

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**JÚLIA BAHIA MIRANDA**

**AVALIAÇÃO DA CIRCULAÇÃO DE *Orthopoxvirus* EM PEQUENOS  
MAMÍFEROS DE ÁREAS URBANAS, SILVESTRES E RURAIS DE MINAS  
GERAIS, BRASIL**

**Belo Horizonte, fevereiro de 2016**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**JÚLIA BAHIA MIRANDA**

**AVALIAÇÃO DA CIRCULAÇÃO DE *Orthopoxvirus* EM PEQUENOS  
MAMÍFEROS DE ÁREAS URBANAS, SILVESTRES E RURAIS  
DE MINAS GERAIS, BRASIL**

Dissertação de mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Microbiologia do Instituto de Ciências  
Biológicas da Universidade Federal de  
Minas Gerais.

**Orientação:** Dra. Giliane de Souza Trindade

**Belo Horizonte, fevereiro de 2016**

## **Agradecimentos**

Agradeço aos meus pais Marcus e Inês pela vida, pelo apoio, carinho e, principalmente, por sempre acreditarem em mim. Vocês são minha maior inspiração e exemplo de honestidade e perseverança. Agradeço por terem me presenteado com uma irmã que é a minha melhor amiga, minha confidente e conselheira. Não existem palavras para expressar o amor que sinto por vocês! Estendo meus agradecimentos a toda minha família, à minha vó Inês, que é minha "mãe" em Belo Horizonte e que sempre me dá um colinho acolhedor. Aos meus avós Francisca e João José pelo exemplo de luta e pelo carinho que sempre deram aos netos, pelos vestidos maravilhosos e por nos deixarem fazer a maior bagunça na casa. Ao meu avô João, por ser um modelo de pessoa bondosa, amorosa e paciente. Aos meus tios e tias, primos e agregados, amo todos vocês e sou muito grata por tê-los em minha vida.

Agradeço ao Alê, o amor da minha vida, meu grande amigo e companheiro. Obrigada pela paciência, pela força e pela compreensão. Eu sei que posso contar com você para qualquer coisa! Obrigada por trazer junto com você sua família, Marcinho, Júlia, Gabriel, tios e tias, vocês são muito especiais para mim.

Aos meus amigos de Bambuí, Carol, Cardosinho, Ju R, Jones, Laís e Laurinha, o meu obrigada a vocês vai pelos momentos de risada, amizade e, principalmente, por saber que vocês sempre estarão lá, mesmo que a distância e o tempo as vezes torne os nossos encontros difíceis. Digo a mesma coisa aos meus queridos Picaretas, vocês tornaram meus dias mais felizes, é sempre um prazer quando encontro algum de vocês perdido no corredor do ICB ou quando nos reunimos em qualquer ocasião.

Obrigada à Santuza e todas as pessoas do laboratório, vocês me ensinaram muito do que sei! Obrigada Vivi, por ter me mostrado como a pesquisa é fascinante e por ter tido tanta paciência comigo quando ainda estava começando.

Agradeço a todos os alunos do Laboratório de Vírus e pelas pessoas que passaram por lá. Cada um, com suas características individuais, deixou algum ensinamento e marcou de alguma maneira minha vida. Agradeço aos alunos mais antigos, que sempre tiveram a disponibilidade para nos ouvir e aconselhar. Aos professores Erna, PP, Cláudio e Jônatas, muito obrigada por nos abrirem as portas, nos oferecerem ótimas condições de trabalho e por dividirem com os alunos o seu valioso conhecimento.

Aos Jovens distintos, Ana Cráudia, Andreia, Gra, Lud, Morice, Paulô, Rafa e Rodrigo, obrigada por tornarem a caminhada mais leve. Vocês são colegas que se tornaram amigos e que vou levar para sempre comigo. Nós estaremos sempre juntos nesse pasto! Da mesma forma agradeço aos alunos do GAG (Galileu, Poli, Iara, Carol, Jaque, Paula e Ana T.), meus irmãozinhos! Eu não seria capaz de fazer tudo que fiz se não fosse a ajuda de cada um de vocês. Vocês foram parceiros nas horas de alegrias e tristezas, obrigada! Obrigada Fê, minha fiel escudeira! Sou muito grata por ter convivido tão de perto com uma pessoa fofa e especial como você!

Muito obrigada à banca avaliadora pela disponibilidade de ler e fazer suas importantes sugestões à minha dissertação. Agradeço aos professores colaboradores do ECOVIR e as equipes de campo. Agradeço também aos funcionários do ICB, à Pós Graduação em Microbiologia e ao povo brasileiro, que através da sua contribuição fomentou minha formação e meu trabalho.

Por fim, agradeço as mulheres de fibra que me mostraram como a Biologia é bela, dentre elas Elaine, minha professora de Ciências, tia Lílian, que me inspirou a escolher este curso e à professora Giliane, que confiou em mim para ser sua orientanda. Gi, obrigada por ter me aceitado ainda na Iniciação Científica e por ter me guiado durante os momentos de dificuldades. Eu admiro muito o trabalho que você desenvolve, seu amor por aquilo que faz e por sua família e, principalmente, pela sua inteligência emocional. Você será sempre uma inspiração em minha vida. Muito obrigada!

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	iii
LISTA DE ABREVIATURAS .....	v
RESUMO .....	vii
ABSTRACT .....	viii
I. Introdução .....	1
1.1. Poxvírus .....	1
1.1.1 Classificação .....	1
1.1.2 Partícula viral e genoma.....	1
1.1.3 Ciclo de multiplicação.....	3
1.1.4 Patogênese.....	7
1.2. <i>Orthopoxvirus</i> .....	10
1.3. <i>Vaccinia vírus</i> .....	15
1.3.1 Sintomatologia clínica, curso da infecção e eliminação viral.....	15
1.3.2 Histórico do <i>Vaccinia virus</i> no Brasil e espectro de hospedeiros.....	19
1.3.3 Roedores e <i>Vaccinia vírus</i> .....	24
1.4. Ecologia de pequenos mamíferos.....	27
1.5. Pequenos mamíferos como fonte de patógenos.....	32
II. JUSTIFICATIVA.....	34
III. OBJETIVOS.....	36
3.1 OBJETIVO GERAL.....	36

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
IV. METODOLOGIA.....	37
4.1 Coleções de pequenos mamíferos.....	37
4.1.2 Sabará.....	39
4.1.3 Serro e Rio Pomba.....	41
4.1.4 Roedores urbanos.....	43
4.2 Sistema celular e vírus.....	44
4.2.1 Células BSC-40.....	44
4.2.2 Vírus.....	44
4.3 Amostras e extração de DNA.....	45
4.3.1 Fígado e demais vísceras.....	45
4.3.2 Soro.....	45
4.4 Ensaio molecular.....	46
4.4.1 PCR em tempo real.....	46
4.4.2 Soro.....	47
4.4.3 Fígado.....	48
4.4.4 Demais vísceras.....	48
4.4.5 PCR convencional.....	48
4.5 Sequenciamento.....	50
4.5.1 Reação de sequenciamento.....	50
4.5.2 Análise das sequências.....	50
4.5.3 Sequenciamento de amostras positivas na qPCR.....	50
4.5.4 Sequenciamento de amostras positivas em PCR convencional.....	51

4.6 Ensaio sorológicos.....	52
4.6.1 PRNT.....	5
4.6.2 ELISA para pequenos roedores.....	53
V. RESULTADOS.....	55
5.1 Resultados da triagem viral por qPCR e busca por anticorpos anti-OPV por PRNT e ELISA para a coleção Sabará.....	55
5.2 Resultados de triagem viral por qPCR e busca por anticorpos anti-OPV por PRNT e ELISA para a coleção Serro.....	58
5.3 Resultados de triagem viral por qPCR e busca por anticorpos anti-OPV por PRNT e ELISA para coleção Rio Pomba.....	62
5.4 Distribuição das amostras positivas de acordo com o período de coleta.....	66
5.5 Distribuição das amostras positivas de acordo com a área de coleta.....	67
5.6 Comparação entre os resultados obtidos para as coleções Sabará, Serro e Rio Pomba.....	67
5.7 Resultados da coleção de roedores urbanos.....	68
5.8 PCR convencional de amostras positivas ou indeterminadas.....	69
5.9 Sequenciamento.....	71
5.9.1 Sequenciamento A56R .....	71
5.9.2 Sequenciamento de C11R.....	72
5.9.3 Sequenciamento A26L.....	73
5.10 Tropismo viral.....	74
VI. DISCUSSÃO.....	76
VII. CONCLUSÕES.....	83
VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84
IX. LISTA DE TRABALHOS PUBLICADOS EM ANAIS DE EVENTOS.....	105

X. ANEXOS.....	109
----------------	-----



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Morfologia e composição da partícula dos poxvírus .....	2
Figura 2: Representação esquemática do genoma de poxvírus.....	3
Figura 3: Representação do ciclo de multiplicação de poxvírus .....	6
Figura 4: Lesões causadas por diferentes <i>Orthopoxvirus</i> .....	7
Figura 5: Modelo esquemático do curso da infecção pelos vírus <i>Ectromelia virus</i> , <i>Vaccinia virus</i> e <i>Variola virus</i> .....	9
Figura 6: Infecção pelo <i>Variola virus</i> e processo de vacinação.....	11
Figura 7: Lesões causadas por <i>Cowpox virus</i> .....	12
Figura 8: Lesões causadas por VACV no gado.....	16
Figura 9: Sinais clínicos da doença causada por VACV em humanos.....	17
Figura 10: Circulação de <i>Vaccinia virus</i> no Brasil.....	20
Figura 11: Árvore filogenética de isolados brasileiros de VACV, linhagens vacinais e outros OPVs.....	23
Figura 12: Adaptação do modelo hipotético proposto por Abrahão e colaboradores para a participação de roedores no ciclo de transmissão do VACV.....	26
Figura 13: Exemplares de alguns roedores encontrados no Brasil.....	28
Figura 14: Alguns marsupiais encontrados no Brasil relevantes para o trabalho.....	30
Figura 15: Exemplar de <i>Sylvilagus brasiliensis</i> .....	32
Figura 16: Áreas de coleta de pequenos mamíferos no estado de Minas Gerais.....	37

Figura 17: Trilhas demarcadas para captura de pequenos mamíferos da coleção Sabará.....	40
Figura 18: Áreas de coleta em Rio Pomba e Serro.....	42
Figura 19: Áreas de coletas de pequenos roedores urbanos.....	44
Figura 20: Concordância entre os resultados obtidos para os testes de qPCR, PRNT e ELISA para a coleção Sabará.....	56
Figura 21: Concordância entre os resultados obtidos para os testes de qPCR, PRNT e ELISA da coleção Serro.....	60
Figura 22: Concordância entre os resultados obtidos para os testes de qPCR, PRNT e ELISA da coleção Rio Pomba.....	64
Figura 23: Distribuição das amostras positivas e testadas em ensaios moleculares de acordo com o mês de captura para as coleções de Sabará, Serro e Rio Pomba.....	66
Figura 24: Distribuição das amostras positivas em PRNT de acordo com o mês de captura para as amostras das coleções de Sabará, Serro e Rio Pomba.....	67
Figura 25: Alinhamento de sequências de 102 pares de bases obtidas para o gene A56R e sequências de outros OPVs.....	72
Figura 26: Alinhamento das sequências de 123 pares de bases obtidas para o gene C11R e sequências de outros OPVs.....	73
Figura 27: Alinhamento da sequência de 126 pares de bases do gene A26L obtida de amostra da coleção de animais urbanos com amostras de VACV brasileiros, vacinais, <i>Cowpox virus</i> e <i>Rabbitpox virus</i> .....	74

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação da família <i>Poxviridae</i> .....	1
Tabela 2: Detecção de OPV em pequenos roedores no Brasil.....	25
Tabela 3: Características de alguns roedores encontrados no Brasil relevantes para o trabalho.....	29
Tabela 4: Características de espécies/gêneros de marsupiais relevantes para o trabalho.....	31
Tabela 5: Coleções de pequenos mamíferos utilizadas no trabalho.....	38
Tabela 6: Iniciadores utilizados em ensaios de PCR em tempo real. ....	46
Tabela 7: Iniciadores utilizados em reações de PCR convencional.....	49
Tabela 8: Amostras de pequenos mamíferos da coleção de Sabará positivas em pelo menos um teste (qPCR, PRNT ou ELISA).....	55
Tabela 9: Espécies de roedores e marsupiais da coleção Sabará testados, positivos e indeterminados nos testes moleculares e sorológicos.....	57
Tabela 10: Amostras de pequenos mamíferos da coleção Serro positivas em pelo menos um teste (qPCR, PRNT ou ELISA).....	59
Tabela 11: Espécies de roedores e marsupiais da coleção Serro testados, positivos e indeterminados nos testes moleculares e sorológicos.....	61
Tabela 12: Titulação dos soros de <i>Trinomys</i> sp. da coleção Serro em ensaio de ELISA.....	62
Tabela 13: Amostras de pequenos mamíferos da coleção Rio Pomba positivas em pelo menos um teste realizado (qPCR, PRNT ou ELISA).....	63
Tabela 14: Espécies de roedores e marsupiais da coleção Rio Pomba testados, positivos e indeterminados nos testes moleculares e sorológicos.....	65

Tabela 15: Positividade por local de captura para cada coleção e para todas as amostras testadas.....	67
Tabela 16: Comparação entre os resultados obtidos para as coleções Sabará, Serro e Rio Pomba.....	68
Tabela 17: Resultados dos ensaios moleculares e sorológicos realizados com amostras dos animais da coleção de urbanos.....	69
Tabela 18: Resultados do teste de PCR convencional que teve como alvo o gene C11R.....	70
Tabela 19: Resultados do teste de PCR convencional que teve como alvo o gene A26L.....	70
Tabela 20: Resultados do teste de PCR convencional que teve como alvo o gene C23L.....	71
Tabela 21: Teste de tropismo viral por qPCR dos genes C11R e A56R das vísceras de animais positivos em ensaios prévios de qPCR.....	75

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>A:</b> Adenina	<b>GP2 virus:</b> <i>Guarani Propriedade 2 virus</i>
<b>ARAV:</b> <i>Araçatuba virus</i>	<b>ha:</b> Hectares
<b>ATCC:</b> <i>American Type Culture Collection</i>	<b>IBGE:</b> Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
<b>BV:</b> <i>Bovine vaccine</i>	<b>IEV:</b> Vírus envelopado intracelular
<b>BPXV:</b> <i>Buffalopox virus</i>	<b>IMV:</b> Vírus madurdo intracelular
<b>CDC:</b> Centers for Disease Control	<b>ICTV:</b> Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus
<b>CEV:</b> Vírus envelopado associado à célula	<b>IOC:</b> Instituto Oswaldo Cruz
<b>cm:</b> Centímetros	<b>ITR:</b> Porção Terminal Invertida
<b>CO<sub>2</sub>:</b> Dióxido de carbono	<b>Kb:</b> Quilobases
<b>CPXV:</b> <i>Cowpox virus</i>	<b>Kg:</b> Quilograma
<b>CT:</b> Cycle treshold	<b>km:</b> Quilômetros
<b>DNA:</b> Ácido desoxirribonucleico	<b>LST-But:</b> Lister-Butantan
<b>DO:</b> Densidade óptica	<b>M:</b> Molar
<b>D.p.i.:</b> Dias pós infecção	<b>m:</b> Metros
<b>ECV:</b> <i>Ectromelia virus</i>	<b>MEM:</b> Meios mínimo essencial
<b>EDTA:</b> <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>	<b>mg:</b> Miligrama
<b>EEV:</b> Vírus envelopado extracelular	<b>mL:</b> Mililitro
<b>ELISA:</b> Ensaio Imunoabsorvente Ligado à Enzima	<b>MPXV:</b> <i>Monkeypox virus</i>
<b>EUA:</b> Estados Unidos da América	<b>mRNA:</b> RNA mensageiro
<b>qPCR:</b> PCR quantitativa/ PCR em tempo real	<b>MURV:</b> <i>Muriae virus</i>
<b>GP1 virus:</b> <i>Guarani Propriedade 1 virus</i>	<b>NCBI:</b> National Center for Biotechnology Information
	<b>ng:</b> Nanogramas

**nm:** Nanômetros

**OIE:** Organização Mundial de Saúde Animal

**PCI:** Fenol, clorofórmio, álcool isoamílico

**PCR:** Reação em cadeia da polimerase

**P.f.u.:** Unidades Formadoras de Placa

**P.i.:** Pós infecção

**PRNT:** Teste de neutralização por redução de placa

**PSTV:** *Passatempo virus*

**RNA:** Ácido ribonucleico

**T:** Timina

**TM:** Temperatura de *melting*

**TMB:** 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine

**u:** Unidades

**VACV:** Vaccinia virus

**VARV:** *Variola virus*

**VB:** Vaccínia bovina

**VBH:** *Belo Horizonte virus*

**WR:** *Western Reserve*

**°C:** Graus celsius

**µg:** Micrograma

**µl:** Microlitros

**µM:** Micromolar

**OPV:** Orthopoxvirus

**pb:** Pares de bases

**PBS:** Tampão fosfato salina

## RESUMO

Vírus pertencentes ao gênero *Orthopoxvirus* são epiteliotrópicos e conhecidos por causar importantes doenças como a varíola, que causou milhões de mortes em todo o mundo. No Brasil o *Vaccinia virus* causa uma doença denominada Vaccínia bovina, que atinge principalmente o gado de leite e ordenhadores. A doença causa danos econômicos, sociais e para a saúde pública e, apesar de indícios da circulação do vírus já terem sido identificados em diversos mamíferos, pouco se sabe a respeito de seu hospedeiro natural. Estudos prévios demonstram a importância dos roedores na cadeia de transmissão do VACV, o que é reforçado pelo isolamento do vírus BeAn58058 de um roedor naturalmente infectado na década de 60. Com o intuito de avaliar a circulação do VACV em roedores e outros pequenos mamíferos, quatro coleções de animais de Minas Gerais foram estudadas no presente trabalho (Sabará, Serro, Rio Pomba e urbanos). Os animais coletados tiveram amostras de soro e/ou fígado testadas para a presença de DNA de OPVs por qPCR e o soro submetido ao ensaio de neutralização por redução de placa (PRNT). Os soros de roedores foram adicionalmente testados em um ensaio de ELISA. Os resultados das técnicas combinadas demonstraram uma positividade de 17,2% para Sabará, 27,2% para o Serro e 11,4% para Rio Pomba. Com relação aos animais urbanos, foi demonstrado que duas amostras provenientes de Contagem foram positivas. Foi possível detectar animais positivos em todas as áreas de captura e vírus pertencentes aos grupos I e II de VACV brasileiros. Os resultados obtidos reforçam a importância da participação dos roedores na cadeia de transmissão do VACV no Brasil e também inserem marsupiais como possíveis vínculos entre o ambiente silvestre e o peridomicílio, onde pode ocorrer a infecção de bovinos e o início de surtos de VB. Estudos adicionais são importantes para o melhor entendimento da importância da detecção do VACV em ambientes urbanos, uma vez que nenhum caso de VB foi reportado nestes locais.

Palavras-chave: *Orthopoxvirus*, *Vaccinia virus*, Vaccínia bovina, roedores, marsupiais.

## ABSTRACT

*Vaccinia virus* causes in Brazil a disease named Bovine vaccine and it affects mainly milking cows and cow handlers. This disease causes many economic, social and public health losses. Virus circulation clues have been obtained from many different mammals, but little is known about its natural host. Previous studies have shown that rodents are important on VACV chain transmission, fact reinforced by BeAn58058 virus isolation from a naturally infected rodent in the 60ths. In order to better evaluate VACV circulation in rodents and other small mammals, four animals collections from Minas Gerais state were studied in the present work (Sabará, Serro and Rio Pomba). Animals had their samples of serum and/or liver tested for OPV DNA presence and serum was also submitted to plaque reduction neutralizing test (PRNT). Rodents serum was additionally tested by ELISA for detection of IgG anti-OPV antibodies. Combined techniques resulted in a positivity of 17,2% for Sabará, 27,2% for Serro and 11,4% for Rio Pomba. Two animals from Contagem were positive for the urban animal's collection. It was possible to detect positive samples in every tested area and it was also possible to detect viruses belonging to group I and II of Brazilian VACVs. The results reinforce the importance of rodents participation in VACV transmission chain in Brazil and they insert marsupials as possible links between the sylvatic environment and peridomicile, place where bovines can be infected and BV outbreaks can start. Further studies are necessary for better understanding the impact of VACV detection in urban environments, since any case of BV has ever been detected in these places.

Key words: *Orthopoxvirus*, *Vaccinia virus*, Bovine vaccine, rodents, marsupials.



# I. INTRODUÇÃO

## 1.1 Poxvírus

### 1.1.1 Classificação

A família *Poxviridae* é composta por vírus com características distintivas que incluem: genoma de DNA dupla fita linear com grampos nas extremidades, sítio de replicação citoplasmático e partícula grande e complexa, que carrega enzimas capazes de promover a síntese de mRNA. Essa família compreende duas subfamílias, *Entomopoxvirinae* que infecta insetos e *Chordopoxvirinae* que infecta vertebrados (Tabela 1). Os gêneros contidos nessas subfamílias apresentam genoma, morfologia e espectro de hospedeiros similares. Apesar de a maioria das espécies estar inserida em algum gênero, existem duas espécies sem gênero determinado em *Entomopoxvirinae* e uma em *Chordopoxvirinae* (Tabela 1) (ICTV, 2014; Moss, 2007).

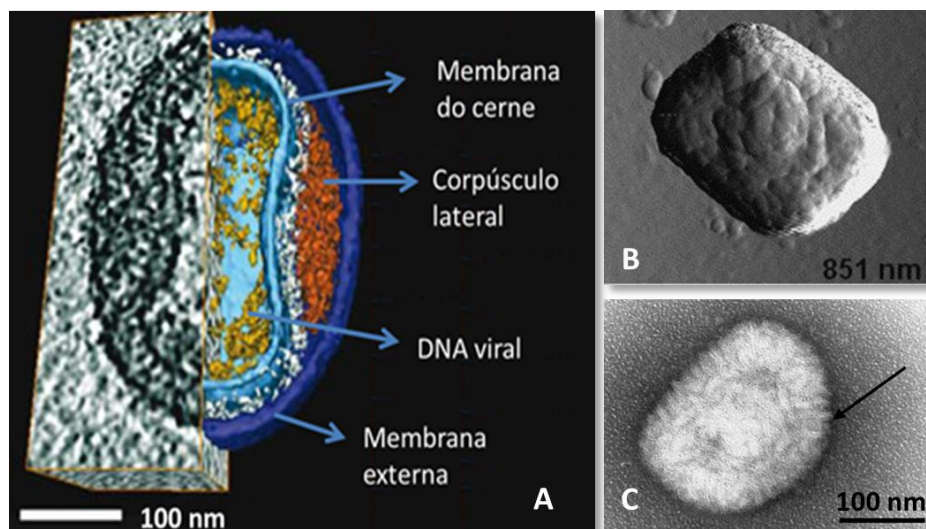
**Tabela 1: Classificação da família *Poxviridae* (ICTV, 2014).**

Subfamília	Gênero	Protótipo	Número de espécies
Chordopoxvirinae	<i>Avipoxvirus</i>	<i>Fowlpox virus</i>	10
	<i>Capripoxvirus</i>	<i>Sheeppox virus</i>	3
	<i>Cervidpoxvirus</i>	<i>Mule deerpox virus</i>	1
	<i>Crocodylidpoxvirus</i>	<i>Nile crocodilepox virus</i>	1
	<i>Leporipoxvirus</i>	<i>Myxoma virus</i>	4
	<i>Molluscipoxvirus</i>	<i>Molluscum contagiosum virus</i>	1
	<i>Orthopoxvirus</i>	<i>Vaccinia virus</i>	10
	<i>Parapoxvirus</i>	<i>Orf virus</i>	4
	<i>Suiipoxvirus</i>	<i>Swinepox virus</i>	1
	<i>Yatapoxvirus</i>	<i>Yaba monkey tumor virus</i>	2
Entomopoxvirinae	Gênero não determinado	<i>Squirrelpox virus</i>	
	<i>Alphaentomopoxvirus</i>	<i>Melolontha melolontha entomopoxvirus</i>	7
	<i>Betaentomopoxvirus</i>	<i>Amsacta moorei entomopoxvirus</i> 'L'	13
	<i>Gammaentomopoxvirus</i>	<i>Chironomus luridus entomopoxvirus</i>	6
	Gênero não determinado	<i>Diachasmimorpha entomopoxvirus</i>	
		<i>Melanoplus sanguinipes entomopoxvirus</i> 'O'	

### 1.1.2 Partícula viral e genoma

Experimentos de crioeletromicroscopia realizados com o *Vaccinia virus* revelaram que as partículas possuem morfologia de tijolo, ovóide ou

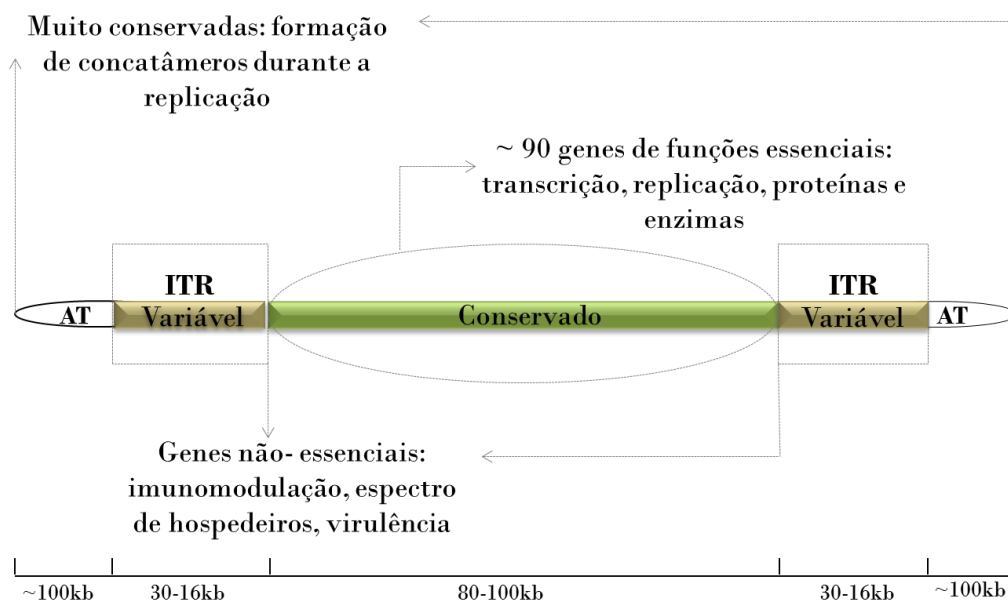
pleomórfica (Figura 1B). Suas dimensões são de aproximadamente 350-370 X 250 X 270nm (Cyrklaff, 2005) e os principais componentes da partícula viral são: proteínas, lipídeos e DNA (Moss, 2007). Nos vírions maduros intracelulares (IMVs), é possível observar uma membrana lipídica com projeções de proteínas em sua porção externa (Figura 1C) e porção interna lisa, além de dois corpos laterais que se encaixam nas concavidades do cerne complexo. O cerne tem morfologia de haltere e é formado por uma dupla camada, sendo a interna consistente com uma camada lipídica com poros e a externa descontínua, indicando a possível presença de uma camada paliçada entre as duas. Existe uma região densa com aspecto fibroso localizada mais proximamente à camada interna do cerne, provavelmente representando as nucleoproteínas virais com compactação ordenada e o DNA viral (Figura 1 A). É importante ressaltar que a partícula viral carrega fatores de transcrição precoces e uma RNA polimerase DNA dependente (Moss, 2007; Cyrklaff, 2005).



**Figura 1: Morfologia e composição da partícula dos poxvírus.** **A:** Partícula de *Vaccinia virus*. A porção esquerda representa uma tomografia por seções do vírus e a da direita um desenho esquemático, evidenciando a membrana do cerne, corpúsculo lateral, DNA viral e a membrana externa (Cyrklaff, 2007 com modificações). **B:** Partícula de *Vaccinia virus* visualizada por microscopia de força atômica (Trindade, 2007c). **C:** Partícula de *Orthopoxvirus* corada negativamente e visualizada por microscopia eletrônica. Seta aponta túbulos irregulares na superfície do vírus (Catroxo, 2009).

Os poxvírus apresentam genomas com tamanhos que variam de 134 Kb a 300 Kb e estes apresentam repetições terminais invertidas, que são sequências semelhantes, mas com disposição contrária. Conectando as duas fitas de DNA existem sequências de DNA fita simples, de cerca de 100 pares de bases e ricas em A + T (Figura 2), que são importantes para a formação de concatâmeros durante a replicação do DNA (Moss, 2007).

Análises do genoma dos cordopoxvírus indicam que a porção central é conservada, apresentando genes que codificam proteínas envolvidas na síntese de RNA e DNA, processamento de proteínas, montagem da partícula viral e proteínas estruturais. As porções laterais, entretanto não apresentam tal nível de conservação e geralmente codificam fatores envolvidos na virulência, espectro de hospedeiros e proteção contra a resposta imunológica do hospedeiro (Figura 2) (Gubser, 2004).



**Figura 2: Representação esquemática do genoma de poxvírus** (Adaptado de Smith & McFadden 2002).

### 1.1.3 Ciclo de multiplicação

Poxvírus possuem diferentes partículas infecciosas, que apresentam capsídeo formado por proteínas, contendo o DNA viral e diversos fatores e enzimas necessários para a transcrição de genes virais precoces (Moss, 2006; Moss,

2012). A partícula denominada vírus maduro intracelular (IMV) possui apenas uma membrana revestindo o capsídeo, é a forma mais abundante do vírus e é possivelmente responsável pela transmissão do vírus entre hospedeiros (Schmidt, 2012; Moss, 2012). O IMV pode adquirir uma membrana adicional através da passagem pelas membranas modificadas pela adição de, pelo menos 6 proteínas, no complexo de Golgi ou endossomos (Smith, 2002; Moss, 2006; Moss, 2012). Essa partícula, ainda no interior da célula, é denominada vírus envelopado intracelular (IEV) e está associada à disseminação do vírus entre células de um mesmo hospedeiro (Moss, 2006; Schmidt, 2012; Moss, 2012). IEVs são movimentados para a periferia celular através de microtúbulos e são exocitados, podendo deixar a célula, dando origem aos vírus envelopados extracelulares (EEVs) ou permanecerem aderidos à célula em protusões formadas por actina, formando vírus envelopados associados à célula (CEVs). CEVs são predominantes em relação aos EEVs (Moss, 2006; Schmidt, 2012; Moss, 2012).

Não existem receptores celulares bem definidos para a adesão/adsorção de VACV e aqueles sugeridos são ubíquos e variados, dessa forma o tropismo desses vírus não é definido pela presença de receptores específicos na célula e sim por eventos posteriores à penetração (Moss, 2006; Schmidt, 2012; Moss, 2012).

Após a adesão das partículas virais à célula, ocorre a penetração e alguns mecanismos são propostos para este processo (Figura 3). Acredita-se que tanto EEVs quanto IMVs utilizem a macropinocitose, através da qual ocorre sinalização celular, rearranjo de actina e formação de *blebs* na membrana da célula que levam ao engolfamento das partículas virais (Moss, 2012). Estudos mostram que, após contato com a superfície celular, o cerne previamente em formato de haltere sofre uma expansão, com perda do arranjo ordenado de proteínas de sua superfície, apresentando então morfologia ovóide. Além disso, o DNA se torna relaxado e preenche toda a cavidade do cerne, podendo ser este um requisito para sua liberação no citoplasma (Cyrklaff, 2007).

Para que o vírus continue seu ciclo de multiplicação, é preciso que seu capsídeo seja liberado no citoplasma, o que pode ocorrer por fusão da

membrana viral com a membrana da vesícula em que ele está contido (Moss, 2006).

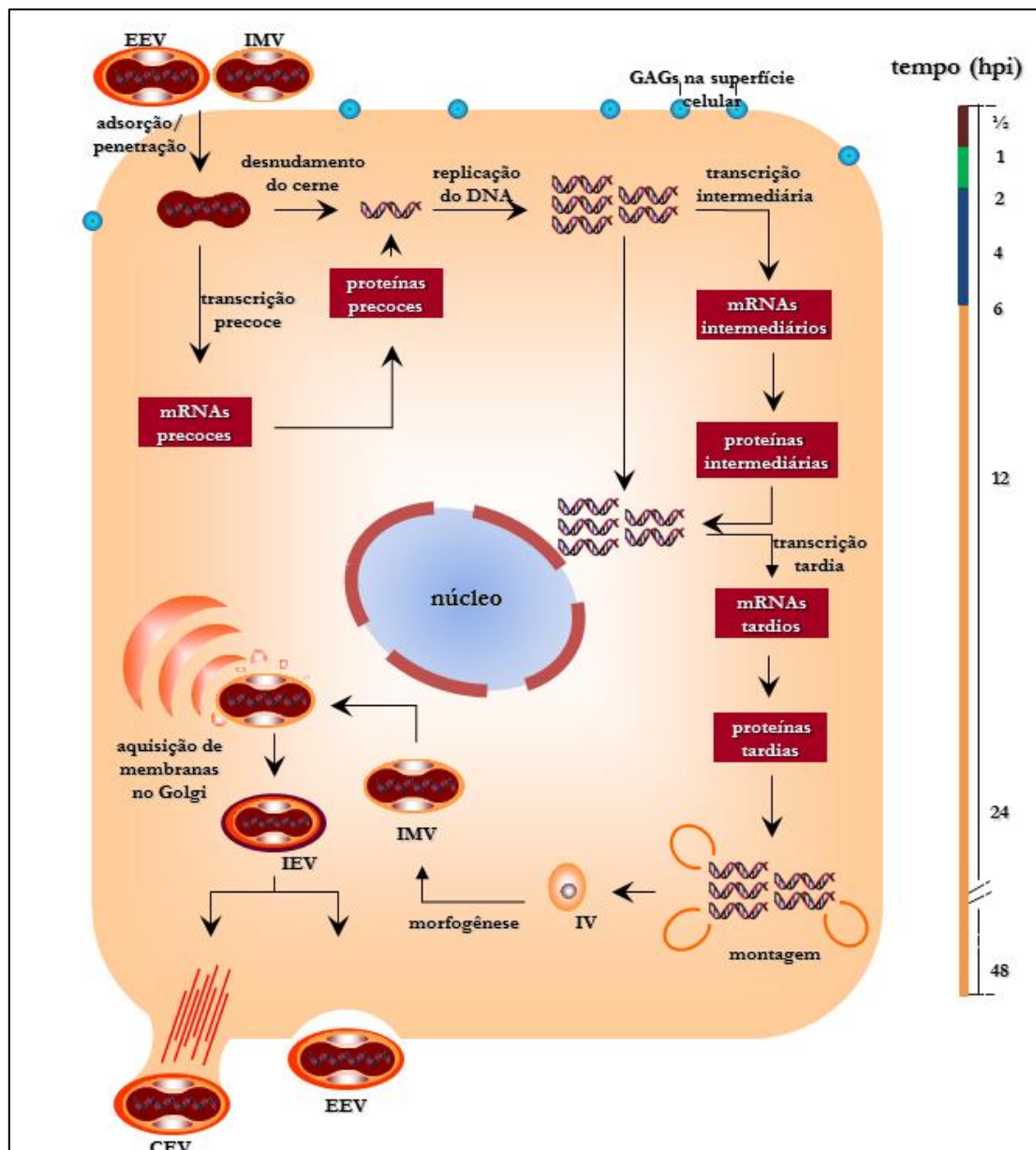
A penetração pode ocorrer também através da fusão da membrana viral com a membrana celular, liberando o capsídeo no citoplasma. Nesse processo a membrana externa do EEV seria perdida antes da fusão (Moss, 2006).

Após a adsorção, penetração e liberação dos cernes no citoplasma, os mesmos são transportados para a região mais interior do citoplasma através de microtúbulos, se acumulando na região perinuclear da célula (Figura 3). Os cernes virais sofrem ativação e ocorre o início da transcrição de genes precoces pela RNA polimerase viral. As proteínas sintetizadas durante essa fase são responsáveis pela replicação do genoma (que envolve formação e resolução de concatêmeros) e evasão da resposta imune do hospedeiro, além de auxiliarem na desencapsidação secundária da partícula (Smith, 2003; Moss, 2007; Roberts, 2008). Com o início da replicação do genoma, inicia-se também a transcrição de genes intermediários, que dão origem a fatores responsáveis pela transcrição de genes tardios. Os genes tardios, por sua vez, codificam proteínas estruturais do vírus e enzimas e fatores necessários para a transcrição dos genes precoces, que são empacotados na partícula viral (Roberts, 2008). Na amostra *Western Reserve* (WR) de VACV, existem 118 genes precoces, 53 intermediários e 38 tardios (Moss, 2012).

Após a expressão dos genes tardios, tem-se início a montagem da partícula viral (Moss, 2012), que ocorre em locais no citoplasma chamados de fábricas virais, onde não se observa a presença de organelas celulares (Smith, 2002). O DNA viral é empacotado no cerne e as proteínas do capsídeo sofrem proteólise, dando origem ao vírion maduro intracelular (Roberts, 2008).

Em períodos tardios da infecção, alguns IMVs são capazes de brotar através da membrana citoplasmática (Smith, 2012). IMVs podem também adquirir uma membrana adicional, dando origem a IEVs, que são transportados para a periferia da célula através de microtúbulos (Arawaka, 2007; Roberts, 2008). As partículas virais que se mantêm aderidas à célula (CEVs) são propulsionadas para células adjacentes através da polimerização da actina, que forma uma

cauda que leva o vírus para outras células. Os EEVs deixam a célula por exocitose (Roberts, 2008).



**Figura 3: Representação do ciclo de multiplicação de poxvírus.** A adsorção é, seguida da transcrição de mRNAs precoces e tradução de proteínas precoces até a primeira hora de infecção. Depois disso, ocorre o desnudamento do cerne com transcrição e replicação do genoma por volta de três horas após a adsorção e transcrição e tradução de mRNAs intermediários e tardios até a sexta hora de infecção. Os eventos seguintes ocorrem até quarenta e oito horas de infecção, culminando na liberação da progênie viral (McFadden, 2005 adaptado por Grupo de Transdução de Sinais).

Existe um mecanismo de repulsão que evita que células sejam super infectadas com EEVs/CEVs e dessa forma, a propagação do vírus em um hospedeiro é acelerada. Uma vez infectando a célula, o vírus produz proteínas que impedem que novas partículas virais penetrem nessa célula, levando também à formação de caudas de actina que levam o vírus para novas células, que caso não estejam expressando tais proteínas virais, poderão ser infectadas (Doucel, 2010).

#### 1.1.4 Patogênese

Os poxvírus, em especial os ortopoxvírus são vírus epiteliotrópicos associados à produção de um exantema característico (Figura 4). Vírus como o que causa a varíola murina, o *Ectromelia virus* e o *Variola virus* que causava a varíola humana, geram infecções generalizadas, enquanto outros causam apenas doença localizada, como é o caso do *Molluscum contagiosum virus*. Entretanto, alguns vírus podem apresentar diferentes patogenias em hospedeiros distintos, como é o caso do *Cowpox virus*, que em humanos e bovinos manifesta-se geralmente de forma mais localizada e causam infecção sistêmica em felinos (Buller, 1991).



**Figura 4: Lesões causadas por diferentes *Orthopoxvirus*. A:** lesões causadas por *Variola virus*. **B:** Lesões causadas por *Ectromelia virus*. **C:** Lesões causadas por *Camelpox virus* (McFadden, 2005).

Os vírus têm acesso a camadas epidermais e dermais da pele através de microabrasões, podendo ocorrer também a injeção mecânica por vetores artrópodes, como é o caso de *Myxoma virus*. Além disso, a infecção pode ser iniciada através do trato respiratório (*Variola virus*, por exemplo) ou trato gastrointestinal (*Ectromelia virus*) (Buller, 1991).

O modelo geral de patogênese para OPVs foi estabelecido através de infecções experimentais de roedores com *Ectromelia virus* (Figura 5). O vírus se multiplica no sítio de inoculação, que geralmente ocorre por abrasão da pele ou contato com fômites, e em seguida, em linfonodos regionais. Ocorre então a viremia primária, podendo o vírus estar livre na corrente sanguínea ou associado a células. O vírus se multiplica em órgãos como baço e fígado e inicia-se então a viremia secundária, depois da qual a multiplicação viral é observada em órgãos como pele, pulmões, rins e intestino, levando ao aparecimento de lesões características na pele (Fenner, 1988). Durante a infecção, anticorpos começam a ser detectados a partir do 7º dia e no 14º dia atingem seu pico, o que é associado com a queda no potencial de transmissão do vírus pelo animal (Buller, 1991).

A produção de lesão exantemática é variável de acordo com o modelo utilizado, por exemplo, em determinadas linhagens de camundongos Balb/c a morte do animal pode ser causada por necrose do fígado e baço antes mesmo que tais lesões sejam formadas e da produção de anticorpos. Em outras linhagens, como C57BL, o animal não vai a óbito e não são observados exantemas (Fenner, 1988).



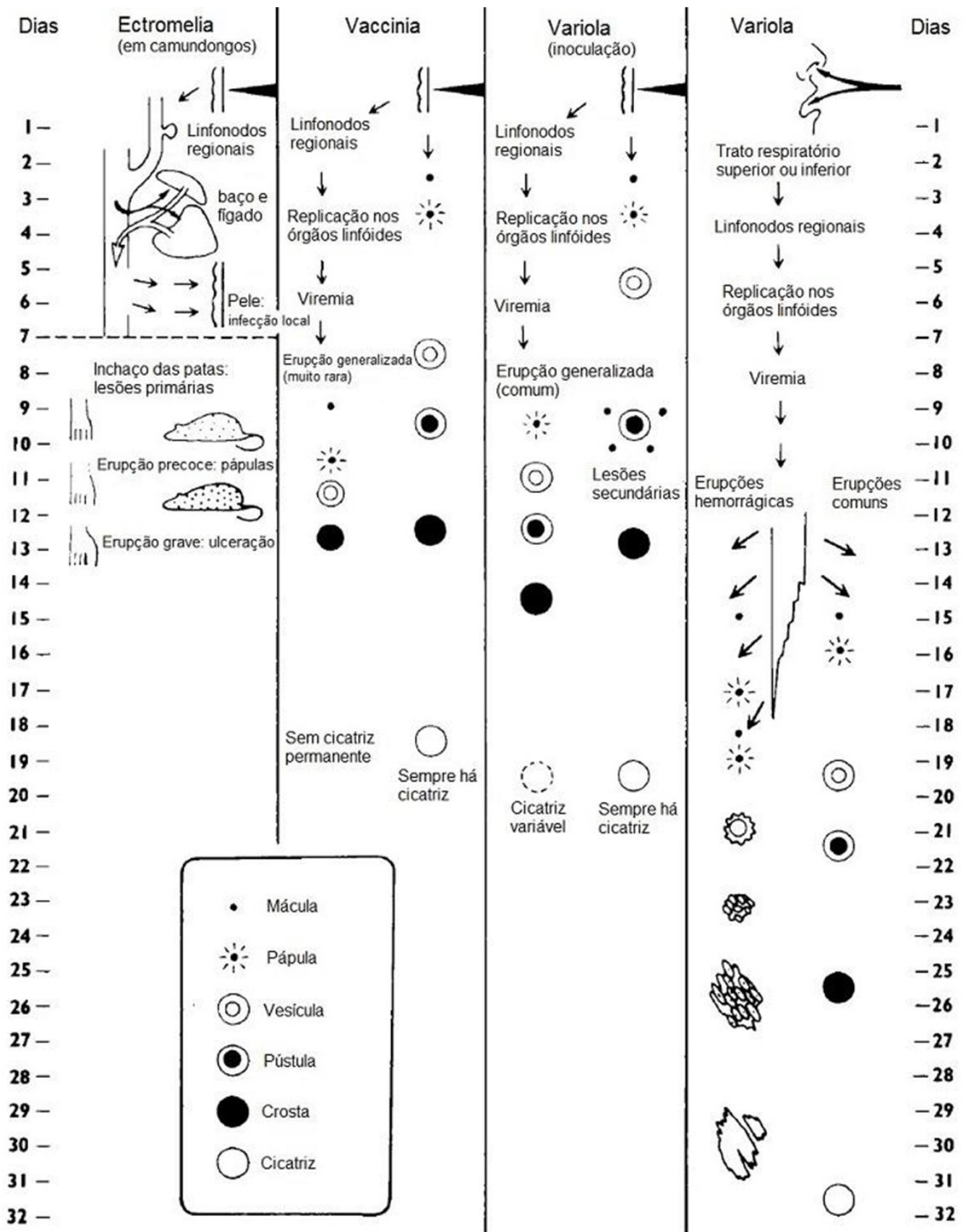


Figura 5: Modelo esquemático do curso da infecção pelos vírus *Ectromelia virus*, *Vaccinia virus* e *Variola virus* (Fenner, 1988, com modificações).

## 1.2. *Orthopoxvirus*

O gênero *Orthopoxvirus* contém vírus capazes de infectar humanos, causando doença autolimitada em pessoas imunocompetentes, além de um amplo espectro de hospedeiros animais (Frey, 2004). Dentre eles existem aqueles com hospedeiros únicos como o *Variola virus* que infecta somente o homem e *Ectromelia virus* que infecta apenas roedores. Por outro lado, vírus como *Monkeypox virus*, *Cowpox virus* e *Vaccinia virus* são capazes de infectar múltiplos hospedeiros como o homem e outros animais (McFadden, 2005; Moss, 2007; Shchelkunov, 2013).

Dentre os ortopoxvírus conhecidos, o *Variola virus* possui grande relevância, uma vez que a varíola é a doença infecciosa que causou mais mortes no mundo (Figura 6A) (McFadden, 2005) até a sua erradicação declarada pela Organização Mundial de Saúde, no ano de 1980. Devido ao grande impacto da doença, metodologias de vacinação foram introduzidas por Edward Jenner ainda no século XVIII, utilizando o *Cowpox virus* como agente vacinal, mas posteriormente, algum evento desconhecido levou à substituição do mesmo pelo *Vaccinia virus* (Fenner, 1988). Devido à disseminação mundial da varíola, a Organização Mundial de Saúde promoveu a maior campanha de vacinação já realizada (Figura 6B). Múltiplos programas garantiram que a vacina chegasse até países mais pobres até que a doença fosse de fato erradicada (Fenner, 1993).

Uma vez que efeitos adversos da vacinação eram frequentemente observados, após a erradicação da Varíola, as campanhas foram descontinuadas e atualmente o vírus é encontrado somente em estoques congelados nos Estados Unidos e Rússia (Fenner, 1988). A erradicação da doença foi possível devido à proteção imunológica cruzada oferecida pelos OPVs utilizados como vacina (Fenner, 1988), além da ausência de reservatório silvestre, facilidade de diagnóstico e ausência de casos assintomáticos (Belongia, 2004).



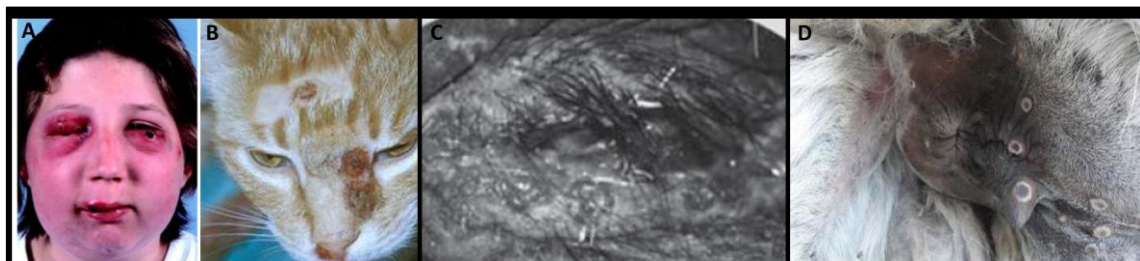
**Figura 6: Infecção pelo *Variola virus* e processo de vacinação.** **A:** criança com lesões causadas pelo *Variola virus* (CDC/James Hicks). **B:** Bebê recebendo vacina contra a varíola (Marion Kaplan/Alamy).

Além do VARV, outros OPVs têm recebido atenção por sua emergência em diferentes partes do mundo. Após a suspensão das campanhas de vacinação contra a varíola, desenvolveu-se um grande contingente populacional não imune contra OPVs e isso pode contribuir para a infecção de mais pessoas e, conseqüentemente, para a maior detecção do agente viral. Dentre esses vírus emergentes destacam-se o *Monkeypox virus*, *Cowpox virus* e *Vaccinia virus*, que são OPVs zoonóticos detectados em diferentes regiões do mundo (Essbauer, 2010).

A doença causada pelo *Monkeypox virus* em humanos é muito semelhante à varíola, porém é mais branda e com o sintoma diferencial de linfadenopatia (Giulio, 2004). Surtos de doença causada por este vírus foram relatados inicialmente em populações de macacos mantidos em cativeiro e, desde o ano de 1970, casos em humanos foram diagnosticados em áreas da África central e ocidental (Arita, 1976). Em 2003, foi registrado um surto da doença em humanos nos Estados Unidos e posteriormente, descobriu-se que o vírus havia sido introduzido através da importação de roedores infectados provenientes da África (Reed, 2004). Campanhas de vigilância realizadas na África indicam que casos humanos da doença aumentaram cerca de 20 vezes nos 30 anos que se seguiram ao fim das campanhas de vacinação contra a varíola (Rimoin, 2010) e cerca de 11% dos casos em pessoas não vacinadas são fatais (Jezec, 1988; McCollum, 2013).

Estudos filogenéticos indicam a existência de dois clados distintos de MPXV, classificados como África ocidental/EUA e Congo Basin. O primeiro, responsável pelas infecções nos EUA, é associado à doença mais amena, com redução na viremia e ausência de transmissão entre humanos e o segundo a doença mais grave (Likos, 2005). Acredita-se que reservatórios do MPXV sejam animais silvestres, e apesar de esses reservatórios serem desconhecidos, é provável a participação de roedores (McFadden, 2005; Reynolds, 2010). Até o momento, o único isolamento de MPXV em animal silvestre naturalmente infectado foi realizado em esquilos da espécie *Funisciurus anerythrus*, entretanto, existem diversos indícios da infecção em outros roedores (revisado por Parker, 2013).

O *Cowpox virus* geralmente causa uma doença auto-limitada em humanos, mas a presença de condições debilitantes, como imunodeficiência, pode resultar em morte (Essbauer, 2010). Casos da doença já foram relatados na Europa, Ásia e África (Egito). Além disso, apesar de o vírus ter sido inicialmente associado às vacas de leite e ordenhadores, ele tem sido isolado de diversos animais (Essbauer, 2010; Amer, 2001; Vorou, 2008) como gatos, roedores e diversos animais de cativeiro ou de criação, como por exemplo, lhamas, elefantes, primatas, jaguatirica e mangustos (Figura 7) (Kurth, 2008; Cardeti, 2011; Hemmer, 2010; revisado por Girling, 2010).



**Figura 7: Lesões causadas por *Cowpox virus*.** A: Lesões observadas na face de jovem infectado após contato com rato infectado com CPXV (Wolfs, 2002). B: Lesões no focinho e cabeça de gato infectado com CPXV (Reynolds, 2008). C: Lesões ao redor do olho de elefante infectado (Kurth, 2008). D: Lesões na orelha de lhama infectada (Cardeti, 2011).

Roedores apresentando ou não sinais clínicos são os reservatórios do CPXV (Revisado por Becker, 2009) e estudos sorológicos nesses animais demonstraram que a presença de anticorpos anti-CPXV aumenta no final do verão e começo do outono, período em que populações de roedores crescem na Europa (Chantey, 1999). Dentre as espécies de roedores das quais o vírus já foi isolado estão: *Microtus agrestis*, *Rattus norvegicus*, *Rhombomys opimus* e *Meriones libicus*, indicando que o vírus pode apresentar múltiplos reservatórios (Essbauer, 2010).

Casos de doença causada por CPXV em humanos são frequentemente notificados em ambientes urbanos indicando que, apesar de o vírus possuir reservatório silvestre, ele se adaptou a esse novo ambiente (Ducournau, 2013; Glatz, 2010). Neste contexto, a infecção de gatos é de grande relevância e tem sido reportada como importante fonte de infecção atual para humanos, uma vez que estes animais podem preda roedores infectados, se infectarem e transmitirem o vírus para os seres humanos (Zijlstra, 2009). Outro fator importante é a manutenção de roedores como *pets*, uma vez que estes animais são os reservatórios do vírus na natureza (Becker, 2009; Campe, 2009).

Através de sequenciamento de genes específicos e ensaios de restrição enzimática, foi demonstrado que existe uma heterogeneidade genética entre amostras de CPXV que se correlaciona com a distribuição geográfica dos mesmos. Acredita-se que a variabilidade genética observada nessas amostras seja fruto de diferentes pressões seletivas encontradas em hospedeiros roedores distintos (Hansen, 2009; Okeke, 2014). Além disso, análises genéticas de vírus isolados em infecções de indivíduos correlacionados durante um surto, indicaram a co-circulação de duas amostras distintas de CPXV, o que pode ser um indício da presença de diferentes amostras em roedores de uma área próxima ou ainda que outro animal também possa atuar como fonte de infecção (Ducournau, 2013).

O VACV é o protótipo do gênero *Orthopoxvirus* e também da família Poxviridae (ICTV, 2014) e durante décadas foi utilizado como vírus vacinal em campanhas de vacinação contra a varíola. Atualmente, devido ao risco da utilização do *Variola virus* ou outros ortopoxvírus como armas biológicas, somente militares

e alguns profissionais da saúde nos Estados Unidos recebem vacinação com o VACV. Estudos mostram que pode haver a infecção de familiares e outras pessoas próximas através do contato direto com o local de aplicação da vacina ou através de fômites. Em pessoas com doenças prévias como dermatite atópica, eczema ou imunocomprometimento, a infecção pelo VACV pode causar eczema vaccinatum, uma condição grave (Marcinak, 2007; Garde, 2004; Vora, 2008).

Diversas pesquisas são realizadas com o intuito de produzir compostos anti-OPVs e vacinas mais seguras com o VACV. O vírus Ankara, uma linhagem de VACV modificada por passagens repetidas em fibroblastos de galinha, é bastante promissor por não causar efeitos adversos (Essbauer, 2010). Além disso, estudos têm sido realizados com o objetivo de desenvolver por engenharia genética vírus que exibam forte tropismo por células cancerígenas e que consigam controlar o desenvolvimento de tumores (Revisado por McFadden, 2005).

Com relação à ocorrência natural do VACV, diversos surtos de doença exantemática causada por linhagens do vírus são reportados em búfalos na Índia (*Buffalopox virus*) e em vacas leiteiras no Brasil, sendo que em ambos locais o homem é comumente infectado (Damaso, 2000; Trindade, 2003; Leite, 2005; Abrahão, 2009a; Gurav, 2011). Casos esporádicos e surtos de infecção por *Buffalopox virus* também foram relatados no Paquistão, Bangladesh, Rússia, Indonésia, Egito e Itália (revisado por Zafar, 2007).

Recentemente, foi identificado um novo OPV zoonótico na Geórgia (Europa), nomeado de *Akhmeta virus*. A infecção foi detectada em pacientes que lidavam com vacas leiteiras que apresentavam lesões exantemáticas em seus tetos. Apesar de não terem sido encontrados indícios de infecção recente (através da detecção de DNA viral e isolamento), observou-se a presença de anticorpos anti-OPV em humanos, vacas, roedores e mussaranhos da região próxima de onde os casos índices foram registrados. Pouco se sabe a respeito da circulação desse novo vírus, mas sua descoberta indica a relevância da emergência de novos ortopoxvírus e da necessidade de vigilância com relação aos mesmos (Vora, 2015).

### **1.3. *Vaccinia virus***

#### **1.3.1 Sintomatologia clínica, curso da infecção e eliminação viral**

A doença causada pelo *Vaccinia virus* no Brasil afeta principalmente o gado de leite e humanos (revisado por Kroon, 2011) e leva a formação de lesões ulcerativas. Em vacas lactantes, a doença recebe o nome de Vaccínia bovina (VB) ou Varíola bovina, que é caracterizada pelo surgimento de lesões no úbere (Figura 8A) e tetos (Figura 8B), enquanto que os bezerros, que se infectam através do contato durante a amamentação, apresentam lesões na mucosa oral (Figura 8C) e focinho (Figura 8D) (Leite, 2005). Após o aparecimento de lesões eritematosas, surgem vesículas, que se desenvolvem em pápulas e pústulas, que dão origem a úlceras, que por sua vez supuram, levando à formação de crostas. A cura ocorre espontaneamente e a doença normalmente tem um curso de 3 a 4 semanas (Trindade, 2003; Trindade, 2006; Leite, 2005; Lobato, 2005). É comum a ocorrência de infecções secundárias nos locais das lesões e a mastite é de grande relevância para o gado de leite (Lobato, 2005; Damaso, 2000). Búfalos infectados pelo *Buffalopox virus*, que é a linhagem de VACV circulante na Índia, apresentam manifestações clínicas semelhantes àquelas observadas durante a VB em vacas, entretanto, as lesões nos búfalos podem ser disseminadas (Gurav, 2011).

Análises da eliminação do vírus nas fezes desses animais demonstram que, mesmo após a cura das lesões, ainda são eliminadas partículas virais viáveis e dessa forma, a infecção não pode ser considerada resolvida. Quanto ao tropismo viral, observou-se, através de ensaios de imunoquímica, que órgãos linfoides, com relevância para placas de Peyer no íleo, são alvos importantes para o vírus, que também é encontrado no fígado e nos rins. Foi proposto que o vírus poderia se disseminar para órgãos linfóides através da infecção de linfócitos e macrófagos e que, no íleo, a infecção de células epiteliais e células caliciformes poderiam transportar o vírus ao lúmen do intestino, explicando assim a presença do mesmo nas fezes (Rivetti, 2013).





**Figura 8: Lesões causadas por VACV no gado. A e B:** Lesões nos tetos de vacas lactantes. **C:** Lesões na mucosa oral de bezerros. **D:** Lesões no focinho de bezerros (A e C: Leite, 2005 com adaptações; B e D: Assis, 2013 com modificações).

Adicionalmente a esses estudos, Abrahão e colaboradores (2009d) demonstraram a presença de DNA e partículas virais viáveis no leite, podendo ser essa uma forma alternativa de eliminação do vírus ou uma contaminação a partir de fragmentação de crostas das lesões nos tetos durante a ordenha. A primeira hipótese é corroborada por um estudo que detectou a presença de DNA viral em leite retirado com auxílio de sonda em vacas experimentalmente infectadas (DeOliveira, 2015).

Em humanos, a doença geralmente ocorre em ordenhadores que entram em contato com lesões de bovinos infectados durante a realização da ordenha manual, sendo assim, ela é considerada uma zoonose ocupacional (Trindade, 2003). As lesões são comumente observadas nas mãos e braços e apresentam padrão de evolução semelhante àquele descrito para bovinos (Figura 10 A, B, C, D), com linfadenopatia (Figura 10 E), febre e eventuais infecções



secundárias, sendo de 4 semanas o curso aproximado da doença (Trindade, 2004; Trindade, 2006; Trindade, 2009; Lobato, 2005; Silva-Fernandes, 2005). Humanos infectados com *Buffalopox virus* (BPXV) também apresentam os mesmos sinais clínicos e curso da infecção descritos para VACV no Brasil. A detecção de lesões na mucosa oral de crianças infectadas com BPXV que não apresentavam contato com animais domésticos ou silvestres é sugestiva de que o consumo de leite cru pode ser uma rota alternativa de disseminação do vírus (Gurav, 2011).



**Figura 9: Sinais clínicos da doença causada por VACV em humanos. A:** Pápula inicial. **B:** Evolução das lesões. **C e D:** Ampliação das lesões mostradas em A e B. **E:** Linfagite no braço esquerdo do paciente (Trindade, 2009).

Estudos *in vivo* em que amostras de *Vaccinia virus* foram inoculadas em camundongos via intranasal, revelaram que a utilização de amostras consideradas virulentas, como VACV-Western reserve (WR) levaram 100% dos animais a óbito no sexto dia após a infecção e os principais sinais clínicos apresentados foram piloereção, arqueamento dorsal e perda de peso, podendo haver balanopostite e alopecia periocular. Nos animais inoculados com a amostra não virulenta Guarani propriedade 2 (GP2), apesar de não serem

observados sinais clínicos, ocorre a produção de anticorpos e DNA viral é recuperado em fezes durante todo o curso da infecção, indicando seu caráter persistente. Além disso, DNA viral é recuperado na urina de animais infectados tanto com VACV-WR quanto com VACV-GP2 durante a fase aguda da doença (até o 7º d.p.i.), partículas infecciosas também são esporadicamente detectadas. Em amostras de saliva, somente DNA viral pôde ser detectado e apenas em animais infectados com a linhagem WR (Ferreira, 2008). A titulação viral dos órgãos dos animais infectados com amostras virulentas revelou a presença do vírus na traquéia, pulmões, coração, fígado, baço e cérebro, indicando a propagação sistêmica do vírus.

Através da utilização de via de inoculação intradérmica das amostras de VACV BeAn 58058, WR e Araçatuba em camundongos Balb/C, observou-se a formação de lesões exantemáticas típicas de poxvírus, iniciando-se com o inchaço no local (dia 2 p.i.), aparecimento de vesículas com lesões ulcerativas (dia 4 p.i.), evolução para pústulas com presença de pus (dias 13-17 p.i.), formação de crostas (dia 18 p.i.) e cicatrização completa após o vigésimo dia (Ferreira, 2008 c). Em animais experimentalmente infectados com o *Belo Horizonte virus* (VBH), uma amostra de VACV isolada de camundongos, foi observado o aparecimento de lesões na pele, com evolução para erupções cutâneas generalizadas e morte subsequente (Trindade, 2004).

Uma vez que foi proposto que partículas virais são eliminadas no leite de vacas infectadas com o VACV, foram realizados experimentos de inoculação de leite experimentalmente contaminado com a amostra não virulenta GP2 em camundongos Balb/c. Apesar de nenhum dos animais ter apresentado sinais clínicos, foi possível detectar DNA viral em swabs orais em períodos intermitentes, além de fezes, sangue, pulmões, coração, língua, rins, fígado e baço. Anticorpos neutralizantes foram detectados em 50% dos animais a partir do 20º dia após a infecção, com títulos variando de 1:80 a 1:160. Esses resultados são indícios de uma infecção sistêmica e possivelmente persistente, já que o DNA viral foi detectado até o 30º d.p.i. Além disso, a hipótese de que o leite contaminado possa ser uma rota alternativa de infecção é reforçada (Rehfeld, 2015).

### **1.3.2 Histórico do *Vaccinia virus* no Brasil e espectro de hospedeiros**

Os primeiros VACVs brasileiros foram isolados nas décadas de 1950 e 1960, sendo o BeAn58058 proveniente de um roedor naturalmente infectado do gênero *Orizomys* (gênero agora subdividido em diversas espécies) capturado na Floresta Amazônica no estado do Pará (daFonseca, 1998) e o segundo, o vírus SPAn232, detectado em um camundongo sentinela na floresta de Cotia em São Paulo (Ueda, 1978; daFonseca, 2002).

Após este período, somente com o início da notificação de surtos de Vaccinia Bovina em 1999, as pesquisas com o VACV se fortaleceram e indícios da circulação do vírus se tornaram cada vez mais presentes (Damaso, 2000). No início da década de 2000, os vírus Cantagalo e Araçatuba foram isolados a partir de amostras de bovinos e humanos infectados apresentando lesões exantemáticas características, nos estados de Rio de Janeiro e São Paulo, ambos na região sudeste do Brasil (Damaso, 2000; Trindade, 2003). Apesar de o sudeste brasileiro representar o epicentro com diversos surtos de VB reportados (Leite, 2005; Lobato, 2005; Trindade, 2006; Donatele, 2007; Megid, 2008; Abrahão, 2009a; Schatzmayr, 2011; Assis, 2012a), observa-se uma irradiação e indícios da circulação do vírus já foram demonstrados em todas as regiões do país (Figura 10).

Em 2009 foi reportado um surto de VB afetando o gado leiteiro e humanos no Tocantins (Medaglia, 2009) e outro em 2010 no estado do Pará (Assis, 2013), ambos na região norte do Brasil. Além disso, diversos surtos foram detectados em um estudo longitudinal em fazendas do Mato Grosso (região próxima à Floresta Amazônica) e Rondônia, sendo a dispersão do vírus atribuída ao transporte de gado e à movimentação dos ordenhadores (Quixabeira-Santos, 2011). Também na região norte do país, um estudo sorológico demonstrou a presença de anticorpos anti-OPV em moradores de uma região rural da Amazônia, na qual não existem relatos de surtos de VB (Mota, 2010).

Com relação às regiões Central, Nordeste e Sul, surtos de VB foram identificados mais de uma vez no estado de Goiás, com o vírus infectando gado e homem (Nagasse-Sugahara, 2004; Sant'Ana, 2013); um surto em

bovinos e humanos já foi reportado no Maranhão (Oliveira, 2013) e os vírus Pelotas 1 e Pelotas 2 foram isolados de uma lesão de cavalo no Rio Grande do Sul (Brum, 2010; Campos, 2010).



**Figura 10: Circulação de *Vaccinia virus* no Brasil** (Oliveira 2013, com modificações).

Além dos casos de infecção pelo VACV detectados em bovinos, humanos e cavalos, outros animais são implicados na cadeia de transmissão do vírus no Brasil. Dentre eles estão búfalos (Assis, 2012 b), macacos (*Cebus apella* e *Allouata caraya*) (Abrahão, 2010), animais domésticos (Peres, 2013), roedores (Abrahão, 2009a; Schatzmayr, 2011; Peres, 2016) incluindo capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) (Barbosa, 2014) e cutia (*Desyprocta* sp.) e outros pequenos mamíferos como quati (*Nasua nasua*) (Abrahão, 2010).

Estudos que avaliaram a presença de anticorpos anti-OPV em animais inseridos ou não em contexto de surto de VB revelaram resultados contrastantes. Abrahão e colaboradores (2009a) demonstraram a presença do mesmo vírus (*Mariana virus*) no gado, humanos e roedores (*Mus musculus*) durante um surto de VB, mas não encontraram indícios de infecção em animais

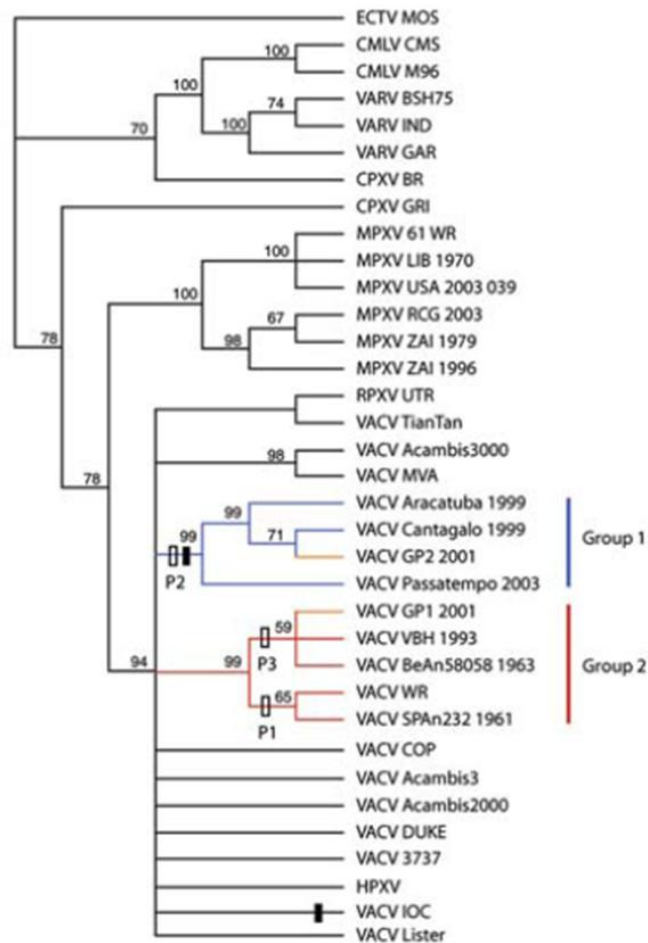
domésticos como cães, gatos e porcos. Além disso, Schatzmayr e colaboradores (2011) detectaram soroprevalência de 77,9% em humanos, 49,2% no gado leiteiro e 17,9% em roedores silvestres. Peres e colaboradores (2013) por sua vez detectaram baixa soroprevalência de anticorpos anti-OPV em pequenos roedores, sendo que cães, suínos e gatos apresentaram maior representatividade. Em um segundo estudo do grupo foi demonstrada a presença de DNA viral em gambás (*Didelphis albiventris*) e cães (Peres, 2016). Somando-se às detecções já descritas, o vírus Belo Horizonte foi isolado durante um surto de doença exantemática em camundongos *Swiss* de um biotério na Universidade Federal de Minas Gerais (Diniz, 2001; Trindade, 2004).

A origem do VACV no Brasil é um tema controverso e passível de muita investigação. Duas teorias são propostas: a primeira sugere que amostras vacinais utilizadas durante campanhas de erradicação da varíola teriam escapado para a natureza e se diferenciado ao longo do tempo em hospedeiros desconhecidos (Damaso, 2000). Já a segunda propõe que esses vírus já possuíam uma circulação natural em reservatórios desconhecidos (Trindade, 2007a; Drumond, 2008).

A comparação do genoma completo de clones vacinais (VACV-IOC) com amostras provenientes de surtos de VB revelou que estes se agrupam com *Horsepox virus*, mas os clones vacinais apresentam maior similaridade com o mesmo do que as amostras de campo. Além disso, as amostras de campo possuem maior perda genética quando comparadas com grupo irmão Dryvax. Com estes dados, Medaglia e colaboradores (2015) propuseram que as amostras brasileiras teriam se originado a partir da amostra vacinal IOC e co-evoluído com as mesmas durante o tempo. Entretanto, com a análise filogenética de diversos genes de amostras brasileiras e linhagens vacinais utilizadas no Brasil, foi observada a presença de substituições e marcadores próprios de cada vírus, indicando a possível existência de origens múltiplas para os vírus aqui isolados e que os mesmos estiveram sujeitos a diferentes pressões seletivas para adaptação à diferentes hospedeiros. Interessantemente, quando esses vírus são agrupados em uma árvore filogenética, os vírus brasileiros tendem a formar um clado distinto daquele

formado por linhagens vacinais, enfraquecendo, mas não excluindo completamente a possibilidade de sua origem vacinal (Drumond, 2007).

A partir da análise filogenética dos genes A56R, E3L e B19R foi criada uma divisão de linhagens de VACV em dois grupos (figura 11), o grupo 1 contém os vírus Araçatuba, Cantagalo, Guarani P2, Passatempo e outras amostras brasileiras e o grupo 2, os vírus Guarani P1, Belo Horizonte, BeAn 58058, SPAn323 e também a amostra protótipo VACV/WR (Trindade, 2007b), essa divisão também foi corroborada também pela análise das sequências dos genes C6L, C7L, K1L, K2L, K3L e B5R (Drumond, 2007). O grupo 1 caracteriza-se pela presença de uma deleção de 18 nucleotídeos no gene A56R, que codifica a hemaglutinina viral, enquanto representantes do grupo 2 não a possuem (Trindade, 2007b). Foi demonstrado também que existe uma deleção no gene que codifica a proteína de ligação a quimiocina CC (C23L) em linhagens do grupo 1, mas não do grupo 2 (Assis, 2012). Leite e colaboradores (2007) mostraram ainda que o gene A26L que codifica a proteína do corpúsculo de inclusão do tipo A é polimórfico entre amostras brasileiras, sendo presente em SPAn232, deletado em alguns vírus como VBH, BeAn e GP1 e com dois blocos de deleções de 12 e 21 pares de bases em outros (ARAV, GP2V, MURV e PSTV).



**Figura 11: Árvore filogenética de isolados brasileiros de VACV, linhagens vacinais e outros OPVs (Trindade, 2007b).**

Ensaio biológico de inoculação intranasal de isolados brasileiros e controles como WR e LST-But, corroboram os estudos filogenéticos e dividem as amostras brasileiras de VACV em dois grupos. O grupo classificado como 1 através de estudos filogenéticos, apresenta vírus pouco virulentos, que causam infecções subclínicas em modelo murino. Já os vírus do segundo grupo, são virulentos nesse tipo de modelo, causando sinais clínicos como piloereção, perda de peso e arqueamento dorsal, além de alta morbidade (Ferreira, 2008b). Campos e colaboradores (2011) também mostraram que o fenótipo de placa é diferente entre uma linhagem do grupo 1 e outra do grupo 2 isoladas de um mesmo equino, sendo as placas do primeiro grupo menores.

Outro estudo demonstrou ainda que vírus de placas pequenas e grandes podem ser isolados de uma mesma amostra de lesão, e análises subsequentes

desses clones purificados corroboraram que aqueles pertencentes ao grupo 2 eram virulentos em modelo animal, apresentavam multiplicação mais rápida e formavam cometas, enquanto que aqueles do grupo 1 eram avirulentos e se multiplicavam menos. Interessantemente, para alguns clones foi demonstrada a presença de marcadores moleculares de ambos os grupos, como por exemplo, os genes A56R e C23L característicos do grupo 2 e A26L do grupo 1. Tais dados indicam que existe uma grande diversidade de amostras circulantes e que pode haver recombinação entre as mesmas, podendo ser este um indicativo das origens múltiplas dessas amostras (Oliveira, 2015).

### **1.3.3 Roedores e *Vaccinia virus***

A detecção do VACV, seu DNA ou de anticorpos anti-OPV em roedores no Brasil, apesar de pouco explorada (dados resumidos na tabela 2), é de grande importância para o estudo da cadeia de transmissão do vírus no país. Dentre os vírus isolados a partir de animais naturalmente infectados, 3 são classificados no grupo 2 de VACVs brasileiros (BeAn58058, Span 232 e VBH) (daFonseca, 1998; daFonseca2002; Trindade, 2004) e um no grupo 1 (*Mariana virus*) (Abrahão, 2009), revelando uma diversidade de agentes circulantes. Além disso, os roedores infectados ou portadores de anticorpos anti-OPV são provenientes das áreas sudeste (daFonseca, 2002; Abrahão, 2009; Schatzmayr, 2001; Peres, 2013), norte (daFonseca, 1998) e possivelmente sul (Trindade, 2004), revelando também como essa infecção ocorre por todo o país.



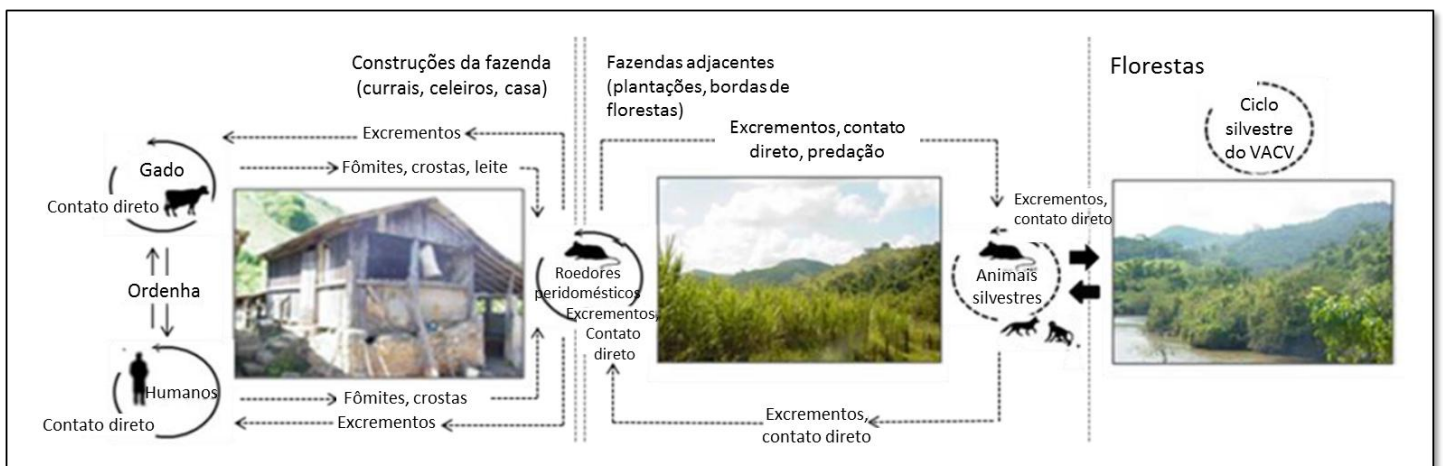
**Tabela 2: Detecção de OPV em pequenos roedores no Brasil**

<b>Espécie</b>	<b>Ano</b>	<b>Ocorrência</b>	<b>Tipo de detecção</b>	<b>Local</b>	<b>Referência</b>
<i>Oryzomys</i> sp.	1963	Natural	Isolamento	Floresta Amazônica - Pará	daFonseca, 1998
<i>Mus musculus</i>	1965	Sentinela	Isolamento	Floresta de Cotia - São Paulo	Ueda, 1978
<i>Mus musculus</i> - Swiss	2001	Natural em biotério	Isolamento, amplificação de DNA e teste de neutralização com soro anti-OPV	Biotério da UFMG - Belo Horizonte, MG (animais provenientes de Curitiba)	Diniz, 2001; Trindade 2004
<i>Mus musculus</i>	2009	Natural - surto de VB	Isolamento, amplificação e sequenciamento de DNA, PRNT	Mariana, Minas Gerais	Abrahão, 2009a
<i>Oligoryzomys nigripes</i> , <i>Akodon cursor</i> , <i>Nectomys squamipes</i> , <i>Euryoryzomys russatus</i>	2001 - 2011	Natural – períodos com surto de VB	PRNT	Áreas rurais do estado do Rio de Janeiro	Schatzmayr, 2011
<i>Oligoryzomys nigripes</i> , <i>Oligoryzomys flavescens</i> , <i>Sooretamys angouya</i>	2010	Natural - sem surto de VB no momento da coleta	Ensaio sorológicos: PRNT e neutralização viral	Áreas rurais do estado de São Paulo	Peres, 2013

Estudos em modelo murino revelaram que *Mus musculus* infectados via intranasal com VACV eliminam o vírus nas fezes e partículas virais podem ser manter viáveis por períodos de até 20 dias, em condições que mimetizam aquelas do período de maior relato de surtos de BV na região sudeste do Brasil, que é a estação seca (meses de junho e julho), sendo que o DNA viral pode ser encontrado em até 60 dias. Neste contexto é importante relatar que camundongos expostos às fezes de outros camundongos infectados tornaram-se também infectados (sem apresentarem sinais clínicos de doença), dando continuidade a um ciclo de transmissões. Dessa forma, este pode ser um veículo através do qual a transmissão do vírus ocorre no Brasil. Uma vez

protegido de danos ambientais nas fezes, o vírus poderia infectar outros roedores, humanos e bovinos através da contaminação de alimentos ou mesmo a aspiração das fezes (Abrahão, 2009b; Ferreira, 2008; Abrahão, 2009a). Além disso, estudos mostraram que camundongos podem se infectar quando expostos a fezes de bovino infectado com VACV, sugerindo um possível mecanismo através do qual a sua infecção poderia ocorrer durante os surtos de VB (D’Anunciação, 2012).

Abrahão e colaboradores relataram uma relação direta da presença de excrementos de roedores com a identificação de surtos de BV (Abrahão, 2009b). Levando em consideração dados citados acima, foi proposto um modelo hipotético de transmissão no qual o roedor é capaz de se infectar tanto com o vírus proveniente do ambiente silvestre como aquele proveniente de surtos em ambientes rurais, atuando como uma ponte para a transmissão do vírus entre esses dois ambientes (Figura 12) (Abrahão, 2009a).



**Figura 12: Adaptação do modelo hipotético proposto por Abrahão e colaboradores para a participação de roedores no ciclo de transmissão do VACV (Abrahão, 2009a com modificações).**

Neste modelo, as linhas cheias representam mecanismos já demonstrados, enquanto linhas tracejadas representam mecanismos de transmissão não comprovados cientificamente. É proposto que roedores peridomésticos seriam capazes de se infectar através do contato com possíveis reservatórios silvestres e levar o vírus para fazendas, nas quais poderia infectar humanos e bovinos. Além disso, um roedor peridoméstico não infectado, poderia adquirir o

vírus nas fazendas durante surtos de BV e levar o vírus para o ambiente silvestre, podendo assim infectar outros animais e dar continuidade a um ciclo silvestre da doença (Abrahão, 2009a).

#### **1.4. Ecologia de pequenos mamíferos**

O termo “pequenos mamíferos” é utilizado para definir mamíferos não voadores com menos de 1kg, mas é comumente adotado como referência para roedores e marsupiais. Esses animais correspondem a quase metade dos mamíferos identificados no mundo (Bennett, 1996). Os hábitos alimentares são diversos, podendo ser onívoros e frugívoros. Muitos se alimentam de insetos, frutos, sementes e pode haver necrofagia. Além disso, pode existir um padrão sazonal na alimentação, que varia de acordo com a disponibilidade de recursos. O consumo de restos de matéria orgânica e lixo por eles é comum em ambientes urbanos (Ramos, 2007).

De acordo com a Lista Anotada dos Mamíferos do Brasil (Paglia, 2012), no Brasil existem 9 famílias, 74 gêneros e 234 espécies de roedores, correspondendo a 34,7% dos mamíferos encontrados no país. O maior número de espécies é observado na Mata Atlântica, seguida pela Floresta Amazônica e Cerrado. Alguns gêneros e espécies de roedores são representados na figura 13.



**Figura 13: Exemplos de alguns roedores encontrados no Brasil. A:** *Akodon montenses*. **B:** *Calomys expulsus*. **C:** *Juliomys pictipes*. **D:** *Cerradomys subflavus*. **E:** *Necromys lasiurus*. **F:** *Nectomys squamipes*. **G:** *Oecomys* sp. **H:** *Oligoryzomys microtis*. **I:** *Oxymycterus judex* (Bonvicino, 2008).

Os roedores brasileiros apresentam extensa gama de adaptações fisiológicas envolvendo alimentação, período de maior atividade, período de reprodução e modo de locomoção. As áreas de vida e frequências de movimentação são relativamente semelhantes e a capacidade de se adaptar a ambientes antropizados é variável entre as espécies.

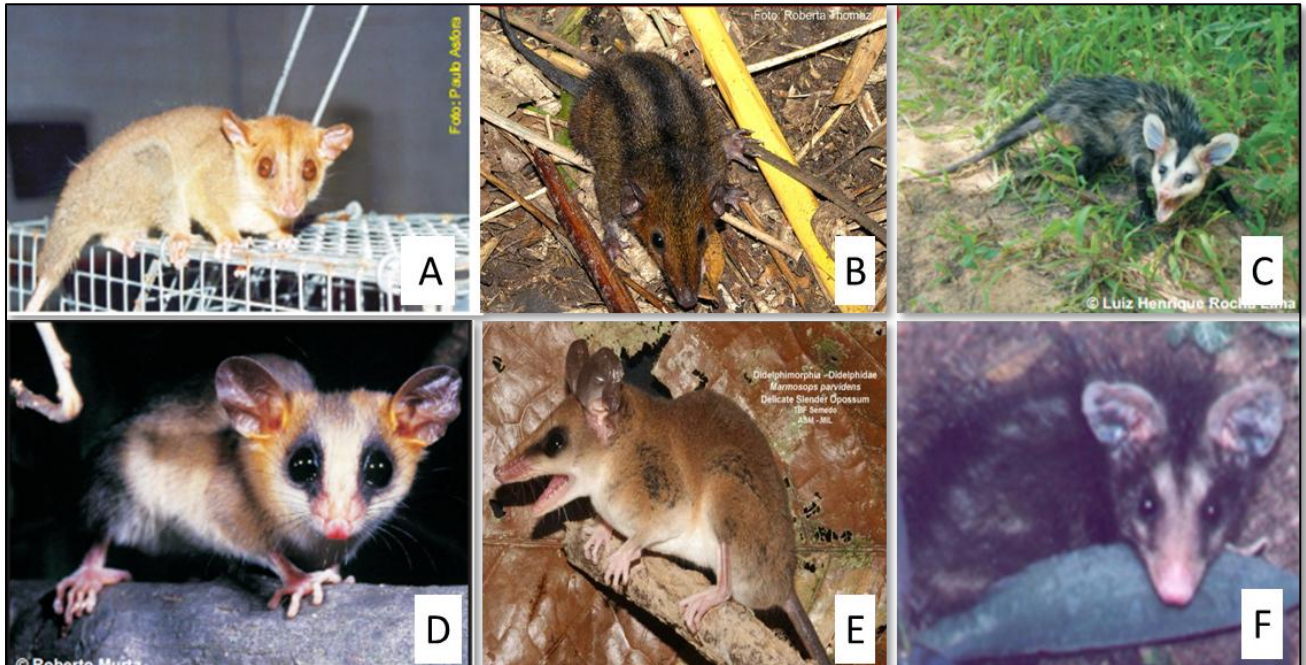
**Tabela 3: Características de alguns roedores encontrados no Brasil relevantes para o trabalho.**

Espécie/ gênero	Ocorrência	Reprodução	Hábitos alimentares	Atividade	Locomoção	Frequência de movimentação	Área de vida	Observações	Referências
<i>Akodon cursor</i>	MA, Ca, Ce	Todo o ano	Onívoro - insetívoro	Noturno	Terrestre	0 a 30 metros	0,12 – 0,68 ha	Adaptados a ambientes fragmentados	Geise, 2011; Rossi, 2011; Paglia, 2012
<i>Oxymycterus</i>	Am, MA, Ce, Ca, Pp	Todo o ano	Onívoro - Insetívoro	Noturno	Semi - fossorial	46,56 a 60,37 m	0,58 ha (machos) e 0,88 ha (fêmeas)	Considerados especialistas	Pedreira, 1998; Paise, 2006; Paglia, 2012
<i>Nectomys squamipes</i>	MA, Ce	Final da estação chuvosa	Onívoro	Noturno	Semi - aquático	20,4 a 90,4 m	0,3 – 1,6 ha	Adapta-se a ambientes diversos	Ernest, 1986; Rossi, 2011; Paglia, 2012
<i>Necomys lasiurus</i>	Todos os biomas brasileiros	Todo o ano	Frugívoro - onívoro	Diurno	Terrestre	27,4 – 31,3 m (machos) e 10,2 – 23,1 m (fêmeas)	0,2 – 0,52 ha	Generalistas	Becker, 2007; Pires, 2009; Rossi, 2011; Paglia, 2012
<i>Oligoryzomys</i>	Todos os biomas brasileiros	Todo o ano	Frugívoro - granívoro	Noturno	Terrestre	18,04 m (fêmeas) e 31,81 m (machos) para <i>O. nigripes</i>	0,9 – 4,13 ha para <i>O. nigripes</i>	Podem estar associados a ambientes antropizados	Pütker, 2006; Boiani, 2008; Braga, 2009; Miranda, 2009; Rossi, 2011; Paglia, 2012
<i>Cerradomys subflavus</i>	MA, Ce	Maiores captura de jovens no fim da estação chuvosa	Frugívoro - granívoro	-	Terrestre	-	-	Generalistas e associados a ambientes antropizados	Vieira, 1997; Bergallo, 2005; Percequillo, 2008; Paglia, 2012; Bonvicino, 2014;
<i>Oecomys catherinae</i>	MA, Ce, Ca		Frugívoro - granívoro	-	Arborícola	-	-	-	Paglia, 2012
<i>Calomys</i>	Ce, Ca, MA, Pp, Pt	Picos no início das estações seca e chuvosa	Frugívoro - granívoro	Noturno	Terrestre	Cerca de 30 m em ambientes antropizados	-	Podem estar associados a ambientes antropizados	Melo, 1984; Póvoa, 2007; Sommaro, 2010; Rossi, 2011; Paglia, 2012
<i>Trinomys</i>	MA, Ce, Ca	Todo o ano	Frugívoro - granívoro	Noturno	Terrestre	Menor que 30 m para <i>T. iheringi</i>	0,29 a 1,26 ha para <i>T. iheringi</i>	-	Brito, 2003; Percequillo, 2008; Cordeiro Júnior, 2006; Attias, 2009; Paglia, 2012
<i>Juliomys</i>	MA	-	Frugívoro – predador de sementes	Noturno	Arborícola	-	-	Pouco conhecimento acerca do gênero	Oliveira, 2002; Paresque, 2009; Rossi, 2011; Paglia, 2012; Fonseca, 2013; Cerberoncini, 2014
<i>Guerlinguetus ingrami</i>	MA	-	Frugívoro - granívoro	Diurno	Escansorial	-	Pequena	Possuem características que os permitem ocupar florestas fragmentadas	Ribeiro, 2009; Mendes, 2011; Paglia, 2012
<i>Mus musculus/ Rattus rattus</i>	Exótico / sinantrópico	Todo o ano	Onívoro	Noturno	Terrestre	< 30 m para <i>M. musculus</i> , 27 m (fêmeas) e 38 m (machos) de <i>R. rattus</i>	0,22 – 1,78 ha para <i>Rattus rattus</i> e 0,16 ha para <i>Mus musculus</i>	Vivem em grupos familiares	Ewer, 1971; Mackenzie, 1972; Bonvicino, 2014; Whisson, 2007; Stivanin, 2011; Phifer- Rixey, 2015

CE: Cerrado. CA: Caatinga. Pt.: Pantanal. Pp: Pampas. MA: Mata Atlântica. Am: Amazônia



Entre marsupiais, é encontrada uma família, 16 gêneros e 55 espécies, sendo essas registradas em maior quantidade na Floresta Amazônica, Cerrado e Mata Atlântica.



**Figura 14: Alguns marsupiais encontrados no Brasil relevantes para o trabalho.**  
**A:** *Caluromys philander* (Pontes). **B:** *Monodelphis americana* (<http://nelseience.blogspot.com.br/2015/11/genus-monodelphis-grupo-m-americana.html>). **C:** *Didelphis albiventris* (Stumpp,2009) **D:** *Gracilinanus agilis* (Stumpp, 2009). **E:** *Marmosops parvidens* (<http://www.mammalogy.org/marmosops-parvidens-1698>). **F:** *Didelphis aurita* (<http://www.planet-mammiferes.org/drupal/node/25?indice=Didelphis+aurita>)

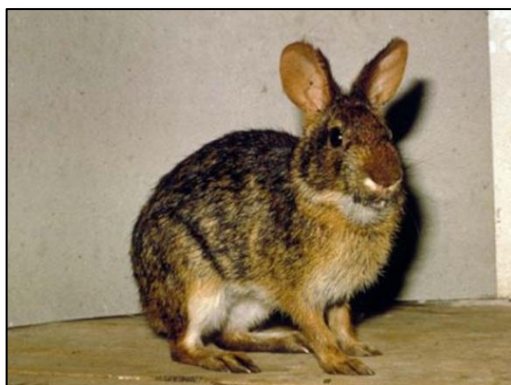
Os marsupiais da América do Sul geralmente possuem estações definidas de reprodução começando antes do período de chuvas. Esses animais são mais ativos durante períodos úmidos e possuem hábitos noturnos, não sociais e alimentação do tipo generalista (Revisado por Loretto, 2006). Os marsupiais com relevância para o presente trabalho são encontrados em áreas de Mata Atlântica e Cerrado, possuem estações reprodutivas semelhantes e são onívoros. É importante ressaltar que as áreas de vida, a movimentação e a capacidade de se adaptar a ambientes antropizados são bastante distintas (Tabela 4).

**Tabela 4: Características de espécies/gêneros de marsupiais relevantes para o trabalho.**

Espécie/ gênero	Ocorrência	Reprodução	Hábitos alimentares	Atividade	Locomoção	Frequência de movimentação	Área de vida	Observações	Referências
<i>Didelphis aurita</i> / <i>Didelphis albiventris</i>	CE, CA, Pt, Pp ( <i>D. albiventris</i> ), MA ( <i>D. aurita</i> )	Padrão poliétrico sazonal – estação chuvosa	Frugívoro – onívoro	Noturno	Escansorial	<1000 m	2,5 ha ( <i>D. albiventris</i> ) e 1,8 ha ( <i>D. aurita</i> )	Sinantrópicos associados a áreas urbanizadas	Sunquist, 1987; Freitas, 1997; Cárceres, 2002; Graipel, 2006; Sanchez, 2009; Oliveira, 2010, Paglia, 2012; Oliveira, 2015
<i>Gracilinanus microtarsus</i>	CE	Estação chuvosa	Insetívoro - onívoro	Noturno	Arborícola	24 m	0,12 – 0,09 ha (fêmeas) e 0,14 – 0,18 ha (machos)	São animais solitários e podem viver de um a dois anos	Stumpp, 2009; Pires, 2010; Paglia, 2012; Smith, 2012
<i>Marmosopsis incanus</i>	MA, CE, CA	Estação chuvosa	Insetívoro - onívoro	Noturno	Escansorial	28 m	0,15 ha (fêmeas) e 0,27 – 0,4 ha (machos)	Associados a ambientes antropizados e semelparidade observada em machos	Zangrandi, 2007; Loretto, 2008; Rossi, 2011; Paglia, 1012
<i>Monodelphis americana</i>	CE , MA	Ano todo/ estação chuvosa	Insetívoro - onívoro	Diurno	Terrestre	73,14 m	0,044 ha	Estudos indicam que podem ser semélparos	Eisenberg, 1992; Macrini, 2004; Solari, 2010; Rossi, 2011; Paglia, 2012
<i>Caluromys philander</i>	Am, MA, CE, Pt	Três vezes por ano, variando de acordo com a disponibilidade de alimento	Frugívoro - onívoro	Noturno	Arborícola	200 m	3,1 ha	Encontrados em áreas de mata e apresentam hábitos especialistas	Rossi, 2011; Paglia, 2012; Jeffrey, 2012; Nascimento, 2013; Macrini, 2014

CE: Cerrado. CA: Caatinga. Pt.: Pantanal. Pp: Pampas. MA: Mata Atlântica. Am: Amazônia

Além de roedores e marsupiais, dentre os pequenos mamíferos, encontra-se o *Sylvilagus brasiliensis* (Figura 15), a única espécie da ordem Lagomorpha descrita no Brasil. Esses animais são conhecidos popularmente como coelho ou tapeti e distribuem-se em todos os biomas do país (Paglia, 2012). Eles são pequenos, solitários, herbívoros, terrestres e com hábitos noturnos ou crepusculares (Revisado por Langguth, 2003). Geralmente vivem em florestas, mas podem se adaptar a bordas e pastagens. Sua prole é pequena (média de 1,2 filhotes por ninhada) e o período de gestação varia de acordo com o local onde são capturados (28 a 44 dias) (Malpica, 2008).



**Figura 15: Exemplo de *Sylvilagus brasiliensis*** (<http://www.mammalogy.org/sylvilagus-brasiliensis-666>)

### **1.5. Pequenos mamíferos como fonte de patógenos**

Roedores possuem grande relevância para a saúde pública, uma vez que podem transmitir e atuarem como reservatórios de diversos patógenos. Entre as doenças associadas a roedores estão a leptospirose, principalmente em ambientes urbanos; peste bubônica; hantavirose; febres hemorrágicas; doença causada por *Monkeypox virus*, angiostrongilose (Mackenzie 1972, Himsforth 2012); febre maculosa (Ogrzewalska, 2012), dentre outras. Através da análise de dados relacionados à detecção de vírus em roedores, Luis (2013) demonstrou que 179 diferentes vírus estão associados a esses animais. Além disso, 68 vírus zoonóticos foram documentados em espécies de roedores, evidenciando sua importância na emergência de doenças.

Com o aumento da população em centros urbanos, aumentam as chances de contato entre humanos e roedores, elevando os riscos de epidemias das



doenças, principalmente em aglomerados mais precários. O mesmo ocorre em ambientes rurais e silvestres após modificações do hábitat, levando a alterações nas dinâmicas populacionais e propiciando maior contato entre os roedores e humanos, animais domésticos e de criação (Revisado por Himsforth, 2012; Ministério da Saúde, 2002).

Devido à proximidade filogenética, a probabilidade de compartilhamento de patógenos entre humanos e outros animais é maior com mamíferos e, devido ao fato de roedores representarem o maior grupo de mamíferos, eles são capazes de abrigar diversos tipos de patógenos humanos. Outros aspectos que favorecem a participação de roedores na cadeia de transmissão de patógenos zoonóticos são: a rápida taxa de reprodução desses animais e o contato próximo que podem estabelecer com humanos. Estudos de captura de roedores em locais distintos dos Estados Unidos para busca por vírus causadores de febres hemorrágicas indicaram que a presença do vírus está negativamente correlacionada com a biodiversidade. Esse fato é explicado pela teoria da diluição proposta por Ostfeld, que preconiza que a maior biodiversidade de espécies de roedores em uma comunidade diminui a chance de contatos entre hospedeiros produtivos e assim, reduz a transmissão do mesmo entre os roedores hospedeiros e, conseqüentemente, para os humanos. Essa teoria se aplica principalmente para doenças transmitidas por roedores generalistas, que, após modificações antropogênicas conseguem se adaptar melhor ao novo ambiente e, por competição, eliminar espécies especialistas, aumentando sua densidade populacional e a chance de contato e transmissão do patógeno para humanos (Mills, 2006).

## II. JUSTIFICATIVA

Os vírus do gênero *Orthopoxvirus* são responsáveis por causar doenças no homem e em animais. Dentre eles, o *Variola virus*, erradicado através de campanhas de vacinação coordenadas pela Organização Mundial da Saúde e outros vírus que têm chamado atenção por seu potencial zoonótico e sua emergência em localidades distintas. É o caso de *Monkeypox virus*, que causa doença grave em humanos e cujos surtos são frequentemente reportados em países da África. O *Cowpox virus*, que apesar de causar patologia menos grave em humanos, causa doença recorrente em países da Europa e tem importante circulação em ambiente urbanos, associada à atividade predatória entre roedores e gatos e ao contato dos mesmos com outros animais e com humanos. No Brasil o ortopoxvírus circulante é o *Vaccinia virus*, que afeta principalmente o gado de leite e trabalhadores que lidam com esses animais.

No Brasil, o VACV foi isolado pela primeira vez na década de sessenta e desde o final da década de noventa, diversos surtos de vaccínia bovina tem sido relatados no país. A doença gera perda econômica, uma vez que a produção de leite é reduzida em animais infectados e trabalhadores muitas vezes são afastados de suas funções. Além disso, existe um impacto na saúde pública, uma vez que esses trabalhadores geralmente procuram tratamento médico e muitas vezes recebem medicamentos desnecessários devido à falta de conhecimento de clínicos a respeito da doença. É observado também impacto social durante surtos, pois é comum a utilização de mão de obra familiar em pequenas fazendas de produção de leite.

O hospedeiro natural do VACV ainda é desconhecido, mas existem evidências da participação de roedores na cadeia de transmissão do vírus. No Brasil, indícios da presença do vírus já foram obtidos de animais naturalmente infectados e em animal sentinela. Além disso, foi demonstrado que roedores eliminam partículas virais em suas fezes e são capazes de transmitir o vírus para outros roedores e também se infectar através do contato com fezes de bovinos infectados e a infecção também pode ocorrer através do leite bovino infectado com partículas virais.

Visto que no Brasil são encontradas cerca de 230 espécies de roedores e a maioria deles é de pequeno porte e que roedores são hospedeiros naturais do *Cowpox virus* e possivelmente de *Monkeypox virus*, além das informações acerca da infecção por VACV nesses animais, é importante estudar a circulação desses vírus em roedores brasileiros. Este estudo irá colaborar para o melhor entendimento da cadeia de transmissão do vírus e possibilitar a prevenção de novos surtos, que geram tantos danos para a economia leiteira e populações vulneráveis.

Uma vez que já foram encontrados indícios de infecção por OPVs em marsupiais e que estes animais podem apresentar comportamento sinantrópico, a avaliação da circulação de VACV nos mesmos também se faz importante.

Outro aspecto relevante da circulação de VACV é ausência de sua detecção em ambientes urbanos. A circulação e presença de doença causada por *Cowpox virus* em centros urbanos também estimulam a pesquisa por VACV nesses locais. A busca por esse vírus nesses roedores auxiliará no esclarecimento sobre sua presença ou ausência, se ocorre infecção não notificada ou se o vírus por motivos diversos não é capaz de infectar outros animais, incluindo o homem nesses ambientes.

### **III. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar a circulação de *Orthopoxvirus* em pequenos mamíferos de áreas urbanas, rurais e silvestres, do estado de Minas Gerais.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

3.2.1 Montar coleções de soros e tecidos de pequenos mamíferos de Minas Gerais;

3.2.2 Detectar a presença de DNA de *Orthopoxvirus* em roedores e outros pequenos mamíferos em amostras de fígado e soro;

3.2.3 Avaliar a presença de DNA de OPVs em diferentes vísceras disponíveis de animais com amostras positivas;

3.2.4 Determinar a espécie viral a partir da amplificação de diferentes alvos e sequenciamento;

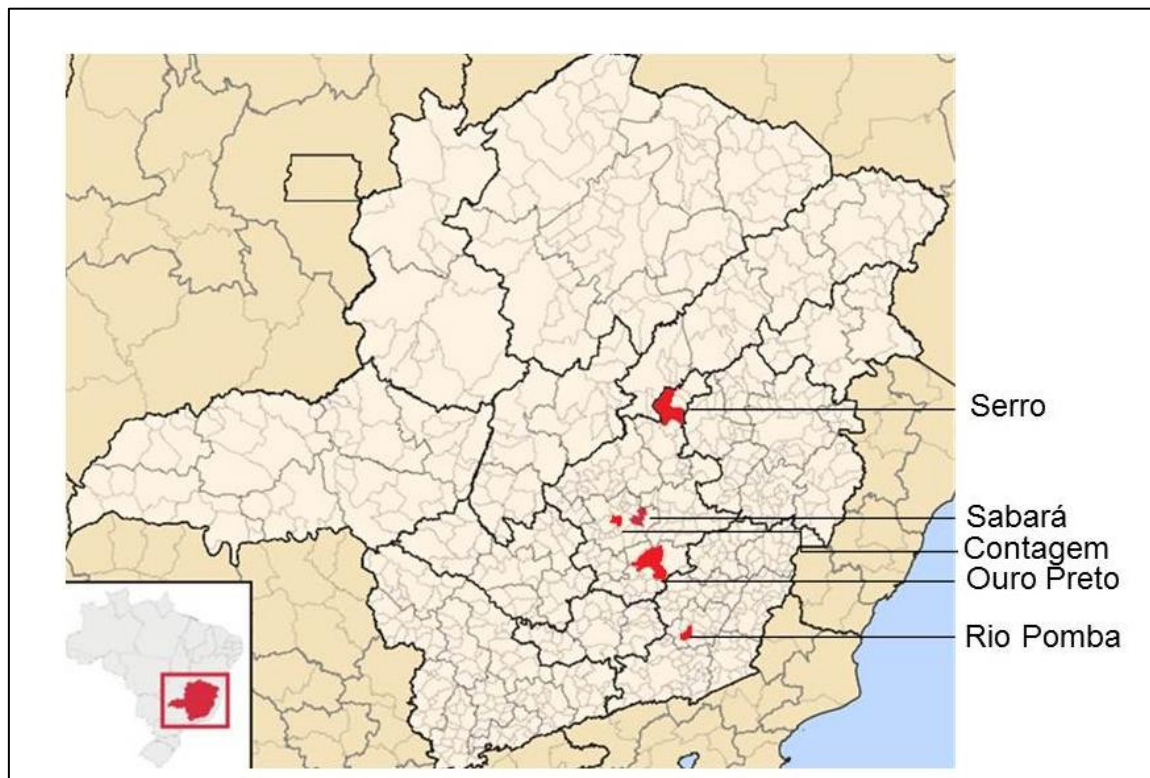
3.2.5 Avaliar a presença de anticorpos anti-OPV do tipo IgG em roedores;

3.2.6 Avaliar a presença de anticorpos neutralizantes anti-OPV em roedores e outros pequenos mamíferos.

## IV. METODOLOGIA

### 4.1 Coleções de pequenos mamíferos

As amostras de pequenos mamíferos utilizadas neste trabalho fazem parte da coleção do Laboratório de Vírus. Elas foram coletadas no estado de Minas Gerais (Figura 17) e divididas em quatro coleções de acordo com a data e metodologia de coleta (Tabela 5). Dentre elas: Sabará, Serro, Rio Pomba e Roedores urbanos.



**Figura 16: Áreas de coleta de pequenos mamíferos no estado de Minas Gerais** (Wikipedia com modificações).

**Tabela 5: Coleções de pequenos mamíferos utilizadas no trabalho.**

Coleção	Bioma	Histórico de Vaccínia bovina	Período de coleta	Área de coleta	Animais coletados	Total	Amostras disponíveis
Sabará	Transição entre Mata Atlântica e Cerrado	Não registrado	Abril/2011 a maio/2012 (mensalmente)	Mata	<i>Didelphis albiventris</i> (92), <i>Gracilinanus microtarsus</i> (10), <i>Akodon cursor</i> (1), <i>Oligoryzomys</i> sp. (4), <i>Guerlinguetus</i> sp. (1)	176	40 amostras de fígado e 123 amostras de soro
				Campo	<i>Didelphis albiventris</i> (16), <i>Necomys lasiurus</i> (39), <i>Guerlinguetus</i> sp. (1), <i>Cerradomys subflavus</i> (11), <i>Sylvilagus brasiliensis</i> (1)		
Serro	Transição entre Mata Atlântica e Cerrado	Casos notificados desde 2005 (Trindade, 2009; Assis, 2012a)	Setembro/2012 a setembro/2013 (bimensalmente)	Mata	<i>Marmosops incanus</i> (6), <i>Caluromys philander</i> (1), <i>Gracilinanus agilis</i> (1), <i>Didelphis aurita</i> (4), <i>Trinomys setosus</i> (10), <i>Oecomys catherinae</i> (1), <i>Akodon</i> sp. (1)	49	21 amostras de fígado e 47 amostras de soro
				Campo	<i>Gracilinanus agilis</i> (1), <i>Didelphis aurita</i> (1), <i>Cerradomys subflavus</i> (1), <i>Necomys squamipes</i> (1), <i>Calomys tener</i> (2), <i>Calomys expulsus</i> (2)		
				Peridomicílio	<i>Didelphis aurita</i> (8), <i>Mus musculus</i> (3), <i>Oligoryzomys nigripes</i> (3), <i>Rattus rattus</i> (3)		
Rio Pomba	Mata Atlântica	Relatos pessoais, mas sem registros	Setembro/2012 a setembro/2013 (bimensalmente)	Mata	<i>Monodelphis americana</i> (1), <i>Didelphis aurita</i> (6), <i>Gracilinanus microtarsus</i> (6), <i>Caluromys philander</i> (1), <i>Akodon cursor</i> (7), <i>Juliomys pictipes</i> (2), <i>Oligoryzomys nigripes</i> (2), <i>Guerlinguetus ingrami</i> (1)	174	67 amostras de fígado e 160 amostras de soro
				Campo	<i>Gracilinanus microtarsus</i> (1), <i>Akodon c.f. mystax</i> (28), <i>Akodon cursor</i> (16), <i>Calomys</i> sp. (17), <i>Calomys tener</i> (62), <i>Necomys lasiurus</i> (14), <i>Oligoryzomys nigripes</i> (2), <i>Necomys squamipes</i> (1), <i>Oxymycterus</i> sp. (1)		
				Peridomicílio	<i>Didelphis aurita</i> (3), <i>Oligoryzomys nigripes</i> (3)		
Urbanos	Sabará, Contagem (transição entre Mata Atlântica e Cerrado) e Ouro Preto (Mata Atlântica)	Não registrado	Novembro/2011	Peridomicílio (áreas antropizadas)	<i>Mus</i> spp (14)	14	13 amostras de fígado e 10 amostras de soro

#### 4.1.2 Sabará

Sabará faz parte da região metropolitana de Belo Horizonte, capital de Minas Gerais (Mapa da diversidade cultural de Sabará) e está inserida em uma zona de transição entre bioma de Mata Atlântica e Cerrado. Possui aproximadamente 134 mil habitantes (IBGE) e suas principais atividades econômicas são a metalurgia, extração de minérios (Senac) e turismo (Prefeitura de Sabará). A captura de pequenos mamíferos foi realizada em uma área denominada Unidade Fazendinha (19°53'19.30"S 43°50'18.31"O) pertencente ao Centro Universitário Metodista Izabela Hendrix, onde funcionou uma escola até o ano de 2012. A área possui forte declive e está próxima do Rio das Velhas. A vegetação é ombrófila caracterizada pela transição entre Mata Atlântica e Cerrado. Os arredores da Unidade Fazendinha possuem ocupação humana intensa e dentro da Unidade é observada a presença de trilhas utilizadas pelos locais, além de perturbação antropogênica como caça e presença de animais domésticos (Ázara, 2013).

As capturas foram licenciadas pelo Instituto Brasileiro de Meio Ambiente - IBAMA (n° 2055205/2007 SISBIO) e foram realizadas em parceria com o Laboratório de Ecologia Química de Vetores, ICB/UFMG e o Laboratório de Biologia da Conservação e Ecologia de Mamíferos ICB/UFMG. Para sua realização, três trilhas foram demarcadas na área de estudo (Figura 18). A primeira se insere em área de Cerrado (pasto) em local que sofre impacto antropogênico intenso, na qual é observada a presença de lixo e animais domésticos. As trilhas 2 e 3 (mata) caracterizam-se por vegetação típica de Mata Atlântica, sendo que a primeira sofre menos impactos antrópicos e a segunda é considerada uma mata com interferência.



**Figura 17: Trilhas demarcadas para captura de pequenos mamíferos da coleção Sabará.**

**A:** Vista panorâmica da área de estudo e demarcação das trilhas. **B:** Trilha 1 (campo) - Área de Cerrado com maior impacto antropogênico. **C:** Trilha 2 (mata)- Mata Atlântica com menor interferência antrópica. **D:** Trilha 3 (mata) - Área de Mata Atlântica com interferência humana (Ázara, 2013).

Cada trilha foi demarcada em 15 pontos com distância de 20 metros entre eles, totalizando 300 metros de trilha. Em cada um dos pontos foram instaladas uma armadilha do tipo Sherman (H. B. Sherman Traps, Inc., Tallahassee, FL) de 8x9x22 cm e uma gaiola Tomahawk® (Tomahawk Live Trap Co., Tomahawk, Wisconsin) de 48x15x15 cm alternadamente no chão ou elevadas (1,5 ou 0,5 metros). Cada armadilha continha como isca um pedaço de abacaxi e um chumaço de algodão embebido em óleo de fígado de bacalhau. As coletas duraram de abril de 2011 a maio de 2012 e foi realizada uma campanha por mês. As armadilhas eram deixadas nas trilhas por 4 noites, na segunda noite as iscas eram repostas e em cada manhã as armadilhas eram verificadas para a presença de animais.

Os animais capturados eram anestesiados com solução de xilazina e cetamina (5 mg/Kg de Xilazina + 90 mg/Kg de Cetamina) e então pesados, medidos e



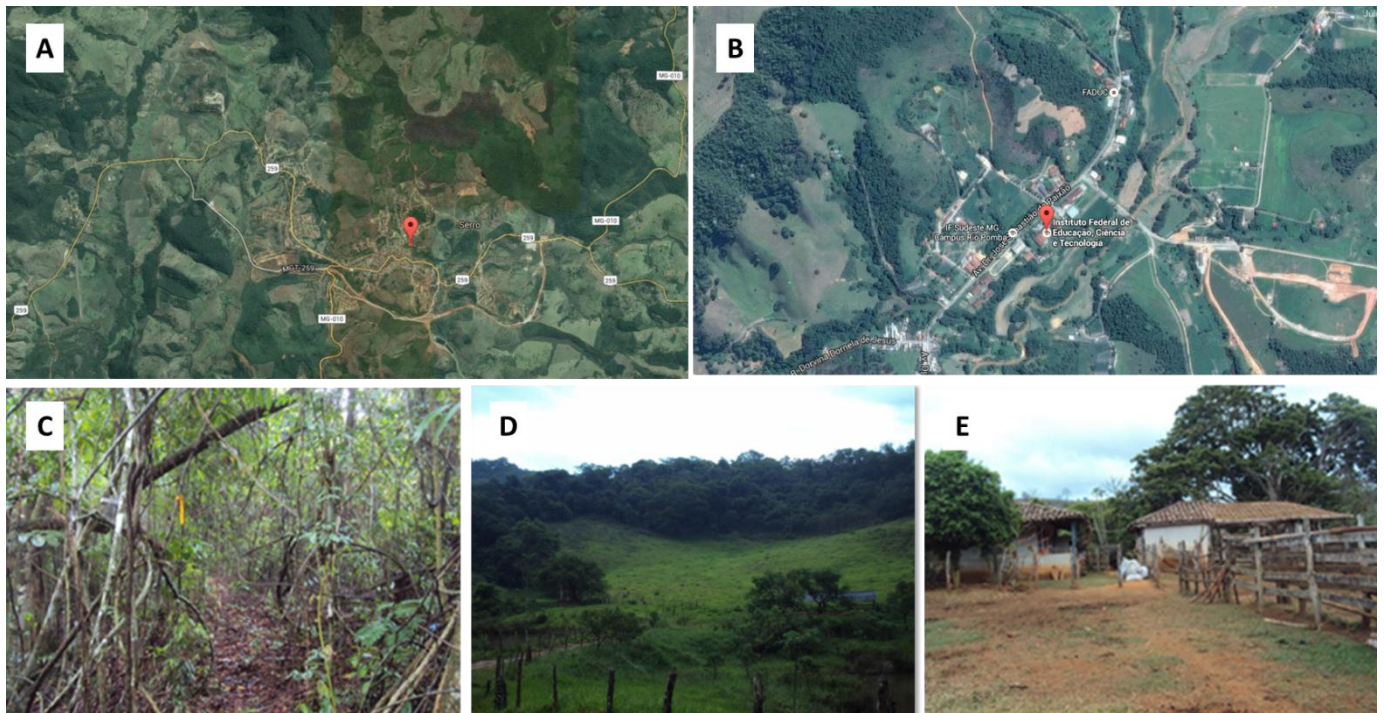
avaliados com relação às suas características morfológicas. O sangue dos animais foi coletado através de punção cardíaca e para a coleta de órgãos foi administrada uma sobredose de anestésicos até que o animal viesse a óbito. Tanto as vísceras como soro foram armazenadas em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  até seu processamento.

Todas as campanhas foram realizadas por pessoal treinado e seguiram regras de biossegurança adequadas para o manuseio de pequenos mamíferos (Mills, 1995). Para a manipulação dos animais foram utilizadas botas, macacões descartáveis, luvas cirúrgicas, luvas de borracha e máscaras com filtro "High Efficiency Particulate Air" (HEPA).

#### **4.1.3 Serro e Rio Pomba**

A cidade do Serro ( $18^{\circ} 36' 21.16'' \text{ S } 43^{\circ} 23' 12.89'' \text{ O}$ ) se localiza no Vale do Jequitinhonha, região central de Minas Gerais (Prefeitura do Serro) e está inserida em uma área de transição entre Mata Atlântica e Cerrado (IBGE). A economia da cidade se divide em agricultura familiar, movimentação financeira gerada por serviços públicos e fabricação e comercialização de queijo (Prefeitura do Serro). Uma vez que a produção de queijo é de grande relevância, a criação de gado leiteiro torna-se uma atividade bastante presente na cidade. É importante ressaltar que surtos de Vaccínia bovina têm sido notificados nas fazendas do município desde 2005 (Trindade, 2009; Assis, 2012a).

Como área de estudo foram escolhidas duas fazendas que apresentam como principal atividade a produção de leite para a fabricação de queijo. As duas propriedades apresentavam áreas de mata, pastagem e construções que correspondiam a currais e outras edificações (Figura 19). As capturas foram realizadas conforme descrito para Sabará, mas realizadas bimestralmente e durante o final de 2012 até o final de 2013. Em cada propriedade foram traçados 5 transectos, 2 em área de mata, 2 em campo e o último correspondente a áreas de construções (peridomicílio).



**Figura 18: Áreas de coleta em Rio Pomba e Serro. A:** Vista panorâmica do município do Serro, onde se inserem as duas propriedades nas quais as capturas aconteceram. **B:** IFET sudeste. Área de estudo situada na cidade de Rio Pomba. **C:** Área característica de mata. **D:** Área de pastagem (campo). **E:** Área de curral, considerada peridomicílio. Fonte: Google Earth (A e B); Borges, 2014 (C, D, E).

Rio Pomba (21° 16' 29" S 43° 10' 45" O) é uma cidade localizada na Zona da Mata Mineira a cerca de 250 km da capital do estado (Instituto Estrada Real), em uma área em que a economia é baseada em mini e pequenas propriedades rurais e agroindústrias (IF sudeste). A cidade possui cerca de 18 mil habitantes e está inserida em bioma de Mata Atlântica (IBGE). Existem relatos passados da ocorrência de *Vaccinia bovina* em Rio Pomba, entretanto, nos anos recentes não se tem notícias da circulação do VACV no município (Relatos pessoais).

A área de coleta de pequenos mamíferos foi delimitada dentro do campus do Instituto Federal de Ciência, Educação e Tecnologia do Sudeste de Minas (IFET) (Figura 19). O instituto oferece cursos voltados principalmente para a agropecuária e, dessa forma, apresenta criações de animais e plantações. Foram delimitados 10 transectos, 4 em áreas de pastagens (campo), 4 em áreas de mata e 2 nas proximidades de currais e galpões de criação de aves, suínos e coelhos. As capturas foram realizadas conforme descrito para Sabará no item 4.1.2.

As coletas realizadas no Serro e em Rio Pomba foram realizadas em parceria com os professores Adriano Paglia (Departamento de Biologia Geral-ICB/UFMG), Betânia Paiva Drumond (Universidade Federal de Juiz de Fora) e Silvio Leite Monteiro da Silva (Instituto Federal de Ciência, Educação e Tecnologia do Sudeste de Minas).

#### **4.1.4 Roedores urbanos**

A coleta de roedores urbanos foi realizada em parceria com o Dr. Urs Ben Müller, do Institute for Genetics, da University of Cologne, Alemanha. Os animais foram capturados em Ouro Preto (20°22'44.9"S 43°30'40.9"O) , Sabará (19°53'15.0"S 43°49'55.9"O - 19°53'19.4"S 43°50'18.4"O) e Contagem (19°53'15.0"S 43°49'56.1"O), áreas urbanas do Estado de Minas Gerais. Ouro Preto localiza-se na Serra do Espinhaço e está inserida na zona metalúrgica de Minas Gerais (quadrilátero ferrífero) (Site da Prefeitura de Ouro Preto). Possui uma população aproximada de 70 mil habitantes (IBGE) e sua economia baseia-se em atividades de mineração e metalurgia, sendo o turismo proeminente, uma vez que a cidade foi tombada como Patrimônio Histórico da Humanidade pela UNESCO (Itamaraty). Contagem faz parte da região metropolitana de Belo Horizonte (Prefeitura de Contagem) e apresenta cerca de 650 mil moradores (IBGE). É um dos municípios mais populosos de Minas Gerais e um importante pólo industrial do Brasil (Prefeitura de Contagem).

As capturas de roedores foram realizadas em novembro de 2011 em ambientes que apresentavam acúmulo de lixo ou indícios prévios da presença de roedores, como fezes (Figura 20). Foram utilizadas armadilhas do tipo *live trap* e uma colher de pasta de avelã e chocolate como isca. As armadilhas eram colocadas aos pares e em quinas e deixadas por um período de duas noites sem troca da isca. O manuseio e coleta de amostras dos animais capturados foram semelhantes ao descrito no item 4.1.2.



**Figura 19: Áreas de coletas de pequenos roedores urbanos. A: Contagem. B e C: Sabará. D: Ouro Preto.** Fonte: Google Earth

## 4.2 Sistema celular e vírus

### 4.2.1 Células BSC-40

BSC-40 é uma linhagem celular contínua derivada de células epiteliais de rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*). A cultura foi obtida da American Type Culture Collection (ATCC) (Maryland, EUA). O cultivo foi realizado em meio mínimo Eagle (Gibco™, USA), com acréscimo de 5% de soro fetal bovino (Cultilab, Brasil), glutamina e antimicrobianos – fungizona (2,5 mg/mL), penicilina (200 U/mL) e gentamicina (50 mg/mL). A cultura foi repicadas 3 vezes por semana e mantida em estufa a 37°C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. As células foram utilizadas em Ensaio de Redução de Placa por Neutralização (PRNT).

### 4.2.2 Vírus

A amostra Western Reserve (WR) de *Vaccinia virus*, foi gentilmente cedida pelo Dr. C. Jungwirth (Universitat Wurzburg, Alemanha) e a amostra Guarani Propriedade 2 (GP2) foi isolada pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Vírus durante um surto de Vacínia Bovina. Ambas fazem parte da coleção de



amostras do Laboratório de Vírus (ICB/UFMG). A amostra WR foi utilizada em ensaios de soroneutralização, ELISA e o DNA extraído como controle positivo para ensaios de qPCR e PCR convencional. DNA extraído da amostra viral GP2 foi utilizado como controle positivo para ensaios de PCR convencional que tinham como alvo o gene A26L.

### **4.3 Amostras e extração de DNA**

#### **4.3.1 Fígado e demais vísceras**

Amostras de fígado foram utilizadas como alvo para triagem do DNA de OPVs por qPCR e amplificação por PCR convencional. Para tanto, o DNA da amostra foi extraído com a utilização do PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen™). Inicialmente, 25 µg da amostra foram congelados com auxílio de nitrogênio líquido e então maceradas com graal de porcelana. O material resultante foi suspenso em mistura de tampão Pure Link Digestion Buffer e proteinase K (1800µl e 20µl, respectivamente). O restante do protocolo foi semelhante aquele descrito pelo fabricante. O DNA foi eluído em 50 µl de Pure Link Elution Buffer fornecido pelo kit. A quantificação e análise da qualidade do DNA foram avaliadas através da utilização do espectrofotômetro NanoDrop® ND-1000 (Thermo Scientific).

#### **4.3.2 Soro**

Amostras de soro foram utilizadas diretamente para reações de qPCR para o gene C11R após diluição de 1:100 em água ou tampão fosfato salina – PBS (NaCl 137 mM; KCl<sub>2</sub> 7 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,4 mM; pH 7,2). Para ensaios de qPCR para o alvo A56R e ensaios de PCR convencional, o DNA foi extraído através da utilização do PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen™) conforme descrito pelo fabricante. A verificação da qualidade e quantificação do DNA foram realizadas de maneira semelhante àquela descrita no item 4.3.1.

Diferentemente do restante das coleções, o DNA das amostras de soro da coleção de animais urbanos foi extraído antes da delimitação dos protocolos utilizados no trabalho e para tanto foi utilizado fenol, clorofórmio e álcool isoamílico (PCI) (Sambrook, 1989). A um volume inicial de 300 µl de amostra foi adicionado um volume igual de PCI (25:24:1). A solução foi misturada por

agitação em vortex, incubada a 37°C por 5 minutos e centrifugada a 17.900 x g por 5 minutos em temperatura ambiente. A fase aquosa (contendo o DNA) foi transferida para um novo tubo recebeu 10% de seu volume de Acetato de Sódio (3M e pH 5,5). Depois disso foi adicionado 2,5 vezes o volume da solução de etanol absoluto. As amostras foram homogeneizadas, incubadas em banho de gelo por 10 minutos e centrifugadas a 17.900 x g a 4°C. O sobrenadante foi descartado por inversão e após secagem a 37°C por cerca de 20 minutos, o DNA foi ressuspendido em 50 µl de água de injeção. A solução resultante foi incubada por 15 minutos em banho maria a 37°C para dissolução do *pellet* formado.

#### 4.4 Ensaios moleculares

##### 4.4.1 PCR em tempo real

Os ensaios de PCR em tempo real foram utilizados com o objetivo de triar as amostras para a presença de DNA de OPVs, uma vez que a técnica é sensível e adequada para utilização em um grande número de amostras. A qualidade da extração de DNA foi avaliada pela amplificação de controle interno, o gene  $\beta$ -actina de murinos, que também se mostrou eficiente para amplificação do DNA de marsupiais. Dois genes de OPV foram testados, C11R que codifica o fator de crescimento viral e A56R que codifica a proteína do corpúsculo de inclusão do tipo 1.

**Tabela 6: Iniciadores utilizados em ensaios de PCR em tempo real.**

Iniciador	Alvo	Sequência	Tamanho	Referência
$\beta$ -actina MurF/R	$\beta$ - actina de roedores	F: 5' AAATCGTGCGTGACATCAAAGA 3' R: 5' GCCATCTCCTGCTCGAAGTC 3'	63 pb	Laboratório de Vírus – não publicado
PAF/PAR	Gene C11R de OPVs	PAF: 5' CGCTACAACAGATATTCCAGCTATTCAG 3' PAR: 5' AGCGTGGATACAGTCACCGTGTA 3'	80 pb	Alves, PA – não publicado
HA F/R	Gene A56R de OPVs	F: 5' AACCACCGATGATGCGGAT 3' R: 5' TGCCACGGCCGACAATATAA 3'	158 pb (VACVs grupo 2) ou 140 pb (VACV grupo 1)	Oliveira, DB – não publicado

Descrição para alvos, sequências, tamanho do fragmento amplificado e referência.

#### 4.4.2 Soro

Uma vez que amostras de soro foram testadas sem extração de DNA, a viabilidade da amostra diluída 1:100 em PBS ou água foi inicialmente testada pela amplificação do gene  $\beta$ -actina (tabela 3), que é constitutivo para roedores, mas que também amplifica amostras de marsupiais e outros pequenos mamíferos. Para tanto foi utilizado o master mix SYBR® Green PCR Master Mix (Applied biosystems) e a máquina StepOne™ (Applied biosystems). Dez  $\mu$ l de reação constituída de 5  $\mu$ l de Master Mix, 0,2  $\mu$ M de cada iniciador (0,2  $\mu$ l), 1  $\mu$ l de amostra e 3,8  $\mu$ l de água de injeção foram adicionados aos poços de cada placa de 48 poços. As amostras foram testadas em duplicata e cada placa continha o controle negativo (água de injeção) e o controle positivo (10 ng de DNA extraído de fígado de camundongo suíço), em duplicata. A ciclagem utilizada foi: 94°C por 2 minutos para desnaturação inicial, 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 15 segundos e pareamento e extensão a 60°C por 1 minuto. Para construção da curva de desnaturação, a amostra foi aquecida a 95°C por 15 segundos, resfriada a 60°C por 1 minuto e novamente aquecida a 95°C por 1 minuto. Para amostras que não apresentaram amplificação em nenhuma das replicatas, a diluição de 1:10 foi testada para a amplificação com  $\beta$ -actina.

As amostras foram então testadas com os iniciadores PAF e PAR (Tabela 3) que amplificam o gene C11R, codificador do fator de crescimento viral e é encontrado em duas cópias no genoma dos ortopoxvírus. Para tanto, 1  $\mu$ l das amostras de soro diluídas 1:100 ou 1:10 (de acordo com o perfil de amplificação com  $\beta$ -actina) foram utilizadas. O ensaio é semelhante ao descrito para  $\beta$ -actina, com variação na concentração de iniciadores utilizados (0,8  $\mu$ M) e o controle positivo utilizado foi 10 ng de DNA extraído de VACV-WR. Foram consideradas positivas as amostras que amplificaram nas duas réplicas, que não apresentavam variação de mais de 1°C na temperatura de *melting* quando comparadas com o controle positivo ou que amplificaram em uma réplica para mais de um alvo de qPCR testado.

Amostras positivas no teste para C11R que apresentavam uma quantidade adequada de soro disponível tiveram o DNA extraído conforme descrito no item

4.3.2. O DNA (25ng) foi testado para a reação que amplifica o gene A56R (tabela 3). A reação utilizada é a mesma descrita anteriormente, com a concentração de 0,2  $\mu$ M de iniciadores e 10 ng DNA de VACV-WR como controle positivo.

#### **4.4.3 Fígado**

O DNA de amostras de fígado, extraído de acordo com o item 4.3.1 foi utilizado para triagem para ortopoxvírus através da amplificação do gene C11R (Tabela 6). A reação foi utilizada conforme descrito no item 4.4.2. As amostras foram testadas em duplicata utilizando 10 e 50 ng do DNA extraído. Essa mesma quantidade de DNA foi utilizada para reações que tiveram como alvo o gene A56R (tabela 6), também descritas no item 4.4.2.

#### **4.4.4 Demais vísceras**

Cinco animais positivos na triagem por qPCR ou algum outro teste de PCR foram selecionados para determinação do tropismo viral. Para tanto amostras disponíveis (baço, intestino grosso, intestino delgado, bexiga, gônada, coração) tiveram o DNA extraído conforme descrito no item 4.3.1. O DNA (25 ng) foi submetido a ensaios de qPCR para os genes C11R e A56R (Tabela 6) de acordo com o descrito no item 4.4.2.

#### **4.4.5 PCR convencional**

Algumas amostras positivas ou indeterminadas foram selecionadas para amplificação por PCR convencional. Para tanto, foram utilizados de 100 a 150 ng de DNA extraído de amostras de fígado e soro e a enzima GoTaq® Hot Start Polymerase (Promega) de acordo com as reações descritas para cada iniciador. O produto das reações foi analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida 8% corado com nitrato de prata.



**Tabela 7: Iniciadores utilizados em reações de PCR convencional.**

Iniciador	Alvo	Sequência	Tamanho	Referência
vgfF/ vgfR	Gene C11R	vgfF: 5' CGCTGCCTATGATAATCAGATCATT 3'	Reação 1: 380 pb	Abrahão JS, 2009c
vgfF2/ vgfR2	de OPVs	vgfR: 5' GATATAGTTGTGCCATAATTTTTAT 3'	Reação 2: 180 pb	
ATIiFL1/ATIiFL2	Gene A26L de OPVs	vgf2: 5' ACACGGTGACTGTATCCA 3'	Reação 1: 753 ou 787 pb	Assis FL, não publicado
ATIiFL1/ATIiFL3		vgfR2: 5' CTAATACAAGCATAATAC 3'	Reação 2: 166 ou 145 pb	
C23L F/R	Gene 23L de OPVs	ATI Irl1: 5' ACCACGTCTACTCGGCGA 3'	124 pb	
		ATI Irl2: 5' TGCATCGAGAGCGGAGGAGGA 3'		
		ATI Irl3: 5' CGATGCCAAGTACATCGACGA 3'		
		C23L F: 5' GCCTGTCCGGAGGACAAGGT 3'		Almeida G, não publicado
		C23L R: 5' ATGTCGCTGTCTTTCTTCTTCGC 3'		

Descrição para alvos, sequências, tamanho do fragmento amplificado e referência.

A reação do tipo *nested* que tem como alvo o gene C11R foi realizada com algumas modificações com relação à ciclagem descrita por Abrahão (2009c). Para as duas reações a ciclagem utilizada foi: para desnaturação inicial e ativação da enzima, o mix e amostra foram submetidos à temperatura de 95°C por 2 minutos, depois disso foram realizados 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 45 segundos, pareamento de iniciadores a 45°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos. Depois disso foi realizada uma etapa final de extensão a 72°C por 5 minutos. A concentração de iniciadores utilizada foi de 0,2 µM e foram utilizados 2 µl do produto da primeira reação como amostra para a segunda.

A ciclagem adotada para a PCR do tipo semi *nested* que tem como alvo o gene A26L foi iniciada por 2 minutos a 95°C e teve 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, pareamento dos iniciadores a 60°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto, com extensão final de 10 minutos a 72°C (Assis FL, não publicado). Foram utilizados 0,2 µM de iniciadores e 1 µl da reação inicial como molde para a segunda.

A reação de amplificação do gene C23L é composta pela desnaturação de 2 minutos a 94°C, 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, pareamento a 50°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos. Além

disso, é realizada uma etapa adicional de extensão a 72°C por 10 minutos. A concentração final dos iniciadores é de 0,2 µM (Almeida G, não publicado).

## **4.5 Sequenciamento**

### **4.5.1 Reação de sequenciamento**

O sequenciamento de amostras selecionadas foi realizado pelo método de Sanger em plataforma ABI3130 (Life Technologies). Para tal finalidade foram enviados para uma empresa terceirizada de 20 a 30 ng de DNA a cada 100 pb de amostra purificada de acordo com os métodos descritos a seguir. Para cada reação foram utilizados 10 pmol do iniciador direto ou reverso utilizado na reação de PCR e água para completar um volume final de 7,5 µl. O restante da reação foi executado pelos responsáveis pelo sequenciamento de acordo com as indicações do fabricante. Para cada reação de sequenciamento foram recebidos os gráficos de eletroferograma, os dados da corrida e a sequência resultante.

### **4.5.2 Análise das sequências**

As sequências obtidas foram analisadas inicialmente através do programa Sequence scanner (Applied biosystems) no qual é possível analisar o valor de Q de cada base e também o eletroferograma. Para a montagem de *contigs* foi utilizado o programa Asparagin Cenargen (EMBRAPA) e quando a qualidade da sequência não foi suportada por este programa, *contigs* foram montados manualmente no programa MEGA 6.0. Os *contigs* montados foram comparados com sequências de OPVs obtidas do banco de dados do NCBI com a utilização do programa MEGA 6.0.

### **4.5.3 Sequenciamento de amostras positivas na qPCR**

Amostras positivas na qPCR para o gene A56R foram amplificadas novamente diretamente do poço positivo da placa na qual a reação inicial foi realizada. Para tanto foram utilizados os iniciadores HA F/R nas concentrações de 0,2 µM, 2 µl de tampão 10X, 25mM de MgCl<sub>2</sub>, 10mM de dNTPs, 3 unidades de Taq, 1 µl de amostra e 13,9 µl de água de injeção para completar o volume final de 20 µl. A ciclagem utilizada foi: 10 minutos a 95°C para desnaturação

inicial, 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, pareamento a 60°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto e extensão final a 72°C por 10 minutos. A amplificação das amostras foi avaliada por eletroforese em gel de poliacrilamida 8% corado com nitrato de prata. As amostras em que houve amplificação foram precipitadas com EDTA. Foram adicionados 11,25 µl de EDTA (125mM) e 135 µl de etanol absoluto gelado a 45µl. A mistura foi centrifugada a 17.900 x g por 25 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi retirado e foram adicionados 120 µl de etanol 70% gelado ao precipitado. A amostra foi então centrifugada a 17.900 x g por 10 minutos, o sobrenadante foi removido e a amostra foi deixada à 37°C por 20 minutos para a secagem do restante do sobrenadante. O DNA foi eluído em 10 µl de água de injeção e as amostras foram deixadas em banho maria por 15 minutos a 37°C. As amostras foram quantificadas e sua qualidade analisada pela leitura em NanoDrop® ND-1000 (Thermo Scientific). As amostras foram sequenciadas de acordo com o item 4.5.1 e a análise das sequências de acordo com o item 4.5.2.

#### **4.5.4 Sequenciamento de amostras positivas em PCR convencional**

Amostras positivas foram reamplificadas de acordo com o alvo utilizado e as condições descritas no item 4.4.2 e o resultado da amplificação foi analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida 8% posteriormente corado com nitrato de prata. Para as amostras em que foi observada apenas uma banda após a reamplificação, foi adotada a metodologia de precipitação com EDTA descrita no item 4.5.3 e o sequenciamento foi realizado de acordo com o item 4.5.1.

Para as amostras que produziram bandas inespecíficas durante a reamplificação, 20 µl das amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 8% e coradas com SYBR® Gold nucleic acid gel stain (Thermo Fisher Scientific) por 20 minutos de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante. O gel foi analisado em transiluminador de luz azul, as bandas específicas foram cortadas com lâmina de bisturi e colocadas em microtubo de 0,6 mL novo com furo feito com agulha de 0,22 mm em sua base. Para triturar o gel, esse tubo foi colocado no interior de um tubo de 1,5 mL e esses tubos foram centrifugados por 1 minuto à 17900 x g. Foram adicionados 500 µl de

NaCl a 0,3 M e a mistura incubada 12-16 horas a 4°C sob agitação constante. A solução foi filtrada em filtro de ponteira para remoção do restante da acrilamida através da centrifugação por 5 minutos a 2000 x g à 4°C. Para precipitação do DNA, foram adicionados 800 µl de etanol absoluto gelado com 1 µl de glicogênio 5 µg/mL. A amostra foi homogeneizada 6 vezes por inversão, incubada por 30 minutos em freezer -70°C e então centrifugada a 2000 x g por 30 minutos à 4°C. O sobrenadante foi removido e para secar o etanol restante, a amostra foi incubada a 37°C por 15 minutos e então suspendida em 10 µl de água de injeção. O DNA resultante foi quantificado e teve sua qualidade analisada em espectrofotômetro NanoDrop® ND-1000 (Thermo Scientific). O sequenciamento foi realizado de acordo com o descrito no item 4.5.1.

## **4.6 Ensaio sorológicos**

### **4.6.1 PRNT**

O ensaio de soroneutralização por redução de placa detecta anticorpos neutralizantes que são protetores para a infecção (OIE 2008). O protocolo utilizado no presente trabalho é uma adaptação daquele proposto por Newman (2003). Animais que tinham uma quantidade adequada de soro disponível foram testados, sendo tal teste realizado em duplicata. Após desnaturação das proteínas do sistema complemento a 56°C por 30 minutos em banho maria, os soros foram diluídos 20 vezes em MEM sem adição de soro fetal bovino. O mesmo volume de MEM contendo 30 a 300 p.f.u. de VACV-WR foi adicionado e a mistura foi incubada a 37°C por 16 horas em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Para o controle de vírus, o mesmo protocolo foi adotado, com substituição dos soros testes por soro fetal bovino. As soluções foram inoculadas em placas de 6 poços contendo células BSC-40 com 90 a 100% de confluência. Cada placa continha um poço correspondente ao controle de vírus e outro ao controle de células. Para a adsorção viral as placas foram mantidas a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, sob agitação em intervalos de 10 minutos. Após 1 hora, foram adicionados 2 mL de MEM com 2% de SFB a cada poço e as placas incubadas por 48 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. As células foram fixadas com solução de formalina 10% (formaldeído 37%) por 30 minutos e então coradas com cristal violeta 1%.

As placas de lise foram contadas visualmente e o número de placas gerados em cada amostra foi determinado como a média dos poços da duplicata. A positividade foi definida com redução de 50% ou mais do número de placas observados em cada amostra com relação ao controle de vírus.

#### **4.6.2 ELISA para pequenos roedores**

O protocolo de ELISA para pequenos roedores detecta anticorpos anti-OPV do tipo IgG e foi padronizado por Borges (2013). Para os ensaios foram utilizadas placas de 96 poços de fundo reto do tipo Nunc maxisorp (Apogent, USA). Cada placa continha dois poços brancos (não recebiam soro), um controle positivo em duplicata (Balb/c infectado com os vírus GP1 ou GP1/GP2), dois controles negativos em duplicata (Balb/c não infectado), as amostras foram testadas em duplicata e a proteína A/G (Pierce, USA) foi utilizada como conjugado.

As placas foram sensibilizadas com partículas totais do vírus VACV-WR diluídas em tampão carbonato (0,01M e pH 9,6) a uma quantidade final de  $10^5$  p.f.u. por poço. As partículas virais foram inativadas em luz UV por 15 minutos e as placas foram incubadas a 4°C por aproximadamente 16 horas. Após este período os poços foram lavados 3 vezes em tampão PBS-Tween 0,5%. Para o bloqueio cada poço recebeu 100 µl de solução de bloqueio (leite desnatado 5% em PBS-Tween) e as placas foram incubadas por duas horas a 37°C. Após 3 lavagens em PBS-Tween foram adicionados os soros diluídos 100 vezes em solução de leite em pó diluído em PBS-Tween a 0,5%. Após incubação por 1 hora a 37°C as placas foram lavadas 3 vezes, receberam o conjugado diluído 10000 vezes em solução de leite em PBS-Tween a 0,5% e foram novamente incubadas novamente a 37°C por 1 hora. Após 5 lavagens, as placas foram reveladas com o substrato 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) (Sigma-Aldrich, EUA) de acordo com as instruções do fabricante e a reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico 1M. A leitura foi realizada a 450 nm no equipamento Multiskan Spectrum (Thermo Scientific).

As amostras foram analisadas com relação à variação entre as réplicas e quando esta foi maior que 20% a amostra foi testada novamente. O ponto de corte foi definido como a média dos controles negativos mais 3 vezes o desvio

padrão dos mesmos. Amostras que tiveram leitura 10% acima ou abaixo do ponto de corte foram consideradas indeterminadas.

## V. RESULTADOS

### .5.1 Resultados da triagem viral por qPCR e busca por anticorpos anti-OPV por PRNT e ELISA para a coleção Sabará

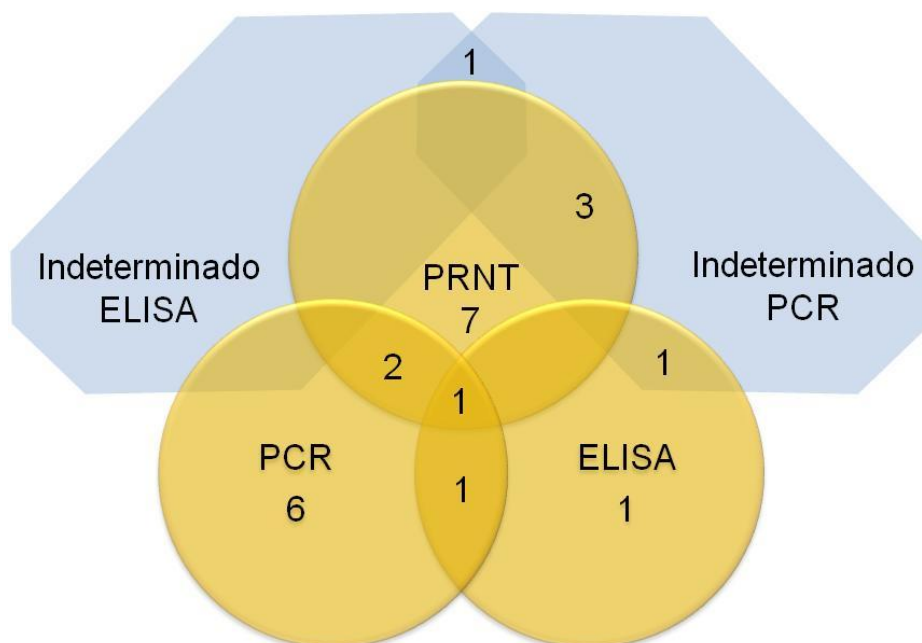
As amostras que estavam disponíveis da coleção Sabará foram testadas em ensaios de qPCR e sorológicos. As amostras de fígado foram testadas na qPCR para amplificação dos genes C11R e A56R e as amostras de soro para a amplificação do gene C11R. O teste de soroneutralização (PRNT) foi realizado em todas as amostras que apresentavam volume adequado e ELISA para as amostras de soro de roedores. Dentre as amostras de animais testados (Anexo 1), 23 foram positivas em pelo menos um teste (Tabela 8). Considerando-se os testes realizados em amostras de 126 animais, 22 foram positivas para pelo menos um teste realizado, o que corresponde a uma positividade total de 17,2%. Para os 47 roedores testados a positividade foi de 36,2% e para os 78 marsupiais testados, de 36,4% (Tabela 8).

**Tabela 8: Amostras de pequenos mamíferos da coleção de Sabará positivas em pelo menos um teste (qPCR, PRNT ou ELISA).**

Espécie	qPCR Fígado C11R	qPCR Fígado A56R	qPCR Soro C11R	PRNT	ELISA
<i>Oligoryzomys</i> sp.	IND	-	-	POS	-
<i>Oligoryzomys</i> sp.	IND	-	-	*	POS
<i>Necromys lasiurus</i>	-	-	POS	-	-
<i>Necromys lasiurus</i>	POS	-	POS	POS	*
<i>Necromys lasiurus</i>	-	-	-	POS	-
<i>Necromys lasiurus</i>	POS	-	-	-	-
<i>Necromys lasiurus</i>	*	*	IND	POS	*
<i>Necromys lasiurus</i>	POS	-	POS	-	-
<i>Necromys lasiurus</i>	*	*	-	-	POS
<i>Necromys lasiurus</i>	-	-	POS	-	-
<i>Necromys lasiurus</i>	POS	-	POS	POS	*
<i>Necromys lasiurus</i>	-	-	-	POS	-
<i>Necromys lasiurus</i>	POS	-	-	-	-
<i>Necromys lasiurus</i>	*	*	IND	POS	*
<i>Cerradomys subflavus</i>	POS	-	POS	-	-
<i>Cerradomys subflavus</i>	POS	POS	-	-	-
<i>Cerradomys subflavus</i>	POS	POS	-	-	-
<i>Didelphis albiventris</i>	*	*	-	POS	*
<i>Didelphis albiventris</i>	*	*	-	POS	*
<i>Didelphis albiventris</i>	*	*	-	POS	*
<i>Didelphis albiventris</i>	*	*	-	POS	*
<i>Didelphis albiventris</i>	*	*	-	POS	*

\*:Não testado. -: Negativo.

A coleção Sabará é composta por 176 animais capturados, entretanto, havia amostras disponíveis para a realização dos três testes (qPCR, ELISA e PRNT) para 32 amostras (18,2%), 75 amostras (42,6%) estavam disponíveis para a realização de dois testes, 21(11,9%) para um teste e para 48 (27,3%) animais capturados não havia amostra disponível para a realização de nenhum teste. Das amostras testadas em mais de um teste, sete foram positivas apenas no PRNT, seis na qPCR e uma no ELISA. Um animal apresentou amostras positivas nos três testes realizados (Figura 21).



**Figura 20: Concordância entre os resultados obtidos para os testes de qPCR, PRNT e ELISA para a coleção Sabará.** Os círculos em amarelo representam resultados positivos e as figuras azuis os resultados indeterminados.

Animais de três espécies/gêneros de roedores (*Oligoryzomys sp.*, *Necromys lasiurus* e *Cerradomys subflavus*) apresentaram amostras positivas em pelo menos um teste realizado. Uma amostra do gênero *Guerlinguetus sp.* apresentou resultados indeterminados no teste de qPCR (Tabela 9).



Tabela 9: Espécies de roedores e marsupiais da coleção Sabará testados, positivos e indeterminados nos testes moleculares e sorológicos.

Espécie	Total	Mata	Pasto	PCR testado	PCR positivo	PCR ind.	PRNT testado	PRNT positivo	ELISA testado	ELISA positivo	ELISA ind.	Total [P/T]
<i>Akodon cursor</i>	1	1 (100%)	0 (0%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0/0
<i>Oligoryzomys sp.</i>	4	4 (100%)	0 (0%)	4	0 (0%)	4 (100%)	2	1 (50%)	4	1 (25%)	0 (0%)	2/4 (50%)
<i>Guerlinguetus sp.</i>	2	1 (50%)	1 (50%)	2	0 (0%)	1 (50%)	2	0 (0%)	0	0	0	0/2 (0%)
<i>Necromys lasiurus</i>	39	0 (0%)	39 (100%)	30	8 (26,6%)	10 (33,3%)	27	5 (18,5%)	21	3 (14,3%)	2 (9,5%)	12/30 (40%)
<i>Cerradomys subflavus</i>	11	0 (0%)	11 (100%)	11	3 (27,3%)	6 (54,5%)	10	0 (0%)	10	0 (0%)	2 (20%)	3/11 (27,3%)
<b>Total roedores</b>	<b>57</b>	<b>6 (10,5%)</b>	<b>51 (89,5%)</b>	<b>47</b>	<b>11 (23,4%)</b>	<b>21 (44,7%)</b>	<b>41</b>	<b>6 (14,6%)</b>	<b>35</b>	<b>4 (11,4%)</b>	<b>4 (11,4%)</b>	<b>17/47 (36,2%)</b>
<i>Sylvilagus brasiliensis</i>	1	0 (0%)	1 (100%)	1	0 (0%)	0 (0%)	1	0 (0%)	-	-	-	0/1 (0%)
<i>Didelphis albiventris</i>	108	92 (85,2%)	16 (14,8%)	71	0 (0%)	9 (12,7%)	71	5 (7%)	-	-	-	5/71 (7%)
<i>Gracilinanus microtarsus</i>	10	10 (100%)	0 (0%)	7	0 (0%)	1 (14,3%)	3	0 (%)	-	-	-	0/7 (0%)
<b>Total marsupiais</b>	<b>118</b>	<b>102 (86,4%)</b>	<b>16 (13,6%)</b>	<b>78</b>	<b>0 (0%)</b>	<b>10 (12,8%)</b>	<b>74</b>	<b>5 (6,7%)</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>5/78 (6,4%)</b>
<b>Total</b>	<b>176</b>	<b>108 (61,4%)</b>	<b>68 (38,6%)</b>	<b>126</b>	<b>11 (8,7%)</b>	<b>31 (24,6%)</b>	<b>116</b>	<b>11 (9,5%)</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>22/128 (17,2%)</b>

Ind: Indeterminado. P: positivos. T: testados.

Com relação aos testes de qPCR, 126 animais tiveram amostras testadas e dessas, 11(8,7%) foram positivas em pelo menos um teste e 31(24,6%) foram consideradas indeterminadas. A positividade total para roedores foi de 23,4% e nenhum marsupial apresentou amostras positivas nesses testes. Os CTs observados para as amostras positivas variaram de 30,79 a 38,55.

Os ensaios de PRNT foram realizados em amostras de 116 animais, dos quais 11 (9,5%) foram positivos. O percentual de redução no número de placas virais variou de 0 a 77% e a positividade observada foi de 14,6% para roedores e 6,7% para marsupiais.

Uma vez que o teste de ELISA foi padronizado para roedores, somente amostras de soro provenientes desses animais foram testadas. Dentre os 47 animais testados, quatro apresentaram amostras de soro positivas, o que representa 11,4% dos mesmos e a mesma proporção de 11,4% foi observada para amostras indeterminadas.

## **5.2 Resultados de triagem viral por qPCR e busca por anticorpos anti-OPV por PRNT e ELISA para a coleção Serro**

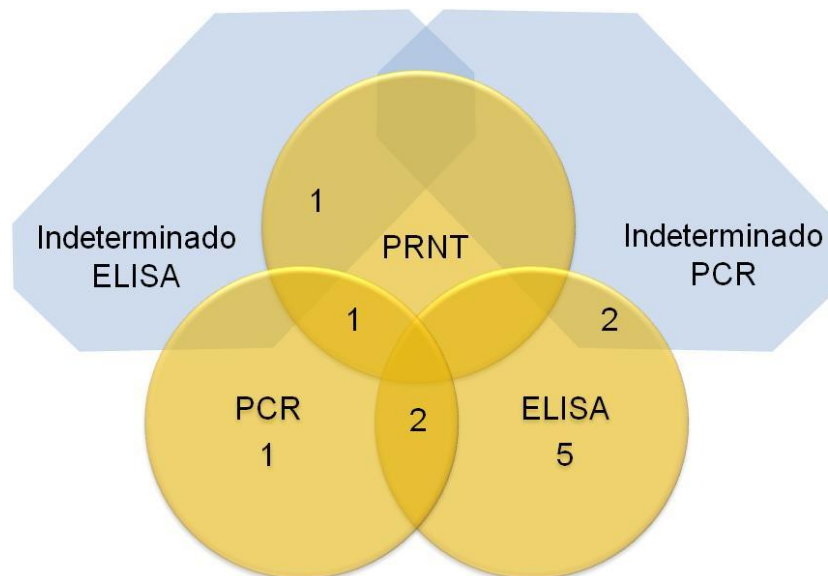
As amostras de soro dos animais da coleção do Serro foram testadas para a amplificação por qPCR para o gene C11R e para ensaios de PRNT. Os soros dos roedores foram adicionalmente testados em ensaios de ELISA. As amostras de fígado disponíveis foram testadas em ensaios de qPCR para amplificação dos genes C11R e A56R (Tabela 10). Animais das espécies/gêneros *Trinomys setosus*, *Calomys expulsos*, *Mus musculus*, *Rattus rattus*, *Akodon* sp. e *Nectomys squamipes* apresentaram amostras positivas.

**Tabela 10: Amostras de pequenos mamíferos da coleção Serro positivas em pelo menos um teste (qPCR, PRNT ou ELISA).**

<b>Espécie</b>	<b>qPCR Fígado C11R</b>	<b>qPCR Fígado A56R</b>	<b>qPCR Soro C11R</b>	<b>PRNT</b>	<b>ELISA</b>
<i>Trinomys setosus</i>	-	-	-	-	POS
<i>Trinomys setosus</i>	-	-	-	-	POS
<i>Trinomys setosus</i>	-	-	POS	-	POS
<i>Trinomys setosus</i>	-	-	IND	-	POS
<i>Trinomys setosus</i>	POS	-	POS	-	POS
<i>Trinomys setosus</i>	*	*	-	-	POS
<i>Trinomys setosus</i>	*	-	-	-	POS
<i>Calomys expulsos</i>	POS	-	POS	POS	-
<i>Mus musculus</i>	POS	POS	-	-	-
<i>Rattus rattus</i>	-	-	IND	-	POS
<i>Akodon sp.</i>	-	-	-	POS	IND
<i>Nectomys squamipes</i>	-	-	-	-	POS

\*:Não testado. -: Negativo.

Apesar de 49 animais terem sido coletados (Anexo 2), dois (4,0%) animais não apresentavam amostras disponíveis para a realização dos testes de qPCR, PRNT e ELISA. Para 25 (41,0%) animais os três testes foram realizados, dois testes foram realizados em amostras de 21 (42,8%) animais e amostras de um animal (2,0%) foram submetidas apenas a um teste, o que resultou em 47 animais testados no total. Nenhum dos animais testados apresentou amostra positiva em todos os três testes realizados, entretanto, foi observada concordância entre amostras positivas na qPCR e PRNT e na qPCR e ELISA (Figura 21).



**Figura 21: Concordância entre os resultados obtidos para os testes de qPCR, PRNT e ELISA da coleção Serro.** Os círculos em amarelo representam resultados positivos e as figuras azuis os resultados indeterminados.

Para os testes moleculares por qPCR, 46 animais tiveram amostras testadas, o que resultou em uma positividade de 6,5% e na porcentagem de 11,6% indeterminados. Dos 25 roedores testados, 3 foram considerados positivos (12%) e para os 21 marsupiais testados, a positividade foi de zero por cento. Os CTs das amostras variaram de 31,67 a 39,33.

Os resultados dos ensaios de PRNT foram dados para 46 amostras testadas, das quais 2 (4,3%) foram positivas. Roedores apresentaram uma positividade de 8% e nenhum marsupial apresentou amostras positivas neste teste. O percentual de redução de placas nos testes variou de 0 a 55,8%.

Os ensaios de ELISA foram realizados em amostras de 25 roedores e, destes, oito foram considerados positivos, resultado em positividade de 32%. Além disso, três amostras foram consideradas indeterminadas, correspondendo a 12% dos animais testados.

Tabela 11: Espécies de roedores e marsupiais da coleção Serro testados, positivos e indeterminados nos testes moleculares e sorológicos.

Espécie	Total	Mata	Pasto	Peri.	PCR testado	PCR positivo	PCR ind	PRNT testado	PRNT positivo	ELISA testado	ELISA positivo	ELISA ind	Total [P/T]
<i>Trinomys setosus</i>	10	10 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	8	2 (25%)	1 (12,5%)	8	0 (0%)	8	7 (87,5%)	1 (12,5%)	7/8 (87,5%)
<i>Calomys tener</i>	2	0 (0%)	2 (100%)	0 (0%)	2	0 (0%)	0 (0%)	2	0 (0%)	2	0 (0%)	0 (0%)	0/2 (0%)
<i>Calomys expulsos</i>	2	0 (0%)	2 (100%)	0 (0%)	2	1 (50%)	0 (0%)	2	1 (50%)	2	0 (0%)	0 (0%)	1/2 (50%)
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	3	0 (0%)	0 (0%)	3 (100%)	3	0 (0%)	0 (0%)	3	0 (0%)	3	0 (0%)	0 (0%)	0/3 (0%)
<i>Mus musculus</i>	3	0 (0%)	0 (0%)	3 (100%)	3	0 (0%)	1 (33,3%)	3	0 (0%)	3	0 (0%)	0 (0%)	1/3 (33,3%)
<i>Rattus rattus</i>	3	0 (0%)	0 (0%)	3 (100%)	3	0 (0%)	2 (66,7%)	3	0 (0%)	3	1 (33,3%)	0 (0%)	1/3 (33,3%)
<i>Oecomys catherinae</i>	1	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	1	0 (0%)	0 (0%)	1	0 (0%)	1	0 (0%)	0 (0%)	0/1 (0%)
<i>Akodon sp.</i>	1	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	1	0 (0%)	0 (0%)	1	1 (100%)	1	0 (0%)	1 (100%)	1/1 (100%)
<i>Cerradomys subflavus</i>	1	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	1	0 (0%)	0 (0%)	1	0 (0%)	1	0 (0%)	0 (0%)	0/1 (0%)
<i>Nectomys squamipes</i>	1	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	1	0 (0%)	0 (0%)	1	0 (0%)	1	0 (0%)	1 (100%)	1/1 (100%)
<b>Total roedores</b>	<b>27</b>	<b>12 (44,4%)</b>	<b>6 (22,2%)</b>	<b>9 (33,3%)</b>	<b>25</b>	<b>3 (12%)</b>	<b>4 (16%)</b>	<b>25</b>	<b>2 (8%)</b>	<b>25</b>	<b>8 (32%)</b>	<b>3 (12%)</b>	<b>13/25 (52%)</b>
<i>Didelphis aurita</i>	13	4 (30,8%)	1 (7,7%)	8 (61,5%)	12	0 (0%)	0 (0%)	13	0 (0%)	-	-	-	0/13 (0%)
<i>Marmosops incanus</i>	6	6 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	6	0 (0%)	0 (0%)	6	0 (0%)	-	-	-	0/6 (0%)
<i>Caluromys philander</i>	1	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	1	0 (0%)	1 (100%)	1	0 (0%)	-	-	-	0/1 (0%)
<i>Gracilinanus agilis</i>	2	1 (50%)	1 (50%)	0 (0%)	2	0 (0%)	0 (0%)	2	0 (0%)	-	-	-	0/2 (0%)
<b>Total marsupiais</b>	<b>22</b>	<b>12 (54,5%)</b>	<b>2 (9%)</b>	<b>8 (36,4%)</b>	<b>21</b>	<b>0 (0%)</b>	<b>1 (4,8%)</b>	<b>22</b>	<b>0 (0%)</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>0/22 (0%)</b>
<b>Total</b>	<b>49</b>	<b>24 (49%)</b>	<b>8 (16,3%)</b>	<b>17 (34,7%)</b>	<b>46</b>	<b>3 (6,5%)</b>	<b>5 (11,6%)</b>	<b>46</b>	<b>2 (4,3%)</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>13/47 (27,6%)</b>

Peri: Peridomicílio. Ind: Indeterminado. P: positivos. T: testados.

Uma vez que todos animais da espécie *Trinomys setosus* foram positivos ou indeterminados no ensaio de ELISA, foi realizada uma titulação daqueles disponíveis na diluição de 1:100, 1:200, 1:400 e 1:800. O soro controle positivo também foi testado como forma de comparação (Tabela 12).

**Tabela 12: Titulação dos soros de *Trinomys* sp. da coleção Serro em ensaio de ELISA.**

	1:100	1:200	1:400	1:800
<b>Controle positivo</b>	+	+	-	-
<b>Animal 1</b>	+	IND	-	-
<b>Animal 2</b>	+	IND	-	-
<b>Animal 3</b>	+	IND	-	-

IND: Indeterminado. +: Positivo. -: Negativo.

### **5.3 Resultados de triagem viral por qPCR e busca por anticorpos anti-OPV por PRNT e ELISA para coleção Rio Pomba**

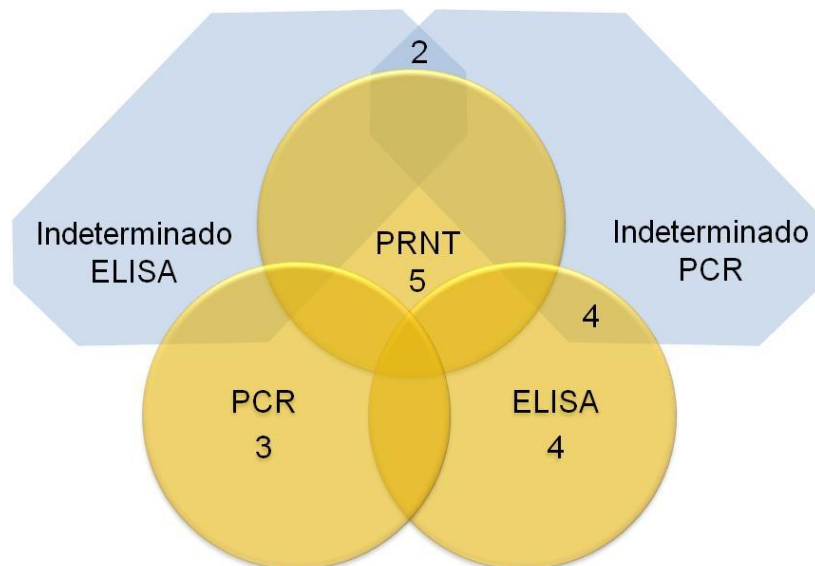
As capturas em Rio Pomba resultaram na coleta de 175 animais (Anexo 3) e destes, 107 tiveram amostras submetidas a algum ensaio, qPCR para triagem viral (C11R para amostras de soro e fígado e A56R para amostras de fígado) e ensaios sorológicos como PRNT e ELISA (somente roedores). As espécies/gêneros *Akodon cursor*, *Akodon c.f. mystax*, *Calomys tener*, *Necromys lasiurus*, *Didelphis aurita* e *Caluromys philander* foram considerados positivos em pelo menos um dos testes realizados (Tabela 13).

**Tabela 13: Amostras de pequenos mamíferos da coleção Rio Pomba positivas em pelo menos um teste realizado (qPCR, PRNT ou ELISA).**

<b>Espécie</b>	<b>qPCR Fígado C11R</b>	<b>qPCR Fígado A56R</b>	<b>qPCR Soro C11R</b>	<b>PRNT</b>	<b>ELISA</b>
<i>Akodon cursor</i>	*	*	IND	-	POS
<i>Akodon cursor</i>	-	-	IND	POS	POS
<i>Akodon cursor</i>	*	*	-	-	POS
<i>Akodon cursor</i>	*	*	IND	POS	IND
<i>Akodon cursor</i>	*	*	-	POS	-
<i>Akodon cursor</i>	-	-	-	-	POS
<i>Akodon cursor</i>	-	-	-	-	POS
<i>Akodon cursor</i>	-	-	-	-	POS
<i>Akodon c.f. mystax</i>	-	-	-	POS	-
<i>Akodon c.f. mystax</i>	-	-	IND	POS	-
<i>Calomys tener</i>	POS	-	*	-	*
<i>Calomys tener</i>	*	*	-	POS	-
<i>Calomys tener</i>	*	*	-	POS	-
<i>Necomys lasiurus</i>	-	IND	-	POS	*
<i>Necomys lasiurus</i>	POS	-	-	-	-
<i>Necomys lasiurus</i>	*	*	IND	-	POS
<i>Didelphis aurita</i>	*	*	-	POS	*
<i>Caluromys philander</i>	POS	-	POS	-	-

\*:Não testado. -: Negativo.

Dos 175 animais capturados na coleção Sabará, para amostras provenientes de 107 animais (61,4%) foi possível realizar os três testes (qPCR, PRNT e ELISA), em 45 (25,7%) foram realizados dois testes, em dez (5,7 %) apenas um teste e para os 13 (7,4%) restantes não foi possível realizar nenhum teste. Dentre essas amostras, cinco foram positivas apenas no PRNT, quatro apenas no ELISA, três apenas na qPCR, duas foram indeterminadas no ELISA e na qPCR e quatro foram positivas no ELISA e indeterminadas na qPCR (Figura 23).



**Figura 22: Concordância entre os resultados obtidos para os testes de qPCR, PRNT e ELISA da coleção Rio Pomba.** Os círculos em amarelo representam resultados positivos e as figuras azuis os resultados indeterminados.

Os testes de qPCR foram realizados em amostras de 155 animais e destes, três (1,9%) foram positivos e 25 (16,1%) indeterminados. Dos 137 roedores testados, dois (1,5%) foram positivos além de um (5,5%) dos 18 marsupiais testados.

O percentual de redução no número de placas nos testes de PRNT realizados variou de 10 a 95,6%. Dentre as 143 amostras testadas, 27 (18,9%) foram consideradas positivas, sendo a positividade observada para roedores e marsupiais de 6,2 e 6,3%, respectivamente.

Apenas soros de roedores foram testados no ELISA e dos 119 em que o teste foi realizado, sete (5,9%) apresentaram resultados positivos, sendo outros três (15,8%) considerados indeterminados.



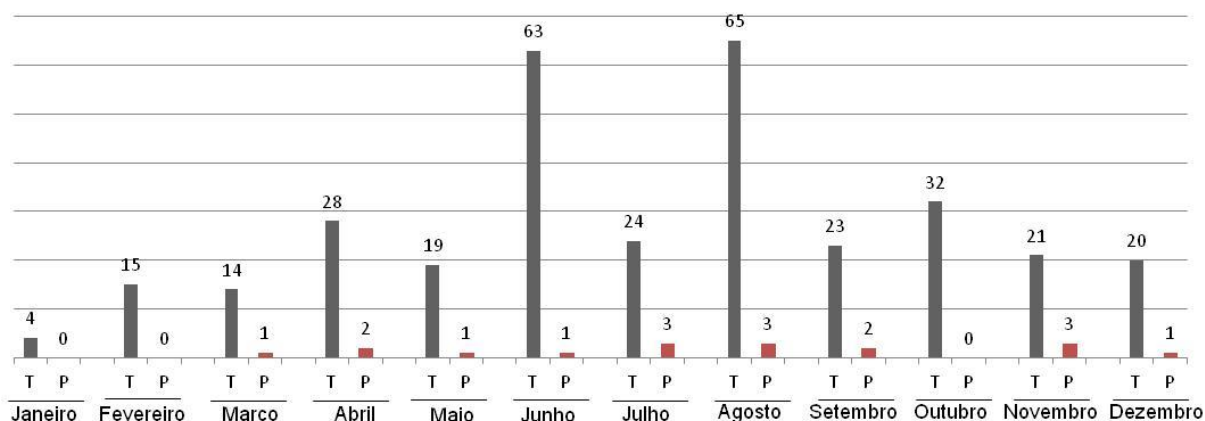
Tabela 14: Espécies de roedores e marsupiais da coleção Rio Pomba testados, positivos e indeterminados nos testes moleculares e sorológicos.

	Total	Mata	Pasto	Peri.	PCR testado	PCR positivo	PCR ind.	PRNT testado	PRNT positivo	ELISA testado	ELISA positivo	ELISA ind.	Total [P/T]
<i>Akodon sp.</i>	51	7 (13,7%)	44 (86,3%)	0 (0%)	43	0 (0%)	7 (16,3%)	41	5 (12,2%)	39	6 (15,4%)	3 (0,7%)	10/45 (22,2%)
<i>Calomys sp.</i>	79	0 (0%)	79 (100%)	0 (0%)	69	1 (0,1%)	10 (14,5%)	64	2 (0,3%)	61	0 (0%)	0 (0%)	3/69 (4,3%)
<i>Necromys lasiurus</i>	14	0 (0%)	14 (100%)	0 (0%)	13	1 (0,7%)	6 (4,6%)	11	1 (0,9%)	10	1 (0,1%)	0 (0%)	3/14 (21,4%)
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	7	2 (28,6%)	2 (28,6%)	3 (42,8%)	7	0 (0%)	0 (0%)	6	0 (0%)	6	0 (0%)	0 (0%)	0/7 (0%)
<i>Juliomys pictipes</i>	2	2 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	2	0 (0%)	0 (0%)	2	0 (0%)	1	0 (0%)	0 (0%)	0/2 (0%)
<i>Guerlinguetus ingrami</i>	1	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	1	0 (0%)	1 (100%)	1	0 (0%)	0	0 (0%)	0 (0%)	0/1 (0%)
<i>Nectomys squamipes</i>	1	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	1	0 (0%)	0 (0%)	1	0 (0%)	1	0 (0%)	0 (0%)	0/1 (0%)
<i>Oxymycterus sp.</i>	1	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	1	0 (0%)	0 (0%)	1	0 (0%)	1	0 (0%)	0 (0%)	0/1 (0%)
<b>Total roedores</b>	<b>156</b>	<b>12 (0,7%)</b>	<b>141 (90,3%)</b>	<b>3 (0,2%)</b>	<b>137</b>	<b>2 (1,5%)</b>	<b>25 (18,2%)</b>	<b>127</b>	<b>8 (6,3%)</b>	<b>119</b>	<b>7 (5,9%)</b>	<b>3 (15,8%)</b>	<b>16/140 (11,4%)</b>
<i>Didelphis aurita</i>	9	6 (66,7%)	0 (0%)	3 (33,3%)	9	0 (0%)	1 (11,1%)	8	1 (12,5%)	-	-	-	1/9 (11,1%)
<i>Gracilinanus microtarsus</i>	8	7 (87,5%)	1 (12,5%)	0 (0%)	7	0 (0%)	0 (0%)	6	0 (0%)	-	-	-	0/7 (0%)
<i>Monodelphis americana</i>	1	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	1	0 (0%)	0 (0%)	1	0 (0%)	-	-	-	0/1 (0%)
<i>Caluromys philander</i>	1	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	1	1 (100%)	0 (0%)	1	0 (0%)	-	-	-	1/1 (100%)
<b>Total marsupiais</b>	<b>19</b>	<b>15 (7,9%)</b>	<b>1 (5,3%)</b>	<b>3 (15,8%)</b>	<b>18</b>	<b>1 (5,5%)</b>	<b>1 (5,5%)</b>	<b>16</b>	<b>1 (6,2%)</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>2/18 (11,1%)</b>
<b>Total</b>	<b>175</b>	<b>27 (15,5%)</b>	<b>142 (81,1%)</b>	<b>6 (0,4%)</b>	<b>155</b>	<b>3 (1,9%)</b>	<b>25 (16,1%)</b>	<b>143</b>	<b>27 (18,9%)</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>18/158 (11,4%)</b>

Peri.: Peridomicílio. Ind: Indeterminado. P: Positivo. T: Testado.

#### 5.4 Distribuição das amostras positivas de acordo com o período de coleta

Analizando-se conjuntamente as coleções Sabará, Serro e Rio Pomba, as coleções foram realizadas durante todos os meses do ano e o maior número de capturas se deu nos meses secos de junho e agosto. Com relação as amostras positivas nos ensaios de qPCR, observou-se as seguintes positivities: 0% para janeiro, 0% para fevereiro, 7,1% para março, 7,1% para abril, 5,2% para maio, 1,6% para junho, 12,5% para julho, 4,6% para agosto, 8,7% para setembro, 0% para outubro, 14,3% para novembro e 5% para dezembro (Figura 23).



**Figura 23: Distribuição das amostras positivas e testadas em ensaios moleculares de acordo com o mês de captura para as coleções de Sabará, Serro e Rio Pomba.**

Com relação aos ensaios sorológicos de PRNT e ELISA, a positividade para cada mês foi: janeiro (50%), fevereiro (11,1%), março (11,1%), abril (7,1%), maio (11,1%), junho (6,4%), julho (16,0%), agosto (18,6%), setembro (27,3%), outubro (3,2%), novembro (20%) e dezembro (0%).

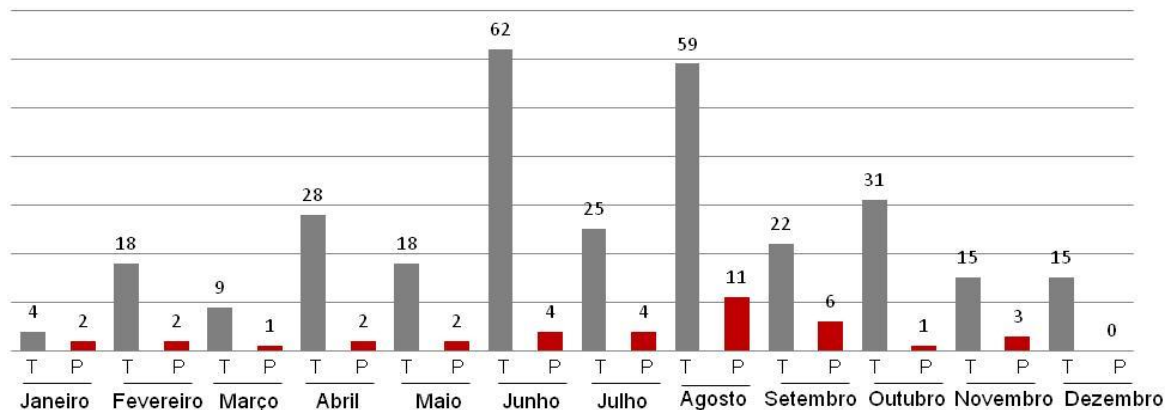


Figura 24: Distribuição das amostras positivas em PRNT de acordo com o mês de captura para as amostras das coleções de Sabará, Serro e Rio Pomba.

### 5.5 Distribuição das amostras positivas de acordo com a área de coleta

As coletas para as coleções Sabará, Serro e Rio Pomba foram realizadas em diferentes áreas e em todas elas foram encontradas amostras positivas (Tabela 15). As positivities para mata e pasto foram semelhantes e a positividade para peridomicilio foi mais baixa, assim como o número de animais capturados nesse local. Somente para a coleção Serro houve amostras positivas no peridomicilio e a maior proporção de animais positivos observadas para as coleções foram pasto para Sabará (23,5%), mata para Serro (33,3%) e mata para Rio Pomba (22,2%).

Tabela 15: Positividade por local de captura para cada coleção e para todas as amostras testadas.

	Sabará		Serro		Rio Pomba		Total	
	T	P	T	P	T	P	T	P
<b>Mata</b>	108	6 (5,5%)	24	8 (33,3%)	27	6 (22,2%)	159	20 (12,6%)
<b>Pasto</b>	68	16 (23,5%)	8	2 (25,0%)	142	12 (8,4%)	218	30 (13,8%)
<b>Peri.</b>	0	0	17	2 (11,7%)	6	0 (0%)	23	2 (8,7%)

T: Testado. P: Positivo. Peri.: Peridomicilio.

## 5.6 Comparação entre os resultados obtidos para as coleções Sabará, Serro e Rio Pomba

Uma vez que as coleções Sabará, Serro e Rio Pomba eram compostas por números maiores de pequenos mamíferos, é possível realizar uma comparação entre os resultados encontrados. Para Sabará foi observada uma positividade total de 17,2% e quatro espécies/gêneros de pequenos mamíferos apresentaram amostras positivas, entre esses pequenos mamíferos três gêneros/espécies eram de roedores e uma de marsupial. Com relação aos resultados para a coleção Serro, seis espécies/gêneros de roedores foram positivos, o que correspondeu a uma positividade total de 27,6%. Para Rio Pomba, a positividade observada foi de 11,4% e quatro espécies/gêneros de roedores e duas espécies de marsupiais tiveram amostras consideradas positivas.

**Tabela 16: Comparação entre os resultados obtidos para as coleções Sabará, Serro e Rio Pomba.**

	<b>Espécies positivas</b>	<b>qPCR P/T</b>	<b>ELISA P/T</b>	<b>PRNT P/T</b>	<b>Positividade total P/T</b>
<b>Sabará</b>	<i>Oligoryzomys</i> sp., <i>Necromys lasiurus</i> , <i>Cerradomys subflavus</i> , <i>Didelphis albiventris</i>	11/126 (8,7%)	4/35 (11,4%)	11/116 (9,5%)	22/128 (17,2%)
<b>Serro</b>	<i>Trinomys setosus</i> , <i>Calomys expulsos</i> , <i>Mus musculus</i> , <i>Rattus rattus</i> , <i>Akodon</i> sp., <i>Nectomys squamipes</i>	3/46 (6,5%)	8/25 (32%)	2/46 (4,3%)	13/47 (27,6%)
<b>Rio Pomba</b>	<i>Akodon cursor</i> , <i>Akodon c.f. mystax</i> <i>Calomys tener</i> , <i>Necromys lasiurus</i> , <i>Didelphis aurita</i> , <i>Caluromys philander</i>	3/155 (1,9%)	7/119 (5,9%)	27/143 (18,9%)	18/158 (11,4%)

P: Positivo. T: Testado.

## 5.7 Resultados da coleção de roedores urbanos

Na coleção de animais urbanos, 11 animais possuíam amostra para algum tipo de teste (molecular ou sorológico) (Tabela 16). Todos os animais testados foram negativos no ensaio de ELISA e nenhum apresentou quantidade suficiente de amostra para ser testada na soroneutralização. Quanto aos ensaios de qPCR, 3 amostras foram consideradas indeterminadas, uma proveniente de Contagem e as outras duas de Ouro Preto no ensaio de amplificação do gene C11R a partir de amostras de soro.

**Tabela 17: Resultados dos ensaios moleculares e sorológicos realizados com amostras dos animais da coleção de urbanos.**

Área de coleta	Espécie	qPCR Fígado A56R	qPCR Fígado C11R	qPCR Soro C11R	PRNT	ELISA
Contagem	<i>Mus spp.</i>	-	IND CT 31,51	-	*	-
Contagem	<i>Mus spp.</i>	-	-	-	*	-
Contagem	<i>Mus spp.</i>	-	-	-	*	-
Sabará	<i>Mus spp.</i>	-	-	-	*	-
Contagem	<i>Mus spp.</i>	-	-	-	*	-
Sabará	<i>Mus spp.</i>	-	-	-	*	*
Sabará	<i>Mus spp.</i>	-	-	-	*	-
Sabará	<i>Mus spp.</i>	-	-	-	*	-
Sabará	<i>Mus spp.</i>	*	*	*	*	*
Ouro Preto	<i>Mus spp.</i>	-	IND CT 32,35	-	*	-
Ouro Preto	<i>Mus spp.</i>	-	-	*	*	*
Ouro Preto	<i>Mus spp.</i>	-	IND CT35,39	-	*	-
Ouro Preto	<i>Mus spp.</i>	-	-	*	*	*
Ouro Preto	<i>Mus spp.</i>	-	-	-	*	-

CT: Cycle treshold. \*: Não testado. -: Negativo.

Uma vez que a coleção era composta por poucos animais, todas as amostras que apresentavam soro tiveram o DNA extraído e foram testadas em PCR convencional para os genes C11R e A26L. Duas amostras foram positivas para o gene C11R e um delas também foi positiva para o gene A26L.

## 5.8 PCR convencional de amostras positivas ou indeterminadas

Para confirmação dos resultados de amplificação do gene C11R por qPCR e para sequenciamento, algumas amostras positivas ou indeterminadas foram

submetidas à amplificação do mesmo alvo em PCR convencional. As amostras de soro, testadas sem extração nos ensaios de qPCR, tiveram o DNA extraído antes da PCR convencional. Dentre as 12 amostras testadas, três foram positivas (Tabela 18).

**Tabela 18: Resultados do teste de PCR convencional que teve como alvo o gene C11R.**

<b>Amostra</b>	<b>Matriz</b>	<b>Resultado</b>	<b>Coleção</b>
<i>Cerradomys subflavus</i>	Soro	Positivo	Sabará
<i>Didelphis albiventris</i>	Soro	Negativo	
<i>Didelphis albiventris</i>	Soro	Positivo	
<i>Necomys lasiurus</i>	Fígado	Negativo	
<i>Necomys lasiurus</i>	Fígado	Negativo	
<i>Necomys lasiurus</i>	Fígado	Negativo	
<i>Didelphis albiventris</i>	Fígado	Positivo	
<i>Necomys lasiurus</i>	Fígado	Negativo	
<i>Necomys lasiurus</i>	Fígado	Negativo	
<i>Calomys</i> sp	Fígado	Negativo	Serro
<i>Mus musculus</i>	Fígado	Negativo	
<i>Rattus rattus</i>	Fígado	Negativo	
<i>Trinomys</i> sp	Fígado	Negativo	
<i>Didelphis aurita</i>	Soro	Negativo	Rio Pomba
<i>Necomys lasiurus</i>	Fígado	Negativo	
<i>Calomys tener</i>	Fígado	Positivo	
<i>Akodon cursor</i>	Fígado	Negativo	

O segundo teste de PCR convencional realizado teve como alvo o gene A26L, três das 12 amostras testadas, 3 foram positivas (Tabela 19).

**Tabela 19: Resultados do teste de PCR convencional que teve como alvo o gene A26L.**

<b>Amostra</b>	<b>Matriz</b>	<b>Resultado</b>	<b>Coleção</b>
<i>Cerradomys subflavus</i>	Soro	Positivo	Sabará
<i>Didelphis albiventris</i>	Soro	Positivo	
<i>Cerradomys subflavus</i>	Fígado	Negativo	
<i>Cerradomys subflavus</i>	Fígado	Negativo	
<i>Necomys lasiurus</i>	Fígado	Negativo	
<i>Necomys lasiurus</i>	Fígado	Negativo	
<i>Mus musculus</i>	Fígado	Negativo	Serro
<i>Trinomys</i> sp	Fígado	Negativo	
<i>Calomys</i> sp	Fígado	Negativo	Rio Pomba
<i>Necomys lasiurus</i>	Fígado	Negativo	
<i>Caluromys philander</i>	Soro	Negativo	
<i>Necomys lasiurus</i>	Fígado	Positivo	

O teste de PCR convencional que teve como alvo o gene C23L foi realizado com 6 amostras e um delas foi positiva (Tabela 20).

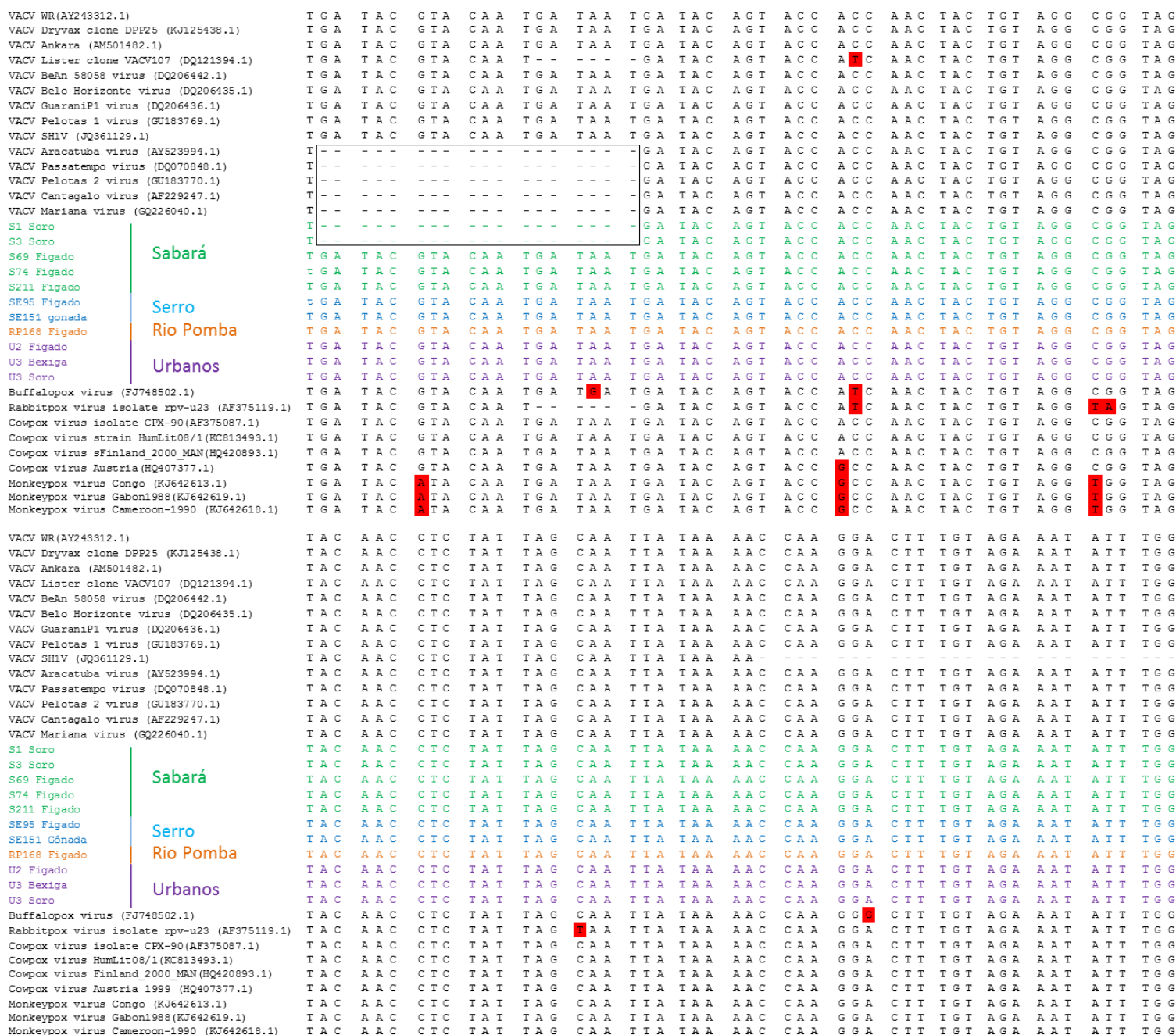
**Tabela 20: Resultados do teste de PCR convencional que teve como alvo o gene C23L.**

<b>Amostra</b>	<b>Matriz</b>	<b>Resultado</b>	<b>Coleção</b>
<i>Cerradomys subflavus</i>	Soro	Positivo	Sabará
<i>Necromys lasiurus</i>	Fígado	Negativo	
<i>Didelphis albiventris</i>	Fígado	Negativo	
<i>Didelphis albiventris</i>	Soro	Negativo	Serro
<i>Mus musculus</i>	Fígado	Negativo	
<i>Necromys lasiurus</i>	Soro	Negativo	Rio Pomba

## 5.9 Sequenciamento

### 5.9.1 Sequenciamento A56R

As amostras Sabará 1 (*Cerradomys subflavus* - soro), Sabará 3 (*Didelphis albiventris* - soro), Sabará 69 (*Cerradomys subflavus* - soro), Sabará 74 (*Cerradomys subflavus* - fígado), Sabará 211 (*Necromys lasiurus* - soro), Serro 95 (*Trinomys setosus* - fígado), Serro 151 (*Trinomys sp.* - gônada), Rio Pomba 168 (*Calomys tener* - fígado), Urbano 2 (*Mus spp.* - fígado), Urbano 3 (*Mus spp.* - bexiga) e Urbano 3 (*Mus spp.* - soro) foram escolhidas para o sequenciamento uma vez que geraram amplificação na qPCR para o gene A56R (Figura 25).



**Figura 25: Alinhamento de seqüências de 102 pares de bases obtidas para o gene A56R e seqüências de outros OPVs. A deleção de 18 nt observada em VACVs do grupo 1 está evidenciada e em vermelho são mostrados nucleotídeos não conservados. Em verde estão as amostras de Sabará, azul Serro, laranja Rio Pomba e roxo roedores urbanos.**

### 5.9.2 Sequenciamento de C11R

As amostras Sabará 64 (*Didelphis albiventris* - soro) e Sabará 148 (*Calomys tener* - soro) positivas na PCR convencional para o gene C11R foram sequenciadas (Figura 26).





VACV WR (AY243312.1)	T A C	A C G	G T G	A C T	G T A	T C C	A C G	C T A	G A G	A T A	T T G	A C G	G T A	T G T	A T T	G T A	G A T	G C T	C T C	A T G	G T T
VACV SPAN 232 virus (AY523995.1)	T A C	A C G	G T G	A C T	G T A	T C C	A C G	C T A	G A G	A T A	T T G	A C G	G T A	T G T	A T T	G T A	G A T	G C T	C T C	A T G	G T T
VACV Guarani P1 virus (DQ206440.1)	T A C	A C G	G T G	A C T	G T A	T C C	A C G	C T A	G A G	A T A	T T G	A C G	G T A	T G T	A T T	G T A	G A T	G C T	C T C	A T G	G T T
VACV Guarani P2 virus (DQ206441.1)	T A C	A C G	G T G	A C T	G T A	T C C	A C G	C T A	G A G	A T A	T T G	A C G	G T A	T G T	A T T	G T A	G A T	G C T	C T C	A T G	G T T
VACV Aracatuba virus (AF503170.1)	T A C	A C G	G T G	A C T	G T A	T C C	A C G	C T A	G A G	A T A	T T G	A C G	G T A	T G T	A T T	G T A	G A T	G C T	C T C	A T G	G T T
VACV Cantagalo virus (KT013210.1)	T A C	A C G	G T G	A C T	G T A	T C C	A C G	C T A	G A G	A T A	T T G	A C G	G T A	T G T	A T T	G T A	G A T	G C T	C T C	A T G	G T T
VACV Passatempo (DQ085462.1)	T A C	A C G	G T G	A C T	G T A	T C C	A C G	C T A	G A G	A T A	T T G	A C G	G T A	T G T	A T T	G T A	G A T	G C T	C T C	A T G	G T T
VACV IOC clone B141 (KT184690.1)	T A C	A C G	G T G	A C T	G T A	T C C	A C G	C T A	G A G	A T A	T T G	A C G	G T A	T G T	A T T	G T A	G A T	G C T	C T C	A T G	G T T
VACV Lister clone 107 (DQ121394.1)	T A C	A C G	G T G	A C T	G T A	T C C	A C G	C T A	G A G	A T A	T T G	A C G	G T A	T G T	A T T	G T A	G A T	G C T	C T C	A T G	G T T
VACV Copenhagen (M35027.1)	T A C	A C G	G T G	A C T	G T A	T C C	A C G	C T A	G A G	A T A	T T G	A C G	G T A	T G T	A T T	G T A	G A T	G C T	C T C	A T G	G T T
S64 Soro	T A C	A C G	G T G	A C T	G T A	T C C	A C G	C T A	G A G	A T A	T T G	A C G	G T A	T G T	A T T	G T A	G A T	G C T	C T C	A T G	G T T
S148 Soro	T A C	A C G	G T G	A C T	G T A	T C C	A C G	C T A	G A G	A T A	T T G	A C G	G T A	T G T	A T T	G T A	G A T	G C T	C T C	A T G	G T T
VACV Mariana virus (GQ226041.1)	T A C	A C G	G T G	A C T	G T A	T C C	A C G	C T A	G A G	A T A	T T G	A C G	G T A	T G T	A T T	G T A	G A T	G C T	C T C	A T G	G T T
Ectromelia virus (AF163845.1)	T A C	A C G	G T G	A C T	G T A	T C C	A C G	C T A	G A G	A T A	T T G	A C G	G T A	T G T	A T T	G T A	G A T	G C T	C T C	A T G	G T T
Cowpox virus HumGra07/1 (KC813510.1)	T A C	A C G	G T G	A C T	G T A	T C C	A C G	C T A	G A G	A T A	T T G	A C G	G T A	T G T	A T T	G T A	G A T	G C T	C T C	A T G	G T T
Camelpox virus 0408151v (KP768318.1)	T A C	A C G	G T G	A C T	G T A	T C C	A C G	C T A	G A G	A T A	T T G	A C G	G T A	T G T	A T T	G T A	G A T	G C T	C T C	A T G	G T T
Taterapox virus Dahomey (DQ437594.1)	T A C	A C G	G T G	A C T	G T A	T C C	A C G	C T A	G A G	A T A	T T G	A C G	G T A	T G T	A T T	G T A	G A T	G C T	C T C	A T G	G T T
Horsepox virus MNR-76 (DQ792504.1)	T A C	A C G	G T G	A C T	G T A	T C C	A C G	C T A	G A G	A T A	T T G	A C G	G T A	T G T	A T T	G T A	G A T	G C T	C T C	A T G	G T T
Rabbitpox virus (AY484669.1)	T A C	A C G	G T G	A C T	G T A	T C C	A C G	C T A	G A G	A T A	T T G	A C G	G T A	T G T	A T T	G T A	G A T	G C T	C T C	A T G	G T T
Cowpox virus HumGra07/1 (KC813510.1)	T A C	A C G	G T G	A C T	G T A	T C C	A C G	C T A	G A G	A T A	T T G	A C G	G T A	T G T	A T T	G T A	G A T	G C T	C T C	A T G	G T T
Cowpox virus Germany (HQ420898.1)	T A C	A C G	G T G	A C T	G T A	T C C	A C G	C T A	G A G	A T A	T T G	A C G	G T A	T G T	A T T	G T A	G A T	G C T	C T C	A T G	G T T
Variola virus Somalia (DQ437590.1)	- - C	A C G	G T G	A C T	G T A	T C C	A C G	C T A	G A G	A T A	T T G	A C G	G T A	T G T	A T T	G T A	G A T	G C T	C T C	A T G	G T T
Variola virus India (DQ437585.1)	- - C	A C G	G T G	A C T	G T A	T C C	A C G	C T A	G A G	A T A	T T G	A C G	G T A	T G T	A T T	G T A	G A T	G C T	C T C	A T G	G T T
VACV WR (AY243312.1)	A T A	C A G	G C A	T T A	G A T	G T C	A G C	A T G	T A G	T A T	T A G	T A G	A C T	A T C	A A C	G T T	C A G	A A A	A C C	C A A	
VACV SPAN 232 virus (AY523995.1)	A T A	C A G	G C A	T T A	G A T	G T C	A G C	A T G	T A G	T A T	T A G	T A G	A C T	A T C	A A C	G T T	- A G	A A A	A C C	C A A	
VACV Guarani P1 virus (DQ206440.1)	A T A	C A G	G C A	T T A	G A T	G T C	A G C	A T G	T A G	T A T	T A G	T A G	A C T	A T C	A A C	G T T	C A G	A A A	A C C	C A A	
VACV Guarani P2 virus (DQ206441.1)	A T A	C A G	G C A	T T A	G A T	G T C	A G C	A T G	T A G	T A T	T A G	T A G	A C T	A T C	A A C	G T T	C A G	A A A	A C C	C A A	
VACV Aracatuba virus (AF503170.1)	A T A	C A G	G C A	T T A	G A T	G T C	A G C	A T G	T A G	T A T	T A G	T A G	A C T	A T C	A A C	G T T	C A G	A A A	A G C	C A A	
VACV Cantagalo virus (KT013210.1)	A T A	C A G	G C A	T T A	G A T	G T C	A G C	A T G	T A G	T A T	T A G	T A G	A C T	A T C	A A C	G T T	C A G	A A A	A C C	C A A	
VACV Passatempo (DQ085462.1)	A T A	C A G	G C A	T T A	G A T	G T C	A G C	A T G	T A G	T A T	T A G	T A G	A C T	A T C	A A C	G T T	C A G	A A A	A C C	C A A	
VACV IOC clone B141 (KT184690.1)	A T A	C A G	G C A	T T A	G A T	G T C	A G C	A T G	T A G	T A T	T A G	T A G	A C T	A T C	A A C	G T T	C A G	A A A	A C C	C A A	
VACV Lister clone 107 (DQ121394.1)	A T A	C A G	G C A	T T A	G A T	G T C	A G C	A T G	T A G	T A T	T A G	T A G	A C T	A T C	A A C	G T T	C A G	A A A	A C C	C A A	
VACV Copenhagen (M35027.1)	A T A	C A G	G C A	T T A	G A T	G T C	A G C	A T G	T A G	T A T	T A G	T A G	A C T	A T C	A A C	G T T	C A G	A A A	A C C	C A A	
S64 Soro	A T A	C A G	G C A	T T A	G A T	G T C	A G C	A T G	T A G	T A T	T A G	T A G	A C T	A T C	A A C	G T T	C A G	A A A	A C C	C A A	
S148 Soro	A T A	C A G	G C A	T T A	G A T	G T C	A G C	A T G	T A G	T A T	T A G	T A G	A C T	A T C	A A C	G T T	C A G	A A A	A C C	C A A	
VACV Mariana virus (GQ226041.1)	A T A	C A G	G C A	T T A	G A T	G T C	A G C	A T G	T A G	T A T	T A G	T A G	A C T	A T C	A A C	G T T	C A G	A A A	A G C	C A A	
Ectromelia virus (AF163845.1)	A T A	C A G	G C A	T T A	G A T	G T C	A G C	A T G	T A G	T A T	T A G	T A G	A C T	A T C	A A C	G T T	C A G	A A A	A G C	C A A	
VACV BeAn58058 (U79140.1)	A T A	C A G	G C A	T T A	G A T	G T C	A G C	A T G	T A G	T A T	T A G	T A G	A C T	A T C	A A C	G T T	C A G	A A A	A G C	C A A	
Camelpox virus 0408151v (KP768318.1)	A T A	C A G	G C A	T T A	G A T	G T C	A G C	A T G	T A G	T A T	T A G	T A G	A C T	A T C	A A C	G T T	C A G	A A A	A G C	C A A	
Taterapox virus Dahomey (DQ437594.1)	A T A	C A G	G C A	T T A	G A T	G T C	A G C	A T G	T A G	T A T	T A G	T A G	A C T	A T C	A A C	G T T	C A G	A A A	A G C	C A A	
Horsepox virus MNR-76 (DQ792504.1)	A T A	C A G	G C A	T T A	G A T	G T C	A G C	A T G	T A G	T A T	T A G	T A G	A C T	A T C	A A C	G T T	C A G	A A A	A G C	C A A	
Rabbitpox virus (AY484669.1)	A T A	C A G	G C A	T T A	G A T	G T C	A G C	A T G	T A G	T A T	T A G	T A G	A C T	A T C	A A C	G T T	C A G	A A A	A G C	C A A	
Cowpox virus HumGra07/1 (KC813510.1)	A T A	C A G	G C A	T T A	G A T	G T C	A G C	A T G	T A G	T A T	T A G	T A G	A C T	A T C	A A C	G T T	C A G	A A A	A G C	C A A	
Cowpox virus Germany (HQ420898.1)	A T A	C A G	G C A	T T A	G A T	G T C	A G C	A T G	T A G	T A T	T A G	T A G	A C T	A T C	A A C	G T T	C A G	A A A	A G C	C A A	
Variola virus Somalia (DQ437590.1)	A T A	C A G	G C A	T T A	G A T	G T C	A G C	A T G	T A G	T A T	T A G	T A G	A C T	A T C	A A C	G T T	C A G	A A A	A G C	C A A	
Variola virus India (DQ437585.1)	A T A	C A G	G C A	T T A	G A T	G T C	A G C	A T G	T A G	T A T	T A G	T A G	A C T	A T C	A A C	G T T	C A G	A A A	A G C	C A A	

**Figura 27: Alinhamento da sequência de 126 pares de bases do gene A26L obtida de amostra positiva da coleção de animais urbanos com amostras de VACV brasileiros, vacinais, Cowpox virus e Rabbitpox virus.** A sequência de U3 está representada em azul. Os nucleotídeos variáveis estão representados em vermelho e o retângulo realça a deleção de 21 pares de base apresentada por amostras brasileiras de VACV.

### 5.10 Tropismo viral

Os animais Sabará 3 (*Didelphis albiventris*), Sabará 211 (*Necromys lasiurus*), Serro 151 (*Trinomys setosus*), Rio Pomba 139 (*Caluromys philander*) e Urbano 3 (*Mus* spp.) foram selecionados para análises de tropismo viral em órgãos dos animais positivos ou indeterminados em ensaios de qPCR. O DNA extraído das vísceras disponíveis foi submetido a ensaios de qPCR que tiveram como alvo os genes C11R e A56R (Tabela 22).

**Tabela 21: Teste de tropismo viral por qPCR dos genes C11R e A56R das vísceras de animais positivos em ensaios prévios de qPCR.**

	<i>Didelphis albiventris</i> (Sabará)		<i>Necomys lasiurus</i> (Sabará)		<i>Trinomys setosus</i> (Serro)		<i>Caluromys philander</i> (Rio Pomba)		<i>Mus spp.</i> (Urbanos)	
	C11R	A56R	C11R	A56R	C11R	A56R	C11R	A56R	C11R	A56R
Coração	-	-	+	+	+	-	+	-	*	*
Baço	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-
Intestino	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+
Bexiga	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+
Pulmão	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
Rim	+	-	*	*	+	-	+	-	+	-
Ovário	+	-	*	*	*	*	*	*	*	*
Testículo	*	*	-	-	+	+	+	+	+	-
Diafragma	-	-	*	*	*	*	*	*	*	*
Medula	*	*	-	-	*	*	*	*	*	*

-: Negativo. +: Positivo. \*: Não testado.

## VI DISCUSSÃO

Apesar de o *Vaccinia virus* causar no Brasil uma doença emergente com impacto social, na economia e saúde pública, poucos estudos foram realizados com intuito de se conhecer melhor a cadeia de transmissão do vírus e seus potenciais reservatórios (Abrahão, 2009a; Abrahão, 2010; Schatzmayr, 2011; Assis, 2012; Peres, 2013; Barbosa, 2014; Peres, 2016). Até o momento, o estudo de captura de pequenos mamíferos e busca por indícios da circulação do vírus havia sido realizado principalmente através de testes sorológicos (Schatzmayr, 2011; Peres, 2013). Schatzmayr (2011) encontrou uma positividade de anticorpos anti-OPV de 17,9% em roedores silvestres capturados em locais com ou sem registro de surtos de VB e Peres (2013) descreveu uma positividade de 8,7% para roedores silvestres e 8,2% para o marsupial *Didelphis* spp. Um segundo estudo de Peres (2015) utilizou técnicas de biologia molecular (PCR *nested* para o gene A56R) para detecção de DNA de OPVs em diversos animais durante um surto de VB e encontrou cães e gambás (*Didelphis* spp.) positivos. Entretanto, neste estudo o número amostral foi inexpressivo, tendo apenas dois roedores silvestres testados.

Através da utilização de PCR em tempo real, a detecção de DNA viral pode ser facilitada, uma vez que a técnica apresenta alta sensibilidade (Valesk, 2005). Além disso, a utilização de duas matrizes distintas e dois diferentes alvos aumenta a chance de detecção do vírus, bem como a amplificação do gene C11R, que é conservado entre os OPVs (Abrahão, 2010) e é encontrado em duas cópias no genoma do *Vaccinia virus*. Um estudo semelhante ao realizado neste trabalho foi feito para a avaliação da presença do MPXV em roedores africanos. A positividade encontrada foi de 4,4% e, contudo 12,7% foram consideradas indeterminadas devido à dificuldade em reproduzir o resultado positivo. Os pesquisadores relataram que os problemas de reprodutibilidade dos resultados podem ser devido à baixa carga viral nos animais estudados (Reynolds, 2010).

Dentre as amostras testadas por qPCR no presente trabalho, foi encontrada uma positividade total de 23,4% para roedores e 0% para marsupiais de

Sabará, 12% para roedores e 0% para marsupiais do Serro e 1,5% para roedores e 5,5% para marsupiais de Rio Pomba. Uma vez que as amostras positivas apresentavam CTs bastante tardios (acima de 30),  possível especular que a disponibilidade de DNA viral nas amostras era baixa, indicando uma replicação basal do vírus nesses animais. Além disso, essa baixa carga de DNA pode resultar na amplificação em apenas uma replicata das duas testadas e gerar um resultado indeterminado. Algumas amostras consideradas indeterminadas foram sequenciadas, demonstrando que estudos adicionais são necessários para classificar com segurança as amostras como positivas ou negativas.

Com relação aos testes de soroneutralização, 14,6% dos roedores e 9,5% dos marsupiais foram positivos em Sabará, 8,0% dos roedores e nenhum marsupial foi positivo no Serro e 6,3% dos roedores e 6,2% dos marsupiais foram positivos em Rio Pomba. Esses resultados indicam a circulação prévia de VACV, uma vez que este é o OPV circulante no Brasil. Além disso, a positividade da amostra indica que o animal foi capaz de produzir anticorpos neutralizantes, que são detectados pela técnica, o que pode ser importante para o controle da infecção (Chaudhri, 2006).

Para a técnica de ELISA, somente roedores foram testados, pois não havia disponibilidade de soros controles para a padronização do ensaio para marsupiais. Em Sabará, foram encontrados 11,4% dos animais positivos e 11,4% indeterminados; para o Serro, 32,0% foram positivos e 12,0% indeterminados; já em Rio Pomba, 5,9% das amostras foram positivas e 15,8% indeterminadas. Uma vez que todos os animais da espécie *Trinomys setosus* capturados no Serro foram positivos no ELISA, foi feita a titulação de 3 soros que tinham volume adequado, e estes se mostraram positivos na primeira diluição e indeterminados na segunda, o que pode indicar um baixo título de anticorpos. Para aqueles animais indeterminados no ELISA e positivos nos ensaios moleculares ou PRNT  possível especular que o resultado indeterminado seja na verdade um positivo, com início da produção de anticorpos do tipo IgG (detectados pelo ELISA), que coincide com a queda na replicação viral (Buller, 1991).

Nas amostras testadas foram encontrados diferentes perfis de resultados, algumas eram positivas somente na qPCR, outras na qPCR e PRNT, outras na qPCR e ELISA, outras somente em algum dos testes sorológicos e ainda aquelas positivas somente nos ensaios moleculares. As amostras positivas apenas na qPCR ou na qPCR e PRNT podem representar o início da infecção pelo vírus, no qual está havendo replicação do genoma e anticorpos do tipo IgM estão sendo produzidos. Depois disso, anticorpos do tipo IgG começam a ser produzidos e a replicação viral diminui (PCR negativo e ELISA/PRNT positivos). Com o tempo não é mais possível detectar DNA viral e os ensaios que detectam anticorpos continuam positivos. Em alguns casos algum dos testes não pôde ser realizado, não permitindo a análise completa dessa dinâmica. É interessante notar que um animal da coleção de Sabará, capturado inicialmente no mês de julho teve testes sorológicos negativos, entretanto, quando foi recapturado em setembro, apresentava PRNT positivo. Esse animal provavelmente entrou em contato com o vírus durante este período e desenvolveu uma resposta imune contra o mesmo.

Através da amplificação e sequenciamento utilizando os genes A56R e A26L, foi possível detectar amostras pertencentes ao grupo I e II de VACV brasileiros. As duas amostras sequenciadas que pertenciam ao grupo I fazem parte da coleção de Sabará. Todas as amostras sequenciadas para as coleções do Serro e Rio Pomba pertenciam ao grupo II. Na coleção de animais urbanos, a amostra 3 demonstrou um perfil duplo, apresentado a deleção de 21 nucleotídeos no gene A26L, mas com ausência de deleção de 18 nucleotídeos no gene A56R. Situação semelhante já foi observada (de Oliveira, 2015), mas esse resultado pode ser também fruto da co-circulação de amostras dos grupos I e II. Ducournau e colaboradores (2013) também já identificaram a co-circulação de duas linhagens diferentes de CPXV na França. Os dados obtidos aqui reforçam que ambos os grupos de VACV brasileiros estão circulando na natureza (Trindade, 2006; Campos, 2010) e apesar da detecção da circulação de vírus do grupo II (considerados virulentos em modelo murino), nenhum animal apresentou sinal clínico de doença exantemática. A ausência de sinais clínicos pode ser mais um indício da replicação basal do vírus nesses hospedeiros (Rehfeld, 2015).

Uma vez detectada a presença do vírus nas coleções estudadas, foram feitos ensaios de qPCR para determinar em quais órgãos dos animais infectados o DNA viral poderia ser detectado. Foi testado um animal de cada espécie a seguir: *Didelphis albiventris*, *Necromys lasiurus*, *Trinomys setosus*, *Caluromys philander* e *Mus* spp. Para *D. albiventris* (grupo I de VACV brasileiros) foi detectado DNA viral apenas na bexiga, rim, ovário e intestino. Para os animais com vírus classificados como grupo II (*N. lasiurus* e *T. setosus*) e para *C. philander* (não teve A56R ou A26L sequenciado) foi possível detectar DNA viral também no coração e baço, além de pulmão para *C. philander*. O animal 3 da coleção de urbanos (*Mus* spp.) que apresentou duplo perfil com relação aos grupos I e II, teve DNA detectado em todos os órgãos testados (baço, intestino delgado, intestino grosso, pulmão, bexiga, rim e gônada). Os resultados indicam, que mesmo quando o vírus circulante é do grupo I (menor replicação) ele é capaz de atingir órgãos como intestino e rins, o que propicia a eliminação do mesmo e pode facilitar sua dispersão e transmissão para outros animais como bovinos e outros roedores e marsupiais. Estudos anteriores já haviam demonstrado que indícios da presença do VACV nos órgãos detectados neste trabalho podiam ser encontrados tanto após a infecção via intranasal com amostras virulentas (Ferreira, 2008), quanto após a infecção com leite contaminado com amostra não virulenta do grupo I (Rehfeld, 2015). Além disso, o *Mariana virus* foi isolado de líquido peritoneal e dos testículos (Abrahão, 2009a), o que é concordante com amostras de gônadas e ovários positivas encontradas no presente trabalho.

Ao se analisar a estação em que em que os animais com amostras positivas foram capturados, tanto para dados moleculares como sorológicos, o número de positivos foi maior no inverno, estação seca de Minas Gerais. Trabalhos prévios relatam a maior ocorrência de casos de VB nesse período (Lobato, 2005; Sant'Ana, 2011; Schatzmayr, 2011) e tal fato pode ser decorrente do aumento populacional de roedores, o que é comprovado pelo maior número de capturas de roedores nas coleções estudadas. Entretanto, o maior número de captura nesses meses pode ser uma explicação alternativa para o fato observado.

Com relação ao local de captura dos animais que apresentaram amostras positivas, para Sabará houve detecção tanto nas áreas de mata como naquelas de pasto, podendo indicar contato entre os animais circulantes em ambas as áreas. As amostras positivas de Rio Pomba são provenientes de animais capturados em mata e pasto, mas não no peridomicílio. Para o Serro, onde surtos de VB são frequentemente reportados, houve detecção também em peridomicílio. Esse fato pode ser um indicativo de que os animais infectados tenham contato com os animais domésticos, incluindo bovinos, e com o homem, o que poderia favorecer a transmissão do vírus e, conseqüentemente, o aparecimento e detecção de doença. No Serro, a positividade também foi maior para roedores nas técnicas de qPCR, o que está de acordo com a maior detecção de surtos neste local do que em Rio Pomba (Trindade, 2009; Assis, 2005; Costa, 2015).

A ausência de detecção de casos de VB em Sabará poderia ser explicada pela falta de um agente amplificador da infecção, como é o caso da doença em bovinos. Além disso, apesar da presença de animais como cavalos nas redondezas, esses animais não permanecem por longos períodos na unidade de coleta e no geral apenas permeiam a propriedade, reduzindo o contato dos mesmos com roedores ou com excretas produzidas por eles.

As espécies que apresentaram amostras positivas em algum teste da coleção de Sabará foram: *Cerradomys subflavus*, *Necomys lasiurus*, *Didelphis albiventris* e *Oligoryzomys* sp. Das espécies testadas no Serro, *Trinomys setosus*, *Calomys tener*, *Nectomys squamipes*, *Rattus rattus*, *Mus musculus* e *Akodon* sp foram positivas. Já para Rio Pomba, *Akodon* sp., *Calomys tener*, *Didelphis aurita* e *Caluromys philander* foram as espécies com amostras positivas. Trabalhos anteriores já haviam detectado indícios da circulação de VACV nas espécies de roedores *N. squamipes*, *A. cursor*, *O. nigripes* (Schatmayr, 2011; Peres, 2013), *M. musculus* (Abrahão, 2009a) e no marsupial *Didelphis* spp. (Peres, 2013; Peres, 2015). Com exceção do marsupial *C. philander*, que é considerado especialista, e do roedor *Trinomys* sp., cujos dados não estão disponíveis, os outros roedores que tiveram amostras positivas são considerados generalistas quanto ao uso do hábitat e



frequentemente podem se adaptar a novos ambientes, incluindo aqueles fragmentados e antropizados (Tabelas 3 e 4).

Assim como demonstrado recentemente por Peres (2015), alguns marsupiais foram positivos tanto em técnicas sorológicas como moleculares. Esses relatados não fornecem dados sobre a participação dos mesmos na cadeia de transmissão do VACV no Brasil. Entretanto, uma vez que esses animais podem ter grandes movimentações diárias e se associar tanto a áreas antropizadas como a ambientes silvestres (Tabela 4), eles poderiam transportar o vírus de um ambiente ao outro e assim contribuir para a cadeia de transmissão do VACV.

Os resultados obtidos reforçam o modelo proposto por Abrahão (2009a), no qual roedores, também inserindo aqui os marsupiais, atuariam como pontes entre o ambiente silvestre, onde o vírus circula entre hospedeiros naturais e o ambiente peridomiciliar, no qual são encontrados os animais domésticos e o contato com o ser humano é favorecido. Uma vez que já foi demonstrado que roedores são capazes de infectar-se através do consumo de leite contaminado e também do contato com fezes de vacas e roedores também contaminadas e que os mesmos eliminam partículas virais em suas fezes, esse ciclo pode ser fechado, explicando como os roedores se tornariam infectados e como transmitiram a infecção para outros animais. Além disso, a presença de DNA viral em órgãos como rins, bexiga e gônadas pode indicar formas adicionais de transmissão do vírus através da urina e transmissão sexual, mas estudos são necessários para comprovar tal hipótese.

Através dos estudos com roedores urbanos, foi possível detectar indícios da circulação do VACV em ambientes urbanos de Minas Gerais. Não é possível descrever ainda a importância desses achados para a cadeia de transmissão do vírus, uma vez que nenhum caso de VB foi registrado neste ambiente. Entretanto, já foram encontrados indícios da presença do vírus em fezes de capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) recolhidas na Lagoa da Pampulha em Belo Horizonte (Ambrósio, não publicado), e em amostras de cães, gatos e quatis (*Nasua nasua*) também de Belo Horizonte (Costa, não publicado). O *Cowpox virus*, OPV relacionado ao VACV, tem circulação conhecida em

ambientes urbanos. Nesses ambientes ele é comumente transmitido de seus reservatórios, que são roedores, para gatos e os gatos, por sua vez, transmitem o vírus para humanos (Haenssle, 2006; Herder, 2010). Além disso, na Europa roedores são frequentemente mantidos como animais domésticos e através do contato íntimo, são capazes de transmitir o vírus para humanos (Campe, 2009).

A ausência de detecção de casos de VB em ambientes urbanos pode ser fruto da dificuldade de diagnóstico da doença ou mesmo da inexistência de um hospedeiro no qual o vírus consiga se multiplicar bem e gerar sinais clínicos característicos. Não se sabe se gatos, importantes para a cadeia de transmissão do CPXV em ambientes urbanos, ou mesmo outros animais que apresentam contato próximo com humanos, seriam capazes de transmitir o VACV no Brasil. Estudos adicionais são necessários para melhor caracterização da situação do *Vaccinia virus* nos ambientes urbanos.

## VII CONCLUSÕES

7.1 Através dos resultados foi possível demonstrar que o *Vaccinia virus* circula em áreas de mata, campo, pasto, peridomicílio e urbanas.

7.2 Dados de sequenciamento revelaram a circulação de vírus dos grupos I e II e também de uma amostra com perfil misto.

7.3 O fato de animais serem positivos na qPCR para detecção de DNA viral é sugestivo de infecção recente e a positividade para anticorpos do tipo IgG de infecção passada.

7.4 Foram encontradas amostras positivas provenientes de todos os ambientes estudados, porém somente no Serro animais positivos foram capturados em peridomicílio. Este dado respalda o modelo proposto por Abrahão e colaboradores em 2009.

7.5 O período em que um maior número de amostras foi positivo coincide com aquele em que o maior número de surtos de VB são registrados, sugerindo que o aumento da população de roedores possa estar envolvido com o aparecimento dos casos.

7.6 O número de vísceras diferentes nas quais foi possível a detecção do DNA viral indica infecção sistêmica causada pelo vírus nos animais capturados. Contudo, não existem indícios de que esses animais desenvolvam doença clássica representada pela presença de lesões típicas de poxvírus.

7.7 A detecção de marsupiais positivos reforça dados prévios e sugere uma possível participação dos mesmos na cadeia de transmissão do VACV.

## VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHÃO, J.S.; *et al.* One More Piece in the VACV Ecological Puzzle: Could Peridomestic Rodents Be the Link between Wildlife and Bovine Vaccinia Outbreaks in Brazil?. **PLoS ONE**, v.4, n.10, 2009 a.

ABRAHÃO, J.S.; *et al.* Long-lasting stability of Vaccinia virus strains in murine feces: implications for virus circulation and environmental maintenance. **Arch Virol**, v.154, p.1551–1553, 2009b.

ABRAHÃO, J. S.; *et al.* Nested-multiplex PCR detection of Orthopoxvirus and Parapoxvirus directly from exanthematic clinical samples. **Virology Journal**, v.6, n.140, 2009c.

ABRAHÃO J.S.; *et al.* Bovine Vaccinia Outbreaks: Detection and Isolation of Vaccinia Virus in Milk Samples. **FOODBORNE PATHOGENS AND DISEASE**. v.6, n.9, p.1141-1146, 2009 e.

ABRAHÃO J.S.; *et al.* Prevenção e controle do *Vaccinia virus* no Brasil: padronização de um sistema prime-boost para imunização e determinação de seus hospedeiros naturais. Tese de doutorado. 2010. Programa de Pós Graduação em Microbiologia/ Universidade Federal de Minas Gerais.

ABRAHÃO J.S.; *et al.* *Vaccinia Virus* Infection in Monkeys, Brazilian Amazon. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 6, p.976-979, 2010.

ABREU, *et al.* Caracterização da Região do Serro como Produtora de Queijo Minas Artesanal. Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado de Minas Gerais (EMATER-MG).

ALTSCHUL, S.F.; *et al.* Basic local alignment search tool. **J Mol Biol**, v.215, p. 403–410, 1990.

AMER, M.; *et al.* Human cowpox infection in Sharkia Governorate, Egypt. **International Journal of Dermatology**, v.40, p.14-17, 2001.

ASSIS, F.L.; *et al.* Group 2 Vaccinia Virus, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.18, n.12, p.2035-38, 2012a.

ASSIS, F. L.; *et al.* Serologic Evidence of Orthopoxvirus Infection in Buffaloes, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.18, n.4, p.698-699, 2012b.

ASSIS, F.L., *et al.* Reemergence of Vaccinia Virus during Zoonotic Outbreak, Pará State, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 19, n. 12, p. 2017-2020, 2013.

ARAKAWA Y.; *et al.* The Release of Vaccinia Virus from Infected Cells Requires RhoA-mDia Modulation of Cortical Actin. **Cell Host & Microbe**, v.1, p.227–240, 2007.

ARITA, I.; HENDERSON, D.A. Monkeypox and whitepox viruses in West and Central Africa. **Bull World Health Organ**. 1976.

ATTIAS, N.; *et al.* Potential distribution and new records of *Trinomys* species (Rodentia: Echimyidae) in the state of Rio de Janeiro. **ZOOLOGIA**, v.26, n.2, p.305–315, 2009.

ÁZARA, T.M.F. DETECÇÃO DE Dengue virus EM *Aedes albopictus* Skuse E PEQUENOS MAMÍFEROS DE FRAGMENTO FLORESTAL URBANO. Tese de doutorado. Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. 2013.

BARBOSA, A.V.; *et al.* Presence of neutralizing antibodies to *Orthopoxvirus* in Capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) in Brazil. **J Infect Dev Ctries**, v.8, n.12, p.1646-1649, 2014.

BECKER, C.; *et al.* Cowpox Virus Infection in Pet Rat Owners. **Deutsches Ärzteblatt International**, v.106, n.19, p. 329–34, 2009.

BECKER, R.G.; *et al.* ESTRUTURA DE COMUNIDADES DE PEQUENOS MAMÍFEROS E DENSIDADE DE *Necromys lasiurus* (RODENTIA,

SIGMODONTINAE) EM ÁREAS ABERTAS DE CERRADO NO BRASIL CENTRAL. **Mastozoología Neotropical**, v.14, n.2, p.157-168, 2007.

BELONGIA, E.A.; NALEWAY, A.L. Smallpox Vaccine: The Good, the Bad, and the Ugly. **Clinical Medicine & Research**, v. 1, n. 2, p. 87-92, 2003.

BENNETT, M.; BAXBY, D. Cowpox. **J. Med. Microbiol**, v.45, p.157-158, 1996.

BERGALLO, H.G.; *et al.* HABITAT USE BY *Oryzomys subflavus* (RODENTIA) IN AN OPEN SHRUBLAND FORMATION IN RESTINGA DE JURUBATIBA NATIONAL PARK, RJ, BRAZIL. **Braz. J. Biol**, v.65, n.4, p.583-588, 2005.

BOIANI, L.; *et al.* ANNUAL MALE REPRODUCTIVE CYCLE OF A HANTAVIRUS RESERVOIR, THE LONG-TAILED MOUSE *Oligoryzomys flavescens* (RODENTIA; CRICETIDAE, SIGMODONTINAE) FROM URUGUAY. **Mastozoología Neotropical**, v.15, n.1, p.23-32, 2008.

BONVICINO, C.R.; *et al.* Guia dos Roedores do Brasil, com chaves para gêneros baseadas em caracteres externos. Rio de Janeiro: Centro Pan-Americano de Febre Aftosa - OPAS/OMS, 2008. 120 p.: il. (**Série de Manuais Técnicos, 11**).

BONVICINO, C.; *et al.* A new species of *Cerradomys* (Mammalia: Rodentia: Cricetidae) from Central Brazil, with remarks on the taxonomy of the genus. **ZOOLOGIA**, v. 31, n.6, p. 525–540, 2014.

BORGES, I.A. FATORES DE RISCO E CADEIA DE TRANSMISSÃO DA VACCÍNIA BOVINA NO ESTADO DE MINAS GERAIS. Tese de doutorado. Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais. 2014.

BULLER, R.M.L.; PALUMBO, G.J. Poxvirus pathogenesis. **Microbiol Ver**, v. 55, p. 80–122, 199.1

BRAGA, C.A.C.; *et al.* ESTUDO DA PREFERÊNCIA DE HABITAT E DIETA DE OLIGORYZOMYS NIGRIPES OLFERS, 1918. **Anais do III Congresso Latino Americano de Ecologia**, 10 a 13 de Setembro de 2009, São Lourenço – MG.

BRITO, D.; FIGUEIREDO, M.S.L. Minimum viable population and conservation status of the Atlantic Forest spiny rat *Trinomys eliasi*. **Biological Conservation**, v.112 , p.153–158, 2003.

BRUM, M.C.S.; *et al.* An outbreak of orthopoxvirus-associated disease in horses in southern Brazil. **J Vet Diagn Invest**, v. 22, p.143–147, 2010.

CÁCERES, N.C. Food Habits and Seed Dispersal by the White-Eared Opossum *Didelphis Albiventris* in Southern Brazil. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, Vol. 37, 2002.

CAMPE, H.; *et al.* Cowpox Virus Transmission from Pet Rats to Humans, Germany. **Emerging Infectious Diseases**, v.15, n. 5, p. 777-780, 2009.

CAMPOS, M.A.S.; KROON, E.G. Critical period of irreversible block of VACV replication. **Review Microbiology**, v.28, n.2, p.474-83, 1993.

CAMPOS, R.K.; *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.

CARDETI, G.; *et al.* Cowpox Virus in Llama, Italy. **Emerging Infectious Diseases**. v. 17, n. 8, p. 1513-1515, 2011.

CARGNELUTTI, J.F.; *et al.* Vaccinia viruses isolated from skin infection in horses produced cutaneous and systemic disease in experimentally infected rabbits. **Research in Veterinary Science**, v.93, p.1070–1075, 2012.

CASTILLO, E.; *et al.* Commensal and wild rodents in an urban area of Argentina. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 52, p.135 – 141, 2003.

CATROXO, M.; *et al.* Ultrastructural Study of Poxvirus Causing Myxomatosis in Rabbits, in São Paulo and Santa Catarina, Brazil. **O. S. Int. J. Morphol**, v. 27, n.2, p.543-552, 2009.

CERBONCINI, R.A.S.; *et al.* New records of the red-rumped mouse *Juliomys pictipes* (Osgood, 1933) (Rodentia: Sigmodontinae) in coastal Atlantic Forest of Paraná, southern Brazil. **Biotemas**, v.27, n.1, p.159-164, 2014.

CHANTREY, J.; *et al.* Cowpox: reservoir hosts and geographic range. **Epidemiol. Infect.**, v122, p.455-460, 1999.

CHAUDHRI, G.; *et al.* Obligatory Requirement for Antibody in Recovery from a Primary Poxvirus Infection. **JOURNAL OF VIROLOGY**, v.80, n.13, 2006.

COSTA, G.B.; *et al.* Alternative Routes of Zoonotic Vaccinia Virus Transmission, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 12, p. 2244-2246, 2015.

CYRKLAFF, M.; *et al.* Cryo-electron tomography of vaccinia virus. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.9, n.2, p.420, 2005.

CYRKLAFF, M.; *et al.* Whole Cell Cryo-Electron Tomography Reveals Distinct Disassembly Intermediates of Vaccinia Virus. **PLoS ONE**, v.5, e420, 2007.

D'ANUNCIAÇÃO, L.; *et al.* Filling One More Gap: Experimental Evidence of Horizontal Transmission of Vaccinia Virus Between Bovines and Rodents. **VECTOR-BORNE AND ZOOLOGICAL DISEASES**, v.12, n.1, p.61-64, 2012.

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

DAMASO, C.R.; *et al.* An emergent poxvirus from humans and cattle in Rio de Janeiro State: Cantagalo vírus may derive from brasilian smallpox vaccine. **Virology**, v.277, n.2, p.439-49, 2000.



deOliveira, T.M.L.; *et al.* 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, p.898-903, 2015.

DINIZ, S., *et al.* An outbreak of mousepox in Swiss mice in a laboratory animal facility – case report. **Arq Braz Med Vet Zootec**, v.53, p.52–156, 2001.

DOCEUL, V.; *et al.* Repulsion of superinfecting virions: a mechanism for rapid virus spread. **Science**, v.327, n.87, p.873-6, 2010.

DONATELE, D.M.; *et al.* Epidemiologia da poxvirose bovina no Estado do Espírito Santo, Brasil. **Braz. J. vet. Res. anim. Sci.**, v.44, n. 4, p. 275-282, 2007.

DUCOURNAU, C.; *et al.* Concomitant Human Infections with 2 Cowpox Virus Strains in Related Cases, France, 2011. **Emerging Infectious Diseases**, v. 19, n. 12, p. 1996-1999, 2013.

DRUMOND, B.P.; *et al.* Brazilian Vaccinia virus strains are genetically divergent and differ from the Lister vaccine strain. **Microbes Infect.**, v.10, n.2, p.185-97, 2008.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa). Disponível em: <<http://www.cnpqgl.embrapa.br/sistemaproducao/>>. Acessado em: 07/02/2016

ERNEST, K.A.; MARES, M.A. Ecology of *Nectomys squamipes*, the neotropical Water rat, in Central Brazil: home range, habitat selection, reproduction and behaviour. **J. zool.**, v.210, p.599-612, 1986.

ESSBAUER, S.; *et al.* Zoonotic poxviruses. **Veterinary Microbiology**, v.140, p.229–236, 2010.

EISENBERG, J.F.; REDFORD, K.H. Mammals of the Neotropics, Volume 2: The Southern Cone: Chile, Argentina, Uruguay, Paraguay. **The University of Chicago Press**, 1992

EWER, R.F. The Biology and Behaviour of a Free -Living Population of Black Rats (*Rattus rattus*). **Animal Behaviour Monographs**, v.4, part 3. 1971.

FENNER, F.; *et al.* Smallpox and Its Eradication. **Geneva: World Health Organization**, 1988.

FENNER, F. Smallpox: Emergence, Global Spread and Erradication. **Hist. Phil. Life Sci.**, 15 p.397-420, 1993.

FERREIRA, J.M.; *et al.* *Vaccinia virus*: shedding and horizontal transmission in a murine model. **J Gen Virol**, v.89, n.12, p.2986-91, 2008 a

FERREIRA, J.M.; *et al.* Virulence in murine model shows the existence of two distinct populations of Brazilian *Vaccinia virus* strains. **PLoS One**, v.26, n.3, p.3043-50, 2008 b.

FERREIRA, J.M.S. *VACCINIA VIRUS: VIRULÊNCIA DE AMOSTRAS BRASILEIRAS EM CAMUNDONGOS BALB/C E RESPOSTA IMUNE AO IMUNÓGENO INATIVADO*. Tese de doutorado. Programa de Pós Graduação em Microbiologia. UFMG. 2008 c.

FONSECA, F.G.; *et al.* Morphological and molecular characterization of the poxvirus BeAn 58058. **Archives of Virology**, v.143, n.89, p.1171-1186, 1998.

FONSECA, R.; *et al.* *Juliomys rimofrons* Oliveira and Bonvicino, 2002 (Rodentia: Cricetidae): Distribution extension. **Check List**, v.9, n.3, p.684–685, 2013.

FREITAS, S.R.; et al. Habitat preference and food use by *Metachirus nudicaudatus* and *Didelphis aurita* (Didelphimorphia, Didelphidae) in a restinga forest at Rio de Janeiro. **Rev. Bras. Biol.**, v.57, n.1, p.93-98. 1997.

FREY, S.E.; BELSHE, R.B. Poxvirus Zoonoses — Putting Pocks into Context. **engl j med**, v.350, n.4, p.324-327, 2004.

GLATZ, M.; et al. Human cowpox in a veterinary student. **Lancet Infect Dis**, v.10, p.288, 2010.

GARDE, V.; et al. Tertiary Contact Vaccinia in a Breastfeeding Infant. **JAMA**, v.291, p.725-727, 2004.

GEDDES, A.M. The history of smallpox. **Clinics in Dermatology**, v.24, p.152 – 157, 2006.

GEISE, L. *Akodon cursor* (Rodentia: Cricetidae). **Mammalian Species**, v.44, n.893, p.33–43, 2011.

GIULIO, D.B.; ECKBURG, P.B. Human monkeypox: an emerging zoonosis. **Lancet Infect Dis**, v.4, n.1, p.15-25, 2004.

GIRLING, S.J.; et al. Fatal *Cowpox virus* infection in two squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). **Veterinary Record**, v.169, n.156b, 2011.

GRAIPEL, M.E., FILHO, M.S. Reprodução e dinâmica populacional de *Didelphis aurita* Wied-Neuwied (Mammalia: Didelphimorphia) em ambiente periurbano na Ilha de Santa Catarina, Sul do Brasil. **Biotemas**, v.19, n.1, p.65-73, 2006.

GUBSER, C.; et al. Poxvirus genomes: a phylogenetic analysis. **J Gen Virol**, v.85, n.1, p.105-17, 2004.

GURAV, Y.K.; et al. Buffalopox outbreak in humans and animals in Western Maharashtra, India. **Preventive Veterinary Medicine**, v.100, p. 242– 247, 2011.

HAENSSLE, H.A.; *et al.* Orthopoxvirus infection transmitted by a domestic cat. **J Am Acad Dermatol**, v. 54, n.2, 2006.

HERDER, V.; *et al.* Poxvirus infection in a cat with presumptive human transmission. **Veterinary Dermatology**, v. 22, p.220–224, 2011.

HEMMER CJ, LITTMANN M, *et al.* Human cowpox virus infection acquired from a circus elephant in Germany. *International Journal of Infectious Diseases*. 2010. v.14, e338–e340

HERNANDEZ, R.; BROWN, D.T. **Current Protocols in Microbiology**. APPENDIX 4I Growth and Maintenance of Chick Embryo Fibroblasts (CEF). John Wiley & Sons, Inc. 2010.

HIMSWORTH, C.G.; *et al.* Rats, Cities, People, and Pathogens: A Systematic Review and Narrative Synthesis of Literature Regarding the Ecology of Rat-Associated Zoonoses in Urban Centers. **VECTOR-BORNE AND ZOONOTIC DISEASES**, v.13, n. 6, p.349-359, 2013.

IBGE. Disponível em:

<<http://cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?codmun=315670>>;  
<<http://cidades.ibge.gov.br/painel/painel.php?codmun=311860>>;  
<<http://cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?codmun=314610>>;  
<<http://www.cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?lang=&codmun=316710&search=||infogr%E1ficos:-informa%E7%F5es-completas>>;  
<<http://www.cidades.ibge.gov.br/painel/painel.php?lang=&codmun=315580&search=%7Crio-pomba>>

IF sudeste. Disponível em:

<<http://www.riopomba.ifsudestemg.edu.br/portal/node/2>> Acessado em: 07/02/2016.

Instituto Brasileiro de Mineração (IBRAM). Disponível em: <<http://www.ibram.org.br/>> Acessado em: 07/02/2016.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Disponível em: <<http://cidades.ibge.gov.br/xtras/home.php>> Acessado em: 07/02/2106.

Instituto Estrada Real. Disponível em:

<<http://www.institutoestrada-real.com.br/cidades/rio-pomba/111>> Acessado em: 07/02/2106

Itamaraty. Disponível em: <[dc.itamaraty.gov.br/imagens-e-textos/revista4-mat8.pdf](http://dc.itamaraty.gov.br/imagens-e-textos/revista4-mat8.pdf)> Acessado em: 07/02/2015.

Internacional Committee On Taxonomy Of Viruses (ICTV). Master Species List 2014. Disponível em <<http://www.ictvonline.org>>

JEFFREY A. The Online Guide to the Animals of Trinidad and Tobago. 2012.

Disponível em:

<[https://sta.uwi.edu/fst/lifesciences/documents/Caluromys\\_philander.pdf](https://sta.uwi.edu/fst/lifesciences/documents/Caluromys_philander.pdf)>

Acessado em: 07/02/2016

JEZEK, B.G.; *et al.* Clinico-epidemiological features of monkeypox patients with an animal or human source of infection. **Bulletin of the World Health Organization**, v.66, n.4, p. 459-464, 1988.

JOKLIK, W.K. The purification of four strains of poxvirus. **Virology**, v.18, n.56, p.9-18, 1962.

CORDEIRO JÚNIOR, D.A.; TALAMONI, S.A. New data on the life history and occurrence of spiny rats *Trinomys moojeni* (Rodentia: Echimyidae), in south eastern Brazil. **Acta Theriologica**; v. 51, n.2, p.163–168, 2005.

KURTH, A.; *et al.* Rat-to-Elephant-to-Human Transmission of *Cowpox Virus*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 4, p. 670-671, 2008.

KROON, E.G.; *et al.* Zoonotic Brazilian Vaccinia virus: From field to therapy. **Antiviral Research**, v.92, p.150–163, 2011.

LANGGUTH, A. THE KARYOTYPE OF SYLVILAGUS BRASILIENSIS MINENSIS THOMAS (LAGOMORPHA: LEPORIDAE). **Revista Nordestina de Biologia**, v.17, n.1/2, p.59-62, 2003.

LAURIE, E.M.O. The reproduction of house-mouse (*Mus musculus*) living in different environments. **Bureau of animal population, Oxford University**. 1945.

LEITE, J.A.; *et al.* Passatempo virus: A novel VACV isolated during a zoonotic outbreak in Brazil. **Emerging Infections Disease**, v.11, n.12, p.1935-8, 2005.

LEITE, J.A.; *et al.* Brazilian *Vaccinia virus* strains show genetic polymorphism at the *ati* gene. **Virus Genes**, v.35, p.531–539, 2007.

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

LOBATO, Z.I.P., *et al.* Surto de vaccínia bovina causada pelo vírus *Vaccinia* na região da Zona da Mata Mineira. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.32, n.54, p.45-52, 2005.

LORETTO, D. Demografia e seleção de hábitat de marsupiais arborícolas neotropicais com uso de ninhos artificiais. Dissertação de mestrado. 2006. Universidade Federal do Rio de Janeiro.

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

LUIS, A.D.; HAYMAN, D.T.S.; O'SHEA, T.J.. *et al.* A comparison of bats and rodents as reservoirs of zoonotic viruses: are bats special? **Proc R Soc B**, v. 280: 20122753, 2013.

MACKENZIE, R.B. Public health importance of rodents in South America. **Bull. Wid Hith Org.**, v.47, p.161-169, 1972.

MACRINI, T.E. *Monodelphis domestica*. **MAMMALIAN SPECIES**, n.760, p.1–8, 2004.

MACRINI, T.E. Development of the Ethmoid in *Caluromys philander* (Didelphidae, Marsupialia) With a Discussion on the Homology of the Turbinal Elements in Marsupials. **THE ANATOMICAL RECORD**, v.297, p.2007–2017, 2014.

MARCINAK, J.; *et al.* Household Transmission of Vaccinia Virus from Contact with a Military Smallpox Vaccinee -Illinois and Indiana, 2007. **Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR). Centers for Disease Control**, v.56, n.19, p.478-481, 2007.

MALPICA, F.J.R.; CORDERO, R.H. *Sylvilagus brasiliensis*. The IUCN Red List of Threatened Species. Mexican Association for Conservation and Study of Lagomorphs (AMCELA). 2008.

MCCOLLUM, A.M.; DAMON, I.K. Human Monkeypox. **Clinical Infectious Diseases**, V.2, p.260–267, 2014.

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

MEDAGLIA, M.L.G.; *et al.* Spread of Cantagalo Virus to Northern Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n.7, p.1142-1143, 2009.

MEDAGLIA, M.L.G.; *et al.* Genomic analysis, phenotype, and virulence of the historical Brazilian smallpox vaccine strain IOC: Implications for the origins and evolutionary relationships of vaccinia virus. **J. Virol.**, v. 89, n.23, 2015.

MELLO, D.A. *Calomys callosus* Rengger, 1830 (Rodentia-Cricetidea): sua caracterização, distribuição, biologia, criação e manejo de uma cepa em laboratório. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.79, n.1, p.37-44, 1984.

MENDES, C.P.; JÚNIOR, J.F.C. comportamento de *Guerlinguetus ingrami thomas* 1901 (Sciuridae, Rodentia) em um fragmento de mata em cascavel – PR. X Congresso de Ecologia do Brasil, 16 a 22 de Setembro de 2011, São Lourenço - MG

MEYER, H.; *et al.* Gene for A-type inclusion body protein is useful for a polymerase chain reaction assay to differentiate orthopoxviruses. **Journal of Virological Methods**, v.64, p.217-221, 1997.

MILLS, J.N.; *et al.* Methods for Trapping and Sampling Small Mammals for Virologic Testing. **CDC**. 1995.

MILLS, J.N. Biodiversity loss and emerging infectious disease: An example from the rodent-borne hemorrhagic fevers. **BIODIVERSITY**, v.7, n.1, p.9-17, 2006.

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

MOSS, B. Poxviridae: The viruses and their replication in FIELDS, B.N., KNIPE, D.M., HOWLEY, P.M. & GRIFFIN, D.E. **Fields virology**, 6th ed (Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins), 2013.

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

MOTA, B.E.; *et al.* Seroprevalence of orthopoxvirus in an Amazonian rural village, Acre, Brazil. **Arch Virol.**, v.155, n.7, p.1139-44, 2010.

MIRANDA, G.B.; *et al.* Phylogenetic and Phylogeographic Patterns in Sigmodontine Rodents of the Genus *Oligoryzomys*. **Journal of Heredity**, v.100, n.3, p.309–321, 2009.

NAGASSE-SUGAHARA, T.K.; KISIELIUS, J.J. Human vaccinia-like vírus 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.

NASCIMENTO, A.L.C.P.; *et al.* Marsupiais de uma área de caatinga (Pernambuco, Brasil) com registro de nova localidade para *Caluromys philander* (Linnaeus, 1758). **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais, Aquidabã**, v.4, n.1, p.104-110, 2013.



NEWMAN, F.K.; *et al.* Improved assay to detect neutralizing antibody following vaccination with diluted or undiluted vaccinia (Dryvax) vaccine. **J Clin Microbiol**, v.41, n.7, p.3154-7, 2003.

OIE. MANUAL OF DIAGNOSTIC TESTS AND VACCINES FOR TERRESTRIAL ANIMALS (mammals, birds and bees). 2008. Sixth Edition Volume 2.

OLIVEIRA, D.B.; *et al.* Group 1 Vaccinia virus zoonotic outbreak in Maranhão State, Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.89, n.5, p. 1142–1145, 2013.

OLIVEIRA, C.F.; *et al.* Home range and shelter preferences of marsupial *Didelphis aurita* (Wied-Neuwied, 1826) in a fragmented area in southeastern Brazil. **Mammalia**, v.79, n.2, p. 237–240, 2015.

OLIVEIRA, G.; *et al.* From Lesions to Viral Clones: Biological and Molecular Diversity amongst Autochthonous Brazilian Vaccinia Virus. **Viruses**, v.7, p.1218-1237, 2015.

OLIVEIRA, J.A.; BONVICINO, C.R. A new species of sigmodontine rodent from the Atlantic forest of eastern Brazil. **Acta Theriologica**, v.47, n.3, p.307–322, 2002.

OLIVEIRA, M.L.; *et al.* ESTUDO POPULACIONAL DE GAMBÁS, *Didelphis albiventris* (MAMMALIA, DIDELPHIDAE), EM UMPEQUENO FRAGMENTO FLORESTAL. **Mastozoología Neotropical**, v.17, n.1, p.161-165, 2010.

OGRZEWALSKA, M.; *et al.* Epidemiology of Brazilian spotted fever in the Atlantic Forest, state of São Paulo, Brazil. **Parasitology**, v.139, p. 1283–1300, 2012.

PAGLIA, A.P.; *et al.* Lista Anotada dos Mamíferos do Brasil 2ª Edição. **OCCASIONAL PAPERS IN CONSERVATION BIOLOGY**, Occasional Paper n.6, 2012.

PAISE, G.; VIEIRA, E.M. DAILY ACTIVITY OF A NEOTROPICAL RODENT (OXYMYCTERUS NASUTUS): SEASONAL CHANGES AND INFLUENCE OF ENVIRONMENTAL FACTORS. **Journal of Mammalogy**, v.87, n.4, p.733–739, 2006.

PARESQUE, R.; *et al.* Karyology of the Atlantic forest rodent Juliomys (Cricetidae): A new karyotype from southern Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v. 32, n.2, p.301-305, 2009.

PARKER, S.; BULLER, R.M. A review of experimental and natural infections of animals with monkeypox virus between 1958 and 2012. **Future Virol**, February v.8, n.2, p.129–157, 2013

PEDREIRA, A.J. Dinâmica populacional e área de vida de Oxymycterus roberti (Rodentia, Muridae) em Campo Úmido do Planalto Central, Brasília – DF. Dissertação de Mestrado, Departamento de Ecologia. Universidade de Brasília. 1998.

PERES, M.G.; *et al.* Serological study of vaccinia virus reservoirs in areas with and without official reports of outbreaks in cattle and humans in São Paulo, Brazil. **Arch Virol.**, v.158, n.12, p.2433-4, 2013.

PERES, M.G.; *et al.* Dogs and Opossums Positive for Vaccinia Virus during Outbreak Affecting Cattle and Humans, São Paulo State, Brazil. **Emerg Infect Dis.**, v.22, n. 2, 2016.

PERCEQUILLO, A.R.; *et al.* Systematic Review of Genus Cerradomys Weksler, Percequillo and Voss, 2006 (Rodentia: Cricetidae: Sigmodontinae: Oryzomyini), with Description of Two New Species from Eastern Brazil. **American Museum of Natural History**, n. 3622, p.1-46, 2008.

PHIFER-RIXEY, M.; NACHMAN, M.W. Insights into mammalian biology from the wild house mouse *Mus musculus*. **eLife**, v.4, e05959, 2015.

PIRES, A.S.; *et al.* Use of space by *Necromys lasiurus* (Rodentia, Sigmodontinae) in a grassland among Atlantic Forest fragments. **Mamm.biol.**, v.75, p.270–276, 2010.

POCOCK, M.J.O.; *et al.* Adaptations of animals to commensal habitats: population dynamics of house mice *Mus musculus domesticus* on farms. **Journal of Animal Ecology**, v.73, p.878–888, 2004.

PONTES ARM, BRAZIL CM, NORMANDE IC, PERES PHAL. Disponível em: <[http://www.mma.gov.br/estruturas/chm/\\_arquivos/14\\_Biodiv\\_14\\_Cap15.pdf](http://www.mma.gov.br/estruturas/chm/_arquivos/14_Biodiv_14_Cap15.pdf)> Acessado em: 07/02/2016

PÓVOA, C.P.; BRANDEBURGO, M.A.M. Study of the social hierarchy and territoriality of *Calomys callosus* Rengger, 1830 (Rodentia: Cricetidae). **Braz. J. Biol.**, v.67, n.3, p.429-432, 2007.

PÜTTKER, T.; *et al.* MOVEMENT DISTANCES OF FIVE RODENT AND TWO MARSUPIAL SPECIES IN FOREST FRAGMENTS OF THE COASTAL ATLANTIC RAINFOREST, BRAZIL. **ECOTROPICA**, v. 12, p.131–139, 2006.

Prefeitura de Contagem. Disponível em: <<http://www.contagem.mg.gov.br>> Acessado em: 07/02/2016

Prefeitura de Ouro Preto. Disponível em: <<http://www.ouropreto.mg.gov.br/informacoes-gerais>> Acessado em: 07/02/2016

Prefeitura do Serro. Disponível em: <<http://www.serro.mg.gov.br/o-serro.html>> Acessado em: 07/02/2016

QUIXABEIRA-SANTOS, J.C.; *et al.* Animal Movement and Establishment of Vaccinia Virus Cantagalo Strain in Amazon Biome, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.17, n.4, p.726-729, 2011.

RAMOS, V.N. Ecologia alimentar de pequenos mamíferos de áreas de cerrado no sudeste do Brasil. Dissertação de mestrado. 2007. Universidade Federal de Uberlândia.

REED, K.D.; *et al.* The Detection of Monkeypox in Humans in the Western Hemisphere. **The New England Journal of Medicine**, v350, n.4, p.342-350, 2004.

REHFELD, I.S.; *et al.* Vaccinia virus Transmission through Experimentally Contaminated Milk Using a Murine Model. **PLoS ONE**, v.10, n.5, 2015.

REYNOLDS, M.G.; *et al.* A Silent Enzootic of an Orthopoxvirus in Ghana, West Africa: Evidence for Multi-Species Involvement in the Absence of Widespread Human Disease. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v.82, n.4, p. 746–754, 2010.

RIBEIRO, L.F.; *et al.* Behavioral patterns of *Guerlinguetus ingrami* (Thomas, 1901) from three natural populations in Atlantic forest fragments in Espírito Santo state, Southeastern Brazil. **Natureza on line**, v.7, n.2, p.92-96, 2009.

RIMOIN, A.W.; *et al.* Major increase in human monkeypox incidence 30 years after smallpox vaccination campaigns cease in the Democratic Republic of Congo. **PNAS**, v. 107, n.37, p. 16262–16267, 2010.

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

ROBERTS, K.L.; *et al.* Vaccinia virus morphogenesis and Dissemination. **Trends in Microbiology**, v.16, n.10, p.472-479, 2008.

ROPP, S.L.; *et al.* PCR Strategy for Identification and Differentiation of Smallpox and Other Orthopoxviruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, n.8, p.2069-2076, 1995.

ROSSI, N.F. Pequenos mamíferos não-voadores do Planalto Atlântico de São Paulo: Identificação, história natural e ameaças. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Zoologia. 2011.

SANCHES, V.G.A.; *et al.* ÁREA DE VIDA DE DIDELPHIS ALBIVENTRIS (MARSUPIALIA, DIDELPHIDAE) EM UMA ILHA DO RIO PARANÁ, BRASIL. **Anais do III Congresso Latino Americano de Ecologia**, 10 a 13 de Setembro de 2009, São Lourenço - MG

SANT'ANA, F.J.F.; *et al.* Outbreaks of vesicular disease caused by Vaccinia virus in dairy cattle from Goiás State, Brazil (2010-2012). **Pesq. Vet. Bras.**, v.33, n.7, p.860-866, 2013.

SANGER, F.; *et al.* DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Biotechnology**, v.24, n.54, p.104-108, 1977.

SAMBROOK, FRITSCH, MANIATIS. Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd Edition, Vol. 3, pages E3 -E4; **Cold Spring Harbor Laboratory Press**. 1989.

SCHATZMAYR, H.G.; *et al.* Human and animal infections by vaccinia-like viruses in the state of Rio de Janeiro: A novel expanding zoonosis. **Vaccine**. 29S, D65– D69. 2011.

SCHMIDT, F.I.; *et al.* Poxvirus host cell entry. **Current Opinion in Virology**, v. 2, p.20–27, 2012.

Senac. Disponível em:

<[http://www.descubraminas.com.br/Turismo/DestinoPagina.aspx?cod\\_destino=10&cod\\_pgi=2167](http://www.descubraminas.com.br/Turismo/DestinoPagina.aspx?cod_destino=10&cod_pgi=2167)> Acessado em: 07/02/2016

SHCHELKUNOV, S.N. An Increasing Danger of Zoonotic Orthopoxvirus Infections. **PLOS Pathogens**, v.9, n.12, p.1-4, 2013.

SILVA-FERNANDES, A.T.; *et al.* Natural human infections with Vaccinia virus during bovine vaccinia outbreaks. **Journal of Clinical Virology**, v.44, p.308–313, 2009.

SMITH, G.L.; MCFADDEN, G. Smallpox: anything to declare? **Nat Rev Immunol**, v.2, n.7, p.521-7, 2002.

SMITH, G.L.; *et al.* The formation and function of extracellular enveloped vaccinia virus. *Journal of General Virology*, v. 83, p.2915–2931, 2002.

SMITH, G.L.; *et al.* VACCINIA VIRUS MOTILITY. **Annu. Rev. Microbiol.**, v.57, p.323–42, 2003.

SMITH, P. *Gracilinanus microtarsus* - FAUNA Paraguay. **Handbook of the Mammals of Paraguay**,. n.42, 2012

SOMMARO, L.; *et al.* Corn mice (*Calomys musculinus*) movement in linear habitats of agricultural ecosystems. **Journal of Mammalogy**, v. 91, n.3, p.668–673, 2010.

STIVANIN, M.; *et al.* USO DO HABITAT E AREA DE VIDA DE PEQUENOS MAMÍFEROS NO PARQUE ESTADUAL DO PAPAGAIO - CHARAO NO MUNICÍPIO DE SARANDI/RS. **X Congresso de Ecologia do Brasil**, 16 a 22 de Setembro de 2011, São Lourenço – MG.

STUMPP, R.G.A.V. *Cuíca-graciosa* (*Gracilinanus agilis*). **Bicho da Vez - nº.08**, Universidade Federal de Viçosa, Museu de Zoologia João Moojen. 2009.

TRINDADE, G.S.; *et al.* Araçatuba virus, a vaccinia-like virus associated with infections in humans and cattle. **Emerg Infect Dis.**, v.9, n.2, p.155-60, 2003.

TRINDADE, G.S.; *et al.* Belo Horizonte virus: a vaccinia-like virus lacking the A-type inclusion body gene isolated from infected mice. **J. Gen Virol.**, v.434, n.54, p.56-59, 2004.

TRINDADE, G.S.; *et al.* Short report: Isolation of two vaccinia virus strains from a single bovine vaccinia outbreak in rural area from Brazil: Implications on the emergence of zoonotic orthopoxviruses. **Am J Trop Med Hyg.**, v.75, n.3, p.486-90, 2006.

TRINDADE, G.S.; *et al.* Zoonotic Vaccinia virus infection in Brazil: Clinical description and implications for health professionals. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, n.4, p.1370-1372, 2007a.

TRINDADE, G.S.; *et al.* Brazilian Vaccinia Viruses and Their Origins. **Emerging Infectious Diseases**, v.13, n.7, p.965-972, 2007

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

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

TRINDADE, G.S.; *et al.* Zoonotic Vaccinia Virus: Clinical and Immunological Characteristics in a Naturally Infected Patient. **Clinical Infectious Diseases**, v.48, p.37–40, 2009.

UEDA, Y.; *et al.* Studies on Cotia Virus - an Unclassified Poxvirus. **J. gen. Virol.**, v.40, p.163-276, 1978.

VALASEK, M.A.; REPA, J.J. The power of real-time PCR. **Adv Physiol Educ.** v.29, n.151–159, 2005.

VIANA, F.A.B. GUIA TERAPÊUTICO VETERINÁRIO. 2ª ed. 2007. Ed. CEM.

VIEIRA, M.V. Dynamics of a rodent assemblage in a cerrado of southeast Brazil. **Rev. Bras. Biol.**, v.57, n.1, p.99-107, 1997.

VORA, N.M.; *et al.* Human Infection with a Zoonotic Orthopoxvirus in the Country of Georgia. **N ENGL J MED.**, v.372 n.13 p.1223-1230, 2015.

VOROU, R.M.; *et al.* Cowpox virus infection: an emerging health threat. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v.21, n.2, p.153–156, 2008.

WHISSON, D.A.; *et al.* HOME RANGE AND MOVEMENTS OF ROOF RATS (RATTUS RATTUS) IN AN OLD-GROWTH RIPARIAN FOREST, CALIFORNIA. **Journal of Mammalogy**, v.88, n.3, p.589–594, 2007.

ZAFAR, A.; *et al.* Nosocomial Buffalopoxvirus Infection, Karachi, Pakistan. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 6, p.902-904, 2007.

ZANGRANDI, P.L.; *et al.* SEMELPARIDADE NA CATITA MARMOSOPS INCANUS (DIDELPHIMORPHIA, DIDELPHIDAE). **Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil**, 23 a 28 de Setembro de 2007, Caxambu - MG

ZIJLSTRA, M.; *et al.* A necrotising ulcer after rescuing a kitten. **BMJ Case Rep**, 2013.



## **IX. LISTA DE TRABALHOS PUBLICADOS EM ANAIS DE EVENTOS**

### **XXV Brazilian Congress of Virology & IX MERCOSUR MEETING OF VIROLOGY, 2014, Ribeirão Preto**

1. **MIRANDA, J. B.**; Borges, I. A.; MULLER, B. U.; FERREIRA, P. C. P.; BONJARDIM, C. A.; KROON, E. G.; HOWARD, J. C.; TRINDADE, G. S. STUDY OF THE CIRCULATION OF VACCINIA VIRUS IN SMALL RODENTS OF URBAN AREAS OF THE STATE OF MINAS GERAIS.

2. ALVES, P. A.; AMARAL, C. D.; Borges, I. A.; **MIRANDA, J. B.**; SACCHETTO, L.; COSTA, G. B.; ABRAHAO, J. S.; PAGLIA, A. P.; FIQUEIREDO, L. T. M.; DRUMOND, B. P.; TRINDADE, G. S. AN OLD VIRUS IN A NEW SPOT: DETECTION OF HANTAVIRUS IN WILD RODENTS FROM CENTRAL REGION OF MINAS GERAIS STATE.

3. COSTA, G. B.; Almeida, G.G.; FIGUEIREDO, P. O.; **MIRANDA, J. B.**; BONJARDIM, C. A.; FERREIRA, P. C. P.; ABRAHAO, J. S.; KROON, E. G.; TRINDADE, G. S. EVIDENCE OF ORTHOPOXVIRUS CIRCULATION AMONG URBAN DOMESTIC CATS, MINAS GERAIS, BRAZIL.

4. REZENDE, I.; AMARAL, C. D.; SACCHETTO, L.; **MIRANDA, J. B.**; Borges, I. A.; VIEIRA, F. N.; ALVES, P. A.; PAGLIA, A. P.; TRINDADE, G. S.; DRUMOND, B. P. Prospective study of Flaviviruses in small mammals, in Minas Gerais, Brazil.

5. SACCHETTO, L.; **MIRANDA, J. B.**; AMARAL, C. D.; Borges, I. A.; VIEIRA, F. N.; AMBROSIO, L. L. D.; ALVES, P. A.; SIQUEIRA, T.; PAGLIA, A. P.; TRINDADE, G. S.; DRUMOND, B. P. Prospective study of Coronaviruses in rodents in a rural area of Minas Gerais.

### **Simpósio de Microbiologia da UFMG. A Microbiologia e a Sociedade, 2014.**

1. **MIRANDA, J. B.**; MULLER, B. U.; Borges, I. A.; FERREIRA, P. C. P.; BONJARDIM, C. A.; ABRAHAO, J. S.; KROON, E. G.; HOWARD, J. C.; TRINDADE, G. S. DETECÇÃO DE fvb virus EM ROEDORES DE AMBIENTES URBANOS.

2. AMARAL, C.D.; BORGES, I.A.; ALVES, P.A.; **MIRANDA, J.B.**; FIGUEIREDO, P.; COSTA, G.B.; ABRAHÃO, J.S.; PAGLIA, A.P.; FIGUEIREDO, L.T.M.; DRUMOND, B.P.; TRINDADE, G.S. Um vírus antigo, um novo local: Detecção de Hantavirus em roedores silvestres na região central do estado de Minas Gerais.

3. COSTA, G.B.; ALMEIDA, G.G.; FIGUEIREDO, P.O.; **MIRANDA, J.B.**; BONJARDIM, C.A.; FERRERIA, P.C.P.; ABRAHÃO, J.S.; KROON, E.G.; TRINDADE, G.S. Detecção de Orthopoxvirus (OPV) em gatos domésticos de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

4. REZENDE, I.M.; AMARAL, C.D.; SACCHETO, L.; **MIRANDA, J.B.**; BORGES, I.A.; VIEIRA, F.N.; ALVES, P.A.; PAGLIA, A.P.; TRINDADE, G.S.; DRUMOND, B.P. Prospecção de flavivírus em pequenos mamíferos em Minas Gerais, Brasil.

5. SACCHETO, L.; **MIRANDA, J.B.**; AMARAL, C.D.; BORGES, I.A.; VIEIRA, F.N.; AMBRÓSIO, L.L.D.; ALVES, P.A.; SIQUEIRA, T.R.; PAGLIA, A.P.; TRINDADE, G.S. Estudo prospectivo de coronavírus em roedores de uma área rural de Minas Gerais.

## **II Biennial Conference of the Wildlife Disease Association Latin American, 2015.**

1. COSTA, G. B.; ALMEIDA, L. R.; SANTOS, A.; de OLIVEIRA, J. S.; SARAIVA-SILVA, A. T.; **MIRANDA, J. B.**; MARQUES, F. A.; FERREIRA, P. C. P.; ABRAHAO, J. S.; KROON, E. G.; PEREIRA, P. L. L.; TRINDADE, G. S. Serologic evidence of circulating Orthopoxviruses in wild coatis (*Nasua nasua* Linnaeus, 1766) from Brazil and the risks for emergence in urban areas.

## **XI Congreso Argentino de Virología e II Congreso Latinoamericano de Virología, 2015.**

1. COSTA, G. B.; AMARAL, C. D.; **MIRANDA, J. B.**; Borges, I. A.; VIEIRA, F. N.; KROON, E. G.; FIGUEIREDO, L. T. M.; ABRAHAO, J. S.; DRUMOND, B. P.; TRINDADE, G. S. Hantavirus circulation among small mammals and humans from Atlantic Forest and Cerrado in North Minas Gerais, Brazil.

### **III Simpósio Avançado de Virologia Hermann Schatzmayr, 2015.**

1. ALVES, P. A.; AMARAL, C. D.; MIRANDA, J. B.; REZENDE, I.; SACCHETTO, L.; DRUMOND, B. P.; FERREIRA, P. C. P.; ABRAHAO, J. S.; TRINDADE, G. S. A qPCR platform for zoonotic viral agents diagnostic: application on rodents emerging viruses detection at the Minas Gerais State, Brazil.

### **II Simpósio de Microbiologia da UFMG. Microbiologia Translacional: Do ambiente natural às aplicações biotecnológicas, 2015.**

1. **MIRANDA, J. B.**; Borges, I. A.; VIEIRA, F. N.; MARQUES, F. A.; COSTA, G. B.; de OLIVEIRA, J. S.; FERREIRA, P. C. P.; BONJARDIM, C. A.; EIRAS, A. E. ; PAGLIA, A. P.; ABRAHAO, J. S.; KROON, E. G.; TRINDADE, G. S. EVIDÊNCIAS DA CIRCULAÇÃO DE Orthopoxvirus EM PEQUENOS MAMÍFEROS DAS REGIÕES DE RIO POMBA E SERRO EM MINAS GERAIS.

2. AMARAL, C. D.; COSTA, G. B.; Borges, I. A ; **MIRANDA, J. B.**; VIEIRA, F. N. ; TOLARDO, A.; FARIGINOLI, M.; KROON, E. G.; FIQUEIREDO, L. T. M.; ABRAHAO, J. S.; DRUMOND, B. P.; PAGLIA, A. P.; TRINDADE, G. S. Hantavirus circulation among small mammals and humans from Atlantic Forest and Cerrado in North Minas Gerais, Brazil.

3. COSTA, G. B.; ALMEIDA, L. R.; SANTOS, A.; de OLIVEIRA, J. S.; SARAIVA-SILVA, A. T.; **MIRANDA, J. B.**; MARQUES, F. A.; FERREIRA, P. C. P.; ABRAHAO, J. S.; KROON, E. G.; PEREIRA, P. L. L.; SANTOS, D. EMERGÊNCIA DE ORTHOPOXVIRUS EM ÁREAS URBANAS: EVIDÊNCIAS SOROLÓGICAS DA CIRCULAÇÃO ENTRE QUATIS E CÃES DE AMBIENTE SILVESTRE E URBANO EM MINAS GERAIS, BRASIL.

4. de OLIVEIRA, J. S.; COSTA, G. B.; AMARAL, C. D.; **MIRANDA, J. B.**; FIQUEIREDO, P. O.; MARQUES, F. A ; SARAIVA-SILVA, A. T.; Borges, I. A.; FIQUEIREDO, L. T. M.; ABRAHAO, J. S.; KROON, E. G.; PAGLIA, A. P.; EIRAS, A. E. ; TRINDADE, G. S. EVIDÊNCIA SOROLÓGICA DA CIRCULAÇÃO DE Hantavirus EM PEQUENOS MAMÍFEROS DA REGIÃO METROPOLITANA DE BELO HORIZONTE, MINAS GERAIS, BRASIL.

**XXVI Brazilian Congress of Virology & X Mercosur Meeting of Virology, 2015, Florianópolis.**

**1. MIRANDA, J. B.;** Borges, I. A.; FRANCO-LUIZ, A. P. M; MARQUES, F. A.; VIEIRA, F. N.; MULLER, B. U.; FERREIRA, P. C. P.; BONJARDIM, C. A.; ABRAHAO, J. S.; KROON, E. G.; HOWARD, J. C.; PAGLIA, A. P.; EIRAS, A. E.; TRINDADE, G. S. DETERMINATION OF ANTI-ORTHOPOXVIRUS SEROPREVALENCE AMONG RODENTS OF DIFERENT HABITATS OF MINAS GERAIS WITH A NEWLY DEVELOPED IgG ELISA ESSAY.

**2. MIRANDA, J. B.;** Borges, I. A.; VIEIRA, F. N.; MARQUES, F. A.; COSTA, G. B.; de OLIVEIRA, J. S.; BONJARDIM, C. A.; FERREIRA, P. C. P.; PAGLIA, A. P.; EIRAS, A. E.; ABRAHAO, J. S.; KROON, E. G.; TRINDADE, G. S. EVIDENCE OF ORTHOPOXVIRUS CIRCULATION AMONG SMALL MAMMALS OF SABARÁ, BRAZIL.

3. AMARAL, C. D.; COSTA, G. B.; Borges, I. A.; **MIRANDA, J. B.;** VIEIRA, F. N.; KROON, E. G.; FIQUEIREDO, L. T. M.; ABRAHAO, J. S.; DRUMOND, B. P.; PAGLIA, A. P.; TRINDADE, G. S. Hantavirus circulation among small mammals and humans from Atlantic Forest and Cerrado in North Minas Gerais, Brazil.

4. REZENDE, I.; AMARAL, C. D.; MIRANDA, J. B.; Borges, I. A.; VIEIRA, F. N.; ALVES, P. A.; TRINDADE, G. S.; DRUMOND, B. P. Prospecting Flaviviruses in small mammals in Minas Gerais, Brazil.

5. SACCHETTO, L.; **MIRANDA, J. B.;** AMARAL, C. D.; Borges, I. A.; VIEIRA, F. N.; ALVES, P. A.; PAGLIA, A. P.; TRINDADE, G. S.; DRUMOND, B. P. Prospective study of Coronaviruses in small wild mammals in the State of Minas Gerais, Brazil.

## X. ANEXOS

**Anexo 1:** Resultados de qPCR, PRNT e ELISA das amostras de pequenos mamíferos da coleção Sabará.

Espécie	Área	qPCR Fígado C11R	qPCR Fígado A56R	qPCR Soro C11R	PRNT	ELISA
<i>Oligoryzomys sp.</i>	Mata	IND CT 32,76	-	-	*	-
<i>Oligoryzomys sp.</i>	Mata	IND CT 36,76	-	-	POS	-
<i>Oligoryzomys sp.</i>	Mata	IND CT 30,79	-	-	*	POS
<i>Oligoryzomys sp.</i>	Mata	-	IND CT 37,14	-	-	-
<i>Guerlinguetus sp.</i>	Campo	*	*	-	-	*
<i>Guerlinguetus sp.</i>	Mata	IND CT 36,71	-	-	-	*
<i>Akodon cursor</i>	Mata	*	*	*	*	*
<i>Necomys lasiurus</i>	Campo	-	-	POS CT 35,47; 37	-	-
<i>Necomys lasiurus</i>	Campo	-	-	-	-	-
<i>Necomys lasiurus</i>	Campo	IND CT 35,54	-	-	-	-
<i>Necomys lasiurus</i>	Campo	IND CT 31,84	-	-	-	-
<i>Necomys lasiurus</i>	Campo	IND CT 33,59	-	-	-	IND
<i>Necomys lasiurus</i>	Campo	*	*	-	*	*
<i>Necomys lasiurus</i>	Campo	POS CT 36,07	-	POS CT 37	POS	*
<i>Necomys lasiurus</i>	Campo	*	*	-	*	*
<i>Necomys lasiurus</i>	Campo	*	*	-	-	*
<i>Necomys lasiurus</i>	Campo	*	*	-	*	*
<i>Necomys lasiurus</i>	Campo	-	-	-	POS	-
<i>Necomys lasiurus</i>	Campo	POS CT 32,23; 34,97	-	-	-	-
<i>Necomys lasiurus</i>	Campo	IND CT 33,99	-	-	-	-
<i>Necomys lasiurus</i>	Campo	*	*	IND CT 37,27	POS	*
<i>Necomys lasiurus</i>	Campo	*	*	*	*	*
<i>Necomys lasiurus</i>	Campo	POS CT 36	-	POS CT 33,97	-	-
<i>Necomys lasiurus</i>	Campo	-	-	-	-	-
<i>Necomys lasiurus</i>	Campo	*	*	*	*	*
<i>Necomys lasiurus</i>	Campo	*	*	*	*	*
<i>Necomys lasiurus</i>	Campo	*	*	-	*	*

Espécie	Área	qPCR Fígado C11R	qPCR Fígado A56R	qPCR Soro C11R	PRNT	ELISA
<i>Necromys lasiurus</i>	Campo	*	*	*	*	*
<i>Necromys lasiurus</i>	Campo	*	*	-	-	*
<i>Necromys lasiurus</i>	Campo	*	*	-	-	POS
<i>Necromys lasiurus</i>	Campo	IND CT 32,57	-	*	*	*
<i>Necromys lasiurus</i>	Campo	*	*	*	*	*
<i>Necromys lasiurus</i>	Campo	*	*	*	*	*
<i>Necromys lasiurus</i>	Campo	*	*	-	-	-
<i>Necromys lasiurus</i>	Campo	*	*	-	POS	-
<i>Necromys lasiurus</i>	Campo	*	*	*	-	*
<i>Necromys lasiurus</i>	Campo	POS CT 31,82	POS CT 37,14	POS CT 32,98	POS	POS
<i>Necromys lasiurus</i>	Campo	POS CT 33,4	-	POS CT 31,96	-	POS
<i>Necromys lasiurus</i>	Campo	POS CT 30,79; 30,98	-	POS CT 34,91; 37	-	IND
<i>Necromys lasiurus</i>	Campo	*	*	-	-	-
<i>Necromys lasiurus</i>	Campo	IND CT 31,33	-	-	-	-
<i>Necromys lasiurus</i>	Campo	*	*	*	*	*
<i>Necromys lasiurus</i>	Campo	-	-	INDCT 30,93	-	*
<i>Necromys lasiurus</i>	Campo	IND CT 36,47	-	-	-	-
<i>Necromys lasiurus</i>	Campo	-	-	POS CT 31,93	-	-
<i>Necromys lasiurus</i>	Campo	POS CT 32,89; 34,97	-	-	-	-
<i>Cerradomys subflavus</i>	Campo	-	-	-	-	IND
<i>Cerradomys subflavus</i>	Campo	POS CT 36,25	-	POS CT 33,24	-	-
<i>Cerradomys subflavus</i>	Campo	IND CT 33,78	-	*	-	*
<i>Cerradomys subflavus</i>	Campo	IND CT 34,3	-	-	-	-
<i>Cerradomys subflavus</i>	Campo	POS CT 34,49; 34,97	POS CT 38,55	-	-	-
<i>Cerradomys subflavus</i>	Campo	IND CT 36,8	-	-	-	-
<i>Cerradomys subflavus</i>	Campo	IND CT 33,9	-	-	-	-
<i>Cerradomys subflavus</i>	Campo	IND CT 34,64	-	-	-	-
<i>Cerradomys subflavus</i>	Campo	POS CT 36,78	POS CT 34,14	-	-	-

Espécie	Área	qPCR Fígado C11R	qPCR Fígado A56R	qPCR Soro C11R	PRNT	ELISA
<i>Cerradomys subflavus</i>	Campo	IND CT 33,71	-	-	-	-
<i>Cerradomys subflavus</i>	Campo	*	*	-	*	IND
<i>Sylvilagus brasiliensis</i>	Campo	*	*	-	-	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Mata	*	*	-	-	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Mata	*	*	-	-	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Mata	*	*	*	*	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Mata	*	*	-	-	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Mata	*	*	-	-	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Mata	*	*	IND CT 35,91	-	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Mata	*	*	-	-	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Mata	*	*	-	-	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Mata	*	*	*	*	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Mata	*	*	-	-	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Mata	*	*	*	*	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Mata	*	*	*	*	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Mata	*	*	-	POS	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Mata	*	*	-	-	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Mata	IND CT 33,49	-	-	-	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Mata	-	-	IND CT 30,67	-	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Mata	IND CT 34,55	-	-	-	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Mata	*	*	*	*	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Mata	*	*	*	*	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Mata	*	*	-	-	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Mata	*	*	-	POS	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Mata	*	*	-	-	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Mata	*	*	-	-	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Mata	*	*	-	*	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Mata	*	*	-	-	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Mata	*	*	-	-	*

Espécie	Área	qPCR Fígado C11R	qPCR Fígado A56R	qPCR Soro C11R	PRNT	ELISA
<i>Didelphis albiventris</i>	Mata	*	*	-	POS	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Mata	*	*	-	-	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Mata	*	*	*	*	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Mata	*	*	*	*	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Mata	*	*	*	*	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Mata	*	*	*	*	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Mata	*	*	-	-	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Mata	*	*	-	*	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Mata	*	*	-	-	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Mata	*	*	-	-	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Mata	*	*	*	*	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Mata	*	*	*	*	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Mata	*	*	*	*	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Mata	*	*	*	*	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Mata	*	*	-	*	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Mata	*	*	IND CT 32,17	-	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Mata	*	*	*	*	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Mata	*	*	-	*	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Mata	*	*	*	*	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Mata	*	*	*	*	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Mata	*	*	-	-	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Mata	*	*	*	*	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Mata	*	*	IND CT 36,83	-	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Mata	-	IND CT 38	*	*	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Mata	*	*	*	*	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Mata	*	*	IND CT 33,24	*	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Mata	*	*	-	*	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Mata	*	*	-	-	*



Espécie	Área	qPCR Fígado C11R	qPCR Fígado A56R	qPCR Soro C11R	PRNT	ELISA
<i>Didelphis albiventris</i>	Mata	*	*	*	*	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Mata	*	*	-	-	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Mata	*	*	-	*	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Mata	*	*	-	-	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Mata	*	*	-	-	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Mata	*	*	-	*	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Mata	*	*	*	*	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Mata	*	*	-	*	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Mata	*	*	-	*	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Mata	*	*	-	POS	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Mata	*	*	*	*	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Mata	*	*	*	*	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Mata	*	*	*	*	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Mata	*	*	*	*	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Mata	*	*	-	-	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Mata	*	*	-	-	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Mata	*	*	-	-	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Mata	*	*	-	-	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Mata	*	*	-	-	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Mata	*	*	*	-	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Mata	*	*	-	-	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Mata	*	*	-	-	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Mata	*	*	-	-	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Mata	*	*	*	*	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Mata	*	*	-	-	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Mata	*	*	IND CT 35,49	-	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Mata	*	*	-	-	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Mata	*	*	-	-	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Mata	*	*	*	*	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Mata	*	*	-	-	*

Espécie	Área	qPCR Fígado C11R	qPCR Fígado A56R	qPCR Soro C11R	PRNT	ELISA
<i>Didelphis albiventris</i>	Mata	*	*	*	*	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Mata	*	*	-	-	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Mata	*	*	*	*	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Mata	*	*	*	*	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Mata	*	*	*	*	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Mata	*	*	*	*	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Mata	*	*	-	-	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Campo	*	*	-	POS	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Campo	*	*	-	-	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Campo	*	*	-	-	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Campo	*	*	-	-	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Campo	*	*	-	-	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Campo	*	*	-	-	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Campo	*	*	-	-	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Campo	*	*	*	*	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Campo	*	*	-	-	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Campo	*	*	*	*	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Campo	*	*	-	-	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Campo	*	*	*	*	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Campo	*	*	-	-	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Campo	*	*	*	*	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Campo	*	*	-	-	*
<i>Didelphis albiventris</i>	Campo	*	*	-	-	*
<i>Gracilinanus microtarsus</i>	Mata	*	*	*	*	*
<i>Gracilinanus microtarsus</i>	Mata	*	*	-	-	*
<i>Gracilinanus microtarsus</i>	Mata	*	*	-	*	*
<i>Gracilinanus microtarsus</i>	Mata	IND CT 34,04	-	*	*	*
<i>Gracilinanus microtarsus</i>	Mata	*	*	-	*	*
<i>Gracilinanus microtarsus</i>	Mata	*	*	*	*	*

<b>Espécie</b>	<b>Área</b>	<b>qPCR Fígado C11R</b>	<b>qPCR Fígado A56R</b>	<b>qPCR Soro C11R</b>	<b>PRNT</b>	<b>ELISA</b>
<i>Gracilinanus microtarsus</i>	Mata	*	*	-	-	*
<i>Gracilinanus microtarsus</i>	Mata	*	*	-	-	*
<i>Gracilinanus microtarsus</i>	Mata	*	*	-	*	*
<i>Gracilinanus microtarsus</i>	Mata	*	*	*	*	*

\*:Não testado. -: Negativo.

**Anexo 2:** Resultados de qPCR, PRNT e ELISA das amostras de pequenos mamíferos da coleção Serro.

Espécie	Área	qPCR Fígado C11R	qPCR Fígado A56R	qPCR Soro C11R	PRNT	ELISA
<i>Trinomys setosus</i>	Mata	-	-	-	-	POS
<i>Trinomys setosus</i>	Mata	-	-	-	-	POS
<i>Trinomys setosus</i>	Mata	-	-	POS CT 36,45; 39,33	-	POS
<i>Trinomys setosus</i>	Mata	-	-	-	-	IND
<i>Trinomys setosus</i>	Mata	-	-	IND CT 37	-	POS
<i>Trinomys setosus</i>	Mata	POS CT 32,78	-	POS CT 35,12	-	POS
<i>Trinomys setosus</i>	Mata	*	*	-	-	POS
<i>Trinomys setosus</i>	Mata	-	-	*	*	*
<i>Trinomys setosus</i>	Mata	*	-	-	-	POS
<i>Trinomys setosus</i>	Mata	*	-	*	*	*
<i>Calomys tener</i>	Pasto	-	-	-	-	-
<i>Calomys tener</i>	Pasto	-	-	-	-	-
<i>Calomys expulsos</i>	Pasto	*	*	-	-	-
<i>Calomys expulsos</i>	Pasto	POS CT 31,67	-	POS CT 37	POS	-
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	Peridomicílio	-	-	-	-	-
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	Peridomicílio	-	-	-	-	-
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	Peridomicílio	*	*	-	-	-
<i>Mus musculus</i>	Peridomicílio	-	-	-	-	-
<i>Mus musculus</i>	Peridomicílio	POS CT 36,33	POS CT 37	-	-	-
<i>Mus musculus</i>	Peridomicílio	-	-	IND CT 33,73	-	-
<i>Rattus rattus</i>	Peridomicílio	-	IND CT 39,85	-	-	-
<i>Rattus rattus</i>	Peridomicílio	-	-	-	-	-
<i>Rattus rattus</i>	Peridomicílio	-	-	IND CT 36,91	-	POS
<i>Oecomys catherinae</i>	Mata	*	*	-	-	-

Espécie	Área	qPCR Fígado C11R	qPCR Fígado A56R	qPCR Soro C11R	PRNT	ELISA
<i>Akodon sp.</i>	Mata	-	-	-	POS	IND
<i>Cerradomys subflavus</i>	Pasto	-	-	-	-	-
<i>Nectomys squamipes</i>	Pasto	-	-	-	-	POS
<i>Didelphis aurita</i>	Pasto	*	*	-	-	*
<i>Didelphis aurita</i>	Peridomicílio	*	*	-	-	*
<i>Didelphis aurita</i>	Peridomicílio	*	*	*	-	*
<i>Didelphis aurita</i>	Peridomicílio	*	*	-	-	*
<i>Didelphis aurita</i>	Peridomicílio	*	*	-	-	*
<i>Didelphis aurita</i>	Peridomicílio	*	*	-	-	*
<i>Didelphis aurita</i>	Peridomicílio	*	*	-	-	*
<i>Didelphis aurita</i>	Peridomicílio	*	*	-	-	*
<i>Didelphis aurita</i>	Peridomicílio	*	*	-	-	*
<i>Didelphis aurita</i>	Mata	*	*	-	-	*
<i>Didelphis aurita</i>	Mata	*	*	-	-	*
<i>Didelphis aurita</i>	Mata	*	*	-	-	*
<i>Didelphis aurita</i>	Mata	*	*	-	-	*
<i>Marmosops incanus</i>	Mata	*	*	-	-	*
<i>Marmosops incanus</i>	Mata	*	*	-	-	*
<i>Marmosops incanus</i>	Mata	*	*	-	-	*
<i>Marmosops incanus</i>	Mata	*	*	-	-	*
<i>Marmosops incanus</i>	Mata	*	*	-	-	*
<i>Marmosops incanus</i>	Mata	*	*	-	-	*
<i>Caluromys philander</i>	Mata	IND CT 32,21	-	-	-	*
<i>Gracilinanus agilis</i>	Mata	*	*	-	-	*
<i>Gracilinanus agilis</i>	Pasto	*	*	-	-	*

\*:Não testado. -: Negativo.

**Anexo 3:** Resultados de qPCR, PRNT e ELISA das amostras de pequenos mamíferos da coleção Rio Pomba.

Espécie	Área	qPCR Fígado C11R	qPCR Fígado A56R	qPCR Soro C11R	PRNT	ELISA
<i>Akodon cursor</i>	Mata	IND CT 31,69	-	-	-	-
<i>Akodon cursor</i>	Mata	*	*	IND CT 33,34	-	POS
<i>Akodon cursor</i>	Mata	*	*	-	-	-
<i>Akodon cursor</i>	Mata	-	-	IND CT 32	POS	POS
<i>Akodon cursor</i>	Mata	*	*	-	-	POS
<i>Akodon cursor</i>	Mata	-	-	-	-	IND
<i>Akodon cursor</i>	Mata	*	*	IND CT 37	POS	IND
<i>Akodon cursor</i>	Pasto	-	-	-	-	IND
<i>Akodon cursor</i>	Pasto	*	*	*	*	*
<i>Akodon cursor</i>	Pasto	*	*	-	POS	-
<i>Akodon cursor</i>	Pasto	*	*	*	*	*
<i>Akodon cursor</i>	Pasto	*	*	-	-	-
<i>Akodon cursor</i>	Pasto	*	*	-	-	-
<i>Akodon cursor</i>	Pasto	*	*	-	-	-
<i>Akodon cursor</i>	Pasto	-	-	-	-	-
<i>Akodon cursor</i>	Pasto	-	-	-	-	POS
<i>Akodon cursor</i>	Pasto	*	*	*	*	*
<i>Akodon cursor</i>	Pasto	-	-	-	-	-
<i>Akodon cursor</i>	Pasto	-	-	-	-	POS
<i>Akodon cursor</i>	Pasto	*	*	-	-	*
<i>Akodon cursor</i>	Pasto	-	-	-	-	-
<i>Akodon cursor</i>	Pasto	-	-	-	-	POS
<i>Akodon cursor</i>	Pasto	-	-	-	-	-
<i>Akodon c.f. mystax</i>	Pasto	-	-	-	-	-
<i>Akodon c.f. mystax</i>	Pasto	-	-	-	-	-

Espécie	Área	qPCR Fígado C11R	qPCR Fígado A56R	qPCR Soro C11R	PRNT	ELISA
<i>Akodon c.f. mystax</i>	Pasto	-	-	-	POS	-
<i>Akodon c.f. mystax</i>	Pasto	-	-	-	-	-
<i>Akodon c.f. mystax</i>	Pasto	-	-	-	-	-
<i>Akodon c.f. mystax</i>	Pasto	*	*	-	-	-
<i>Akodon c.f. mystax</i>	Pasto	*	-	-	-	-
<i>Akodon c.f. mystax</i>	Pasto	*	*	*	-	*
<i>Akodon c.f. mystax</i>	Pasto	*	*	-	-	-
<i>Akodon c.f. mystax</i>	Pasto	-	-	-	-	*
<i>Akodon c.f. mystax</i>	Pasto	-	-	*	-	*
<i>Akodon c.f. mystax</i>	Pasto	-	-	-	-	-
<i>Akodon c.f. mystax</i>	Pasto	*	-	*	-	*
<i>Akodon c.f. mystax</i>	Pasto	*	*	-	*	-
<i>Akodon c.f. mystax</i>	Pasto	-	-	-	*	-
<i>Akodon c.f. mystax</i>	Pasto	*	*	-	-	-
<i>Akodon c.f. mystax</i>	Pasto	*	*	-	*	-
<i>Akodon c.f. mystax</i>	Pasto	IND CT 31,61	-	-	*	-
<i>Akodon c.f. mystax</i>	Pasto	-	-	-	*	-
<i>Akodon c.f. mystax</i>	Pasto	-	-	-	-	-
<i>Akodon c.f. mystax</i>	Pasto	*	*	*	*	*
<i>Akodon c.f. mystax</i>	Pasto	-	-	IND CT 37,14	POS	-
<i>Akodon c.f. mystax</i>	Pasto	-	-	-	-	-
<i>Akodon c.f. mystax</i>	Pasto	*	*	-	-	-
<i>Akodon c.f. mystax</i>	Pasto	-	-	-	-	*
<i>Akodon c.f. mystax</i>	Pasto	*	*	*	*	*
<i>Akodon c.f. mystax</i>	Pasto	*	-	IND CT 36,91	-	-
<i>Akodon c.f. mystax</i>	Pasto	-	-	-	-	*

Espécie	Área	qPCR Fígado C11R	qPCR Fígado A56R	qPCR Soro C11R	PRNT	ELISA
<i>Calomys tener</i>	Pasto	-	-	-	-	-
<i>Calomys tener</i>	Pasto	-	-	-	-	-
<i>Calomys tener</i>	Pasto	*	*	-	-	*
<i>Calomys tener</i>	Pasto	-	-	-	-	-
<i>Calomys tener</i>	Pasto	-	-	-	-	-
<i>Calomys tener</i>	Pasto	POS CT 29,72; 30,59	-	*	-	*
<i>Calomys tener</i>	Pasto	-	-	-	-	-
<i>Calomys tener</i>	Pasto	-	-	*	-	-
<i>Calomys tener</i>	Pasto	*	*	-	-	-
<i>Calomys tener</i>	Pasto	-	-	-	-	-
<i>Calomys tener</i>	Pasto	*	*	IND CT 35,95	-	-
<i>Calomys tener</i>	Pasto	-	-	-	-	-
<i>Calomys tener</i>	Pasto	*	IND CT 36,35	-	-	*
<i>Calomys tener</i>	Pasto	IND CT 30,46	-	-	-	-
<i>Calomys tener</i>	Pasto	*	*	-	-	-
<i>Calomys tener</i>	Pasto	-	-	-	-	-
<i>Calomys tener</i>	Pasto	*	*	-	-	-
<i>Calomys tener</i>	Pasto	*	*	*	*	*
<i>Calomys tener</i>	Pasto	*	*	-	-	-
<i>Calomys tener</i>	Pasto	*	*	-	-	-
<i>Calomys tener</i>	Pasto	*	*	IND CT 35,18	-	-
<i>Calomys tener</i>	Pasto	*	*	-	-	-
<i>Calomys tener</i>	Pasto	*	*	-	-	-
<i>Calomys tener</i>	Pasto	*	*	-	*	-
<i>Calomys tener</i>	Pasto	-	-	*	*	*
<i>Calomys tener</i>	Pasto	*	*	-	*	-





Espécie	Área	qPCR Fígado C11R	qPCR Fígado A56R	qPCR Soro C11R	PRNT	ELISA
<i>Calomys tener</i>	Pasto	*	*	-	-	-
<i>Calomys tener</i>	Pasto	-	-	-	-	*
<i>Calomys tener</i>	Pasto	*	*	*	*	*
<i>Calomys tener</i>	Pasto	*	*	*	-	*
<i>Calomys tener</i>	Pasto	-	-	-	-	-
<i>Calomys tener</i>	Pasto	-	-	-	-	-
<i>Calomys tener</i>	Pasto	*	*	*	-	-
<i>Calomys tener</i>	Pasto	*	*	-	-	-
<i>Calomys tener</i>	Pasto	*	*	-	-	-
<i>Calomys sp.</i>	Pasto	*	*	*	*	*
<i>Calomys sp.</i>	Pasto	*	*	-	*	*
<i>Calomys sp</i>	Pasto	-	-	-	-	-
<i>Calomys sp</i>	Pasto	*	*	-	-	-
<i>Calomys sp</i>	Pasto	*	*	-	-	-
<i>Calomys sp</i>	Pasto	*	*	-	-	-
<i>Calomys sp</i>	Pasto	*	*	-	-	-
<i>Calomys sp</i>	Pasto	*	*	*	-	*
<i>Calomys sp</i>	Pasto	*	*	-	-	-
<i>Calomys sp</i>	Pasto	*	*	-	-	-
<i>Calomys sp</i>	Pasto	*	*	-	-	-
<i>Calomys sp</i>	Pasto	*	*	-	-	-
<i>Calomys sp</i>	Pasto	*	*	-	-	-
<i>Calomys sp</i>	Pasto	*	*	-	-	-
<i>Calomys sp</i>	Pasto	*	*	-	-	-
<i>Calomys sp</i>	Pasto	*	*	IND CT 28,42	-	*
<i>Calomys sp</i>	Pasto	*	*	IND CT 35,25	-	-
<i>Calomys sp</i>	Pasto	*	*	-	-	-
<i>Calomys sp</i>	Pasto	*	*	-	-	*
<i>Calomys sp</i>	Pasto	-	-	*	*	*

Espécie	Área	qPCR Fígado C11R	qPCR Fígado A56R	qPCR Soro C11R	PRNT	ELISA
<i>Calomys sp</i>	Pasto	-	-	IND CT 32,65	-	-
<i>Necomys lasiurus</i>	Pasto	*	*	-	-	-
<i>Necomys lasiurus</i>	Pasto	*	*	-	-	-
<i>Necomys lasiurus</i>	Pasto	*	*	-	*	*
<i>Necomys lasiurus</i>	Pasto	*	*	IND CT 37,14	*	-
<i>Necomys lasiurus</i>	Pasto	*	*	-	*	-
<i>Necomys lasiurus</i>	Pasto	-	IND CT 37	-	POS	*
<i>Necomys lasiurus</i>	Pasto	POS CT 31; 31,19	-	-	-	-
<i>Necomys lasiurus</i>	Pasto	-	-	IND CT 36,9	-	-
<i>Necomys lasiurus</i>	Pasto	*	*	IND CT 32,81	-	POS
<i>Necomys lasiurus</i>	Pasto	*	*	IND CT 34,96	-	-
<i>Necomys lasiurus</i>	Pasto	IND CT 30,66	-	-	-	-
<i>Necomys lasiurus</i>	Pasto	-	-	-	-	-
<i>Necomys lasiurus</i>	Pasto	*	*	-	-	*
<i>Necomys lasiurus</i>	Pasto	*	*	*	-	*
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	Pasto	-	-	-	-	-
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	Pasto	*	*	-	-	-
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	Mata	-	-	-	-	-
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	Mata	-	-	-	-	-
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	Peridomicílio	-	-	*	*	*
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	Peridomicílio	-	-	-	-	-
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	Peridomicílio	-	-	-	-	-

Espécie	Área	qPCR Fígado C11R	qPCR Fígado A56R	qPCR Soro C11R	PRNT	ELISA
<i>Juliomys pictipes</i>	Mata	-	-	-	-	*
<i>Juliomys pictipes</i>	Mata	-	-	-	-	-
<i>Guerlinguetus ingrami</i>	Mata	*	*	IND CT 36,45	-	*
<i>Nectomys squamipes</i>	Pasto	-	-	-	-	-
<i>Oxymycterus sp.</i>	Pasto	-	-	-	-	-
<i>Didelphis aurita</i>	Peridomicílio	*	*	-	-	*
<i>Didelphis aurita</i>	Peridomicílio	*	*	-	-	*
<i>Didelphis aurita</i>	Peridomicílio	*	*	-	-	*
<i>Didelphis aurita</i>	Mata	*	*	-	-	*
<i>Didelphis aurita</i>	Mata	*	*	IND CT 34,49	-	*
<i>Didelphis aurita</i>	Mata	*	*	-	*	*
<i>Didelphis aurita</i>	Mata	*	*	-	-	*
<i>Didelphis aurita</i>	Mata	*	*	-	POS	*
<i>Didelphis aurita</i>	Mata	*	*	-	-	*
<i>Gracilinanus microtarsus</i>	Pasto	*	*	-	-	*
<i>Gracilinanus microtarsus</i>	Mata	*	*	-	*	*
<i>Gracilinanus microtarsus</i>	Mata	*	*	-	-	*
<i>Gracilinanus microtarsus</i>	Mata	*	*	-	-	*
<i>Gracilinanus microtarsus</i>	Mata	*	*	-	-	*
<i>Gracilinanus microtarsus</i>	Mata	*	*	-	-	*
<i>Gracilinanus microtarsus</i>	Mata	*	*	-	-	*

<b>Espécie</b>	<b>Área</b>	<b>qPCR Fígado C11R</b>	<b>qPCR Fígado A56R</b>	<b>qPCR Soro C11R</b>	<b>PRNT</b>	<b>ELISA</b>
<i>Gracilinanus microtarsus</i>	Mata	*	*	*	*	*
<i>Monodelphis americana</i>	Mata	-	-	-	-	*
<i>Caluromys philander</i>	Mata	POS CT 31,45	-	POS CT 30,26	-	-

\*:Não testado. -: Negativo.