

O POTENCIAL DO VÍRUS DA VARÍOLA COMO ARMA BIOLÓGICA NO CENÁRIO MUNDIAL ATUAL

Major Nádia Vaez Gonçalves da Cruz^{1,2,*}, Dra. Clarissa R. Damaso²

*e-mail: nadiavaez@hotmail.com, farmacêutica, ¹Instituto de Biologia do Exército, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. ²Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

RESUMO

A erradicação da varíola é considerada uma das maiores conquistas da humanidade, alcançada em 1980 graças ao uso de uma das mais potentes vacinas já desenvolvidas. Porém, no cenário mundial atual, o vírus da varíola é considerado uma ameaça em potencial que pode ser usado como arma biológica para fins de bioterrorismo. Avanços da biotecnologia, ausência de imunidade em grande parte da população mundial, estoques de vacinas restritos e o risco de ainda existirem estoques clandestinos do vírus são os principais motivos que possibilitariam o retorno da doença. Este é um trabalho de revisão que abrange vários aspectos históricos, epidemiológicos e clínicos da varíola e sua erradicação, mas, principalmente, trata das medidas de contenção e prevenção contra varíola usadas no passado e disponíveis na atualidade, bem como, dos esforços a nível mundial para evitar que a varíola volte a aterrorizar novamente a humanidade.

Palavras-chave: Varíola. Bioterrorismo. Defesa Biológica. Vacina antivariólica. Vírus vaccinia.

ABSTRACT

The eradication of smallpox is considered one of the greatest achievements of mankind that was achieved in 1980 thanks to the use of one of the most potent vaccine ever developed. However, in the present global scenario, variola virus is considered a potential threat that can be used as a biological weapon for bioterrorism purposes. Advances in biotechnology, lack of immunity in much of the world population, restricted vaccine stocks, and the risk that hidden stocks of the virus still exist are the main reasons that would allow the disease to return. The present review covers several historical, epidemiological, and clinical aspects of smallpox and its eradication, but mainly it discusses measures for containment and prevention of smallpox used in the past and those currently available, as well as the worldwide efforts to prevent smallpox from returning and haunt the human race again.

Keywords: Smallpox. Bioterrorism. Biological defense. Antiviral vaccine. Vaccinia Virus.

1. INTRODUÇÃO

Ao longo de mais de três milênios, a varíola, uma grave doença infectocontagiosa exclusivamente humana, se tornou parte da história da humanidade, sendo responsável pela morte ou

desfiguração de milhões de pessoas em todo o mundo. Há a estimativa de que, somente no século XX, o número de mortes por varíola foi superior a 300 milhões (OMS, 2016). Foi um longo e árduo caminho percorrido até a sua

erradicação, declarada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 1980, graças à bem-sucedida campanha de vacinação mundial, encerrada dois anos depois (FENNER et al., 1988).

Assim, no cenário delineado pós-erradicação, o receio, a nível mundial, é que a varíola ainda possa ressurgir e que o vírus da varíola (VARV) possa ser utilizado como uma arma biológica para fins de bioterrorismo. Os ataques bioterroristas com esporos de *Bacillus anthracis* enviados através de cartas às autoridades e políticos nos EUA, em setembro de 2001, fizeram crescer ainda mais esse receio. Como exemplo, verifica-se a classificação do VARV na categoria “A” dos agentes biológicos para bioterrorismo, elencados pelo “Centers of Disease Control and Prevention” - CDC (DAMON et al., 2014; CDC, 2019).

Registros históricos demonstram que a transmissão intencional da varíola, para causar baixas no inimigo, já foi realizada há vários séculos atrás, sendo bem sucedida. Em 1763, durante a colonização inglesa nos Estados Unidos, o Exército Britânico, para vencer a resistência dos índios nativos, os presenteou com centenas de cobertores anteriormente utilizados por pessoas com varíola. Os nativos adquiriram a doença e foram praticamente dizimados (EITZEN; TAKAFUJI, 1997).

Ainda hoje, estoques do vírus da varíola (VARV) são mantidos em dois centros colaboradores da OMS - o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) em Atlanta nos Estados Unidos, e o *Variola Virus Maximum Containment Laboratories to the State Research Center of Virology and Biotechnology* (SRC VB VECTOR) em Koltsovo, na Rússia (DAMON et al., 2014). A manutenção é para fins de pesquisas que propiciem o melhor preparo em caso de retorno da doença. Os projetos desenvolvidos e seus resultados são controlados por um comitê assessor da OMS para pesquisa com vírus da varíola (ACVVR), formado por especialistas em poxvírus, que se reúne anualmente na sede em Genebra, na Suíça (OMS, 2018).

Em 1996, o comitê assessor da OMS vigente estabeleceu que os estoques de VARV de ambos os repositórios deveriam ser destruídos em junho de 1999. Entretanto, devido à falta de consenso entre grupos de especialistas, o prazo para a destruição vem sendo postergado, com o estabelecimento de metas de pesquisa e desenvolvimento a serem alcançados antes da perda em definitivo do vírus. As pesquisas que envolvem a manipulação de VARV, com a anuência da ACVVR, são voltadas exclusivamente para o desenvolvimento de novas vacinas,

antivirais e desenvolvimento de testes diagnósticos mais rápidos e eficientes (OMS, 2016).

Passados quarenta anos da erradicação, atualmente, mais de 80% da população mundial não mais possui imunidade protetora, conferida pela vacina, que protegia tanto contra o vírus da varíola, como também cruzadamente contra os demais vírus do gênero *Orthopoxvirus*. Consequentemente, há um cenário atual de doenças reemergentes causadas por ortopoxvírus, como infecções pelo vírus cowpox em vários países da Europa, pelo vírus monkeypox na África e pelo vírus Cantagalo no Brasil, por exemplo (DAMON et al., 2014). Alguns países, como Estados Unidos, Israel e Inglaterra, vacinam estrategicamente determinados grupos de sua população, como por exemplo, primeiros-respondedores, militares enviados para região de conflito e pesquisadores que trabalham com poxvírus (GOLDEN; HOOPER, 2011).

Outro fato preocupante é a possibilidade de ainda existirem estoques não conhecidos, ilegais ou esquecidos, do vírus. Tal possibilidade foi evidenciada em junho de 2014, quando diversos frascos contendo o vírus da varíola foram encontrados abandonados em uma antiga instalação do “Food and Drug

Administration” (FDA) no campus do “National Institutes of Health” (NIH), nos Estados Unidos. Esse material permaneceu esquecido por seis décadas dentro de uma caixa comum, que foi encontrada por um servidor do NIH, sem conhecimento técnico na área, que felizmente informou ao FDA antes de manipular. O material foi recolhido pelo CDC, cujos especialistas constataram a viabilidade do vírus e os destruíram (REARDON, 2014).

Mais recentemente, a biologia sintética, quando usada em algumas pesquisas de uso dual, ou seja, que podem servir tanto para fins benéficos quanto maléficis, tem sido considerada como uma ferramenta em potencial que pode permitir a reemergência da varíola (KOBLENTZ, 2017). Em abril de 2015, foi estabelecido pela OMS um grupo de trabalho encarregado de realizar levantamento de informações técnico-científicas para auxiliar as deliberações do Grupo de Assessoramento Independente sobre as Implicações das Tecnologias de Biologia Sintética relacionadas à Varíola (IAG), que se reuniram em junho daquele mesmo ano. A conclusão do IAG foi que, de forma geral, houve um aumento do risco de reemergência. Foi constatado que, mesmo sendo proibida, a recriação do vírus da varíola, a partir de sequências gênicas do seu DNA, tem se tornado mais acessível de

ser executada, inclusive, por pequenos laboratórios sem as condições adequadas de biossegurança e bioproteção, uma vez que as ferramentas tecnológicas estão se tornando mais acessíveis tanto em relação a custo, como em facilidade de utilização. Dessa forma, foi recomendado por aquele comitê assessor que as medidas de preparo para garantir a capacidade de rápida detecção e resposta, em caso de ressurgimento da varíola, fossem aumentadas e as normas regulatórias de biossegurança revistas (OMS, 2016). É importante ressaltar que a OMS estritamente proíbe a tentativa de reconstruir o VARV, manipular seu genoma por técnicas moleculares ou possuir acima de 20% do seu genoma (>37000 pares de bases). Apenas a posse ou síntese de fragmentos abaixo de 500 pb, para fins diagnósticos, é permitida sem prévio consentimento da OMS via ACVVR (OMS, 2016).

Dessa forma, a possível existência de estoques clandestinos do VARV, somado à produção de vírus a partir de genomas sintéticos, à falta de imunidade na maioria dos indivíduos jovens e à fácil transmissibilidade da doença são os principais fatores que contribuem para a preocupação com o potencial uso do VARV como arma biológica (DAMON et al., 2014).

2. EPIDEMIOLOGIA, PATOGÊNESE, CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS, DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DA VARÍOLA

A varíola se caracteriza pela formação de pústulas disseminadas pelo corpo, de padrão uniforme, com uma taxa de letalidade em torno de 30 a 40%. Porém, quando atingia uma população totalmente desprovida de imunidade prévia, alcançava taxas em torno de 50%, principalmente, em crianças e indivíduos acima dos 40 anos (DAMON, 2013; MOSS, 2011; FENNER et al., 1988). Além da forma mais comum da varíola, denominada *variola major*, houve uma forma variante e menos predominante denominada *variola minor*, que apresentava sintomatologia mais branda e taxa de letalidade muito menor, de 1% apenas, chamada de “Alastrim”. No Brasil, após 1930, houve o predomínio exclusivo dessa forma mais branda da doença (GEDDES, 2006; FENNER et al., 1988). A transmissão ocorre principalmente por via respiratória, através da inalação de perdigotos ou microgotículas expelidas pelo doente, o que requer geralmente um contato próximo e prolongado entre pessoas, e também, por meio de fômites. O período de maior transmissibilidade coincide com o surgimento do *rash*, quando há elevada produção viral na orofaringe, até cerca de 7 a 10 dias

(BREMAN; HENDERSON, 2002; PAULI et al., 2010; DAMON, 2013). O vírus também está presente na urina e secreção conjuntival, cujos níveis decrescem com a convalescência (BREMAN; HENDERSON, 2002).

Após a entrada na orofaringe, o vírus atinge os linfonodos locais e alcança os vasos sanguíneos, levando a uma rápida viremia. Em seguida, num período de 4 a 14 dias, a amplificação viral ocorre principalmente em baço e fígado, levando à viremia secundária que, por sua vez, encaminha uma grande produção viral às vísceras, à orofaringe novamente e à pele. A infecção pode ser controlada pelo sistema imunológico, caso a doença não seja muito severa, tanto por resposta de células T e B quanto pela resposta humoral, através de anticorpos neutralizantes, que estão presentes após uma semana de infecção (BREMAN; HENDERSON, 2002). A incidência da doença era mais alta no inverno, pois, além do maior tempo de permanência das pessoas em ambientes fechados, a baixa temperatura e umidade propiciam a viabilidade prolongada das partículas virais no ambiente (BREMAN; HENDERSON, 2002; MOSS, 2013).

Clinicamente, a varíola major (figura 1) pode ser classificada em 4 tipos: i) varíola ordinária – correspondia a 90% dos

casos sendo a gravidade proporcional a extensão do *rash*, apresentando viremia, febre e prostração; ii) varíola modificada – em pessoas previamente vacinadas, apenas 5% dos casos, poucas lesões, pródromos brandos e caso-fatalidade abaixo de 10%; iii) varíola plana – também compreende 5% dos casos, apresenta lento desenvolvimento das lesões, infecção generalizada e taxa de caso-fatalidade elevada (80%); iv) varíola hemorrágica – menos de 1% dos casos, lesões e mucosas com sangramento, fatalidade em até uma semana do início da doença (FENNER et al., 1988; DAMON, 2013).

O período de incubação da varíola ordinária pode durar de 7 a 17 dias, quando não há sintomas clínicos da doença. Iniciam-se então os sinais e sintomas inespecíficos como febre, dor nas costas, dor de cabeça, febre, vômito e prostração. Um dia antes do *rash* cutâneo surgem lesões nas mucosas de garganta e boca (BREMAN; HENDERSON, 2002). O *rash* se apresenta homogêneo e com distribuição centrífuga, ou seja, maior concentração de lesões nas extremidades, face e membros (figura 1). As lesões têm início com um aspecto papular, no 4º ou 5º dia de surgimento dos sinais e sintomas, evoluindo sequencialmente para máculas, vesículas, até atingir o estágio pustular no 7º dia. Por volta do 14º dia as crostas

estarão formadas e começam a cair. A primo-infecção por varíola confere proteção permanente para o indivíduo (DAMON, 2013). Além da despigmentação e marcas na pele, sequelas podem ocorrer após a varíola severa, que correspondem a: panoftalmite e cegueira em 1% dos casos, em consequência de infecção secundária ou ceratite viral; 2%

das crianças com varíola podem desenvolver artrite, por infecção viral na metáfise óssea; pode ocorrer ainda encefalite em menos de 1% dos casos e demais complicações de ordem respiratória, pneumonia e bacteremia, que aumentam a mortalidade (BREMAN; HENDERSON, 2002; FENNER et al., 1988).



Figura 1. Indivíduo com a varíola major. Verificam-se as lesões pustulares pelo corpo em mesmo estágio e distribuição centrífuga, ou seja, maior concentração nas extremidades do corpo. Fonte: *Centers for Disease Control and Prevention (CDC)*.

A doença considerada para o diagnóstico diferencial da varíola é a varicela, que é causada pelo vírus varicela zoster (*Herpesviridae*). As diferenças clínicas entre as duas doenças podem ser facilmente identificadas, como mostra a tabela 1. São elas: presença de lesões nas palmas das mãos e plantas dos pés na varíola, enquanto que na varicela isso é

muito incomum; na varicela, diferentemente da varíola, a distribuição das lesões é centrípeta, ou seja, maior concentração no tronco e, também na varicela, elas se encontram em estágios diferentes de amadurecimento, enquanto que na varíola há uniformidade (DAMON, 2013; FENNER et al., 1988).

Tabela 1. Diagnóstico diferencial de varíola e varicela (DAMON, 2013).

DIFERENCIAÇÃO	VARIÓLA	VARICELA
Febre	3 dias após o <i>rash</i>	Simultânea ao <i>rash</i>
Características do <i>rash</i>:		
Desenvolvimento	Mesmo estágio	Diferentes estágios
Padrão de distribuição	Centrífugo	Centrípeto
Em palmas e plantas	Presença	Ausência
Óbito	10-30% (<i>variola major</i>)	Raro

O diagnóstico laboratorial da varíola continua avançando, como forma de preparo em Defesa Biológica. Atualmente, a confirmação de um diagnóstico de varíola ou um falso diagnóstico positivo, acarretaria consequências graves, como por exemplo, causar pânico na população (DAMON et al., 2014). Por isso, é imprescindível que testes de detecção rápidos e confiáveis estejam disponíveis e permitam a diferenciação de outras comorbidades clinicamente similares, como infecções por outros Orthopoxvirus (OPXV) ou pelo vírus varicela-zoster (VZV) (OMS, 2010; MAKSYUTOV et al., 2016). Os testes de detecção de ácido nucleico por PCR *real time* são os que mais evoluíram e melhor atendem tal finalidade nos dias atuais (SHCHELKUNOV et al., 2011;

MAKSYUTOV et al., 2016; KONDAS et al., 2015).

No passado, assim que o paciente recebia o diagnóstico de varíola, ele deveria ser imediatamente isolado dos demais, e a equipe de atendimento médico deveria utilizar os Equipamentos de Proteção Individual (EPI) adequados à proteção da infecção por via respiratória, bem como implementar as condutas para evitar a propagação da doença. Toda a equipe médica e contatos próximos deveriam ser vacinados. Tais medidas continuam vigentes, em caso de ressurgimento da varíola nos dias atuais. Se realizada ainda no período de incubação, a vacina pode evitar ou atenuar os sintomas da doença. O tratamento era voltado para manter a hidratação e nutrição do doente, bem como, conter infecções secundárias (BREMAN; HENDERSON,

2002, FENNER et al., 1988). Uma opção não paliativa é a administração de globulina hiperimune, conhecida por VIG, que pode também ser utilizada preventivamente nos indivíduos com suspeita de contatos e em complicações relacionadas à vacinação (OMS, 2010; MOSS, 2011). Atualmente, caso haja o ressurgimento da varíola, preconiza-se o uso de dois antivirais: i) de forma compassiva, pois ainda não foi licenciado, o CMX-001 (Brancidofovir; Chimerix Inc.), que inibe a replicação do DNA viral. É licenciado para infecções por citomegalovírus e adenovírus e busca licenciamento para tratar infecções por poxvírus (LANIER et al., 2010); ii) TPOXX (Tecovirimat ou ST-246, Siga Pharmaceuticals), único antiviral licenciado pelo FDA, em julho de 2018, para uso contra varíola (FDA, 2019). A prevenção da varíola se dá pelo uso de vacinas eficazes descritas a seguir.

3. VACINAÇÃO ANTIVARIÓLICA

3.1. Resposta imune associada

As vacinas antivariólicas consistem de vírus vaccinia (VACV; gênero *Orthopoxvirus*) na forma replicante (FENNER et al., 1988). Durante a campanha de vacinação mundial, a aplicação percutânea era feita através da

escarificação da pele com uma agulha bifurcada, ou com uma pistola injetora, no antebraço esquerdo abaixo do ombro ou ainda na perna de meninas para não deixar a marca no braço (FENNER et al., 1988; MOSS, 2011). Após a vacinação, em indivíduos imunocompetentes, ocorria a replicação viral local com formação de uma pápula, em 3 a 5 dias, e envolta por eritema, que evoluía em poucos dias para vesícula, seguindo para pústula e posterior formação de uma crosta, que se soltava cerca de 2 a 3 semanas depois do evento. Outras reações comuns que acompanhavam esse período eram febre baixa, dor de cabeça, mialgia, fadiga e linfadenopatia local, em decorrência da produção de citocinas (MOSS, 2011). No local do processo inflamatório ficava uma marca de cicatrização referida por “pega”, que era associada à proteção contra varíola. Essa marca definitiva na pele, durante a campanha, auxiliava na verificação de quem fora vacinado ou não (FENNER et al., 1988).

A imunidade é considerada efetiva por 20 ou 30 anos e gradualmente enfraquece após esse período (VINER; ISAACS, 2005; TAUB et al., 2008; MOSS, 2011). Quanto ao título mínimo para promover proteção, um estudo prospectivo realizado em 1972, ou seja, antes da erradicação da varíola, verificou que indivíduos

suscetíveis à infecção por VARV apresentavam títulos de neutralização para VACV menores do que 1/32, ao contrário, indivíduos com títulos iguais ou maiores do que este não desenvolveram a doença (MACK et al., 1972; HAMMARLUND et al., 2003).

Indivíduos com anormalidades severas de células T desenvolvem infecção generalizada por VACV, enquanto que, em casos de aglobulinemia, isso não ocorre. Tal evidência indica que a resposta imune celular também apresenta papel essencial na resposta primária (MOSS, 2011). Independentemente dos papéis protetores desempenhados tanto pela imunidade celular quanto pela humoral, contra a infecção por VARV, os estudos prospectivos realizados quando o vírus era circulante evidenciam que os níveis de anticorpos neutralizantes são bons marcadores de proteção (MACK et al., 1972; HAMMARLUND et al., 2003).

3.2. Vacinas antivariólicas: do passado ao futuro

Nas décadas de 1960 e 1970, época da campanha mundial para erradicação da varíola, as vacinas antivariólicas foram produzidas a partir de diferentes cepas de VACV, em larga escala, a partir de propagação viral em bovinos ou ovos embrionados, sem controle do número de

passagens. Esse antigo método de produção resultava em vacinas contendo uma população geneticamente heterogênea de VACV, ou *quasispecies*, pois raramente se realizava a purificação clonal (FENNER et al., 1988). Lister (Reino Unido), Temple of Heaven (China), Dryvax[®], New York City Board of Health (EUA), IOC (Brasil) e Tashkent (Ex-União Soviética) são algumas cepas de VACV de patogenicidade variável e empregadas em diferentes partes do mundo, sendo atualmente referidas como vacinas de primeira geração (SANCHÉZ-SAMPEDRO et al., 2015). Porém, tais vacinas apresentavam risco de efeitos adversos em níveis inaceitáveis aos padrões atuais. Indivíduos com histórico de dermatite atópica, por exemplo, não podiam ser vacinados. Complicações pós-vacinação eram raras, porém, frequentemente fatais, como por exemplo, a vaccinia progressiva, que se caracteriza pelo desenvolvimento e espalhamento de lesões necróticas (FULGINITI et al. 2003; SANCHÉZ-SAMPEDRO et al., 2015).

Nos anos 90, devido ao receio do ressurgimento da varíola discutido anteriormente, a OMS passou a incentivar o desenvolvimento de vacinas com perfis mais seguros, que permitissem a ampla administração na população (GOLDEN; HOOPER, 2011; QIN et al., 2011). Nessa

intenção, foi realizado o isolamento de clones virais mais atenuados a partir das vacinas de primeira geração, ou seja, novas cepas menos virulentas foram isoladas, mas com bom potencial imunogênico, que foram referidas como vacinas de segunda geração. Essas cepas também passaram a ser produzidas em cultura de células e não mais obtidas em linfas de bovinos (QIN et al., 2011).

Como exemplo, nos Estados Unidos, em 2004, foi isolado o clone ACAM2000, a partir do plaqueamento em culturas de células da vacina Dryvax[®], uma das vacinas antivariólicas de primeira geração, usada na época da erradicação da varíola (MONATH et al., 2004). Estudos demonstraram que ACAM2000 e Dryvax[®] apresentam imunogenicidade equivalentes (FREY et al., 2009; NALCA; ZUMBRUN, 2010), porém, em modelo animal, a vacina de segunda geração ACAM2000 demonstrou um perfil mais seguro do que a cepa Dryvax[®]. Já em humanos, ACAM2000 apresentou níveis semelhantes de risco de patologias cardíacas e outros efeitos adversos, semelhantes à Dryvax[®] (FREY et al., 2009; NALCA; ZUMBRUN, 2010; VOIGT et al., 2016). Cabe notar que, em um mesmo plaqueamento, também foi isolado o clone 3 que demonstrou ser neurovirulento, característica associada à presença de alguns genes de virulência

ausentes em ACAM2000. Este fato ressalta a importância de vacinas obtidas por purificação clonal, uma vez que as vacinas de primeira geração constituem uma mistura de genomas com características diversas (OSBORNE et al., 2007). A vacina ACAM2000 é licenciada para uso atual nos EUA, porém, ainda continua apresentando contraindicação para indivíduos imunossuprimidos ou com distúrbios de pele, o que levou à necessidade do desenvolvimento de vacinas ainda mais atenuadas (MOSS, 2011; SANCHÉZ-SAMPEDRO et al., 2015).

Uma das estratégias empregadas para obter maior atenuação tem sido a seleção de placas virais que sofreram grande número de sucessivas passagens em cultura de células ou membrana corioalantóica, o que resulta na perda ou truncamento de genes de virulência. As cepas vacinais obtidas dessa forma são ditas como vacinas de terceira geração. Após as passagens, a seleção de placa viral de fenótipo pequeno, ou mesmo a ausência de placas em determinados tipos celulares, é um indício de que há redução na capacidade de disseminação viral e provavelmente perda na virulência. É importante, contudo, que haja a conservação do seu potencial imunogênico. Duas importantes cepas vacinais já foram assim obtidas - LC16m8

e MVA (MESEDA E WEIR, 2010; MOSS, 2011).

A LC16m8 foi isolada no Japão na década de 70, a partir de uma placa viral de fenótipo pequeno, após múltiplas passagens em cultura de células de uma cepa de baixa virulência LC16mO, que por sua vez deriva da vacina de primeira geração VACV Lister . A LC16m8 é a única vacina de terceira geração que foi empregada ainda nos tempos que a varíola existia (SAITO, 2009).

A cepa MVA (Modified VACV Ankara) foi selecionada após mais de 500 passagens da cepa VACV Ankara em fibroblastos de embrião de galinha e apresenta elevada restrição de hospedeiros, replicando de maneira ineficiente na maioria das células de mamíferos (VOLZ E SUTTER, 2017). O sequenciamento completo do seu genoma evidenciou seis grandes deleções, totalizando cerca de 31000 pares de bases, e diversas mutações, que resultaram em uma baixa virulência (ANTOINE et al., 1998; WYATT et al., 1998).

Atualmente, a LC16m8 está licenciada para uso no Japão (KIDOKORO et al., 2005). A vacina com base no MVA (IMVAMUNE®/IMVANEX®/MVA-BN®) está licenciada para uso na Europa e no Canadá, inclusive para aplicação em gestantes, imunocomprometidos e pessoas

com desordens de pele, tendo em vista que não replica em células humanas (BAVARIAN NORDIC, 2019). Desde 2010, o Centro de Estocagem Estratégica Nacional dos Estados Unidos passou a estocar a vacina MVA para atender o público com restrições à vacina ACAM2000, que já era estocada e também utilizada para vacinar militares, equipes de primeiros-respondedores e pesquisadores que trabalham com ortopoxvírus. É indicada uma dose inicial, para ativação da resposta imunológica e uma dose de reforço (BAVARIAN NORDIC, 2019). Isso indica que a vacina MVA pode ter maior utilidade em longo prazo, na prevenção da população em geral contra a varíola, e não em curto prazo, como por exemplo, em caso de resposta emergencial para contenção de surto frente a um ressurgimento da doença (VOIGT et al., 2016).

Vacinas antivariólicas contemporâneas, com ênfase na obtenção de melhor perfil de segurança, também estão sendo estudadas. Tais vacinas compreendem tanto sequências gênicas (plasmídeos) para a expressão de proteínas virais, ou diretamente proteínas com características imunogênicas. Porém, a desvantagem reside nas variações existentes na estrutura de tais proteínas quando comparando VACV e VARV,

comprometendo, assim, a proteção por resposta cruzada (VOIGT et al., 2016).

4. BIODEFESA CONTRA A VARIÓLA NO MUNDO

4.1. Modelos e medidas estabelecidas

Hoje, o ressurgimento da varíola seria considerado uma grande emergência de proporções mundiais, podendo levar a população ao pânico. Cabe lembrar que a varíola é uma doença de notificação internacional obrigatória. Em 1972, foi instituído um tratado multilateral pela proibição do uso, desenvolvimento e estocagem de armas biológicas e toxínicas, e a destruição das mesmas, na “*Biological Weapons Convention*” ou BWC, que entrou em vigor a partir de 1975 (FEAKES, 2017). A oitava e última conferência de revisão dos termos da BWC ocorreu em novembro de 2016 (UNITED NATIONS OFFICE AT GENEVA, 2016). Atualmente, existem 182 países-parte da BWC incluindo o Brasil, cinco são apenas signatários, mas não ratificaram, e 10 são não-signatários (UNITED NATIONS OFFICE AT GENEVA, 2019).

Após os atentados com Antraz em 2001, o *US Department of Homeland Security*, oficializou em 2004 que o vírus causador da *variola major* representava uma ameaça ao país e emitiu uma

“Determinação de Material de Risco” para o VARV, dando início ao estabelecimento das contramedidas médicas. Tal determinação se baseou nas seguintes informações: i) o serviço de inteligência americana já havia descoberto que a antiga União Soviética armazenava grandes quantidades do vírus durante os anos 90; ii) a alta infecciosidade do VARV; iii) a fácil produção em larga-escala; iv) a susceptibilidade da população devido à falta de vacinação por mais de 20 anos; v) a validade avançada das vacinas antivariólicas estocadas e, vi) a crescente onda de ações terroristas pelo mundo (BICE; YESKEY, 2015). Apesar de tais justificativas serem voltadas para os EUA, indubitavelmente, elas abrangem a população mundial, que desde a erradicação da varíola nunca mais foi vacinada e os estoques de vacina da OMS seriam insuficientes. Atualmente, a OMS possui cerca de 33 milhões de doses armazenadas na Suíça e em países comprometidos com doação, em caso de necessidade. A maior parte das doses corresponde a vacinas de primeira geração (OMS, 2018).

O CDC elaborou uma classificação de agentes biológicos quanto ao potencial de risco para uso em bioterrorismo, que compreende três categorias principais - A, B e C. A categoria “A”, na qual o VARV

está classificado, compreende os microrganismos associados às seguintes características: elevada taxa de caso-fatalidade, ser de fácil disseminação entre indivíduos, capacidade de gerar pânico e requerer ações especiais no preparo das equipes de resposta (CDC, 2019). O CDC também estabeleceu protocolos de preparo e resposta em caso de ressurgimento da varíola. Tal planejamento compreende várias ações coordenadas, englobando tanto as que devem ser executadas antes do evento ocorrer, ditas como pré-evento, quanto após a ocorrência da mesma, ou pós-evento (VEENEMA, 2003). As primeiras focam em prevenção e preparo e as últimas em contenção e vigilância.

As ações pré-evento compreendem:

i) preparo para a rápida identificação do caso índice; ii) manutenção de estoques estratégicos de vacinas e antivirais disponíveis e iii) vacinação das equipes especiais para a pronta-atuação (VEENEMA, 2003; WHARTON et al., 2003). Já as ações pós-eventos englobam: i) o rastreamento epidemiológico; ii) vacinação em anel ou de bloqueio, que é a vacinação de todas as pessoas expostas a uma possível infecção; e iii) vacinação das equipes médicas e de pronto-emprego na contenção e assistência.

Deve ser destacada a primeira ação pré-evento, que é primordial para o êxito

na contenção. A identificação do caso-índice dependerá da capacidade das equipes médicas em reconhecer a doença, tomar as medidas de precaução adequadas e notificar rapidamente as autoridades sanitárias. Considerando que um caso clínico de varíola nunca mais foi visto por quase 40 anos, uma política de revisão constante dos conhecimentos dos médicos sobre a doença, que permita o seu rápido diagnóstico na clínica, é uma medida essencial de preparo. Há disponível na página eletrônica do CDC, material didático que permite o rápido acesso as informações necessárias ao diagnóstico diferencial (CDC, 2019-1). É imprescindível para o sucesso na contenção que os médicos consigam realizar o diagnóstico clínico diferencial da varicela (WOODS et al., 2004).

Além do diagnóstico clínico, um teste rápido e específico para o diagnóstico laboratorial pode ser imprescindível para confirmar o primeiro e dar o alerta (WOODS et al., 2004). Além da varicela, temos os casos de doenças pustulares por outros ortopoxvírus que, como comentado anteriormente, tem se tornado cada vez mais frequentes em todo o mundo (SHCHELKUNOV, 2013; SINGH et al., 2012; MOUSSATCHÉ et al., 2008). Apesar de grande parte das infecções por esses vírus estarem associadas a lesões

localizadas, em se tratando de indivíduos imunossuprimidos, pode ocorrer um quadro de lesões disseminadas, assemelhando-se um quadro de varíola branda e, dessa forma, levar a uma falsa suspeita, que só seria confirmada com o diagnóstico laboratorial. No Brasil, tal falsa suspeita pode ocorrer devido à ocorrência endêmica de infecções pelo vírus Cantagalo, uma cepa de vírus vaccinia, que é um ortopoxvírus causador de doença zoonótica pustular branda no homem, principalmente nas zonas rurais (DAMASO et al., 2000; QUIXABEIRA-SANTOS et al., 2011). Alguns métodos moleculares de detecção para VARV e demais ortopoxvírus, baseados em ensaios de Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR) do tipo multiplex, já foram descritos (SHCHELKUNOV et al., 2011; KONDAS et al., 2015; MAKSYUTOV et al., 2016). Até o momento, tais testes permanecem validados e específicos para VARV.

A vacinação de grupos de riscos é uma medida adotada nos EUA e envolve também a vacinação de militares desdobrados para áreas de conflitos (GRABENSTEIN & WINKENWERDER, 2003). Em 2002, a vacina de segunda geração, ACAM 2000, foi aplicada nas tropas americanas que seguiram em missão para o sudoeste da Ásia e República da

Coréia. A vacinação antivariólica em militares também é importante para aqueles que vão a missões na região central da África, uma vez que estarão expostos ao risco de infecção por outro ortopoxvírus, o vírus monkeypox, que é endêmico naquela região (NOLEN et al., 2015).

Com a continuidade nas pesquisas de vacinas antivariólicas mais seguras, atualmente, há a disponibilidade de vacinas que inclusive podem atender indivíduos com restrições àquelas utilizadas no passado. É o caso da vacina composta por MVA produzida pela Bavarian Nordic, já licenciada na Europa (IMVANEX®) e Canadá (IMVAMMUNE®), e em status *fast track* na análise pelo FDA nos EUA (MVA-BN®) (BAVARIAN NORDIC, 2019). A utilização dessas vacinas depende da política interna de segurança e saúde de cada país.

4.2. Biodefesa contra a varíola no Brasil

No Brasil ainda não foram estabelecidas medidas de preparo específicas contra um possível ressurgimento da varíola, abrangendo vacinação de grupos especiais ou manutenção de estoques da vacina. De maneira geral, em situação de ataques com agentes biológicos para fins bélicos ou

bioterrorismo, nosso país dispõe de tropas de pronto-emprego do Exército Brasileiro (EB) e da Marinha do Brasil (MB), especializadas em Defesa Química, Biológica, Radiológica e Nuclear (DQBRN), que atuam na defesa biológica contra a varíola, em conjunto com forças auxiliares civis e militares, como a Defesa Civil e o Corpo de Bombeiros (VASCONCELOS, 2018). Nessa situação, além dos equipamentos de proteção individuais, compatíveis com o nível de risco biológico, seria importante que esses profissionais também estivessem com a proteção definitiva promovida pela vacina antivariólica.

Quanto ao rápido diagnóstico, como comentado anteriormente, é essencial a disponibilidade de teste laboratorial rápido e específico para confirmar um caso suspeito de ressurgimento de varíola. Atualmente, o Instituto de Biologia do Exército, que presta assessoria científica na área biológica ao Sistema de Defesa Química, Biológica, Radiológica e Nuclear do EB, conforme estabelece a Portaria Nº 204-EME, de 14 de dezembro de 2012, dispõe de teste de PCR em tempo real para detectar o vírus da varíola e diferenciá-lo dos demais ortopoxvírus. Conforme já mencionado, no Brasil há a circulação endêmica do vírus Cantagalo, causando zoonoses em áreas rurais. O teste

mencionado já foi validado recentemente com as cepas virais em circulação nas regiões norte, centroeste e sudeste do Brasil (CRUZ, 2019). Isso permite maior confiabilidade da não ocorrência de um resultado falso positivo, como citado anteriormente, no caso de uma infecção por esse vírus em um indivíduo imunossuprimido, com lesões disseminadas pelo corpo semelhantes a uma varíola branda, podendo levar a uma falsa e grave suspeita na clínica, que atualmente pode ser esclarecida de maneira definitiva, com o referido teste validado com as cepas brasileiras.

Caso no futuro seja estabelecido um protocolo específico de resposta no Brasil a uma possível reemergência da varíola, aspectos relacionados ao fortalecimento da capacidade de diagnóstico clínico, com a educação continuada dos profissionais, e a disponibilidade de vacinas e opções terapêuticas, são importantes fatores a serem considerados.

5. REFERÊNCIAS

ANTOINE, G., SCHEIFLINGER, F., DORNER, F., FALKNER, F. G. The complete genomic sequence of the modified vaccinia Ankara strain: comparison with other orthopoxviruses. *Virology*, v. 244, n. 2, p. 365-396, 1998.

BAVARIAN NORDIC. MVA-BN. 2019. Disponível em:

<http://www.bavarian-nordic.com/pipeline/technology/mva-bn.aspx> Acesso em: 13 de fevereiro 19.

BREMAN, J. G.; HENDERSON, D. A. Diagnosis and management of smallpox. **New England Journal of Medicine**, v. 346, n. 17, p. 1300-1308, 2002.

CDC. Bioterrorism Agents/Diseases. 2019. Disponível em: <https://emergency.cdc.gov/agent/agentlist-category.asp> Acesso em: 10 de março de 2019.

CDC. Evaluating Patients For Smallpox. 2019 -1. Disponível em: <https://www.cdc.gov/smallpox/pdfs/smallpox-diagnostic-algorithm-poster-2-pages.pdf> Acesso em: 12 de março de 2019.

CRUZ, N. V. G. Biodefesa contra a varíola no Brasil: diagnóstico, genômica de cepas vacinais e imunidade de militares do Exército Brasileiro. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Biofísica). Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2019.

DAMON, I. Poxviruses, p 2160–2184. **Fields virology**, v. 2, 2013.

BICE, S.; YESKEY, K. Poxvirus countermeasures during an emergency in the United States. **Disaster Medicine and Public Health Preparedness**, v. 9, n. 2, p. 121–126, 2015.

DAMASO, C. R. A., ESPOSITO, J. J., CONDIT, R. C., MOUSSATCHÉ, N. An emergent poxvirus from humans and cattle in Rio de Janeiro state: Cantagalo virus may derive from brazilian smallpox vaccine. **Virology**, v. 277, n. 2, p. 439–449, 25 nov. 2000.

DAMON, I. K.; DAMASO, C. R.;

MCFADDEN, G. Are We There Yet? The Smallpox Research Agenda Using Variola Virus. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 5, p. 3–5, 2014.

EITZEN, E. M.; TAKAFUJI, E. T. Historical overview of biological warfare. **Medical aspects of chemical and biological warfare**, p. 415-423, 1997.

FDA. Information on Drugs. 2019. Disponível em: <https://www.fda.gov/Drugs/InformationOnDrugs/ucm613649.htm>. Acesso em: 25 de fevereiro de 2019.

FEAKES, D. The Biological Weapons Convention. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, v. 36, n. 2, p. 621-628, 2017.

FENNER, F., HENDERSON, D. A., ARITA, I., JEZEK, Z., LADNYI, I. D. The history of smallpox and its spread around the world. **Smallpox and its Eradication**, p. 209-244, 1988.

FREY, S. E., NEWMAN, F. K., KENNEDY, J. S., ENNIS, F., ABATE, G., HOFT, D. F., MONATH, T. P. Comparison of the safety and immunogenicity of ACAM1000, ACAM2000 and Dryvax® in healthy vaccinia-naive adults. **Vaccine**, v. 27, n. 10, p. 1637-1644, 2009.

FULGINITI, V. A., PAPIER, A., LANE, J. M., NEFF, J. M., HENDERSON, D. A., INGLESBY, T. V., O'TOOLE, T. Smallpox vaccination: a review, part II. Adverse events. **Clinical infectious diseases**, v. 37, n. 2, p. 251-271, 2003.

GEDDES, A. M. The history of smallpox. **Clinics in dermatology**, v. 24, n. 3, p. 152-157, 2006.

GOLDEN, J. W.; HOOPER, J. W. The strategic use of novel smallpox vaccines in the post-eradication world. **Expert review**

of vaccines, v. 10, n. 7, p. 1021-1035, 2011.

GRABENSTEIN, J. D.; WINKENWERDER, W. US Military Smallpox Vaccination Program Experience. **Journal of the American Medical Association**, v. 289, n. 24, p. 3278–3282, 2003.

HAMMARLUND, E. LEWIS, M. W., HANSEN, S. G., STRELOW, L. I., NELSON, J. A., SEXTON, G. J., HANIFIN, J. M., SLIFKA, M. K. Duration of antiviral immunity after smallpox vaccination. **Nature medicine**, v. 9, n. 9, p. 1131, 2003.

KIDOKORO, M.; TASHIRO, M.; SHIDA, H. Genetically stable and fully effective smallpox vaccine strain constructed from highly attenuated vaccinia LC16m8. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 11, p. 4152-4157, 2005.

KOBLENTZ, G. D. The *De Novo* Synthesis of Horsepox Virus: Implications for Biosecurity and Recommendations for Preventing the Reemergence of Smallpox. **Health Security**, v. 15, n. 5, p. hs.2017.0061, 2017.

KONDAS, A. V., OLSON, V. A., LI, Y., ABEL, J., LAKER, M., ROSE, L., DAMON, I. K. Variola virus-specific diagnostic assays: Characterization, sensitivity, and specificity. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, n. 4, p. 1406–1410, 2015.

LANIER, R., TROST, L., TIPPIN, T., LAMPERT, B., ROBERTSON, A., FOSTER, S., ROSE, M., PAINTER, W., O'MAHONY, R., ALMOND, R., PAINTER, G. Development of CMX001 for the treatment of poxvirus infections. **Viruses**, v. 2, n. 12, p. 2740-2762, 2010.

MACK, T. M. NOBLE JR, J., THOMAS, D. B. A. prospective study of serum antibody and protection against smallpox. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 21, n. 2, p. 214-218, 1972.

MAKSYUTOV, R. A., GAVRILOVA, E. V., SHCHELKUNOV, S. N. Species-specific differentiation of variola, monkeypox, and varicella-zoster viruses by multiplex real-time PCR assay. **Journal of Virological Methods**, v. 236, p. 215–220, 2016.

MESEDA, C. A.; WEIR, J. P. Third-generation smallpox vaccines: challenges in the absence of clinical smallpox. **Future microbiology**, v. 5, n. 9, p. 1367-1382, 2010.

MONATH, T. P., CALDWELL, J. R., MUNDT, W., FUSCO, J., JOHNSON, C. S., BULLER, M., KEMP, T. ACAM2000 clonal Vero cell culture vaccinia virus (New York City Board of Health strain)—a second-generation smallpox vaccine for biological defense. **International journal of infectious diseases**, v. 8, p. 31-44, 2004.

MOUSSATCHÉ, N., DAMASO, C. R.; MCFADDEN, G. When good vaccines go wild: Feral Orthopoxvirus in developing countries and beyond. **Journal of infection in developing countries**, v. 2, n. 3, p. 156–173, 2008.

NALCA, A.; ZUMBRUN, E. E. ACAM2000™: the new smallpox vaccine for United States Strategic National Stockpile. **Drug design, development and therapy**, v. 4, p. 71, 2010.

NOLEN, L. D., OSADEBE, L., KATOMBA, J., LIKOFATA, J., MUKADI, D., MONROE, B., DOTY, J., KALEMBA, L., MALEKANI, J., KABAMBA, J., BOMPONDA, P. L., LOKOTA, J. I., BALILO, M. P., LIKAFI, T., LUSHIMA, R. S., TAMFUM, J. M.,

OKITOLONDA, E. W., McCOLLUM, A. M., REYNOLDS, M. G. Introduction of monkeypox into a community and household: risk factors and zoonotic reservoirs in the Democratic Republic of the Congo. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 93, n. 2, p. 410-415, 2015.

OMS, 2010. **Scientific review of variola virus research, 1999-2010**. No. WHO/HSE/GAR/BDP/2010.3, Geneva: World Health Organization, 2010.

OMS, 2016. **Weekly Epidemiological Record= Relevé épidémiologique hebdomadaire**, v. 91, n. 20, p. 257-264, 2016.

OMS, 2018. WHO Advisory committee on variola virus research: report of the nineteenth meeting, 1-2 November 2017, Geneva, Switzerland. **World Health Organization**.

OSBORNE, J. D., DA SILVA, M., FRACE, A. M., SAMMONS, S. A., OLSEN-RASMUSSEN, M., UPTON, C., BULLER, R. M., CHEN, N., FENG, Z., ROPER, R. L., LIU, J., POUGATCHEVA, S., CHEN, W., WOHLHUETER, R. M., ESPOSITO, J. J. Genomic differences of Vaccinia virus clones from Dryvax smallpox vaccine: the Dryvax-like ACAM2000 and the mouse neurovirulent Clone-3. **Vaccine**, v. 25, n. 52, p. 8807-8832, 2007.

PAULI, G., BLÜMEL, J., BURGER, R., DROSTEN, C., GRÖNER, A., GÜRTLER, L., OFFERGELD, R. 2010. Orthopox viruses: Infections in humans. **Transfusion Medicine and Hemotherapy**, v. 37, n. 6, p. 351, 2010.

QIN, L., UPTON, C., HAZES, B., & EVANS, D. H. Genomic analysis of the vaccinia virus strain variants found in Dryvax vaccine. **Journal of virology**, v. 85, n. 24, p. 13049-13060, 2011.

REARDON, S. Forgotten NIH smallpox virus languishes on death row. **Nature**, v. 514, n. 7524, p. 544, 2014.

QUIXABEIRA-SANTOS, J. C., MEDAGLIA, M. L. G., PESCADOR, C. A., DAMASO, C. R. Animal movement and establishment of vaccinia virus Cantagalo Strain in Amazon Biome, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 4, p. 726-729, 2011.

REARDON, S. Forgotten NIH smallpox virus languishes on death row. **Nature**, v. 514, n. 7524, p. 544, 2014.

SAITO, T., FUJII, T., KANATANI, Y., SAIJO, M., MORIKAWA, S., YOKOTE, H., KUWABARA, N. Clinical and immunological response to attenuated tissue-cultured smallpox vaccine LC16m8. **JAMA**, v. 301, n. 10, p. 1025-1033, 2009.

SÁNCHEZ-SAMPEDRO, L., PERDIGUERO, B., MEJÍAS-PÉREZ, E., GARCÍA-ARRIAZA, J., DI PILATO, M., ESTEBAN, M. The evolution of poxvirus vaccines. **Viruses**, v. 7, n. 4, p. 1726-1803, 2015.

SHCHELKUNOV, S. N., SHCHERBAKOV, D. N., MAKSYUTOV, R. A., GAVRILOVA, E. V. Species-specific identification of variola, monkeypox, cowpox, and vaccinia viruses by multiplex real-time PCR assay. **Journal of Virological Methods**, v. 175, n. 2, p. 163-169, 2011.

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

SINGH, R. K., BALAMURUGAN, V., BHANUPRAKASH, V., VENKATESAN, G., HOSAMANI, M. Emergence and

reemergence of vaccinia-like viruses: Global scenario and perspectives. **Indian Journal of Virology**, v. 23, n. 1, p. 1–11, 2012.

TAUB, D. D., ERSHLER, W. B., JANOWSKI, M., ARTZ, A., KEY, M. L., MCKELVEY, J., MULLER, D., MOSS, B., FERRUCCI, L., DUFFEY, L., LONGO, D. L. Immunity from smallpox vaccine persists for decades: a longitudinal study. **The American journal of medicine**, v. 121, n. 12, p. 1058-1064, 2008.

UNITED NATIONS OFFICE AT GENEVA. Eight Review Conference. 2016. Disponível em: <https://www.unog.ch/bwc/rc8>. Acesso em: 16 de outubro de 2019.

UNITED NATIONS OFFICE AT GENEVA. Membership of the Biological Weapons Convention. 2019. Disponível em: [https://www.unog.ch/80256EE600585943/\(httpPages\)/7BE6CBBEA0477B52C12571860035FD5C?OpenDocument](https://www.unog.ch/80256EE600585943/(httpPages)/7BE6CBBEA0477B52C12571860035FD5C?OpenDocument) Acesso em: 16 de outubro de 2019.

VASCONCELOS, C. A. M. C. DE. As Operações De Defesa Química Biológica Radiológica E Nuclear. **Doutrina Militar Terrestre em Revista**, p. 42–51, 2018.

VEENEMA, T. G. Diagnosis, management, and containment of smallpox infections. **Disaster Management & Response**, v. 1, n. 1, p. 8-13, 2003.

VINER, K. M.; ISAACS, S. N. Activity of vaccinia virus-neutralizing antibody in the sera of smallpox vaccinees. **Microbes and infection**, v. 7, n. 4, p. 579-583, 2005.

VOIGT, E. A.; KENNEDY, R. B.; POLAND, G. A. Defending against smallpox: a focus on vaccines. **Expert review of vaccines**, v. 15, n. 9, p. 1197-1211, 2016.

VOLZ, A.; SUTTER, G. Modified vaccinia virus Ankara: history, value in basic research, and current perspectives for vaccine development. In: **Advances in virus research**. Academic Press, 2017. p. 187-243.

WELTZIN, R., LIU, J., PUGACHEV, K. V., MYERS, G. A., COUGHLIN, B., BLUM, P. S., NICHOLS, R., JOHNSON, C., CRUZ, J., KENNEDY, J. S., ENNIS, F. A., MONATH, T. Clonal vaccinia virus grown in cell culture as a new smallpox vaccine. **Nature medicine**, v. 9, n. 9, p. 1125, 2003.

WHARTON, M., STRIKAS, R. A., HARPAZ, R., ROTZ, L. D., SCHWARTZ, B., CASEY, C. G., ANDERSON, L. J. **Recommendations for using smallpox vaccine in a pre-event vaccination program; supplemental recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC)**. 2003.

WOODS, R., MCCARTHY, T., BARRY, M. A., MAHON, B. Diagnosing smallpox: would you know it if you saw it? **Biosecurity and bioterrorism : biodefense strategy, practice, and science**, v. 2, n. 3, p. 157–163, 2004.

WYATT, L. S., CARROLL, M. W., CZERNY, C. P., MERCHLINSKY, M., SISLER, J. R., MOSS, B. Marker rescue of the host range restriction defects of modified vaccinia virus Ankara. **Virology**, v. 251, n. 2, p. 334-342, 1998.