÇÃO DE LEITE

1. O leite é usado na sua alimentação? 1. Sim (); 2. Não (); 9. Ignorado ()
2. Qual a origem do leite consumido? 1. Próprio (); 2. Industrial (); 3. Outra propriedade rural do município (); 4. Outro () _____
3. O leite é fervido? 1. Sim (); 2. Não (); 9. Ignorado ()
4. Há consumo de leite cru? 1. Sim (); 2. Não (); 9. Ignorado () Se sim, com qual frequência? 1. () Diariamente; 2. Esporadicamente ()
5. Realiza a manipulação de leite cru para a produção de queijo e outros derivados? 1. Sim (); 2. Não (); 9. Ignorado () Se sim, os produtos são comercializados? 1. Sim (); 2. Não (); 9. Ignorado ()
6. Realiza ordenha? 1. Sim (); 2. Não (); 9. Ignorado ()
7. Tipo de ordenha: 1. Manual (); 2. Mecânica ()
8. Número de ordenhas por dia: 1. Uma (); 2. Duas (); 3. Três () 4. Mais _____
9. Onde o leite é armazenado após a ordenha? 1. Latão (); 2. Tanque de expansão ()
10. O leite produzido na propriedade é distribuído? 1. Sim (); 2. Não (); 9. Ignorado () Se sim, pra onde? _____
11. Utiliza algum produto para desinfecção das mãos durante a ordenha? 1. Sim (); 2. Não (); 9. Ignorado () Se sim, em qual momento? 1. Antes da ordenha (); 2. Entre vacas (); 3. Após a ordenha ()

12. Utiliza algum produto para desinfecção dos tetos durante a ordenha? 1. Sim (); 2. Não (); 9. Ignorado () Se sim, em qual momento? 1. Antes da ordenha (); 2. Após a ordenha

ANEXO 2 – QUESTIONÁRIO: PROFISSIONAIS DE SAÚDE



Projeto: Estudos transversais sobre *Vaccinia virus* em Minas Gerais, Brasil: Circulação viral em população urbana e Avaliação do conhecimento de profissionais de saúde em área ~~hiper~~endêmica

Data da Investigação: ____/____/____

Ficha n°: _____

1. DADOS PESSOAIS

Nome: _____

Nascimento: ____/____/____ Idade: _____ Sexo: _____

Endereço: _____

Cidade e Bairro: _____ CEP: _____

Zona: 1. Urbana (); 2. Rural (); 3. Urbana/Rural (); 4. Ignorado () Telefone para contato: _____

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

Profissão: _____

Tempo de formado: _____

Município em que trabalha: _____

Função: _____

A quanto tempo trabalha nesse emprego: _____

Quantas pessoas atuam na equipe em que trabalha: _____

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

5. Indígena ().

Qual a sua faixa de renda familiar bruta mensal?

1. Até 1 salário (); 2. Até 2 salários (); 3. De 2 a 3 salários (); 4. De 3 a 4 salários (); 5.

Acima de 4 salários (); 6. Ignorado ().

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

Possui a marca vacinal? 1. Sim () 2. Não ();

2. DADOS E CONHECIMENTOS PROFISSIONAIS

1. Já ouviu falar da Vaccínia ou Varíola Bovina? 1. Sim () 2. Não ();

2. Como ficou conhecendo a doença? 1. Ocorrência de surto (); 2. Fazendeiros (); 3. Outros profissionais (); 4. Rádio (); 5. TV (); 6. Jornal ou revista (); 7. Internet (); 8. Outro

3. Já ocorreu surto de Vaccínia Bovina na cidade onde trabalha? 1. Sim () 2. Não ()
Quando? _____

4. Foi ensinado a respeito da doença durante sua formação profissional? 1. Sim () 2. Não ()

5. Recebeu algum treinamento a respeito da doença no trabalho? 1. Sim () 2. Não () 3. Primeiro emprego ()

Tipo de treinamento _____

6. Conhece o agente causador da doença? 1. Sim () 2. Não ();

7. A doença ocorre apenas em humanos? 1. Sim () 2. Não (); Quais seriam outros hospedeiros?
1. Bovinos (); 2. Equídeos (); 3. Roedores (); 4. Felinos (); 5. Canídeos (); 6. Suínos ()

8. Quais os possíveis meios de contaminação e transmissão que levam ao surgimento da doença? 1. Contato com bovinos (); 2. Contato com equídeos (); 3. Contato com outros animais (); 4. Contato com animais silvestres (); 5. Contato com um indivíduo infectado (); 6. Consumo de leite cru (); 7. Consumo de queijo cru (); 8. Não sabe ().

9. Quais os sinais que podem ser associados a esta infecção? 1. Febre (); 2. Cefaleia (); 3. Mialgia (); 4. Conjuntivite (); 5. Dor abdominal (); 6. Calafrios (); 7. Vômitos (); 8. Linfadenopatia (); 9. Náuseas (); 10. Icterícia (); 11. Lesões disseminadas (); 12. Não sabe (); 13. Outros

10. Quais são os materiais que podem ser coletados para realização do diagnóstico? 1. Sangue (); 2. Swab de lesão (); 3. Líquido vesicular (); 4. Crosta (); 5. Fezes (); 6. Swab de garganta (); 7. Não sabe ()

11. Quais são os testes diagnósticos que podem ser realizados? 1. Testes sorológicos: ELISA e Soroneutralização () 2. Testes moleculares: PCR e PCR em tempo real (); 3. Isolamento do vírus (); 4. Microscopia eletrônica (); 5. Não sabe ()

12. Quais testes diagnósticos a unidade de saúde tem acesso? 1. Testes sorológicos: ELISA e Soroneutralização () 2. Testes moleculares: PCR e PCR em tempo real (); 3. Isolamento do vírus (); 4. Microscopia eletrônica (); 5. Não sabe ()

13. Para onde as amostras são encaminhadas para o diagnóstico laboratorial?

14. Qual é o tempo médio de espera do resultado dos testes? 1. Uma semana (); 2. Menos de uma semana (); 3. Mais de uma semana (); 4. Um mês (); 5. Mais de um mês (); 6. Não sabe ()

15. Quais as principais formas de tratamento para esta doença? 1. Não há tratamento específico (); 2. Tratamento contra a dor (); 3. Tratamento contra infecções secundárias (); 4. Não sabe ()

16. A unidade de saúde tem acesso a algumas destas formas de tratamento? 1. Sim (); 2. Não (); 3. Não sabe ()

17. Quais são as possíveis medidas preventivas para esta infecção? 1. Isolamento do trabalhador doente (); 2. Uso de equipamentos de proteção (); 3. Uso de desinfetantes (); 4. Limpeza periódica do ambiente de trabalho ()

18. Alguma dessas medidas é implantada pela unidade de saúde? 1. Sim (); 2. Não (); 3. Não sabe ()

19. Essa doença é notificada pela unidade de saúde? 1. Sim (); 2. Não (); 3. Não sabe ()

20. Existe colaboração entre a Secretaria de Agricultura (ou IMA) e a Secretaria de Saúde na notificação, no combate e na prevenção da Vaccinia Bovina? 1. Sim (); 2. Não (); 3. Não sabe ()

21. Qual a importância do trabalho em equipe multiprofissional para o combate eficaz desta doença? 1. Muito importante (); 2. Importante (); 3. Pouco importante (); 4. Sem importância ()

22. De que maneira você, como profissional da saúde, que atua diretamente com as pessoas afetadas por esta doença, pode contribuir para a melhoria das práticas diagnósticas, terapêuticas e preventivas implantadas até o momento na sua equipe?

ANEXO 3 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto: Estudos transversais sobre *Vaccinia virus* em Minas Gerais, Brasil: Circulação viral em população urbana e Avaliação do conhecimento de profissionais de saúde em área ~~hiper~~endêmica

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

Você está sendo convidado pelo nosso grupo a participar de uma pesquisa que tem como finalidade analisar o papel do consumo de queijo e leite cru na transmissão da *Vaccinia* bovina, por viver em uma região onde comumente ocorrem surtos desta doença. Assim, gostaríamos de convidá-lo a participar como voluntário de um estudo que nos auxiliará a compreender melhor a transmissão dessa doença, ajudando-nos a encontrar possíveis tratamentos e métodos de prevenção contra a mesma. A *vaccinia* bovina é uma doença que ataca o gado e outros animais domésticos, e é normalmente causada por um vírus denominado “*vaccinia*”. No gado, a doença pode ser reconhecida pelo surgimento de pústulas e ferimentos nas tetas da vaca, embora este sinal clínico possa ocorrer em outras doenças que afetam o gado. Eventualmente, pessoas que entram em contato com animais infectados podem adquirir a doença. Em pessoas, esta infecção pode causar prostração, febre, inchaço dos membros superiores, dor e surgimento de pústulas e ferimentos nas mãos e membros superiores parecidos com os ferimentos que aparecem nos animais. A doença é benigna e a cura espontânea ocorre em pouco tempo. Em pessoas com o sistema imunológico comprometido a doença pode ser mais grave, com o surgimento de pústulas por todo o corpo. Atualmente, já se sabe que a produção de anticorpos contra o vírus *vaccinia* é muito importante para a recuperação dos indivíduos afetados pela doença. Você será convidado a participar como voluntário. Caso aceite, você responderá a um questionário simples, sobre suas atividades de rotina e sobre o consumo de leite e derivados. Os indivíduos que concordarem em participar do estudo serão realizados um exame de sangue. Esse exame poderá provocar um leve ardor causado pela picada da agulha, e, muito raramente, hematoma (mancha roxa). Esses são os mesmos efeitos que qualquer exame de sangue pode causar. Além disso, será coletada uma amostra de swab oral, amostras de leite e derivados e swab de lesões, se presentes. Todos os testes serão acompanhados por profissional habilitado e medidas para diminuir os problemas citados serão realizadas. Serão retirados 10 ml de sangue, todo material utilizado é descartável ou estéril, portanto isento de risco de contaminação. Serão utilizadas seringas descartáveis individuais para cada paciente. Todo material utilizado será destruído em frente ao paciente. Todos os exames a serem realizados serão gratuitos e os resultados serão enviados gratuitamente aos pacientes doadores. Sua participação neste estudo possibilitará maior conhecimento sobre a *Vaccinia* bovina no Brasil e o vírus causador desta doença. Este estudo não acarretará em nenhum benefício imediato para o participante. No entanto, com o andamento do projeto, todo e qualquer achado que possa ser aplicado e revertido em benefício público será imediatamente implementado. O conhecimento gerado a partir de sua participação ajudará a se entender melhor como nosso organismo responde à infecção, ou porque algumas pessoas não são acometidas pela *vaccinia* bovina. Também auxiliará os agentes de saúde a se prepararem de forma eficiente para o surgimento de novos surtos e poderá indicar se existe a necessidade futura de vacinação contra o vírus ou não. Para a realização deste projeto, os pesquisadores o submeteram ao Comitê de Ética em Pesquisas envolvendo seres humanos da Universidade Federal de Minas Gerais. O projeto completo está disponível para que todo e qualquer participante possa ter conhecimento. Caso queira conhecer o projeto com mais detalhes, basta solicitar uma cópia à Professora Giliane de Souza Trindade através do telefone (31) 3409-2747, ou através da autoridade de saúde pública local. Você tem a liberdade de se recusar a participar e ainda se recusar a continuar participando em qualquer momento da pesquisa, sem qualquer prejuízo. A pesquisa será realizada no Laboratório de Vírus, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Nenhum dos procedimentos usados oferece riscos à sua dignidade, e em nenhum momento usaremos seu nome. Desta forma, as identidades serão preservadas. Esclarecemos também que ao participar desta pesquisa você poderá não ter nenhum benefício direto, assim como não terá nenhum tipo de despesa para participar desta pesquisa, bem como nada será pago por sua participação. Entretanto, esperamos que este estudo nos forneça informações importantes sobre a presença da *vaccinia* bovina na região, de forma que possamos contribuir para evitar infecções futuras.

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

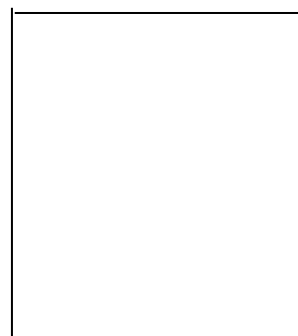
Termo de consentimento livre após esclarecimento

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

Assim sendo, concordo em participar do estudo.

Serro, ____/____/____

Assinatura do voluntário	Nome: Identidade: Telefone pessoal: Telefone para contato: Nome do contato:
Giliane de Souza Trindade Pesquisador responsável	Telefones para contato: (73) 3409-3002



Marca do Polegar

LISTA DE TRABALHOS PUBLICADOS EM ANAIS DE EVENTOS

II Simpósio de Microbiologia da UFMG: Microbiologia Translacional, do ambiente natural às aplicações biotecnológicas, 2015:

1. COSTA, GB; **de Oliveira, J.S.**; SILVA, A. T. S.; MIRANDA, J. B.; MARQUES, F. A.; FERREIRA, P. C. P.; ABRAHAO, J. S.; KROON, E. G.; TRINDADE, G. S. - Emergência de *Orthopoxvirus* em áreas urbanas: evidências sorológicas da circulação entre quatis e cães de ambiente silvestre e urbano em Minas Gerais, Brasil.
2. MIRANDA, J. B.; MARQUES, F. A.; COSTA, GB; **OLIVEIRA, J. S.**; FERREIRA, P. C. P.; BONJARDIM, C. A.; ABRAHAO, J. S.; KROON, E. G.; TRINDADE, G. S. - Evidência da circulação de *Orthopoxvirus* em pequenos mamíferos das regiões de Rio Pomba e Serro em Minas Gerais.
3. **de Oliveira, J.S.**; COSTA, GB; AMARAL, C. D.; MIRANDA, J. B.; FIGUEIREDO, P. O.; MARQUES, F. A.; SILVA, A. T. S.; ABRAHAO, J. S.; KROON, E. G.; TRINDADE, G. S. - Evidência sorológica da circulação de *Hantavirus* em pequenos mamíferos da região metropolitana de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.
4. **de Oliveira, J.S.**; COSTA, GB; BONJARDIM, C. A.; FERREIRA, P. C. P.; ABRAHAO, J. S.; KROON, E. G.; TRINDADE, G. S. - Importância do reconhecimento das infecções por *Orthopoxvirus* entre profissionais de saúde.

XXVI Brazilian Congress of Virology & X Mercosur Meeting of Virology, 2015:

1. MIRANDA, J. B.; COSTA, GB; **de Oliveira, J.S.**; FERREIRA, P. C. P.; BONJARDIM, C. A.; ABRAHAO, J. S.; KROON, E. G.; TRINDADE, G. S. - Evidence of *Orthopoxvirus* circulation among small mammals of Sabará, Brazil.
2. COSTA, GB; **de Oliveira, J.S.**; BONJARDIM, C. A.; FERREIRA, P. C. P.; ABRAHAO, J. S.; KROON, E. G.; TRINDADE, G. S. - Importance of recognizing *Orthopoxvirus* infections among health professionals, Brazil.
3. **OLIVEIRA, J. S.**; COSTA, GB; AMARAL, C. D.; MIRANDA, J. B.; FIGUEIREDO, P. O.; MARQUES, F. A.; SILVA, A. T. S.; ABRAHAO, J. S.; KROON, E. G.; TRINDADE, G. S. - Serological evidence of *Hantavirus* circulation among small mammals from metropolitan region of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

III Simpósio de Microbiologia da UFMG – Doenças Microbianas Emergentes, 2016:

1. **OLIVEIRA, J. S.**; COSTA, GB; FERREIRA, P. C. P.; ABRAHAO, J. S.; KROON, E. G.; TRINDADE, G. S. - Avaliação de rotas alternativas de transmissão do *Vaccinia virus* em uma importante Bacia Leiteira do Estado de Minas Gerais.
2. COSTA, G.B.¹; ALMEIDA, L.R.²; SANTOS, A.G.R.C.²; **DE OLIVEIRA, J.S.¹**; SARAIVA-SILVA, A.T.¹; MIRANDA, J.B.¹; MARQUES, F.A.¹; FERREIRA, P.C.P.¹; ABRAHÃO, J.S.¹; KROON, E.G.¹; PEREIRA, P.L.L.¹; SOARES, D.F.M.²; TRINDADE, G.S.¹ - Detecção do *Vaccinia virus* em cães e quatis de Minas Gerais, Brasil: Análise da emergência do VACV em ambientes urbanos e participação de novos hospedeiros na cadeia epidemiológica.

XVI Curso Internacional de Epidemiologia Molecular, Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz - Fiocruz

Bahia, 2016:

1. **OLIVEIRA, J. S.**; COSTA, GB; FERREIRA, P. C. P.; ABRAHAO, J. S.; KROON, E. G.; TRINDADE, G. S. - Avaliação de rotas alternativas de transmissão do *Vaccinia virus* em uma importante Bacia Leiteira do Estado de Minas Gerais. (Apresentação Oral)

ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO

COSTA, G.B.; MIRANDA, J.B.; ALMEIDA, G.G.; **DE OLIVEIRA, J.S.**; PINHEIRO, M.S.; GONÇALVES, S.A.; DOS REIS J.K.P; FERREIRA, P.C.P.; BONJARDIM, C.A.; ABRAHÃO, J.S.; KROON, E.G.; TRINDADE, G.S. Detection of *Vaccinia virus* in urban domestic cats, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, EID-16-1341.R3 aceito para publicação, 2017.

ARTIGO SUBMETIDO

MIRANDA, J.B.; BORGES, I.A.; CAMPOS, S.P.; VIEIRA, F.N.; COSTA, G.B.; DE AZARA, T.M.F.; MARQUES, F.A.; LUIZ, A.P.M.F.; **DE OLIVEIRA, J.S.**; EIRAS, A.E.; KROON, E.G.; DA SILVA, S.L.M.; DRUMOND, B.P.; PAGLIA, A.P.; TRINDADE, G.S. Another piece in the VACV ecological puzzle: serological and molecular evidences of VACV circulation among small mammals from different Brazilian biomes. **Emerging Infectious Diseases**, EID-16-1643 em revisão.

ARTIGO PARA SUBMISSÃO

Cross-sectional study involving healthcare professionals in a *Vaccinia virus* hyper-endemic area

Jaqueline Silva de Oliveira^{1†}, Galileu Barbosa Costa^{1†}, Ana Paula Moreira Franco Luiz¹, Juliana de Almeida Leite², Cláudio Antônio Bonjardim¹, Paulo César Peregrino Ferreira¹, Jônatas Santos Abrahão¹, Betânia Paiva Drumond¹, Erna Geessien Kroon¹, Giliane de Souza Trindade^{1*}.

Affiliations:

1 – Laboratório de Vírus, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil.

2 – Respiratory Virus Laboratory, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ); Present Address: Pan American Health Organization/World Health Organization, Washington, District of Columbia.

*Corresponding author: Giliane de Souza Trindade, PhD. Present address: Department of Microbiology, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. Av. Presidente Antônio Carlos, 6627, Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais. CEP 31270-901, email: giliane@icb.ufmg.br

†These authors contributed equally to this work.

The *Orthopoxvirus* genus (OPV) consists of emerging viruses that stand out by the importance in human and veterinary medicine, among them the *Variola virus* (VARV), *Cowpox virus* (CPXV), *Monkeypox virus* (MPXV) and *Vaccinia virus* (VACV). VACV had gained notoriety since it was used as a vaccine during smallpox eradication campaign successfully driven by World Health Organization (WHO) [1]. After smallpox eradication in 1980, mass vaccination was suspended, except for military personnel, health assistance, and laboratory workers professionals in the United States and some parts of Europe [2]. Frequently, accidental infections have also been reported when VACV is transmitted from vaccinees to others, sometimes causing serious and even fatal adverse reactions [3,4].

VACV re-emerged in Brazil in late of 90's and currently it was observed the expansion of VACV in South America, detected in Argentina (Franco-Luiz et al., 2014), Uruguay (Franco-Luiz et al., 2016), and Colombia (Nakazawa et al., 2016). VACV cause outbreaks of a vesiculopustular disease named bovine vaccinia (BV), an occupational zoonosis [5]. Being detected in dairy cattle and humans, mainly milkers who have direct contact with milking cows,

presented as cutaneous focal points lesions on the skin accompanied by itching, followed by local edema and blistering. Systemic symptoms such as fever, headache, malaise, myalgia, inguinal lymphadenopathy are also observed [5,6]. BV has high morbidity and infected individuals often have secondary lesions derived from self-inoculation process [5]. The clinical aspects of VACV infection are similar to other infections such as leishmaniasis, mycosis, staphylococcal infection, or anthrax poisoning, furthermore is often accompanied by a secondary bacterial infection that complicates the clinical diagnosis [6,7].

The classic route of VACV transmission is the direct contact with infected animals. However, cases in which infected patients reported no direct contact with cattle had already been documented, highlighting the possibility of alternative routes of infection [8-10]. Although BV has been so far described in rural environments, VACV has been recently detected in urban rodents and cats [5,11, Dutra et al., 2016].

BV has been described in several Brazilian states. The disease seems to be more common or reported in particular regions of Brazil, especially in Southeast region where the most important Brazilian dairy basin is located (referência). However, even in those regions where most of the cases are concentrated, many cases still go undetected, because BV is often misdiagnosed as other vesicular diseases. Furthermore, the misdiagnosis leads to incorrect treatment, what makes BV a real burden for veterinary and human public health. Additionally, due to the possibility of person-to-person transmission through direct contact, the possibility of nosocomial infections occurrence and complications for immunocompromised patients must be considered [4,10,12].

Therefore, this work was performed to evaluate the knowledge and experience level of health care professionals related to BV, and also assessing serological evidence of VACV exposure.

A cross-sectional study was carried out during September 2014-2015 in Serro city (18° 36' 17" S 43° 22' 46" W), Minas Gerais State, Brazil (Supplementary Figure 1). Serro is an

endemic region for VACV circulation [6,10,13,14]. Serro has a population of 20,833 inhabitants being 12,895 residents in the urban area and 7,938 in the rural area (IBGE, 2010). The public health system of Serro consists of one hospital, nine health stations, one municipal polyclinic and one epidemiological surveillance service. The municipality health service comprises 103 health professionals (Supplementary Figure 2).

All public health professionals working in Serro were invited to participate in this study. A semi-structured questionnaire was applied to elicit demographic data (age, gender, self-reported skin color, occupation and education level) and knowledge about BV (clinical symptoms, transmission routes, diagnosis, host chain, treatment and measures for disease prevention). A descriptive analysis of the results was performed using the statistical software Epi InfoTM. Chi-square test and Fisher exact test were used to analysis. This study was approved by the Research Ethics Committee of Universidade Federal de Minas Gerais under the registration protocol FR – 413704. An informed consent was obtained from all participants. In order to assess serological evidence of VACV exposure of health care professionals enrolled in this study, we also collected serum samples and tested them by using IgG ELISA and plaque reduction neutralization test (PRNT) [15]. Additionally, a clinical inspection was made on the left arm of participants ≥ 38 years old for the presence of smallpox vaccine take (vaccine scar) which is strongly correlated with protection [16]. Routine smallpox vaccination was discontinued in Brazil in 1978 [1], then individuals with ≥ 38 years old should have received at least one dose of smallpox vaccine as recommended by WHO.

A total of 51 individuals (49,5% of the healthcare professionals of Serro), were enrolled in this study (Table 1). Women represented 92,1% of participants and 64,7% self-reported mixed skin color. The median age was 36 years (ranging from 19 to 60 years), being 37,3% ≥ 38 years, considered vaccinated according to the cut-off age. Nine individuals (17,6%) presented the vaccine take on their left arm. Nursing professionals represented 53% of the individuals and community health agent stands for 35,4%. Other healthcare professionals

(11,6%) comprise dentists and professionals who work in health care units as pharmacy attendant, laboratory secretary, and general services.

BV knowledge questions are summarized in Table 2. Twenty-nine (56,9%) of participants have heard about BV. Eleven individuals (21,6%) witnessed outbreak of BV and only five (9,8%) said they knew the etiologic agent. These data point to the need for communication about BV among healthcare professionals working in Serro. Although BV outbreaks have been officially reported in Serro city since 2005 [6,10,13,14], a high number of healthcare professionals were unaware about BV (Table 2). Thirty-six (70,6%) said that BV does not occur only in humans. However, this response may have been induced, once the name of the disease is suggestive and indicates that dairy cattle are involved. Twenty-nine (56,9%) know unspecific BV clinical signs and symptoms, such as fever, headache, myalgia, nausea, jaundice, vomiting, chills, disseminated lesions, and lymphadenopathy. Seventeen participants (33,3%) do not know about BV transmission routes and 47,1% do not know about prevention, which could facilitate the virus spread in the hospital environment. Hence, the possibility of nosocomial infections and complications for immunocompromised patients should be considered [4,6,12]. Forty-three participants (84,3%) do not know about laboratory diagnosis and 94,1% do not know if the health unit where they work has access to BV diagnosis. Some individuals (5,9%) indicated that samples from suspected BV patients are forwarded to the state reference laboratory (Fundação Ezequiel Dias - FUNED) and 68,6% are unaware the treatment applied to BV. It has been reported that in outbreak sites, the common recommended treatment includes the use of corticosteroids, which is usually associated with the worsening of a patient's condition [5,6].

Among the 51 participants, 22 showed IgG antibodies, representing an overall prevalence of 43,1% (Table 1). The IgG prevalence among those classified as vaccinated individuals, according to the age was 52,6%, whereas in non-vaccinated it was 37,5%. The prevalence of IgG in individuals with vaccine take was 77,8% and among the non-vaccinated

was 35,7%. These results indicate that unvaccinated individuals are exposed to VACV, corroborating other studies that indicate the existence of alternative routes of VACV transmission. Moreover, negligence about BV can increase the chances of exposure through infected patients [8-10].

Regarding neutralizing antibodies, 12 individuals were positive (23,5%), with antibody titers ranging from 100 to 6,400 neutralizing units/ml (Table 1 and Supplementary figure 3). The prevalence among those classified as vaccinated individuals, considering the age >38 years, was 63,2%, whereas none of non-vaccinated, ≤38 years, had detectable OPV neutralizing antibodies. If the vaccine take was used to identify the vaccinated group, the prevalence rates among those vaccinated were 66,7% and among the non-vaccinated are 14,3%.

The demographic characteristics significantly associated with the presence of antibodies was age >38 years old (crOR = < 0.001; CI95% = <0.001 – 0.3), ($p < 0.05$) and the presence of vaccine take (crOR = 12; CI95% = 1.15 – 61.4), ($p < 0.05$). This result is expected since the presence of vaccine take is strongly correlated with protection [16]. This result shows that vaccinated individuals have protective immune response against OPVs, while younger professionals, who were not vaccinated not have this immunity and therefore may be exposed to viruses in the working environment. In the United States and some parts of Europe, healthcare professionals and laboratory workers are still submitted to vaccination [2]. The difference in seroprevalence results between IgG ELISA and PRNT could be explained by the difference in sensitivity of each test, and the type of antibody detected.

Educational measures aimed to health professionals are effective in the surveillance of emerging diseases. In Africa, community intervention stimulated the prevention Monkeypox and was essential to ensure the diagnosis of suspected cases [Roess et al., 2011; Reynolds et al., 2013; Bass et al., 2013]. Our results show that 43,1% of healthcare professionals are unprepared. We decided to produce an educational material that could provide knowledge about BV. The material is written in Portuguese, Spanish and English and was included in this article

as supplementary material (Supplementary figure 4). We believe that educating the affected population, veterinarians and public health assistance staff about the different aspects of BV its burden on public and veterinary health could be reduced.

After smallpox eradication, the importance of poxviruses has decreased in human medicine, not being unusual the unpreparedness of health professionals about the clinical and epidemiological aspects related to OPV. Our data show that most of the public healthcare professionals, who are in direct contact with infected individuals, have poorly knowledge about the BV. As result of this deficiency, OPV infections could easily spread to the hospital and medical centers, setting precedents to nosocomial infections, which are difficult to treat. Pointing out the importance of knowledge about BV among healthcare professionals, data presented here enhances the efforts for BV control and prevention.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank colleagues from Laboratório de Vírus (ICB/UFMG) for their excellent technical support. We also thank Hugo José Valencia Rivero for helping review with educative material translation for Spanish. We are grateful for the assistance of Mirtes Ribeiro, Antônio Moreira, Mariana Sobral Pedrosa and Serro Health Secretary. Financial support was provided by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG). CA Bonjardim, EG Kroon, JS Abrahão, GS Trindade are researchers from CNPq.

REFERENCES

1. Fenner F, Henderson DA, Arita I, Jezek Z, Ladnyi I. Smallpox and its eradication. Geneva: World Health Organization, 1988.

2. Isaacs SN. Working safely with vaccinia virus: laboratory technique and review of published cases of accidental laboratory infections. *Vaccinia virus and poxvirology: methods and protocols*, chapter 1. *Method Mol Biol*. 2012;890:1-21.
3. Neff JM, Lane JM, Fulginiti VA, Henderson DA. Contact Vaccinia-Transmission of Vaccinia From Smallpox Vaccination. *JAMA*. 2002;288:1901-5.
4. Vora S, Damon I, Fulginiti V, Weber SG, Kahana M, Stein SL, Gerber SI, et al. Severe Eczema Vaccinatum in a Household Contact of a Smallpox Vaccinee. *Clin Infect Dis*. 2008;46:1555-61.
5. Kroon EG, Mota BEF, Abrahão JS, da Fonseca FG, de Souza Trindade G. Zoonotic Brazilian vaccinia virus: from field to therapy. *Antivir Res*. 2011;92:150-163.
6. Trindade GS, Guedes MIC, Drumond BP, Mota BE, Abrahão JS, Lobato ZI, et al. Zoonotic Vaccinia Virus: Clinical and Immunological Characteristics in a Naturally Infected Patient. *Clin Infect Dis*. 2009;48:e37-40.
7. Sant'ana FJF, Leal AA, Rabelo RE, Vulcani VAS, Ferreira Junior JA, Cargnelutti JF, et al. Outbreaks of vesicular diseases caused by Vaccinia virus in dairy cattle from Goiás State, Brazil (2010-2012). *Pesq Vet Bras*. 2013;33:860-6.
8. Mota BEF, Trindade GS, Diniz TC, da Silva-Nunes M, Braga EM, Urbano-Ferreira M, et al. Seroprevalence of orthopoxvirus in an Amazonian rural village, Acre, Brazil. *Arch Virol*. 2010;155:1139-44.
9. Pereira-Oliveira G, Tavares Silva Fernandes A, Lopes de Assis F, Augusto Alves P, Moreira Franco Luiz AP, Barcelos Figueiredo L, et al. Intrafamilial transmission of Vaccinia virus during a bovine Vaccinia outbreak in Brazil: a new insight in viral transmission chain. *Am J Trop Med Hyg*. 2014;90:1021-3.
10. Costa GB, Borges IA, Alves PA, Miranda JB, Franco-Luiz AP, Ferreira PC, et al. Alternative routes of zoonotic Vaccinia virus transmission, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2015;21:2244-6.

11. Costa GB, Miranda JB, Almeida GG, de Oliveira JS, Pinheiro MS, Gonçalves SA, et al. Detection of Vaccinia virus in urban domestic cats, Brazil. *Emerg Infect Dis*. Ahead of print, December 2016.
12. Zafar, A.; Swanepoel, R.; Hewson, R.; Nizam, M.; Ahmed, A.; Husain, A. Nosocomial Buffalopoxvirus Infection, Karachi, Pakistan. *Emerg Infect Dis*. 2007;13:902-4.
13. Assis FL, Borges IA, Ferreira PC, Bonjardim CA, Trindade GS, Lobato ZI, et al. Group 2 Vaccinia Virus, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2012;18:2035-2038.
14. Costa GB, Augusto LTS, Leite JA, Ferreira PCP, Bonjardim CA, Abrahão JS, et al. Seroprevalence of Orthopoxvirus in rural Brazil: insights into anti-OPV immunity status and its implications for emergent zoonotic OPV. *Virology Journal*. 2016;13:121
15. Geessien Kroon E, Santos Abrahão J, de Souza Trindade GS, Pereira Oliveira G, Moreira Franco-Luiz AP, Barbosa Costa G, et al. Natural Vaccinia virus infection: diagnosis, isolation, and characterization. *Curr Protoc Microbiol*. 2016;42:14A.5.1-14A.5.43.
16. Kennedy RB, Ovsyannikova IG, Pankratz VS, Vierkant RA, Jacobson RM, Ryan MA, et al. Gender effects on humoral immune responses to smallpox vaccine. *Vaccine*. 2009;27:3319-3323.

LEGENDS FOR FIGURES:

Supplementary Figure 1: Overview of Minas Gerais State, Brazil: A) The point marks Minas Gerais State, located in Southeast region, Brazil. B) Detail of Minas Gerais State: Serro City is highlighted in green. C) Locations of the health units sampled during the course of this investigation are marked with white points. (Google Earth, 2016).

Supplementary Figure 2: Schematic representation of the health units sampled during the study and the number of individuals sampled at each collection point: one hospital (six individuals),

five health stations (total twenty-eight individuals), one municipal polyclinic (eleven individuals) and one epidemiological surveillance service (six individuals).

Supplementary Figure 3: The graphic shows the percentage of reduction and levels of neutralizing antibodies: 12 individuals were positive (represented by different colors) with antibody titers ranging from 100 to 6,400 neutralizing units/ml. The black line indicates the cut-off of the 50% of plaque units reduction.

Supplementary Figure 4: Educational material about BV for healthcare professionals in English, Portuguese and Spanish. (1) External part of the folder. (2) Inside part of the folder containing information about BV (clinical symptoms, transmission routes, diagnosis, host chain, treatment and measures for disease prevention).

Table 1 – Demographic variables related to the presence of anti-OPV neutralizing antibodies and IgG.

DEMOGRAPHICS	N (%)	ELISA IGG POSITIVE (%)	PRNT POSITIVE (%)	P VALUE	ODDS RATIO (CI 95%)
Gender					
Male	4 (7.9)	3 (75.0)	2 (50.0)	NS	
Female	47 (92.1)	19 (40.4)	10 (21.3)		
Age group (years)					
< 38	32 (62.7)	12 (37.5)	0 (0.0)	< 0.05*	< 0.001 (< 0.001 – 0.3)
≥ 38	19 (37.3)	10 (52.6)	12 (63.2)		
Presence of vaccine take^A	9 (17.6)	7 (77.8)	6 (66.7)	< 0.05	12.0 (1.15 – 61.4)
Yes	42 (82.4)	15 (35.7)	6 (14.3)		
No					
Education level					
Elementary school or less ^B	5 (9.8)	4 (80.0)	4 (80.0)	NS	
High school or more ^C	46 (90.2)	18 (39.1)	8 (17.4)		
Residence area					
Rural	5 (9.8)	0 (0.0)	0 (0.0)	NS	
Urban	42 (82.2)	18 (42.9)	11 (26.2)		
Rural/Urban	4 (7.8)	4 (100.0)	1 (25.0)		
Occupation					
Nursing professionals ^D	27 (53.0)	11 (40.7)	8 (29.6)	NS	
Community health agent	18 (35.4)	8 (44.4)	2 (11.1)		
Others ^E	6 (11.6)	3 (50.0)	2 (33.3)		
Service time					
≤ 10 years	37 (72.5)	15 (40.5)	5 (13.5)	NS	
> 10 years	14 (27.5)	7 (50.0)	7 (50.0)		
Self-reported skin color	33 (64.7)	14 (42.2)	5 (15.1)	NS	
Brown	11 (21.6)	6 (54.5)	4 (36.4)		
Black	7 (13.7)	2 (28.6)	3 (42.8)		
White					
Total	51 (100.0)	22 (43.1)	12 (23.5)		

A: Vaccine take of vaccination against smallpox **B** Elementary school or less (≤ 8 years of study) **C:** High school or more (> 8 years of study) **D:** this group includes nursing technician, nursing assistant and nurse **E:** this group includes other professions such as dentist, pharmacy attendant, laboratory secretary and general services. * p value significative only to the presence of anti-OPV neutralizing antibodies.

Table 2 – Public healthcare workers' knowledge about bovine vaccinia (BV) caused by Vaccinia virus (VACV)

KNOWLEDGE QUESTIONS ABOUT BV	CORRECT ANSWER N (%)	INCORRECT ANSWER N (%)
Heard about BV	29 (56.9)	22 (43.1)
Caused by VACV	5 (9.8)	46 (90.2)
VACV infects other hosts ^A	36 (70.6)	15 (29.4)
Clinical signs and symptoms of BV	29 (56.9)	22 (43.1)
Forms of transmission of BV	34 (66.7)	17 (33.3)
Laboratorial diagnosis of BV	8 (15.7)	43 (84.3)
Preventive measures for BV	27 (52.9)	24 (47.1)
Treatment applied to BV	16 (31.4)	35 (68.6)

A: Other hosts includes cattle, horses, cats, dogs, rodents, buffalos, monkeys, capybaras and coatis.

