

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA**

TESE DE DOUTORADO

**FEBRE AMARELA, ENTENDENDO UMA ANTIGA DOENÇA:
ASPECTOS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICOS, VIROLÓGICOS E
DINÂMICA EVOLUTIVA DURANTE OS SURTOS DE 2017 E 2018,
EM MINAS GERAIS, BRASIL**

IZABELA MAURÍCIO DE REZENDE

**BELO HORIZONTE
JUNHO 2020**

IZABELA MAURÍCIO DE REZENDE

**FEBRE AMARELA, ENTENDENDO UMA ANTIGA DOENÇA:
ASPECTOS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICOS, VIROLÓGICOS E
DINÂMICA EVOLUTIVA DURANTE OS SURTOS DE 2017 E 2018,
EM MINAS GERAIS, BRASIL**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, como pré-requisito para obtenção do título de Doutora em Microbiologia.

Orientadora: Betânia Paiva Drumond

BELO HORIZONTE

JUNHO 2020

043

Rezende, Izabela Maurício de.

Febre amarela: entendendo uma antiga doença - aspectos clínico-epidemiológicos, virológicos e dinâmica evolutiva durante os surtos de 2017 e 2018, em Minas Gerais, Brasil [manuscrito] / Izabela Maurício de Rezende. – 2020.

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

Orientadora: Profa. Dra. Betânia Paiva Drumond.

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

1. Febre Amarela. 2. Vírus da Febre Amarela. 3. Epidemiologia. I. Drumond, Betânia Paiva. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ATA DA DEFESA DE TESE DE Izabela Maurício de Rezende
Nº REGISTRO: 2016751236

Às treze horas e trinta minutos do dia dezoito de junho de dois mil e vinte, reuniu-se, remotamente, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Jordana Graziela Alves Coelho dos Reis (titular), Bruno Eduardo Fernandes Mota (titular), Danilo Bretas de Oliveira (titular), Glaucia Fernandes Cota (titular), Ana Paula Moreira Franco Luiz (suplente), Jaqueline Germano de Oliveira (suplente) e a Profa. Dra Betânia Paiva Drumond - Orientadora, para julgar o trabalho final "Febre Amarela: Entendendo Uma Antiga Doença - Aspectos Clínico-Epidemiológicos, Viroológicos E Dinâmica Evolutiva Durante Os Surtos De 2017 E 2018, Em Minas Gerais, Brasil" da aluna Izabela Maurício de Rezende requisito final para a obtenção do Grau de **DOCTORA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Flávio Guimarães da Fonseca - Coordenador do Programa, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. A candidata foi considerada **APROVADA**. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 19 de junho de 2020. O candidato tem 60 (sessenta) dias, a partir desta data, para entregar a versão final da tese ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da UFMG e requerer seu diploma.

Profa. Dra. Jordana Graziela Alves Coelho dos Reis

Jordana G. Coelho-dos-Reis

Prof. Dr. Bruno Eduardo Fernandes Mota

Bruno E. F. Mota

Prof. Dr. Danilo Bretas de Oliveira

[Handwritten signature]
Prof. Dr. Danilo Bretas de Oliveira

Dra. Glaucia Fernandes Cota

Glaucia Cota

Profa. Dra. Betânia Paiva Drumond (Orientador)

Betânia Paiva Drumond

[Handwritten signature]

Prof. Flávio Guimarães da Fonseca
Coordenador

AGRADECIMENTOS

O desenvolvimento deste trabalho foi possível devido ao apoio financeiro de agências de fomento e à colaboração de alunos, professores e pesquisadores de diversas instituições. A equipe deste trabalho expressa aqui o seu agradecimento a todos colaboradores e à banca examinadora deste trabalho, apresentados a seguir:

Às agências de fomento, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Departamento de Ciência e Tecnologia do Ministério da Saúde (DECIT-MS) e European Commission (ERDF). CNPq e NIH, no contexto do U.S.-Brazil Collaborative Biomedical Research Program (RFA-AI-18-054) – Projeto Yellow fever in Brazil: new insights on an old disease” (1R01AI149614 - 01), Coordenadores: Dra. A. Desiree LaBeaud (University of Standford) e o Dr. Olindo Assis Martins-Filho (FIOCRUZ MINAS).

À banca examinadora composta por: Dra. Jordana Graziela Alves Coelho dos Reis, Dr. Bruno Eduardo Fernandes Mota, Dr. Danilo Bretas de Oliveira, Dra. Glaucia Fernandes Cota, Dra. Ana Paula Moreira Franco Luiz e Dra. Jaquelline Germano de Oliveira.

À equipe de médicos e funcionários do Hospital Eduardo de Menezes. E também aos pacientes que participaram deste trabalho, sem os quais nada disso seria possível.

À Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais (SES/MG) e à Fundação Ezequiel Dias (FUNED).

Aos pesquisadores e alunos do Instituto René Rachou, especialmente Laboratório de Imunologia de Doenças Virais e Grupo Integrado de Pesquisa em Biomarcadores.

Um agradecimento especial aos alunos do Grupo Integrado de Pesquisa em Biomarcadores, Jordana, Elaine e Ana Carolina e aos Drs. Andrea Teixeira-Carvalho e Olindo Martins-Filho, pela colaboração

Um agradecimento e um abraço enorme à Andreza e Thais. Guardiãs das amostras!

Ao Dr. Mauricio Nogueira da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto e sua equipe.

À Pró-reitora de Pesquisa da UFMG e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da UFMG.

A todos os funcionários do ICB.

Aos Professores (Mestres) do Laboratório de Vírus. Obrigada Profa Erna, Prof Paulo e Prof Claudio por terem caminhado com o lab por tanto tempo e terem feito desse espaço o que ele é hoje: lugar de troca de conhecimentos e vivências. Beta, Gi e Jonska, ainda bem que vocês foram ensinados por eles e trilham os mesmos caminhos. O lab é uma família (LABIVIRIDAE)!

Aos colegas do Laboratório de Vírus. Aqui cabe um abraço apertado e um muito obrigado a todos. Especialmente aos ICs do LabVirus, que fazem o lab funcionar plenamente, auxiliando em tarefas básicas do dia-a-dia e nos experimentos de todo mundo. Saibam que vocês são a força-motriz desse lugar.

Um abraço muito apertado no Matheus, na Thaisinha e na Gabisinha. Sinceramente, essa tese foi concluída porque eu tive o auxílio de vocês nos experimentos, nas discussões de resultados e na convivência do lab. Obrigada meninos, vocês brilham!

Ao “grupinho” TRAPS! Lívia, Diogo e Paulo Vocês foram os responsáveis pelos momentos de (in)sanidade desse doutorado.

Ao BTT original, Betânia e Livia. À Livina, amiga (de um ano, rs), parceira desde a faculdade de Biologia em JF. Quem diria que nossos caminhos iriam se misturar tanto. Obrigada por todo suporte nesses tantos anos. Você muitas vezes me fez ter coragem para seguir em frente e não desistir. Vamos ganhar o mundo! E à Beta, amiga e, por acaso orientadora. Como sou feliz e orgulhosa por ter sido sua aluna (mesmo xingando diversas vezes, emburrando com suas “reclamações”). Obrigada pelos ensinamentos, direcionamentos, conselhos, advertências, por nunca ter me deixado na mão. Por ter me ensinado o caminho das pedras de uma maneira tão mais fácil e por ter me ajudado a passar por ele. Meninas, obrigada pelas cervejas, pelas conversas jogadas fora, pelos congressos, por terem sido as melhores (e piores) roommates, pelas companhias em experimentos. E por me fazerem amar a virologia (especialmente na companhia de vocês).

Às amigas que tive que deixar em JF, Rafa, Lu e Quel. Vocês moram no meu coração

À toda minha família Maurício Rezende. Um abraço apertado na vovó de cabelos brancos, Alice e um abraço de almas na vovó Therezinha, que hoje é uma estrela no céu que guia nossos caminhos por aqui.

Aos meus pais, Waldir e Angélica e ao meu irmão Igor. Vocês são tudo. Não cabem palavras de agradecimentos aqui. Eu realizei meu sonho! Realizamos juntos!

E ao Pedro, grande amor da minha vida, que eu encontrei na virologia. Lindinho, obrigada! Não vou me estender aqui agradecendo. Não vai caber! Mas nesse contexto, obrigada especialmente pela paciência e por ter sido um co-orientador especial. Nossas discussões em casa me iluminaram em muitos questionamentos e experimentos. Podemos sempre contar um com o outro, e ter você como parceiro de vida e de bancada é um sucesso! Ah, e obrigada por um dia ter permitido que aquela bolinha de pelos entrasse na nossa casa. Jimmy é nosso “fiote” e alegra nossos dias.

***"Quando o mundo estiver unido na busca do conhecimento,
e não mais lutando por dinheiro e poder,
então nossa sociedade poderá enfim
evoluir a um novo nível."***

(Thomas Jefferson)

RESUMO

Ao final de 2016 e início de 2017, o Brasil foi surpreendido com casos de febre amarela acontecendo na região Sudeste, fora da Bacia Amazônica que é a região endêmica para o vírus da febre amarela (YFV). Em 2018, uma nova onda de casos de febre amarela atingiu essa mesma região. Esses casos aconteceram majoritariamente no estado de Minas Gerais (MG). Com esse grande número de casos de febre amarela, surgiu a oportunidade de estudar aspectos clínicos, epidemiológicos, virológicos, e a dinâmica evolutiva viral do YFV dos surtos de 2017 e 2018, em MG, durante a fase aguda e de convalescença da doença. Após o surto de febre amarela em 2017 e 2018, surgiu a hipótese se o vírus causador das duas epidemias de febre amarela em MG seria o mesmo ou se havia ocorrido uma nova introdução do YFV no estado. Dados epidemiológicos conjuntamente com dados de sequenciamento de amostras de soro de pacientes com febre amarela mostraram que os YFV circulante em MG têm uma única origem, e se agrupam com o genótipo Sul Americano I, que é o principal genótipo de YFV circulante no Brasil. Durante o surto de febre amarela, através de uma colaboração com a Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais, foi solicitado ao nosso grupo de pesquisa, a genotipagem de 21 casos suspeitos de reação adversa vacinal após vacinação com YFV-17DD. Após padronização de uma ferramenta de genotipagem baseada em RT-qPCR e sequenciamento, concluiu-se que nenhum dos casos analisados era provenientes de reação adversa vacinal após vacinação com YFV-17DD. Ao se analisar o perfil sócio-demográfico dos pacientes com febre amarela, foi observado que o perfil desses pacientes está de acordo com o perfil de febre amarela silvestre e que a taxa de letalidade acumulada foi de 23,84%. Após análises de RT-qPCR qualitativo e quantitativo, foi possível detectar o RNA do YFV do 4º ao 25º dia após o início dos sintomas, aumentando assim a janela de detecção molecular do YFV. O RNA do YFV também foi encontrado em urina de pacientes, do 1º ao 32º dia após sintomas. Após análises durante a fase aguda da infecção natural pelo YFV, não foram observadas diferenças nos valores de carga viral entre pacientes que evoluíram a óbito ou receberam alta, não sendo a carga viral um possível marcador de prognóstico/gravidade da doença. Um grupo de pacientes foi tratado com o antiviral Sofosbuvir durante a fase aguda da febre amarela. Foram encontradas diferenças estatísticas nos valores de carga viral entre o grupo não tratado com desfecho alta, desfecho óbito e o grupo tratado. Esses valores indicam uma possível ação do antiviral Sofosbuvir na carga genômica viral do YFV no grupo de pacientes tratados, principalmente a partir do 7º dia após sintomas. Durante análises da fase aguda da febre amarela, quatro amostras de LCR de pacientes que evoluíram a óbito foram positivas em RT-qPCR para YFV e apresentaram títulos de neutralização de anticorpos contra o YFV. Também foram analisados os casos de oito pacientes com possível falha vacinal, que haviam sido vacinados há pelo menos um ano contra febre amarela. Todos os oito pacientes analisados tiveram a infecção pelo YFV confirmada por RT-qPCR e seis ainda tiveram a detecção de IgM anti-YFV e de anticorpos neutralizantes. Durante as análises da fase de convalescença da febre amarela, foi observado um grupo de pacientes que apresentaram alterações em marcadores bioquímicos 60 dias após o início dos sintomas, quadro chamado de “hepatite tardia após febre amarela”. Foram analisados os valores dos marcadores de dano hepático AST e ALT durante a fase de convalescença entre o grupo que desenvolveu o quadro clínico de

hepatite tardia e o grupo controle. Os valores são significativamente maiores no grupo com o quadro clínico da hepatite tardia após febre amarela. Desse grupo de pacientes com o quadro de hepatite tardia, duas urinas coletadas na fase de convalescença foram RT-qPCR positivas para o YFV selvagem. De um paciente do grupo de hepatite tardia, foi detectado o YFV selvagem na biópsia de fígado coletada durante a fase de convalescença. Esses dados sugerem a possível persistência dos sintomas da febre amarela, do genoma e possivelmente do YFV na fase de convalescença nesse grupo de pacientes. Grandes surtos trazem oportunidades para se estudar e compreender melhor doenças, seus agentes causadores e sua relação com a população. Quando falamos de antigas doenças, que ocorrem desde séculos passados, a quebra de paradigmas de faz necessária no mundo moderno. Os resultados deste trabalho poderão fornecer dados para implementação de políticas públicas, direcionando novas estratégias de tratamento, prevenção e manejo da febre amarela.

ABSTRACT

At the end of 2016 and beginning of 2017, Brazil was surprised by cases of yellow fever occurring in the Southeast region, outside the Amazon Basin, which is the endemic region for the yellow fever virus (YFV). In 2018, a new wave of yellow fever cases took place in that same region. These cases occurred mainly in the state of Minas Gerais (MG). With this large number of yellow fever cases, the opportunity arose to study clinical, epidemiological, virological aspects, and the evolutionary dynamics of the YFV of the 2017 and 2018 outbreaks in MG, during the acute and convalescent phase of the disease. After the yellow fever outbreak in 2017 and 2018, the hypothesis arose whether the virus that caused the two yellow fever epidemics in MG would be the same or if a new introduction of YFV in the state had occurred. Epidemiological data together with sequencing data from serum samples from patients with yellow fever showed that the circulating YFV in MG had a unique origin, and are grouped with the South American I genotype, which is the main circulating YFV genotype in Brazil. During the yellow fever outbreak, through a collaboration with the Minas Gerais State Secretary of Health, our research group was asked to genotype 21 suspected cases of adverse events following vaccination with YFV-17DD. After standardization of a genotyping tool based on RT-qPCR and sequencing, it was concluded that none of the cases analyzed came from adverse events following vaccination with YFV-17DD. When analyzing the socio-demographic profile of patients with yellow fever, it was observed that the profile of these patients is in accordance with wild yellow fever and that the accumulated mortality rate was 23.84%. After qualitative and quantitative RT-qPCR analyzes, it was possible to detect YFV RNA from the 4th to the 25th day after the onset of symptoms, thus increasing the YFV molecular detection window. After analyzes during the acute phase of natural YFV infection, no differences in viral load values were observed between patients who died or were discharged, and viral load was not a possible marker of disease prognosis/severity. A group of patients was treated with the antiviral Sofosbuvir during the acute phase of yellow fever. Statistical differences were found in the viral load values between the untreated group with discharge and death outcomes and the treated group. These values indicate a possible action of the antiviral Sofosbuvir on the genomic load of YFV in the group of treated patients. During analyzes of the acute phase of yellow fever, four CSF samples from patients who progressed to death were positive on RT-qPCR for YFV and had antibody neutralization titers against YFV. We also analyzed the cases of eight patients with possible vaccine failure, who had been vaccinated at least one year ago against yellow fever. All eight patients analyzed had YFV infection confirmed by RT-qPCR and six still had detection of anti-YFV IgM and had antibody neutralization titers against YFV. During the analysis of the yellow fever convalescence phase, a group of patients was observed who showed changes in biochemical markers 60 days after the onset of symptoms, a condition called "late-relapsing hepatitis after yellow fever". The values of the liver damage markers AST and ALT during the convalescence phase were analyzed between the group that developed the clinical picture of late hepatitis and the control group. The values are significantly higher in the group with the clinical picture of late-relapsing hepatitis after yellow fever. Of this group of patients with late hepatitis, two urine collected during the convalescence phase were RT-qPCR positive for wild-type YFV. From a patient in the late hepatitis group, wild YFV was detected in the liver biopsy collected during the convalescence phase. These data suggest

the possible persistence of the symptoms of yellow fever, the genome and possibly YFV in the convalescence phase in this group of patients. Major outbreaks bring opportunities to study and better understand diseases, their causative agents and their relationship with the population. When we talk about old diseases, which have occurred since centuries past, the breaking of paradigms is necessary in the modern world. The results of this work may provide data for the implementation of public policies, directing new strategies for treatment, prevention and management of yellow fever.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Inferências filogenéticas dos Flavivírus.	- 21 -
Figura 2: Representação esquemática do RNA e da poliproteína viral dos flavivírus.	- 22 -
Figura 3: Representação esquemática do ciclo de replicação de flavivírus..	- 23 -
Figura 4: Casos humanos de febre amarela silvestre e epizootias no Brasil, de 2016 a 2019.	- 27 -
Figura 5: Esquema do protocolo para purificação <i>in-house</i> a partir de gel de poliacrilamida, corado com Sybr Gold (Invitrogen)	- 40 -
Figura 6: Análise bayesiana do YFV sequenciado a partir de amostras de soro de humanos e de fígado de PNHs, em 2017-2018. -	43 -
Figura 7: Árvore de Máxima Verossimilhança do vírus da febre amarela.....	- 52 -
Figura 8: Número total de casos de febre amarela em Minas Gerais.....	- 71 -
Figura 9: Municípios com casos confirmados de febre amarela em Minas Gerais.	- 73 -
Figura 10: Sinais e sintomas apresentados pelos pacientes com febre amarela atendidos no HEM no período de 2017-2018.	- 76 -
Figura 11: Tipos de comorbidades apresentadas pelos pacientes com febre amarela atendidos no HEM no período de 2017-2018. HAS: hipertensão arterial sistêmica.	- 77 -
Figura 12: Distribuição do número de dias de internação dos pacientes com febre amarela internados no HEM, em 2017 e 2018.....	- 78 -
Figura 13: Placa ilustrativa de ensaio de soroneutralização das amostras IgM não reagentes	- 83 -
Figura 14: Valores da média (em \log_{10}) dos valores de carga genômica viral, em cada grupo analisado, por dia de sintomas. DPS: dias pós sintomas.	- 97 -
Figura 15: Valores de carga genômica viral, por grupo analisado e por dia de sintomas.....	- 100 -
Figura 16: Valores de AST e ALT dos pacientes atendidos no HEM em 2017-2018.	- 110 -
Figura 17: Gráficos plotados a partir dos valores das medianas das variáveis consideradas na análise de fatores de prognóstico para hepatite tardia após febre amarela (eixo Y), por dia de sintomas (eixo x).....	- 115 -

Figura 18: Inferências filogenéticas de YFV (213 nt) de amostras sequenciadas a partir de soro, urina e biópsia de paciente atendidos no HEM em 2017..	- 120 -
Figura 19: Valores de AST e ALT do paciente 4, durante o curso da infecção e do seguimento ambulatorial após a alta hospitalar.	- 121 -
Figura 20: Análise filogenética das sequências de RNA na biópsia hepática coletada no 93º dia após o início dos sintomas de febre amarela.	- 126 -
Figura 21: Níveis séricos de IgG anti-YFV do paciente 4.	- 128 -

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Investigação de casos de reação adversa vacinal após vacinação contra febre amarela	- 50 -
Tabela 2: Relação dos pacientes provenientes do HEM, durante o surto de febre amarela, em 2017-2018, com vacinação prévia contra febre amarela há pelo menos um ano antes do início dos sintomas.	82
Tabela 3: Informações dos pacientes com amostra de LCR positiva em RT-qPCR para YFV.	- 86 -
Tabela 4: Amostras de urinas testadas por RT-qPCR e positivas, durante a internação.....	- 89 -
Tabela 5: Valores de carga genômica viral do YFV obtidos a partir de amostras de pacientes internados no HEM no ano de 2017.	- 92 -
Tabela 6: Valores de carga genômica viral do YFV obtidos a partir de amostras de pacientes internados no HEM no ano de 2018.	- 93 -
Tabela 7: Valores máximo e mínimo de carga genômica viral do YFV em cada grupo analisado, por dia de sintoma, a partir do 4º dia.....	- 99 -
Tabela 8: Amostras de soro e urina testadas por RT-qPCR para YFV. Pacientes com amostra de urina e/ou soro coletadas durante o seguimento ambulatorial, durante surto de febre amarela em 2017	- 118 -
Tabela 9: Amostras de coágulo testadas por RT-qPCR para YFV, do grupo que apresentou o quadro clínico da hepatite tardia após febre amarela.	- 119 -
Tabela 10: Evolução temporal do quadro clínico durante febre amarela aguda e fase da hepatite tardia após febre amarela do paciente 4.	- 122 -
Tabela 11: Contagem de hemoglobina e células sanguíneas durante febre amarela aguda e hepatite tardia após febre amarela do paciente 4.....	- 124 -

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Valores de medianas, por dia de internação, das variáveis bioquímicas analisadas no estudo de fatores de prognóstico durante fase aguda da febre amarela para desenvolvimento da hepatite tardia após febre amarela.- 113 -

LISTA DE ABREVIATURAS

μM – Micromolar

ALP – Fosfatase alcalina

ALT - Alanina aminotransferase

AST - Aspartato aminotransferase

ATCC - *American Type Culture Collection*

BA – Bahia

BD – bilirrubina direta

BOD – *Biological Oxigen Demand* (Demanda Biológica de Oxigênio)

BT – Bilirrubina total

C - Capsídeo

cDNA – DNA complementar

CHIKV – *Chikungunya vírus*

CMC – Carboximetilcelulose

CO₂ - Dióxido de Carbono

Cq – *Quantitative cycle*

DENV - *Dengue virus*

DNA - Ácido desoxirribonucléico

dNTP - Desoxirribonucleotídeos fosfatados

DPS – dias após sintomas

E – Envelope

EAG – Efeito adverso grave

ECP - Efeito citopático

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético

ELISA - *Enzyme-linked immunosorbent assay*

FDA - *Food and Drug Administration*

FUNED – Fundação Ezequiel Dias

GGT - gama glutamil transferase

h - Hora

H₂O – Água

HEM – Hospital Eduardo de Menezes

ICB - Instituto de Ciências Biológicas

ICTV - *International Commitee on Taxonomy of Viruses*

IFN – Interferon

Ig – Imunoglobulina
IL – Interleucina
JEV - *Japanese encephalitis virus*
Kb - quilobases
KCl - Cloreto de potássio
L – Litro
L-15 - Meio Leibowitz
LCR - Líquido cefalorraquidiano
M – Membrana
M.O.I – *Multiplicity of infection* (multiplicidade de infecção)
MCMC - *Markov chain Monte Carlo*
MEM - Meio mínimo essencial de Eagle
mg – Miligrama
MG – Minas Gerais
MgCl₂ - Cloreto de Magnésio
min – Minuto
ML - *Maximum likelihood* (máxima verossimilhança)
mL - Mililitro
M-MLV - *Moloney Murine Leukemia Virus*
MRCA - *Most Common Recent Ancestor* (ancestral comum mais recente)
NaCl - Cloreto de sódio
ng – Nanograma
NJ - *Neighbor joining*
nm – Nanômetro
NS – *Non-structural* (não estrutural)
nt – Nucleotídeo
°C – Grau Celsius
OROV – *Oropouche virus*
pb - Pares de bases
PBS – phosphate buffer saline (tampão salina fosfato)
PCR – *Polimerase chain reacton* (reação em cadeia da polimerase)
pH - Potencial hidrogeniônico
PNH – Primata Não Humano
PR – Paraná

prM – Proteína pre Membrana
PTTA – Tempo de protrombina
p/v – peso/volume
qPCR - PCR quantitativa
RdRp - RNA polimerase RNA dependente
RN – Rio Grande do Norte
RNA - Ácido ribonucléico
RNAm - RNA mensageiro
RNI - Razão normalizada internacional
rpm - Rotações por minuto
RS – Rio Grande do Sul
RT – *Reverse transcription* (transcrição reversa)
s – Segundo
SES – Secretaria de Estado de Saúde
SFB - Soro fetal bovino
SLEV - *St. Louis encephalitis virus*
SNC – Sistema nervoso central
SP – São Paulo
TAE - Tris-acetato-EDTA
Tm - Temperatura de dissociação
TNF - *Tumor necrosis factor* (Fator de necrose tumoral)
UI – Unidade internacional
UFP – Unidade formadora de placa
V - Volt
WNV - *West Nile virus*
YFV - *Yellow fever virus*
ZIKV – *Zika virus*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	- 20 -
1.1. Os Flavivírus	- 20 -
1.2. Vírus da Febre Amarela.....	- 23 -
1.3. A febre amarela	- 25 -
2. JUSTIFICATIVA	- 34 -
3. OBJETIVOS	- 36 -
4. CAPÍTULO 1: Caracterização filogenética dos vírus circulantes, durante surtos de febre amarela e análise da filodinâmica viral	- 38 -
4.1. Fluxograma	- 38 -
4.2. Metodologia	- 38 -
4.2.1 Detecção molecular de YFV	- 39 -
4.2.2 Sequenciamento e Inferências filogenéticas	- 40 -
4.3. Resultados e Discussão	- 41 -
4.4. Conclusão	- 45 -
5. CAPÍTULO 2: Padronização de uma técnica de genotipagem de YFV e Análise da ocorrência de febre amarela em pacientes com suspeita de reação adversa vacinal após vacinação.	- 45 -
5.1. Fluxograma	- 46 -
5.2. Metodologia	- 47 -
5.2.1 Extração de RNA	- 47 -
5.2.2 Ferramenta de genotipagem	- 47 -
5.3. Resultados e Discussão	- 48 -
5.4. Conclusões	- 54 -
6. CAPÍTULO 3: Análise de aspectos clínico-epidemiológicos e virológicos de pacientes com febre amarela, durante a fase aguda da doença, atendidos no HEM, em 2017-2018	- 54 -
6.1. Fluxogramas	- 55 -
6.2. Metodologia	- 61 -
6.2.1 Amostras biológicas:.....	- 61 -
6.2.2 Análise de dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes ...	- 61 -
6.2.3 Titulação viral.....	- 62 -

6.2.4	Isolamento viral.....	- 62 -
6.2.5	Detecção molecular de YFV	- 63 -
6.2.6	Inferências filogenéticas	- 64 -
6.2.7	Detecção de anticorpos contra febre amarela.....	- 65 -
6.2.8	Depleção de IgM total e de IgG total	- 66 -
6.2.9	Determinação de carga genômica viral do YFV	- 67 -
6.2.10	Parâmetros bioquímicos analisados.....	- 67 -
6.2.11	Análise estatística	- 69 -
6.3.	Resultados e Discussão	- 70 -
6.4.	Conclusões	- 100 -
7.	CAPÍTULO 4: Analisar o curso natural da febre amarela durante a fase de convalescença da doença, avaliando aspectos clínicos, bioquímicos e persistência viral em diferentes amostras de pacientes de febre amarela com desfecho alta e pelo menos um retorno ambulatorial no HEM	- 102 -
7.1.	Fluxograma	- 103 -
7.2	Metodologia	- 104 -
7.2.1	Amostras biológicas.....	- 104 -
7.2.2	Detecção molecular de YFV	- 104 -
7.2.3	Sequenciamento e Inferências filogenéticas	- 105 -
7.2.4	Detecção de anticorpos contra febre amarela.....	- 106 -
7.2.5	Detecção de IgG anti-YFV pela técnica de ELISA	- 106 -
7.2.6	Parâmetros bioquímicos analisados.....	- 107 -
7.2.7	Análise estatística	- 109 -
7.3	Resultados e Discussão	- 110 -
8	CONCLUSÕES FINAIS.....	- 131 -
9	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	- 133 -
10	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	- 135 -
11	RELAÇÃO DA PRODUÇÃO CIENTÍFICA E OUTRAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O DOUTORADO – AGOSTO/2016 A JUNHO/2020.....	- 149 -
12	ANEXOS.....	156

1. INTRODUÇÃO

O cenário epidemiológico brasileiro atual é preocupante, principalmente após o aumento da circulação e detecção de diversos arbovírus no país. Desde a primeira detecção do Yellow fever virus (YFV) no Brasil, em 1929 (DAVIS; SHANNON, 1929), diversos outros arbovírus que causam doenças em humanos já foram descritos no país. O termo arbovírus vem da abreviação para a frase no inglês *arthropod-borne virus* e representa vírus que são transmitidos a um hospedeiro vertebrado através de um artrópode hematófago (FIGUEIREDO, 2007; WEAVER e REISEN, 2010).

10

1.1. Os Flavivírus

Recentemente, o ICTV reordenou a nomenclatura de algumas famílias virais. Desse modo, atualmente a família *Flaviviridae*, composta pelos gêneros *Flavivirus*, *Pestivirus*, *Hepaciviruse* *Pegivirus* (SIMMONDS *et al.*, 2017) (Figura 1) está incluída no super-reino Riboviria, reino Orthornavirae, filo Kitrinoviricota, classe Flasuviricetes, ordem Amarillovirales (ICTV, 2020; SIMMONDS *et al.*, 2017).

O gênero *Flavivirus*, constituído por aproximadamente 50 vírus, pertence ao grupo de arbovírus de maior importância global, responsável por altas taxas de morbidade e mortalidade, além de doenças graves como encefalites, febres, febres hemorrágicas e hepatites em humanos (ICTV, 2019; MACKENZIE; GUBLER; PETERSEN, 2004; NOGUEIRA *et al.*, 2005).

Os vírions dos representantes do gênero *Flavivírus* são formados por um envelope lipídico (~50 nm) e um capsídeo contendo uma fita simples de RNA, polaridade positiva, com aproximadamente 11.000 nucleotídeos (nt). Esse RNA funciona como mRNA na célula, originando uma poliproteína que é posteriormente clivada em três proteínas estruturais (envelope (E), capsídeo (C) e membrana (M)) e sete proteínas não estruturais (NS) (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a NS4b e NS5) (PIERSON; DIAMOND, 2013) (Figura 2).

30

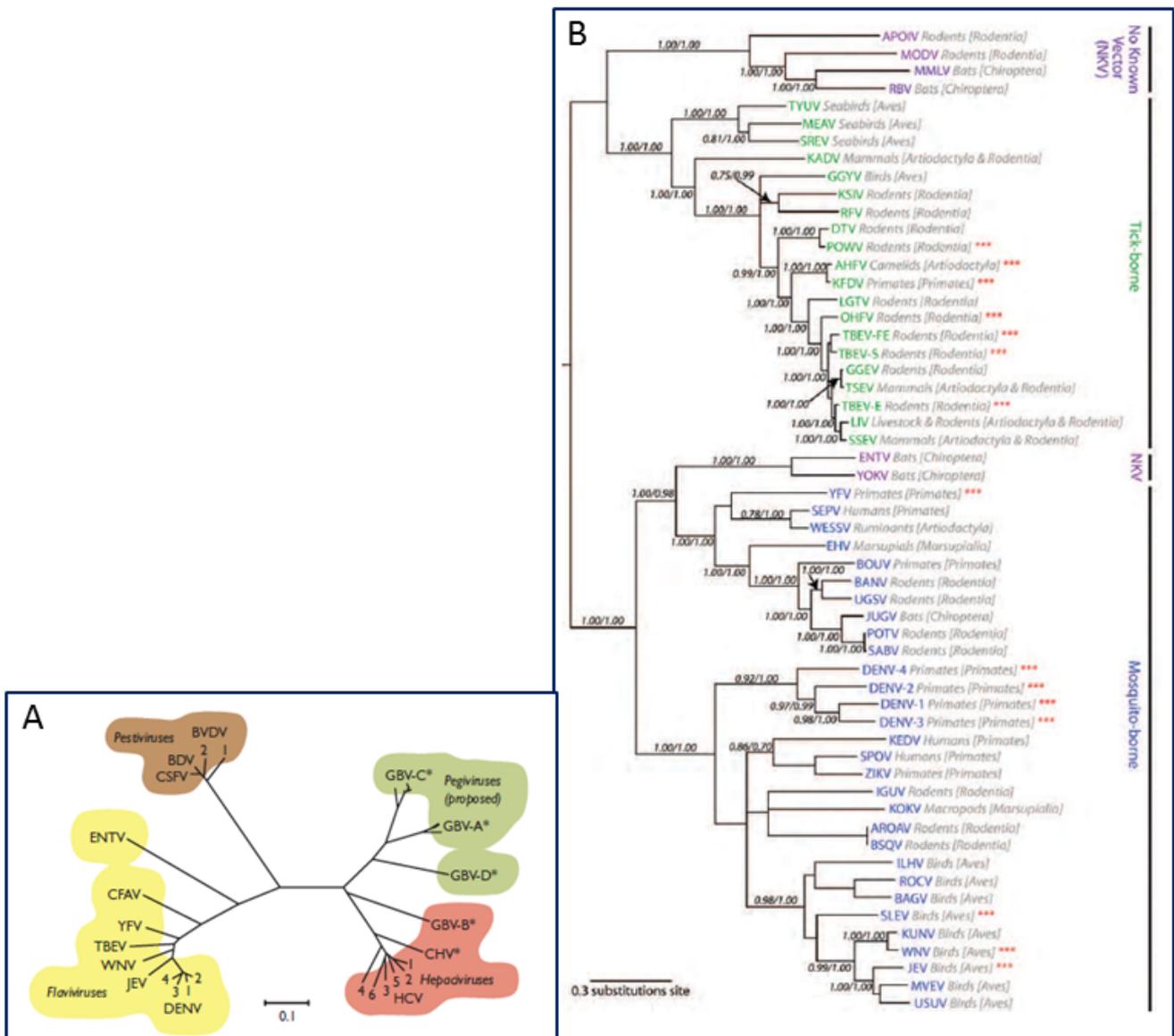


Figura 1: Inferências filogenéticas dos Flavivírus. (A) Árvore filogenética da família Flaviviridae, baseada em sequências do gene NS5. A escala indica a substituição de aminoácidos por sítio. (B): Árvore filogenética dos vírus do gênero Flavivírus demonstrando a relação entre os vírus e seus vetores. A escala indica a substituição de aminoácidos por sítio. Fonte: LINDENBACH *et al.*, 2013; PIERSON; DIAMOND, 2013.

5

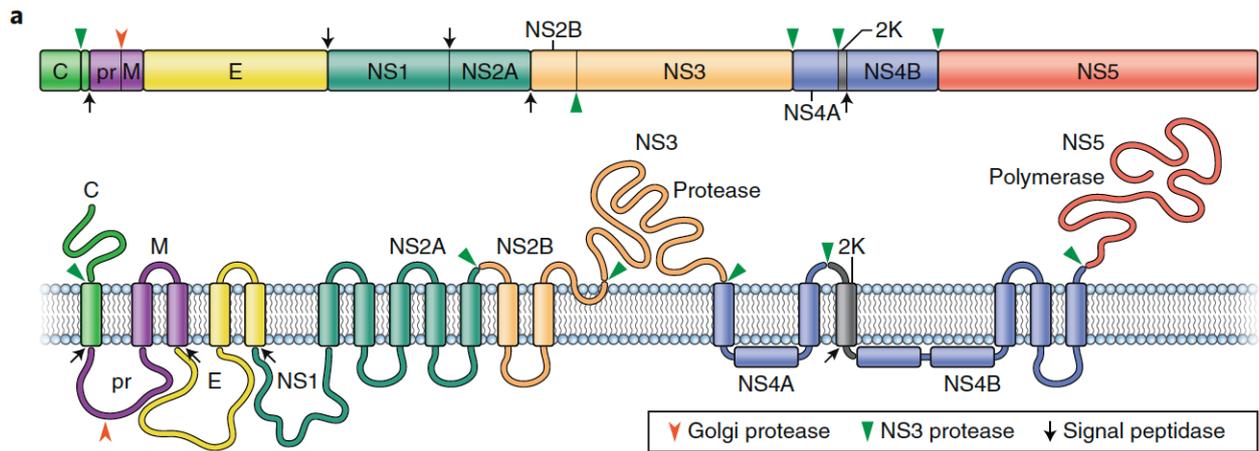


Figura 2: Representação esquemática do RNA e da poliproteína viral dos flavivírus. Setas indicam os sítios de clivagem pelas proteases celulares (seta vermelha) ou pela protease viral NS3 (seta verde) na poliproteína viral. Fonte: PIERSON; DIAMOND, 2020.

5

A replicação dos flavivírus se inicia com a ligação da proteína E do envelope viral a um dos receptores da célula alvo no hospedeiro mamífero. Após essa interação, os flavivírus entram na célula através de endocitose mediada por clatrina. O baixo pH da vesícula endossômica induz a fusão do envelope viral com a membrana celular do endossomo e após o desnudamento do nucleocapsídeo, o RNA genômico é liberado no citoplasma. O RNA genômico dos flavivírus codifica uma única janela aberta de leitura, flanqueada por duas regiões não-traduzidas responsáveis por coordenar a replicação, tradução e por regular a resposta imune do hospedeiro. O ciclo de multiplicação dos flavivírus ocorre integralmente no citoplasma celular, associado com membranas intracelulares. O genoma viral assume o papel de RNA mensageiro (mRNA) para tradução de todas as proteínas virais e também é utilizado como molde durante a replicação do RNA, gerando uma fita de RNA com polaridade negativa (antigenoma), que servirá de molde para a replicação de novas fitas de RNA com polaridade positiva (RNA genômico). As proteínas virais são produzidas a partir de uma única poliproteína, que é clivada por uma combinação da protease viral e de proteases do hospedeiro. A replicação do RNA viral ocorre nas membranas do hospedeiro reorganizadas através das ações das proteínas virais não estruturais. Essas estruturas de membrana induzidas por vírus coordenam espacialmente a replicação do RNA genômico viral e a morfogênese do vírus, além de proteger os produtos de replicação dos sensores imunológicos inatos

do hospedeiro. Partículas de vírus se agrupam e brotam no retículo endoplasmático e trafegam para fora da célula. A partir desse ponto, a progênie segue pela via secretora da célula, a partícula viral sofre conformações em sua estrutura externa e o vírion é liberado na superfície celular, por exocitose (Figura 3) (LINDENBACH et al., 2013; revisado por PIERSON; DIAMOND, 2020).

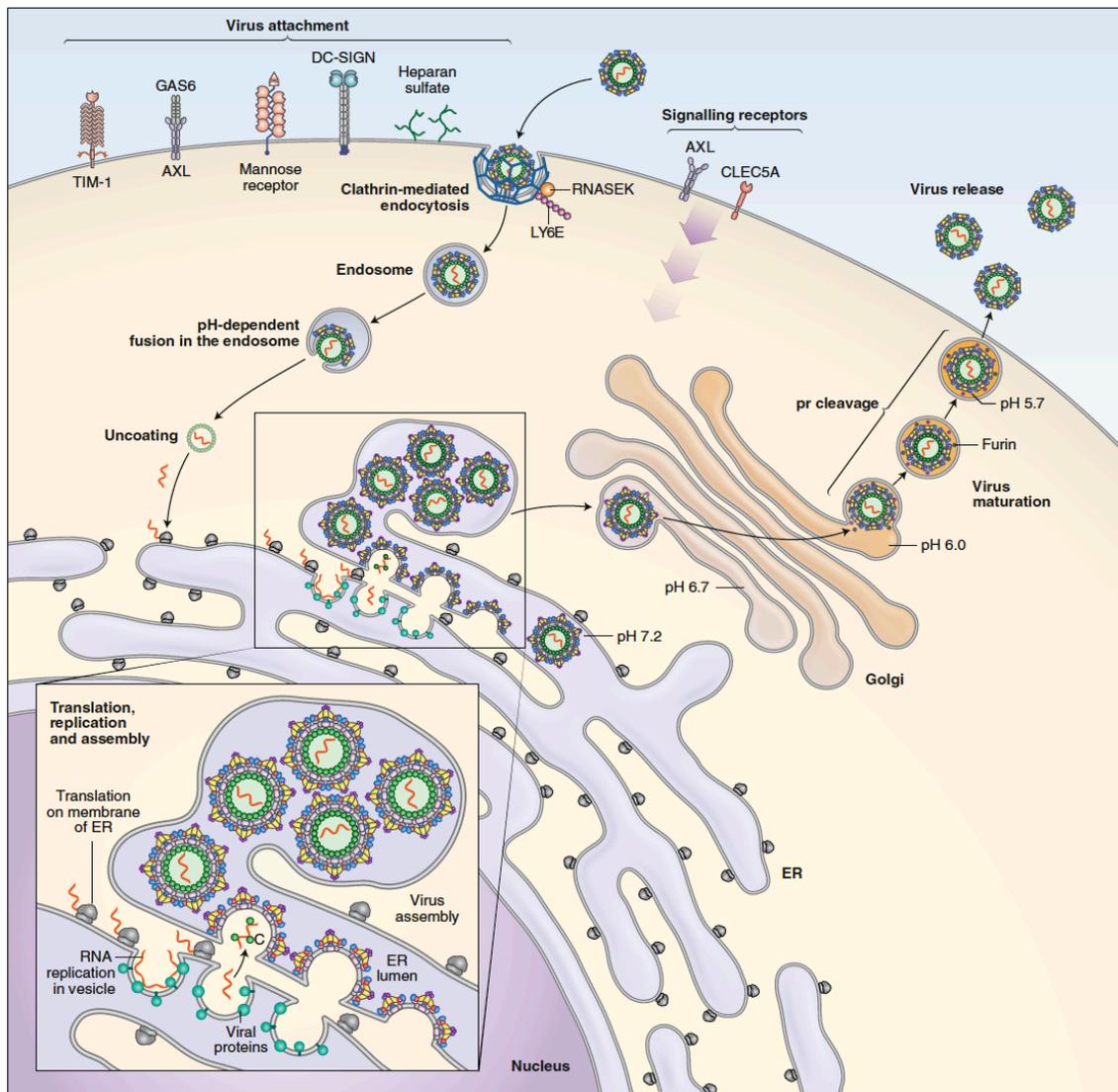


Figura 3: Representação esquemática do ciclo de replicação de flavivírus. Os flavivírus infectam células de mamíferos por meio de interações com vários tipos de fatores de fixação do hospedeiro. Os vírions são internalizados por mecanismos dependentes de clatrina. A fusão viral com membranas hospedeiras ocorre no endossomo de maneira dependente do pH. A maturação do vírion, definida pela clivagem da prM por uma protease do tipo furina, ocorre durante a saída. Fonte: PIERSON; DIAMOND, 2020.

1.2. Vírus da Febre Amarela

O vírus da febre amarela (YFV) é considerado o protótipo da família Flaviviridae (SIMMONDS *et al.*, 2017). O YFV é filogeneticamente classificado em apenas um tipo, dividido em sete genótipos, sendo cinco genótipos africanos (*West/Central Africa*, *West Africa*, *East Africa*, *East/Central Africa* e *Angola*) e dois genótipos sul americanos (*South-American I* e *II*) (MONATH; VASCONCELOS, 2015). Análises filogenéticas demonstraram que os genótipos são estritamente relacionados à localidade em que circulam e que o YFV foi introduzido nas Américas através de navios de escravos vindos da África, por volta do ano de 1600 (CARRINGTON; AUGUSTE, 2013; CATHEY; MARR, 2014).

O YFV causa a febre amarela, primeira doença humana atribuída a um vírus (REED; CARROLL; AGRAMONTE, 1901). O vírus infecta humanos e primatas não-humanos (PNHs), sendo transmitido aos hospedeiros e reservatórios pela saliva de mosquitos vetores, em dois ciclos de transmissão, silvestre e urbano. O ciclo silvestre do YFV envolve PNHs e mosquitos silvestres dos gêneros *Haemagogus* e *Sabethes*. Ocasionalmente, o vírus pode ser transmitido ao homem, que se torna um hospedeiro acidental. Em áreas onde o ciclo urbano do YFV é bem estabelecido, o vírus é capaz de causar epidemias, sendo transmitido para os humanos principalmente pelo mosquito *A. aegypti* (MONATH, 2001b; PIERSON; DIAMOND, 2013). O YFV é endêmico em regiões tropicais e subtropicais da África e da América do Sul. O YFV chega a causar, anualmente até 200.000 casos de febre amarela em todo o mundo, com aproximadamente 20%-60% de casos fatais (MONATH; VASCONCELOS, 2015).

Na África, os surtos de febre amarela ocorrem majoritariamente no oeste africano, onde o YFV se mantém no ciclo urbano. Nas demais localidades da África o YFV se mantém no ciclo silvestre, os surtos de febre amarela são mais esporádicos e com menor número de casos. Nos anos de 2016-2017 a África vivenciou o pior surto de febre amarela dos últimos 30 anos, com casos reportados majoritariamente na Angola, região que não é considerada endêmica para o YFV, e na República Democrática do Congo. Foram relatados 884 casos confirmados e 121 mortes (DOUAM; PLOSS, 2018; MAGUIRE; HEYMAN, 2016).

Na América do Sul o YFV é endêmico na região da Bacia Amazônica, que compreende os países Brasil, Peru, Bolívia, Equador, Colômbia, Venezuela, Guiana Francesa, Suriname e Guiana (ESPINOZA VILLAR *et al.*, 2009; MONATH, 2001b). O ciclo nessa região é considerado silvestre, envolvendo espécies locais de PNHs e principalmente mosquitos vetores dos gêneros *Haemagogus* sp. e *Sabethes* sp.. Os genótipos circulantes são o Sul Americano I e II, sendo que atualmente o genótipo Sul Americano II tem sua circulação descrita apenas na região do Peru (BRYANT; HOLMES; BARRETT, 2007; MIR *et al.*, 2017; MONATH, 2001b).

Para detecção do YFV, o teste diagnóstico mais utilizado nos Laboratórios Centrais (LACEN) do Ministério da Saúde é o teste sorológico baseado em MAC-ELISA, para detecção de IgM anti-YFV. Esse teste é recomendado a partir do 6º dia de sintomas. É um teste realizado em algumas horas e que fornece um diagnóstico presuntivo de febre amarela (PAHO/WHO, 2018). Essa técnica possui limitações como a reatividade cruzada com IgM contra outros flavivírus, além do fato de os níveis de IgM em uma segunda infecção por flavivírus serem baixos e produzidos apenas nos 2-3 primeiros dias da infecção, podendo estar abaixo do limiar de detecção do teste (MONATH; VASCONCELOS, 2015). Diagnósticos moleculares são recomendados pela Organização Pan Americana de Saúde (PAHO) no intervalo de até 10 dias após o início dos sintomas, fase em que ainda é possível detectar o RNA no soro de pacientes infectados (PAHO/WHO, 2018).

1.3. A febre amarela

Durante os séculos XVIII e XIX, a febre amarela foi considerada uma das piores doenças dos séculos, causando grandes surtos urbanos nas Américas (DOUAM; PLOSS, 2018). Com as campanhas de erradicação do mosquito vetor *Aedes aegypti* no início do século XX, a febre amarela urbana foi erradicada de muitos países, inclusive do Brasil (revisado por SILVA *et al.*, 2020). No Brasil, o último surto de febre amarela urbana foi reportado no estado do Rio de Janeiro, em 1929. O último caso de febre amarela urbana relatado no país aconteceu em 1942, no estado do Acre (SOPER, 1942). No período de 1937 a 1967 e em 1672 casos humanos de febre amarela silvestre foram relatados no Brasil (FRANCO,

1969; revisado por SILVA et al., 2020). Desde essa época o YFV é mantido em um ciclo enzoótico silvestre na Bacia Amazônica brasileira e surtos pequenos e esporádicos de febre amarela são relatados fora dessa região (CÂMARA et al., 2011; revisado por SILVA et al., 2020). No ano de 1999, o perfil da circulação do YFV silvestre começou a se alterar e o maior número de casos em humanos passou a ser reportado nos estados do Centro-Oeste, Sudeste e Sul do Brasil (VASCONCELOS, 2003; revisado por SILVA et al., 2020). Durante o período epidêmico de 2000-2001, ocorreu um surto de febre amarela em Minas Gerais (MG) e São Paulo (SP), com 98 casos confirmados em humanos. Na mesma época, epizootias foram relatadas nos estados da Bahia (BA), Paraná (PR) e Rio Grande do sul (RS). Em 2008-2009, outro surto ocorreu na região de RS, MG, SP, BA e Rio Grande do Norte (RN), com 57 casos em humanos confirmados. Epizootias foram confirmadas em MG, SP, RS e PR, neste mesmo período (ARAÚJO *et al.*, 2011; MS-BR, 2018a). No período de 1980 a 2015, 792 casos humanos de febre amarela silvestre e 421 mortes foram relatados no país (revisado por SILVA et al., 2020).

No período de 2016-2018 o Brasil vivenciou um grande surto de febre amarela, sendo relatados ao menos 2251 casos e 772 mortes associadas ao YFV, com a grande maioria dos casos no estado de MG, região sudeste do Brasil (MS-BR, 2017, 2018b, 2019) (Figura 4). Desde o surto de 2009 o estado de MG não registrava nenhum caso de febre amarela. Nos anos de 2016-2018, Minas Gerais vivenciou o maior surto de febre amarela já descrito desde o fim da circulação de febre amarela urbana no Brasil. Até janeiro 2019 foram relatados 1002 casos humanos confirmados com 340 mortes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020; SES-MG, 2017, 2018a, 2019) (Figura 4), aproximadamente 45% do total de casos do Brasil no mesmo período. Carcaças de PNHs positivas para o YFV foram detectadas desde 2017 até meados de 2018, inclusive em período não epidêmico (SES-MG, 2017, 2018a).

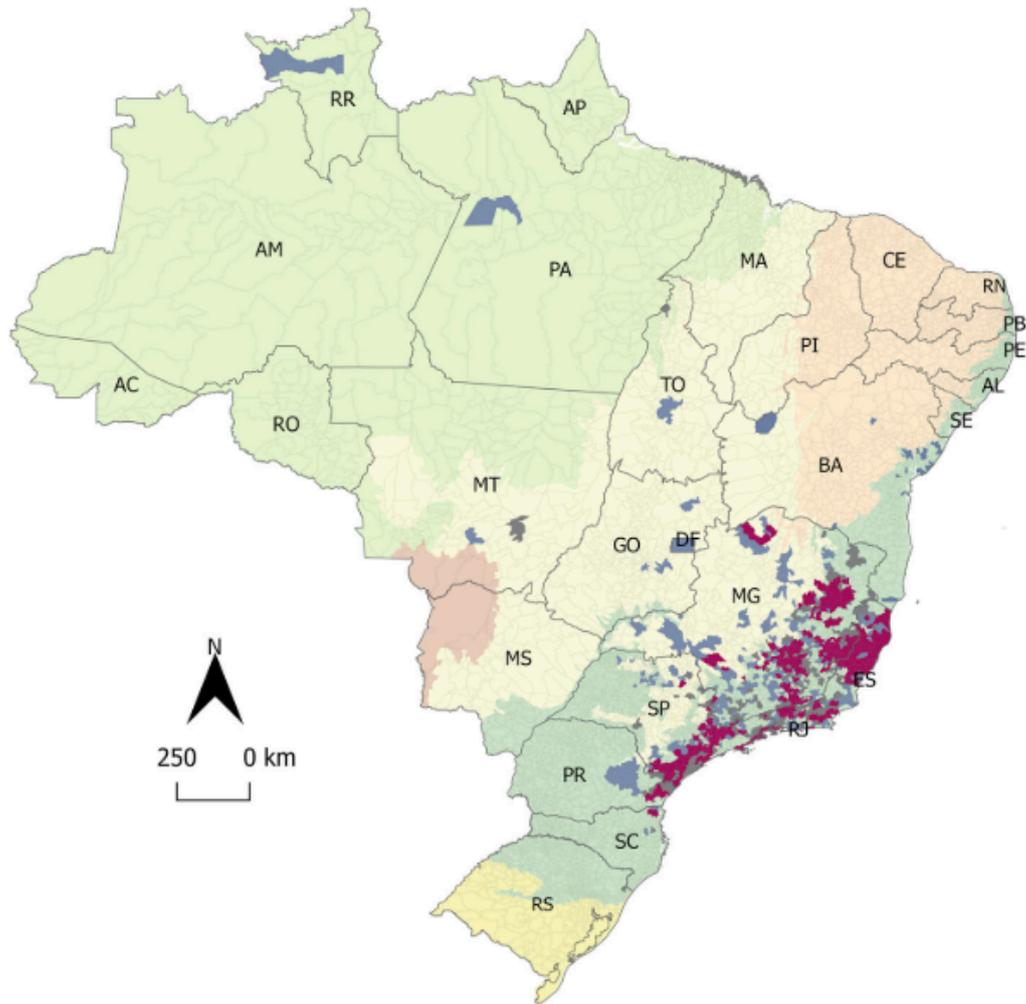


Figura 4: Casos humanos de febre amarela silvestre e epizootias no Brasil, de 2016 a 2019. O mapa apresenta os biomas da Amazônia (em verde claro), Caatinga (em laranja claro), Cerrado (em amarelo claro), Mata Atlântica (em verde escuro), Pampa (em amarelo escuro) e Pantanal (em marrom claro) no Brasil. Os municípios são coloridos de acordo com os casos de febre amarela em PNHs (em azul), em humanos (em cinza) e tanto em humanos quanto em PNHs (em vermelho). Fonte: SILVA et al., 2020. Cortesia Lívia Sacchetto.

10 Nos humanos, a infecção pelo YFV pode causar desde uma infecção
 assintomática a uma grande variedade de sinais clínicos e sintomas, incluindo
 casos fatais, com falência hepática e renal (PIERSON; DIAMOND, 2013). Após
 a picada do mosquito vetor e o período de incubação, os sintomas podem
 aparecer abruptamente. Classicamente, a febre amarela é dividida em três fases
 15 principais da doença: infecção, remissão e intoxicação. A primeira fase,
 conhecida como “fase de infecção”, pode durar de 3-6 dias e o paciente
 apresenta sintomas inespecíficos. Nessa fase o paciente apresenta-se virêmico,

com valores de títulos virais entre 10^5 e 10^6 cópias RNA/ml (MONATH, 2001b). Após esse período, a pessoa infectada entra em um período que é conhecido como “fase de remissão”. Essa fase, que dura de algumas horas até 2 dias, é representada pela melhora clínica do paciente, geralmente acompanhada da soroconversão. Após esse período, o paciente pode evoluir para cura ou, em aproximadamente 20%-60% dos casos, eles evoluem para a fase conhecida como “fase de intoxicação”. Essa é a forma grave da doença, caracterizada por febre hemorrágica, icterícia e grave doença viscerotrópica, com falência hepática e renal. Com base na literatura, nesta fase os pacientes já desenvolveram resposta imune e não são mais virêmicos. Cerca de 50% dos pacientes que evoluem para a fase grave, morrem (MONATH, 2001b; QUARESMA *et al.*, 2013). Os pacientes que sobrevivem à forma grave da doença evoluem para a fase de convalescença da febre amarela. Estudos dessa fase da doença indicam a ocorrência de hepatite prolongada associada a sintomas inespecíficos, como fadiga e fraqueza, que podem se prolongar por semanas e até meses, além de alteração nos valores de enzimas que indicam dano hepático e renal (CASADIO *et al.*, 2020; DENIS *et al.*, 2019; FRANCIS *et al.*, 1972; MONATH, 2001b; PIERSON; DIAMOND, 2013; REZENDE *et al.*, 2020).

Com relação ao YFV silvestre e a fase de convalescença, foi demonstrado por REUSKEN *et al.* (2017) a presença do genoma do YFV em soro de paciente naturalmente infectado, 20 dias após o início dos sintomas. Nesse mesmo paciente, o genoma do YFV foi detectado na urina, 45 dias após o início dos sintomas (REUSKEN *et al.*, 2017). Em outro estudo, o genoma do YFV foi detectado no soro, sêmen e urina de um paciente naturalmente infectado, 22 dias após o início dos sintomas (BARBOSA *et al.*, 2018). Esses estudos indicam a persistência do genoma de YFV silvestre nestes pacientes na fase de convalescença da doença.

Após a picada pelo mosquito infectado, o YFV infecta células dendríticas e se multiplica, aumentando a carga viral. O YFV alcança a corrente sanguínea periférica (viremia) até alcançar o fígado. Em humanos, a febre amarela é classicamente viscerotrópica e o fígado é o principal órgão acometido pelo YFV, embora rins, baço, linfonodos e coração também possam ser acometidos (LEMOS *et al.*, 2020; MONATH, 2001b; MONATH; VASCONCELOS, 2015). No fígado, o YFV induz necrose e apoptose dos hepatócitos, responsável pelo dano

hepático durante a febre amarela (DOUAM; PLOSS, 2018; LEMOS *et al.*, 2020; MONATH, 2001b; QUARESMA *et al.*, 2013).

Em um estudo recente, realizado com o objetivo de avaliar os danos hepáticos que o YFV pode causar, foi analisado um grupo com 14 pacientes com febre amarela e que necessitaram de transplante hepático, internados em um hospital da rede pública da cidade de Belo Horizonte/MG, no ano de 2018. Esse estudo demonstrou que pacientes com insuficiência hepática causada pelo YFV apresentaram elevados valores de transaminases, icterícia, coagulopatia, trombocitopenia e encefalopatia hepática. Dados histológicos do fígado acometido desses pacientes demonstrou esteatose microvesicular e necrose lítica. Além disso, os hepatócitos começaram a expressar a isoforma do tipo 3 do receptor trifosfato de inositol, que normalmente não é expresso em hepatócitos (LEMOS *et al.*, 2020).

Além da morte dos hepatócitos pelo YFV, outro fator importante para a patogênese da febre amarela é a tempestade de citocinas gerada pelo sistema imune do hospedeiro. Elevadas concentrações de TNF- α podem aumentar a atividade citolítica de linfócitos TCD8, aumentando o dano hepático. Em paralelo, o grande número de células Th3 TCD4 encontradas no fígado em pacientes com febre amarela fatal expressa altos níveis de TGF- β . O TGF- β é uma potente citocina anti-inflamatória e forte indutora de apoptose. Esses dados sugerem que o desbalanço das citocinas anti e pró-inflamatórias produzidas pelas células TCD4 pode ser um dos principais fatores da imunopatogênese na febre amarela (revisado por DOUAM; PLOSS, 2018).

Após a infecção natural pelo YFV, é observada uma forte resposta de células T antígeno-específicas e de células B de memória, promovendo uma imunidade duradoura contra o YFV. São produzidas células T e células secretoras de IgG, que podem perdurar por décadas no indivíduo (revisado por DOUAM; PLOSS, 2018). Mesmo com a produção de IgG, os níveis de IgM após uma infecção pelo YFV podem persistir altos no soro por até mais de um ano (MONATH; VASCONCELOS, 2015). Dessa forma, achados de IgM em pacientes suspeitos de infecção pelo YFV não podem ser o único resultado considerado para fechamento de casos suspeitos de febre amarela.

Como geralmente a fase de intoxicação da febre amarela está associada com o período não virêmico, onde observa-se a soroconversão do paciente,

especula-se que a resposta imune possa contribuir para esse quadro clínico (MONATH; BARRETT, 2003). Ter Meulen et al (2004) já demonstraram que em pacientes com febre amarela, o desbalanço entre citocinas e quimiocinas pró e anti-inflamatórias, com maiores níveis de citocinas e quimiocinas sendo medidos em pacientes fatais da febre amarela, está relacionado com o desfecho clínico desses pacientes durante a fase de intoxicação da febre amarela (TER MEULEN *et al.*, 2004).

Alguns flavivírus apresentam a capacidade de invadir o sistema nervoso central (SNC) e estabelecer uma infecção aguda no local (LINDENBACH *et al.*, 2013). No SNC, o YFV vacinal pode acometer o encéfalo e as meninges, levando a quadros de encefalites e meningites (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). Com base na literatura científica acessada durante o desenvolvimento deste trabalho, para o YFV, o neurotropismo é associado apenas ao YFV vacinal (DOKE *et al.*, 2016; FLORCZAK-WYSPIAŃSKA; NAWOTCZYŃSKA; KOZUBSKI, 2017; MARTINS *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2010). Recentemente foi detectado o RNA do YFV selvagem em líquido cefalorraquidiano (LCR) em um quadro de meningite grave que evoluiu para óbito, em uma criança com 3 anos, vacinada aos 9 meses de vida com (MARINHO *et al.*, 2019).

Até o contexto do surto de febre amarela que acometeu o Brasil nos anos de 2016-2018, os estudos que correlacionam fatores virais que podem determinar o quadro clínico mais grave da febre amarela eram escassos e muitas vezes foram feitos em experimentos com o vírus vacinal YFV-17DD (KLITTING *et al.*, 2018). Alguns estudos sugerem que a viremia durante a fase aguda da febre amarela é baixa quando comparada com outros flavivírus, podendo variar de 10^2 - 10^7 cópias RNA/ml (revisado por KLITTING *et al.*, 2018; MONATH, 2001b; VAN DER STUYFT *et al.*, 1999). Porém, a maioria das informações sobre viremia são de relatos de caso ou foram estudos com o YFV 17DD. Em um desses estudos, em modelo murino, há a indicação que altos valores de carga viral estão associados a gravidade da febre amarela (FARM; STATION; ALBANS, 1986). Estudos recentes com amostras do surto de 2016-2018 apontam que a carga viral pode ser um preditor de mortalidade para os casos de febre amarela, quando os valores de carga genômica viral são maiores que $5,1 \log_{10}$ cópias/ml (KALLAS *et al.*, 2019).

Um estudo realizado na África, com 23 pacientes demonstrou que a média dos valores das transaminases em casos fatais da febre amarela era de aspartato aminotransferase (AST) = 2766 U/L e alanina aminotransferase (ALT) = 660 U/L, enquanto que nos casos de pacientes que curaram, mas desenvolveram icterícia, a média dos valores era de AST= 929 U/L e de ALT=351 U/L (OUDART; REY, 1970). Alguns estudos indicam que um pior prognóstico ocorre quando ALT ultrapassa os valores de 1200 U/L e/ou AST atinge níveis acima de 1500 U/L (MONATH, 2001b; MONATH; VASCONCELOS, 2015; OUDART; REY, 1970).

Com os surtos recentes de febre amarela, foi possível começar a responder algumas dessas questões, como a investigação da correlação dos valores de AST, ALT, bilirrubina total (BT), direta (BD) dentre outros marcadores bioquímicos durante a fase aguda e a relação com o prognóstico da doença. Valores alterados de AST, ALT, Bilirrubina, Creatinina (Cr) e RNI já foram associados ao pior prognóstico da febre amarela, podendo ser preditores do desfecho óbito (KALLAS *et al.*, 2019; RIBEIRO *et al.*, 2019).

Desde a década de 1930 existe uma vacina disponível contra a febre amarela. No Brasil, a vacina é produzida a partir da linhagem 17DD do vírus atenuado. A vacina contra a febre amarela é considerada umas das vacinas mais seguras e eficazes já produzidas. A vacina é capaz de conferir proteção contra todos os genótipos circulantes do YFV (revisado por KLITTING *et al.*, 2018; MONATH, 2005). Desde 2017, o Ministério da Saúde preconiza a aplicação de dose única da vacina contra febre amarela, por considerar que apenas uma dose é capaz de induzir imunidade protetora em 99.99% das pessoas que receberam a vacina (MS, 2017).

Como a vacina YFV-17DD é produzida com o vírus atenuado, eventos adversos associados à vacinação podem acontecer. O quadro clínico pode variar desde reações locais leves até doenças viscerotrópica e neurotrópicas graves, podendo levar o vacinado a óbito. No Brasil, desde 2005 os casos de reação adversa vacinal são de notificação compulsória e imediata (LUCENA *et al.*, 2020). A incidência dos casos graves de reação adversa vacinal confirmados no Brasil, é de 1 caso para cada 250.000 doses aplicadas da vacina YFV-17DD (MS, 2014). No Brasil, no período de julho de 2016 a junho de 2017, 2540 casos de reação adversa vacinal foram notificados, sendo 135 considerados eventos

adversos graves (EAG) (LUCENA *et al.*, 2020). Observou-se maior incidência de EAG no mês de janeiro de 2017, coincidindo com o mês de início da ampliação do bloqueio vacinal, com a ocorrência de 1,3 caso por 100 mil doses aplicadas (LUCENA *et al.*, 2020).

5 Com relação ao YFV vacinal, foi observada a presença do YFV-17DD na urina de vacinados em até 25 dias após a data da vacinação. Os valores de carga genômica viral variaram de 3×10^1 a 5×10^5 . Esse achado evidencia a persistência do genoma do YFV vacinal na urina de pacientes vacinados, com valores de carga genômica viral próximos aos encontrados no soro durante a fase
10 aguda da doença (DOMINGO *et al.*, 2011; MONATH, 2001b; VOLKOV *et al.*, 2020).

Apesar da infecção natural pelo YFV conferir proteção eficaz por toda a vida, já foi demonstrado que ocorre a queda e até mesmo a completa falta dos títulos de anticorpos neutralizantes e da imunidade celular dez anos após a
15 aplicação de uma única dose da vacina YFV-17DD (BASTOS-CAMACHO *et al.*, 2014; COSTA-PEREIRA *et al.*, 2018). Sendo assim, a aplicação de uma segunda dose seria necessária para evitar a queda de soropositividade contra YFV, principalmente de pessoas que vivem em áreas de risco (CAMPI-AZEVEDO *et al.*, 2016).

20 Não existe um tratamento específico para tratar os casos de febre amarela, embora estudos estejam sendo conduzidos na procura por um antiviral seguro e eficaz. Com o surto de ZIKV no Brasil, novas abordagens terapêuticas começaram a ser repensadas para as flavivirose. O antiviral Sofosbuvir (β -d-2'-deoxy-2'- α -fluoro-2'- β -C-methyluridine) já é amplamente utilizado em infecções
25 pelo HCV, com efeito antiviral de ação direta na proteína NS5 viral, que possui função de RNA polimerase (KEATING, 2015). O mesmo medicamento já se mostrou eficaz em infecções pelo ZIKV *in vitro* (SACRAMENTO *et al.*, 2017a) e *in vivo* (FERREIRA *et al.*, 2017) e já foi liberado pelo FDA-USA para utilização em infecções causadas pelo ZIKV (BULLARD-FEIBELMAN *et al.*, 2017). Outros
30 estudos já foram publicados demonstrando a atividade protetora do antiviral Sofosbuvir contra o YFV em ensaios *in vivo* e *in vitro* (DE FREITAS *et al.*, 2019; MENDES *et al.*, 2019).

Os últimos surtos de febre amarela que ocorreram na África (KRAEMER *et al.*, 2017) e no Brasil (SES-MG, 2018a) demonstraram a necessidade de

revisão no diagnóstico da febre amarela. Em alguns casos, os testes diagnósticos sorológicos e moleculares podem ser usados de forma complementar. Testes rápidos são importantes para o melhor manejo de pacientes durante o surto, em contrapartida da necessidade de um diagnóstico eficiente e assertivo para identificar áreas de circulação do YFV, variantes genéticas virais e auxiliar na implementação de medidas de controle do vírus e imunização da população em áreas de risco (KLITTING *et al.*, 2018).

Embora a febre amarela seja uma doença antiga, ainda existem muitas lacunas sobre sua patogênese, sua clínica, além de não existir um tratamento específico. Indicadores clínicos e laboratoriais podem dar um maior suporte para o manejo dos pacientes e do estabelecimento do pior prognóstico da doença. No entanto, vale lembrar que a febre amarela evolui rapidamente e as características clínicas podem variar de acordo com fatores relacionados ao hospedeiro e à fase da infecção da doença.

15

2. JUSTIFICATIVA

Ao final de 2016 e início de 2017, o país foi surpreendido com casos de febre amarela acontecendo na região Sudeste do Brasil, fora da Bacia Amazônica, que é a região endêmica para o YFV. O vírus encontrou uma
5 população *nãive* e sem imunidade protetora nesta região. Mesmo com a existência de uma vacina contra o YFV, a cobertura vacinal na região afetada estava bem abaixo dos 95% recomendados pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Em 2018 o YFV foi detectado majoritariamente nas regiões de MG diferentes daquelas em que circulou no ano de 2017. Essas áreas, apesar da
10 intensa campanha de vacinação em 2017 ainda se encontravam com baixa cobertura vacinal. O número de casos de febre amarela no Brasil em 2016-2018 (2155 casos confirmados, com 745 óbitos) ultrapassou o total de casos somados desde 1980 até 2015 (871 casos confirmados) em todo o país.

Apesar dos impactos negativos dos surtos recentes de febre amarela, a
15 ocorrência desses traz uma oportunidade de estudo dessa doença. Estudos do curso natural da infecção durante a fase aguda e a fase de convalescença da febre amarela podem auxiliar no entendimento da patogênese da doença, na procura por marcadores de prognóstico/gravidade, no manejo clínico dos pacientes e no entendimento da clínica da doença, uma vez que estudos com
20 esse intuito são escassos. O acompanhamento desses pacientes pode trazer informações sobre a persistência do YFV, uma vez que esse fenômeno já foi observado para o ZIKV e pouco se sabe sobre persistência e YFV. A investigação da presença do YFV durante fases mais tardias da febre amarela, como fase de intoxicação e convalescença, pode auxiliar no diagnóstico
25 laboratorial, especialmente por técnicas moleculares, mesmo em fases mais tardias da doença. Além disso, a procura pelo genoma do YFV em amostras de urina e saliva podem auxiliar em testes diagnósticos menos invasivos e também avaliar a persistência do genoma do YFV nessas amostras.

Além dos estudos da infecção natural pelo YFV, a busca de marcadores
30 de prognóstico, como a carga viral, pode auxiliar no manejo clínico do paciente. Os estudos do curso da infecção podem trazer importantes informações não só sobre a carga genômica viral, mas também sobre a carga de partículas

infecciosas, uma vez que não existem estudos que estabeleçam a relação entre carga genômica e partículas infectivas.

5 Devido à falta de tratamento específico para a febre amarela, novas abordagens terapêuticas devem ser consideradas, principalmente em épocas de surtos. O uso do antiviral Sofosbuvir já se mostrou promissor em estudo *in vitro* e *in vivo* contra o ZIKV e o YFV e pode ser um importante aliado durante a evolução da doença. O antiviral pode ter impacto positivo nas infecções pelo YFV e esse impacto pode ser mensurado através da carga viral e de marcadores bioquímicos, como AST, ALT, BT, BD, dentre outros.

10 Durante grandes surtos, quando há uma vacina disponível, campanhas de vacinação em massa são realizadas a fim de se tentar controlar a disseminação do agente causador. Já se é conhecido que a vacina YFV-17DD pode causar reações adversas após a vacinação. Durante um surto, realizar a diferenciação entre casos de doença relacionados à vacina ou ao YFV silvestre
15 é de extrema importância para manejo clínico, uma vez que casos de reação adversa vacinal podem estar associados a doença neurotrópica. Além disso, esses dados são importantes também para a epidemiologia da febre amarela. Além da reação adversa vacinal, casos de pacientes que tiveram falha na proteção contra YFV também podem ocorrer e esses casos são postos a prova
20 em épocas de grandes surtos, devendo ser mais bem compreendidos.

 Diante disso, fica evidente a necessidade de um estudo de investigação, epidemiologia, acompanhamento e caracterização genética do YFV, que causou um grande surto no Brasil e mais especificamente em MG nos anos de 2017-2018. Os resultados deste trabalho poderão fornecer dados para implementação
25 de políticas públicas, direcionando novas estratégias de tratamento, prevenção, controle e manejo dos pacientes.

3. OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar aspectos clínicos, epidemiológicos, virológicos e dinâmica evolutiva viral de uma infecção natural pelo YFV, durante a fase aguda e de convalescença da
5 doença, durante os surtos de 2017-2018 em Minas Gerais.

Os objetivos específicos, juntamente com respectivos tópicos de metodologias, resultados, discussão e conclusões serão apresentados em capítulos como indicado abaixo:

10

1. **CAPÍTULO 1:** Caracterização filogenética do YFV circulante e análise da filodinâmica viral, durante os surtos de 2017 e 2018.

15

2. **CAPÍTULO 2:** Padronização de uma técnica de genotipagem de YFV e análise da ocorrência de febre amarela em pacientes com suspeita de reação adversa vacinal.

20

3. **CAPÍTULO 3:** Análise de aspectos clínico-epidemiológicos e virológicos de pacientes com febre amarela, durante a fase aguda da doença, atendidos no Hospital Eduardo de Menezes (HEM), em 2017-2018:

25

a. Análise de aspectos clínico-epidemiológicos de pacientes atendidos no HEM, em 2017-2018;

b. Análise de casos de pacientes que foram vacinados e tiveram falha na proteção contra o YFV, atendidos no HEM;

c. Análise da presença de RNA do YFV em amostras de LCR e urina;

d. Análise de marcadores de diagnóstico de pacientes com febre amarela atendidos no HEM;

30

e. Análise se valores de carga genômica viral pode ser utilizado como prognóstico da febre amarela.

f. Análise da carga genômica viral durante a fase aguda da febre amarela, em pacientes do HEM tratados com o antiviral Sofosbuvir.

4. **CAPÍTULO 4:** Análise do curso natural da febre amarela durante a fase de convalescença da doença, avaliando aspectos clínicos, bioquímicos e persistência viral em diferentes amostras de pacientes com febre amarela e desfecho alta e pelo menos um retorno ambulatorial no HEM.

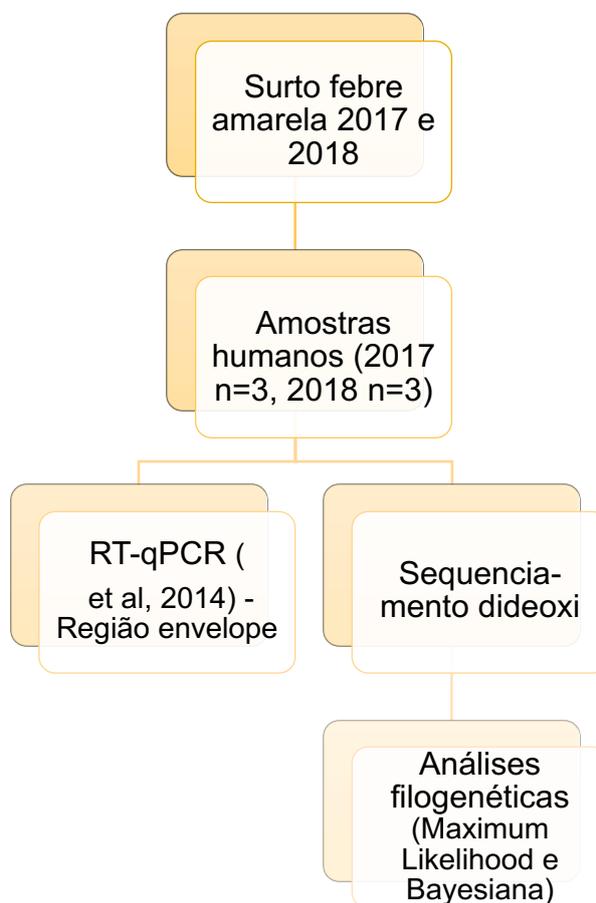
5

4. CAPÍTULO 1: Caracterização filogenética dos vírus circulantes, durante surtos de febre amarela e análise da filodinâmica viral

Após o surto de febre amarela em 2017 e sua continuação em 2018, surgiu a pergunta se o vírus causador das duas epidemias de febre amarela em MG seria o mesmo ou se havia ocorrido uma nova introdução do YFV em MG, ocasionando a epidemia de 2018.

4.1. Fluxograma

De acordo com o fluxograma abaixo, o sequenciamento do gene do envelope das amostras positivas foi a metodologia escolhida, seguido de análises filogenéticas.



4.2.1 Detecção molecular de YFV

Nesse capítulo foram utilizadas amostras de soro de seis pacientes (2017 n=3 e 2018 n=3) com confirmação de infecção pelo YFV e internados no HEM.

5 A extração de RNA total a partir de soro foi realizada a partir de 140 µl de amostra, utilizando o kit Qlamp Viral RNA Minikit (QIAGEN, USA), seguindo as instruções do fabricante. O RNA total extraído foi armazenado até o momento do uso em ultra freezer a -70 °C.

10 Para síntese de cDNA, foi feita uma reação de transcrição reversa a partir de 500 ng do RNA total extraído, utilizando primers aleatórios e a enzima GoScript (Promega, USA), seguindo as especificações.

Para detecção e posterior sequenciamento do YFV nessas amostras, foi realizada a técnica de nested-PCR descrita por JORGE et al. (2017). A primeira reação do PCR convencional foi realizada nas seguintes condições: a 10 µl de tampão 2x (GoTaq Colorless, Promega, USA) foram adicionados 0,5 µl de cada iniciador (10 µM), 3,0 µl do cDNA e água ultrapura q.s.p. 20 µl. A segunda reação de PCR convencional foi realizada nas seguintes condições: a 10 µl de tampão 2x (GoTaq Colorless, Promega, USA) foram adicionados 0,5 µl de cada iniciador (10 µM), 2,0 µl do produto amplificado 1ª PCR e água ultrapura q.s.p. 20 µl. As reações aconteceram em termociclador Verit (Applied Biosystemns), nas seguintes condições: 95°C – 5 minutos e 40 ciclos: 95°C – 30 segundos / 55°C – 30 segundos / 72°C – 90 segundos.

25 Os amplicons de interesse para sequenciamento foram purificados e enviados para sequenciamento pelo método dideoxi (SANGER & NICKLEN, 1977). Antes da purificação, o produto de interesse foi separado por eletroforese em gel de poliacrilamida 8%, posteriormente corado com SybrGold 1000X (Invitrogen). Para a purificação, a banda de tamanho específico, presente no gel de poliacrilamida 8%, foi cortada com auxílio de bisturi e triturada como descrito a seguir: o fragmento de acrilamida, contendo o amplicon desejado, foi colocado em um microtubo de 0,6 ml com um furo no fundo (feito com auxílio de uma 30 agulha de seringa, 13 Ga) (Figura 5 A). Esse tubo foi tampado e inserido dentro de outro microtubo, de 1,5 ml (Figura 5 B). Esse conjunto foi centrifugado por 1 min a 12.400 x g, 4°C (Figura 5 C). Nessa etapa a banda passa, devido a força centrípeta, pelo furo do tubo de 0,6 ml e é triturada (Figura 5 D). O microtubo de 0,6 ml é então descartado. Ao tubo de 1,5 ml, foram adicionados 70 µl de água

ultrapura (Figura 5 E). O tubo foi agitado em vórtex por 15 segundos e incubado a 4°C, *overnight* (Figura 5 F). No outro dia, a solução foi centrifugada, o sobrenadante foi aliqotado em um novo microtubo e armazenado a -20 °C até a utilização (Figura 5 F).

5

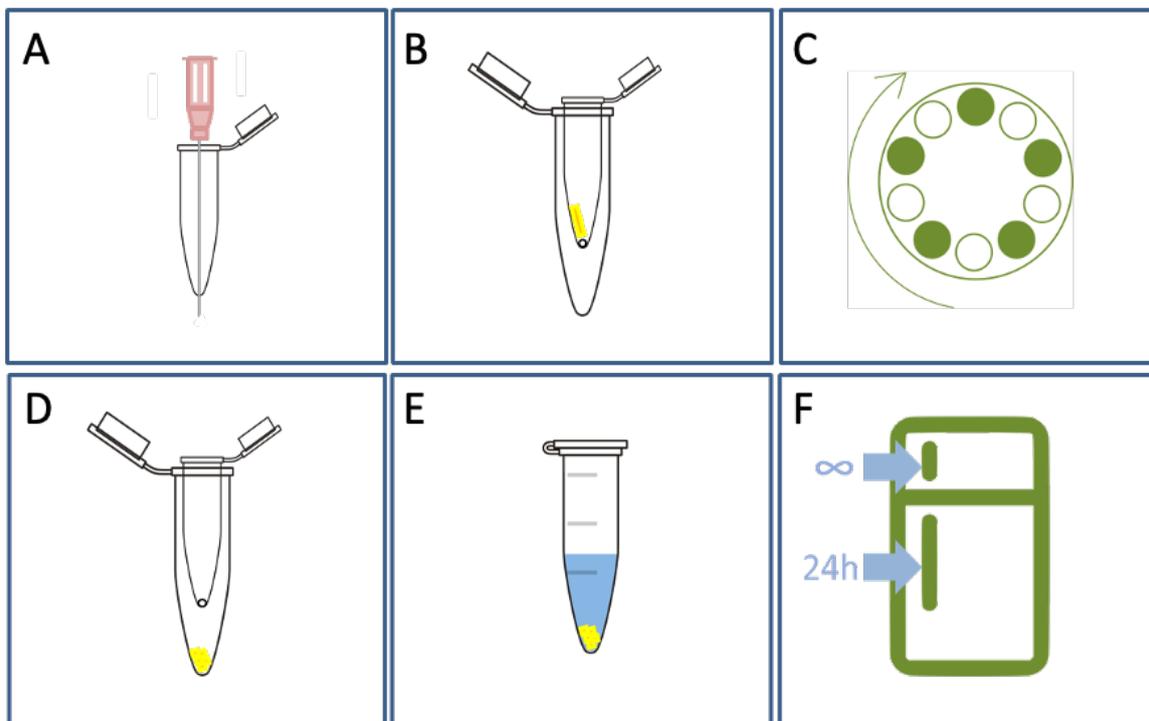


Figura 5: Esquema do protocolo para purificação *in-house* a partir de gel de poliacrilamida, corado com Sybr Gold (Invitrogen). **A:** Furar um microtubo de 0,6 ml com uma agulha de 13 gauge. Atentar para o furo ser feito na mesma direção da dobradiça da tampa do microtubo. **B:** Colocar a banda cortada do gel de poliarilamida dentro do microtubo de 0,6 ml. Fechar o microtubo e coloca-lo dentro de um microtubo de 1,5 ml, devidamente identificado. **C:** Centrifugar esse conjunto a 13.000 x g por 1 minuto. **D:** Com a centrifugação, a banda é triturada ao passar pelo furo feito com a agulha no microtubo de 0,6 ml. Descartar o microtubo de 0,6 mL. **E:** Adicionar 70 µL de água ultrapura à banda triturada. Vortexar o tubo por 20 segundos e em seguida, dar um spin. **F:** Incubar o microtubo a 4° C, *overnight*. Após esse período, o DNA purificado deve ser armazenado em freezer -20° C até o seu uso.

10

15

4.2.2 Sequenciamento e Inferências filogenéticas

20

Após a purificação, 5 ng de DNA (aproximadamente 7,5 µl), juntamente com 0,5 µM do iniciador específico senso ou antissenso, foram utilizados para sequenciamento pelo método dideoxi, descrito por SANGER e NICKLEN (1977).

O sequenciamento foi realizado em sequenciador automático ABI 3700 (Applied Biosystems). Cada amplicon foi enviado para sequenciamento pelo menos duas vezes com cada iniciador específico. Os demais passos para o sequenciamento foram realizados no laboratório da Plataforma de Sequenciamento de DNA Sanger/Fiocruz. O sequenciamento foi realizado em parceria com os

5 pesquisadores Jaqueline Germano de Oliveira e Pedro Augusto Alves, do Instituto René Rachou – Fiocruz Minas.

Para as análises filogenéticas, as sequências de nucleotídeos (nt) foram alinhadas usando o software MAFFT (KATO; ASIMENOS; TOH, 2009). Árvores

10 filogenéticas foram reconstruídas pelo método de máxima verossimilhança implementando no PhyML (GUINDON *et al.*, 2010). O modelo de substituição de nt foi selecionado usando SMS (LEFORT; LONGUEVILLE; GASCUEL, 2017). Previamente às análises para estimar o último ancestral comum (MRCA), análises para checar o sinal temporal das sequências foram realizadas usando

15 o TempEst v.1.5.1 (RAMBAUT *et al.*, 2016). As análises posteriores foram feitas usando o pacote BEAST v.1.8.4 (DRUMMOND *et al.*, 2012), utilizando os algoritmos de Markov Chain Monte Carlo (MCMC). Os arquivos de entrada do BEAST foram gerados no BEUATi v.1.8.2 (DRUMMOND *et al.*, 2012). As corridas foram realizadas usando diferentes modelos demográficos (paramétrico

20 e não-paramétrico) e relógio molecular estrito ou relaxado (*uncorrelated lognormal*). A convergência dos parâmetros foram analisadas no Tracer v.1.7.1 (RAMBAUT *et al.*, 2018), com 95% de confiança (95% *Bayesian credible intervals* (BCI)). As árvores geradas foram sumarizadas usando o TreeAnnotator v.1.8.2 (RAMBAUT; DRUMMOND, 2015). A árvore final foi visualizada e editada

25 no FigTree v.1.4.3 (RAMBAUT, 2016).

30 4.3. Resultados e Discussão

Para melhor entendimento da origem e dinâmica das epidemias recentes causadas pelo YFV no Brasil, foram realizadas análises moleculares do YFV associado a epidemias em humanos e PNHs em 2017-2018. Para isso, foi

sequenciado parte do gene do capsídeo e do envelope do YFV (1259 nt) a partir do soro seis pacientes com febre amarela (2017 n=3 /2018 n=3). Estas sequências foram analisadas conjuntamente com sequências de YFV provenientes de dez carcaças de PNHs, recebidas no Laboratório de Zoonoses da Prefeitura de Belo Horizonte, em 2017. As sequências de YFV provenientes de primatas não humanos fazem parte da tese de doutorado de Lívia Sacchetto (dados não publicados).

A partir dessas análises, foi possível demonstrar que as amostras analisadas se agrupavam em um único clado, juntamente com as amostras do genótipo Sul Americano I (Figura 6), confirmando uma introdução única do YFV em MG, causando os surtos em 2017 e 2018. Os dados indicam a persistência do vírus, possibilitando sua reemergência em 2018. De fato, a persistência da circulação do YFV em PNHs foi demonstrada durante todo o ano de 2017, em Minas Gerais, suportando estes resultados (SES-MG, 2018a; Lívia Sacchetto – dados não publicados).

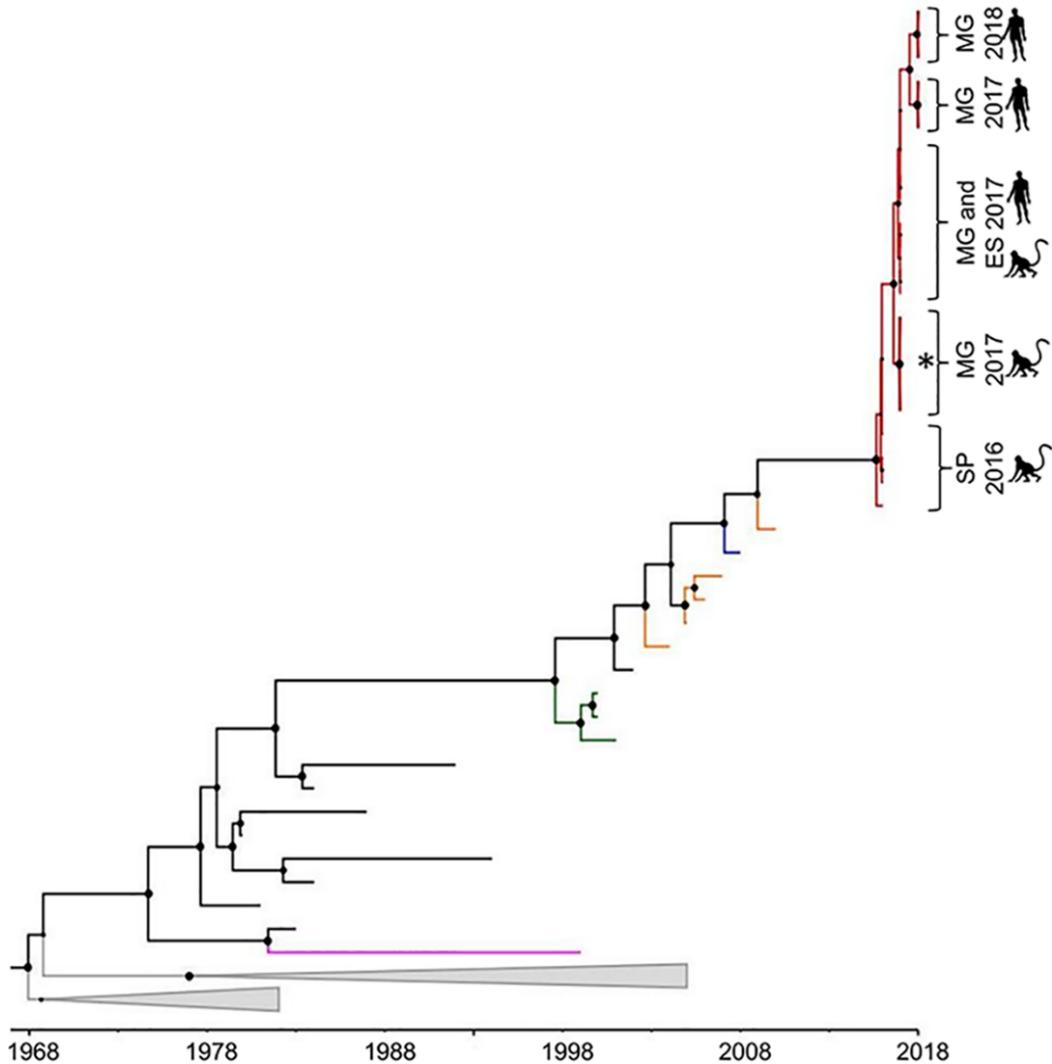


Figura 6: Análise bayesiana do YFV sequenciado a partir de amostras de soro de humanos e de fígado de PNHs, em 2017-2018. A árvore foi estimada utilizando 60 seqüências de nt (1.038 nt) de YFV da América do Sul. Os valores de probabilidade posterior estão representados por círculos desenhados em escala nos nós. Clados contendo amostras brasileiras dos surtos de 2000–01, 2008–09 e o atual (2016–2018) estão representadas em verde, azul e vermelho, respectivamente. Ramos terminais em laranja, rosa e preto representam seqüências da Venezuela, Bolívia, e Brasil, respectivamente. Amostras Africanas estão colapsadas em cinza. Os ramos horizontais estão em escala de anos. ES: Espírito Santo, MG: Minas Gerais e SP: São Paulo. O (*) indica o clado de amostras de YFV obtidas de PNHs que apresentam duas substituições de aminoácidos únicas, caracterizadas como sinapomorfias.

Analisando as seqüências de YFV da região Sudeste do Brasil (MG, SP e ES), foi possível observar que o clado dessas amostras (região Sudeste/2016-2018) está mais próximo a seqüências da Venezuela. De fato alguns estudos

sugerem que o YFV responsável pelas últimas epidemias foi introduzido no Brasil a partir da Venezuela (GÓMEZ *et al.*, 2018; MIR *et al.*, 2017; MOREIRA-SOTO *et al.*, 2018). Faria et al (2018) mostraram que as amostras de YFV do surto de 2017 ficaram mais próximas de um vírus do estado de Roraima. Além disso, foi possível estimar o ancestral comum mais recente do clado formado pelas amostras da região Sudeste, no período de 2016-2018, datado em julho 2015 (95% Bayesian credible intervals (95%BCI) = de julho/2014 a janeiro/2016). Essa data coincide com a época de reemergência do YFV em Goiás. Possivelmente o vírus foi introduzido da região Norte do Brasil, passando pela região Centro-Oeste, até alcançar a região Sudeste. Não foi possível realizar análises filogenéticas das amostras de Goiás devido à falta de sequências de nucleotídeos dessas amostras. Apesar disso, dados epidemiológicos (local e data de casos prévios em humanos e dados de epizootias) em conjunto com esses resultados sugerem que essa linhagem conseguiu persistir infectando humanos e PNHs na região Sudeste do Brasil e causar as recentes epidemias que ocorreram em MG, em 2017-2018.

Outros estudos estimaram que a linhagem que causou o surto de febre amarela em 2017-2018 no estado de Minas Gerais iniciou sua disseminação nessa região há pelo menos dois anos antes da detecção dos casos de febre amarela (DELATORRE *et al.*, 2019; FARIA *et al.*, 2018). O vírus provavelmente possui origem na região da Bacia Amazônica e conseguiu alcançar a região Sudeste através da região Centro-Oeste (DELATORRE *et al.*, 2019), corroborando os dados deste trabalho.

Diante dos casos fatais e de recuperação dos pacientes com ou sem hepatite tardia, foi levantado o questionamento se características virais poderiam estar associadas a estes desfechos. Neste estudo, inicialmente, foram determinadas as sequências de YFV provenientes de casos fatais e não fatais (n=6) de febre amarela, em 2017-2018. Essas amostras ficaram agrupadas em um mesmo clado na árvore (Figura 6), indicando não haver diferenças nos vírus associados a casos fatais e não fatais.

O fato dos vírus todos se agruparem em um único clado está de acordo com estudos que mostram a única introdução do YFV, causando os surtos de 2017 e 2018. Outras hipóteses poderiam explicar os casos fatais e de hepatite tardia, como a fase de infecção que o paciente recebeu atendimento e

características genéticas de cada paciente, bem como da resposta imune de cada um.

Esses resultados foram publicados pelo periódico científico *Plos Neglected and Tropical Disease*, no artigo “*Persistence of Yellow fever virus outside the Amazon Basin, causing epidemics in Southeast Brazil, from 2016 to 2018*”, em Junho/2018 (Anexo I).

4.4. Conclusão

10 ∴ Foi possível estimar o ancestral comum mais recente do clado formado pelas amostras da região Sudeste, no período de 2016-2018, datado em julho 2015. Esses dados indicam uma única introdução do YFV em MG e sua manutenção na região Sudeste do Brasil ao menos até 2018.

15 5. **CAPÍTULO 2: Padronização de uma técnica de genotipagem de YFV e Análise da ocorrência de febre amarela em pacientes com suspeita de reação adversa vacinal após vacinação.**

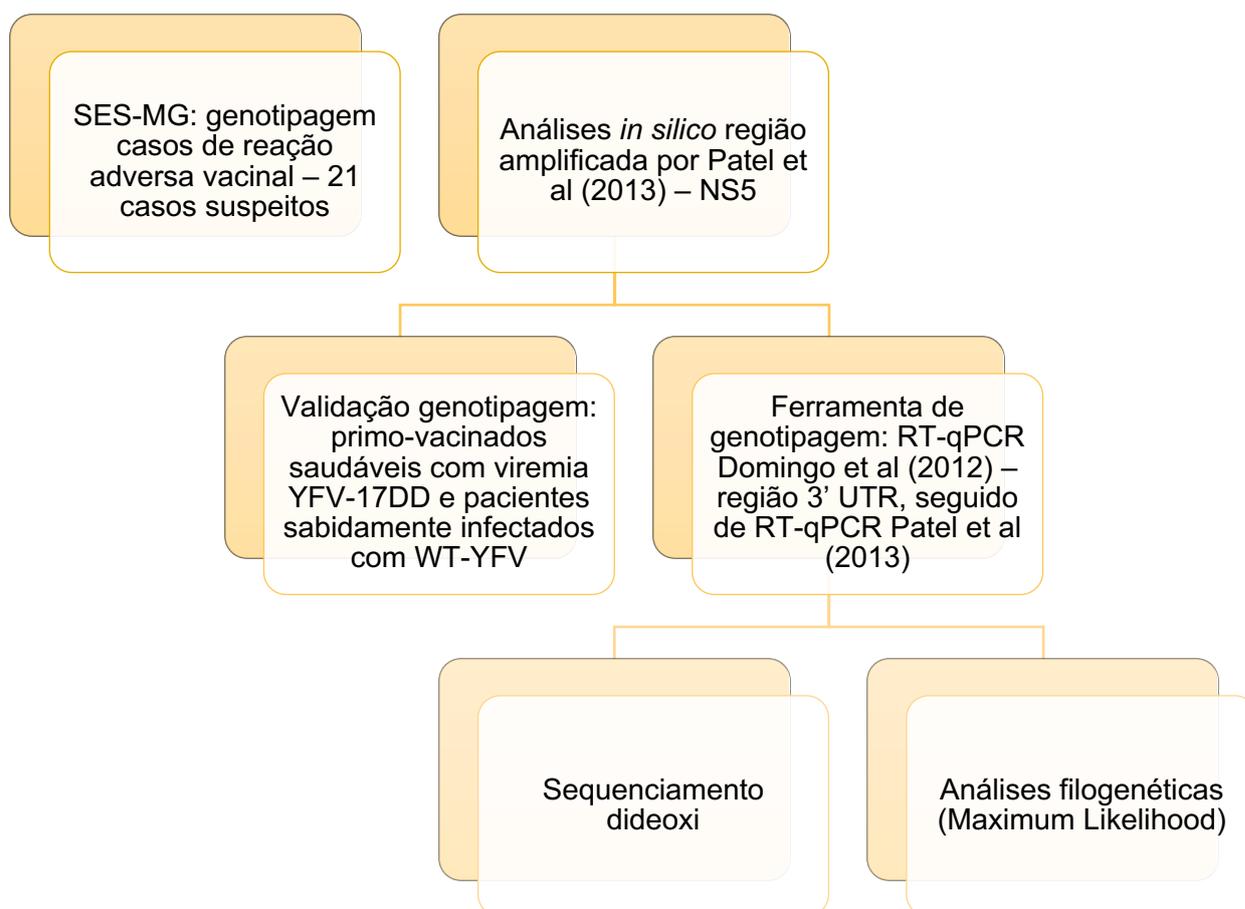
Durante o surto de YFV nos anos de 2017-2018, através de uma colaboração com a Secretaria de Estado de Saúde do estado de MG (SES-MG),
20 foi solicitado ao grupo de pesquisa de estudos em Febre Amarela a genotipagem de 21 casos suspeitos de reação adversa após vacinação com YFV-17DD. Esses casos suspeitos eram de pessoas que haviam se vacinado e após 1-30 dias da vacinação apresentaram algum sintoma correspondente aos sintomas causados pelo YFV. Para validação da nossa ferramenta de genotipagem do
25 YFV, foi selecionado um grupo de amostras pertencentes a diferentes grupos. Esse grupo de amostras foi formado por 25 amostras de soro de pacientes saudáveis e assintomáticos, com viremia confirmada do vírus vacinal YFV-17DD (não eram casos de suspeita de reação adversa vacinal) e 4 amostras de soro de pacientes sabidamente infectados pelo vírus selvagem, previamente
30 sequenciado.

Segundo a SES-MG, a infecção pelo YFV havia sido confirmada em todos os 21 pacientes analisados, por testes sorológicos ou moleculares realizados no

LACEN de MG (FUNED). Os pacientes analisados nesse trabalho apresentaram sintomas de 1 a 13 dias após a vacinação e reportaram febre, dor de cabeça, dor muscular, vômito, dentre outros sintomas.

5 5.1. Fluxograma

De acordo com o fluxograma abaixo, iniciamos com uma análise *in silico*, para análise da região amplificada pelo RT-qPCR descrito por Patel et al (2013). Seguidamente, a ferramenta de genotipagem do YFV foi otimizada com um primeiro RT-qPCR para triagem das amostras (Domingo et al, 2012), seguido de um segundo RT-qPCR (Patel et al 2013) para sequenciamento dideoxi e posterior análises filogenéticas.



5.2. Metodologia

5.2.1 Extração de RNA

A extração de RNA total a partir de soro foi realizada a partir de 140 µl de amostra, utilizando o kit Qlamp Viral RNA Minikit (QIAGEN, USA), seguindo as instruções do fabricante. O RNA total extraído foi armazenado até o momento do uso em ultra freezer a -70 °C.

5.2.2 Ferramenta de genotipagem

Para genotipagem do YFV silvestre e vacinal nas amostras de soro de pacientes com histórico de vacinação recente contra o YFV, foi padronizada uma metodologia molecular. Amostras de grupos de pacientes deste estudo foram inicialmente testadas segundo a metodologia de Domingo et al (2012). Após essa triagem, as amostras seguiram então para a amplificação de parte do genoma de YFV, e posterior sequenciamento, utilizando os iniciadores pan-flavivírus descritos por Patel et al (2013). Após a amplificação, as amostras positivas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 8%. Os fragmentos correspondentes ao tamanho esperado (260 pb) foram purificados, como descrito no item 4.2.1.

Para as inferências filogenéticas, as sequências de nt do YFV obtidas neste trabalho (n = 46) foram alinhadas com 111 sequências correspondentes ao YFV silvestre e ao YFV vacinal ou com sequências de casos de reação adversa vacinal, usando o programa Clustal W, implementado no MEGA7 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016). O modelo de substituição de nucleotídeos Kimura-2-parâmetros com distribuição gama (K2 + G) foi selecionado utilizando o JModel Test (DARRIBA *et al.*, 2012) e utilizado para a reconstrução de árvores pelo método de ML, com 1000 replicatas de bootstrap, usando o MEGA7 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016). As análises bayesianas foram realizadas em paralelo usando o pacote BEAST v.1.8.4 (DRUMMOND *et al.*, 2012) com os algoritmos MCMC. Os arquivos de entrada do BEAST v1.8.4 foram criados com o BEAUTi v.1.8.4. As análises foram realizadas usando modelos coalescentes demográficos do tipo “*Bayesian Skyline*” com relógio molecular relaxado. O melhor modelo foi selecionado comparando as estimativas de verossimilhança marginal, usando o método de amostragem por caminhos (*path sampling - PS*)

e métodos de amostragem por degraus (*stepping-stone sampling - SS*). Cem milhões de cadeias foram executadas e a convergência dos parâmetros foram analisadas no Tracer v.1.7.1 (RAMBAUT et al., 2018), com 95% de confiança (95% *Bayesian credible intervals* (BCI)). As árvores foram amostradas a cada 5 10.000 etapas e, em seguida, resumidas em uma árvore de credibilidade máxima de clados usando o TreeAnotator v.1.8.4 (RAMBAUT; DRUMMOND, 2015). As cadeias foram executadas por três vezes independentes e os dados foram combinados usando o LogCombiner v.1.8.4. A árvore final foi visualizada no FigTree v.1.4.3 (RAMBAUT, 2016).

10

5.3. Resultados e Discussão

Foi padronizada uma metodologia acessível para genotipagem do YFV, usando a amplificação de parte do gene NS5, seguido de sequenciamento nucleotídeo pelo método de SANGER e análises filogenéticas.

15

Análises iniciais *in silico* foram realizadas utilizando parte da sequência de nucleotídeos do gene NS5 de sequências de vírus vacinal e vírus selvagem (266 nucleotídeos, correspondentes a posição 8993 a 9258 do YF-17D, número de acesso GenBank: X03700). A região analisada é a correspondente ao produto amplificado pela RT-qPCR descrita por Patel et al (2013), e já havia sido demonstrado que essa região é capaz de distinguir diferentes genótipos do YFV (PATEL *et al.*, 2013). As análises com 111 sequências parciais do gene NS5, retiradas do GenBank, demonstraram que, com base na sequência de nucleotídeos do produto amplificado (PATEL *et al.*, 2013) é possível distinguir o YFV vacinal dos demais genótipos do YFV.

20

25

As 21 amostras provenientes de pacientes com suspeita de febre amarela causada por vacina foram primeiramente testadas para a presença do gene da Beta-actina, um gene constitutivo que nos indica a integridade do RNA na amostra atestada, e todas foram positivas, com Cq's variando de 21 a 29. Posteriormente, as 21 amostras com suspeita de reação adversa após vacinação foram testadas pela RT-qPCR descrita por DOMINGO et al (2012). Das 21 amostras testadas, 19 foram positivas para o YFV.

30

Em seguida, as amostras de todos os grupos selecionados (amostras com suspeita de reação adversa vacinal, amostras de primo-vacinados saudáveis e

amostras de infecção confirmada pelo YFV selvagem), foram então testadas pela RT-qPCR descrita por Patel et al (2013). Todas as amostras controles (25 amostras provenientes de pacientes saudáveis após primo-vacinação e 4 amostras de pacientes sabidamente infectados pelo WT-YFV) e 17 das 21 amostras com suspeita de reação adversa vacinal foram positivas (Figura 7). As 5 46 amostras positivas foram então sequenciadas pelo método Sanger (SANGER; NICKLEN, 1977).

Tabela 1: Investigação de casos de reação adversa vacinal após vacinação contra febre amarela

Paciente	Idade	Gênero	Data vacinação YFV-17DD	Início sintomas	Amostra testada					Genótipo
					Dias após		RT-qPCR (alvo)		IgM	
					sintomas	Vacinação	5'-UTR ¹	NS5 ²		
1	57	M	1/23/17	1/23/17	3	3	Positive	Positive	N/A	WT
2	15	M	1/19/17	1/20/17	3	4	Positive	Positive	N/A	WT
3	38	F	1/13/17	1/13/17	7	7	Positive	Positive	Positive	WT
4	49	F	1/23/17	1/23/17	4	4	Positive	Positive	N/A	WT
5	51	M	1/14/18	1/16/18	2	4	Positive	Positive	Negative	WT
6	61	M	1/15/18	1/15/18	2	2	Positive	Positive	Negative	WT
7	22	M	1/23/17	1/23/17	5	5	Positive	Positive	N/A	WT
8	39	M	1/16/17	1/16/17	3	3	Positive	Positive	N/A	WT
9	42	M	1/16/17	1/17/17	3	4	Positive	Positive	N/A	WT
10	36	F	1/10/17	1/18/17	5	14	Positive	Positive	Positive	WT
11	37	F	1/13/17	1/23/17	5	16	Positive	Positive	Negative	WT
12	33	F	1/16/17	1/22/17	5	12	Positive	Positive	Negative	WT
13	34	M	1/20/17	1/21/17	6	8	Positive	Positive	Positive	WT
14	62	F	1/14/17	1/17/17	5	9	Positive	Positive	Negative	WT
15	57	M	1/20/17	1/21/17	8	9	Positive	Positive	N/A	WT
16	60	M	1/10/17	1/22/17	3	16	Positive	Positive	Negative	WT
17	42	M	1/15/17	1/17/17	6	9	Positive	Positive	Negative	WT
18	27	M	1/12/17	1/16/17	7	11	Positive	Negative	N/A	N/A
19	40	M	1/19/17	1/21/17	1	2	Positive	Negative	N/A	N/A
20*	48	F	1/14/17	1/18/17	7	12	Negative	Negative	Negative	N/A
21**	32	F	1/14/17	1/25/17	4	16	Negative	Negative	Negative	N/A
22	47	M	2/16/18	ND	ND	5	Positive	Positive	ND	YFV-17DD
23	54	F	2/16/18	ND	ND	6	Positive	Positive	ND	YFV-17DD
24	45	F	2/23/18	ND	ND	6	Positive	Positive	ND	YFV-17DD
25	48	M	2/23/18	ND	ND	4	Positive	Positive	ND	YFV-17DD
26	26	F	2/21/18	ND	ND	5	Positive	Positive	ND	YFV-17DD
27	42	F	2/28/18	ND	ND	5	Positive	Positive	ND	YFV-17DD
28	45	F	2/22/18	ND	ND	5	Positive	Positive	ND	YFV-17DD
29	75	M	2/23/18	ND	ND	5	Positive	Positive	ND	YFV-17DD
30	42	M	3/23/18	ND	ND	6	Positive	Positive	ND	YFV-17DD
31	51	M	2/26/18	ND	ND	8	Positive	Positive	ND	YFV-17DD
32	16	F	2/21/18	ND	ND	5	Positive	Positive	ND	YFV-17DD
33	58	F	2/21/18	ND	ND	5	Positive	Positive	ND	YFV-17DD
34	7	M	2/21/18	ND	ND	5	Positive	Positive	ND	YFV-17DD
35	65	M	2/15/18	ND	ND	4	Positive	Positive	ND	YFV-17DD
36	24	M	2/16/18	ND	ND	4	Positive	Positive	ND	YFV-17DD
37	50	M	2/19/18	ND	ND	4	Positive	Positive	ND	YFV-17DD
38	54	M	3/1/18	ND	ND	5	Positive	Positive	ND	YFV-17DD
39	39	F	3/1/18	ND	ND	6	Positive	Positive	ND	YFV-17DD
40	59	F	3/5/18	ND	ND	4	Positive	Positive	ND	YFV-17DD
41	55	M	3/9/18	ND	ND	5	Positive	Positive	ND	YFV-17DD
42	60	M	3/19/18	ND	ND	1	Positive	Positive	ND	YFV-17DD
43	62	M	2/19/18	ND	ND	4	Positive	Positive	ND	YFV-17DD
44	48	M	2/23/18	ND	ND	5	Positive	Positive	ND	YFV-17DD
45	55	M	2/21/18	ND	ND	5	Positive	Positive	ND	YFV-17DD
46	28	M	2/22/18	ND	ND	5	Positive	Positive	ND	YFV-17DD
47	31	M	ND	1/6/2018	4	ND	Positive	Positive	ND	WT
48	41	M	ND	1/10/2018	7	ND	Positive	Positive	ND	WT
49	65	M	ND	1/13/2018	4	ND	Positive	Positive	ND	WT
50	62	M	ND	1/15/2018	3	ND	Positive	Positive	ND	WT

Legenda: M: masculino. F: feminino. YFV: vírus da febre amarela. WT: wild-type. ND: não disponível. ¹ Domingo et al (2012). ² Patel et al (2013). * a infecção pelo YFV foi posteriormente confirmada pela técnica de MAC-ELISA em amostra coletada na data de 28/01/2017. ** a infecção pelo YFV foi posteriormente confirmada pela técnica de RT-qPCR em amostra coletada na data de 27/01/2017 pelo Laboratório de Referência da SES-MG. Casos de suspeita de reação adversa após vacinação com YFV-17DD investigados nesse trabalho (pacientes 1 a 21) estão em destaque cinza. Pacientes saudáveis após primo-vacinação com YFV-17DD estão numerados de 22 a 46 estão em destaque lilás e pacientes naturalmente infectados com YFV selvagem estão numerados de 47 a 50, em destaque verde.

Análises filogenéticas foram inferidas utilizando sequências geradas a partir das 46 amostras positivas nesse trabalho (número de acesso GenBank: MN613537–MN613582) e 111 sequências obtidas do GenBank. Análises filogenéticas inferidas pelo método da Máxima Verossimilhança demonstraram o agrupamento esperado dos genótipos do YFV: genótipos South American I, South American II, West-African I, West-African II, e East/Central African em clados com bom suporte estatístico (Figura 7). Além disso, as sequências geradas a partir das 17 amostras de pacientes com suspeita de reação adversa vacinal e dos 4 pacientes sabidamente infectados com o YFV selvagem, agruparam com demais amostras do genótipo South-American I (Figura 7). As sequências obtidas a partir dos 25 pacientes saudáveis e assintomáticos com viremia do YFV-17DD agruparam com sequências no clado contendo amostras de casos de reação adversa vacinal, no genótipo West-African II (Figura 7)

Todas as 17 sequências de amostras com suspeita de reação adversa vacinal analisadas nesse estudo agruparam-se no clado contendo sequências de YFV silvestre, não sendo detectado nenhum caso de reação adversa vacinal nas amostras aqui analisadas (Figura 7).

Das 21 amostras com suspeita de reação adversa vacinal testadas nesse trabalho, quatro foram negativas em pelo menos uma das PCRs usadas nessa metodologia, sendo seu resultado considerado inconclusivo com a metodologia empregada nesse estudo.

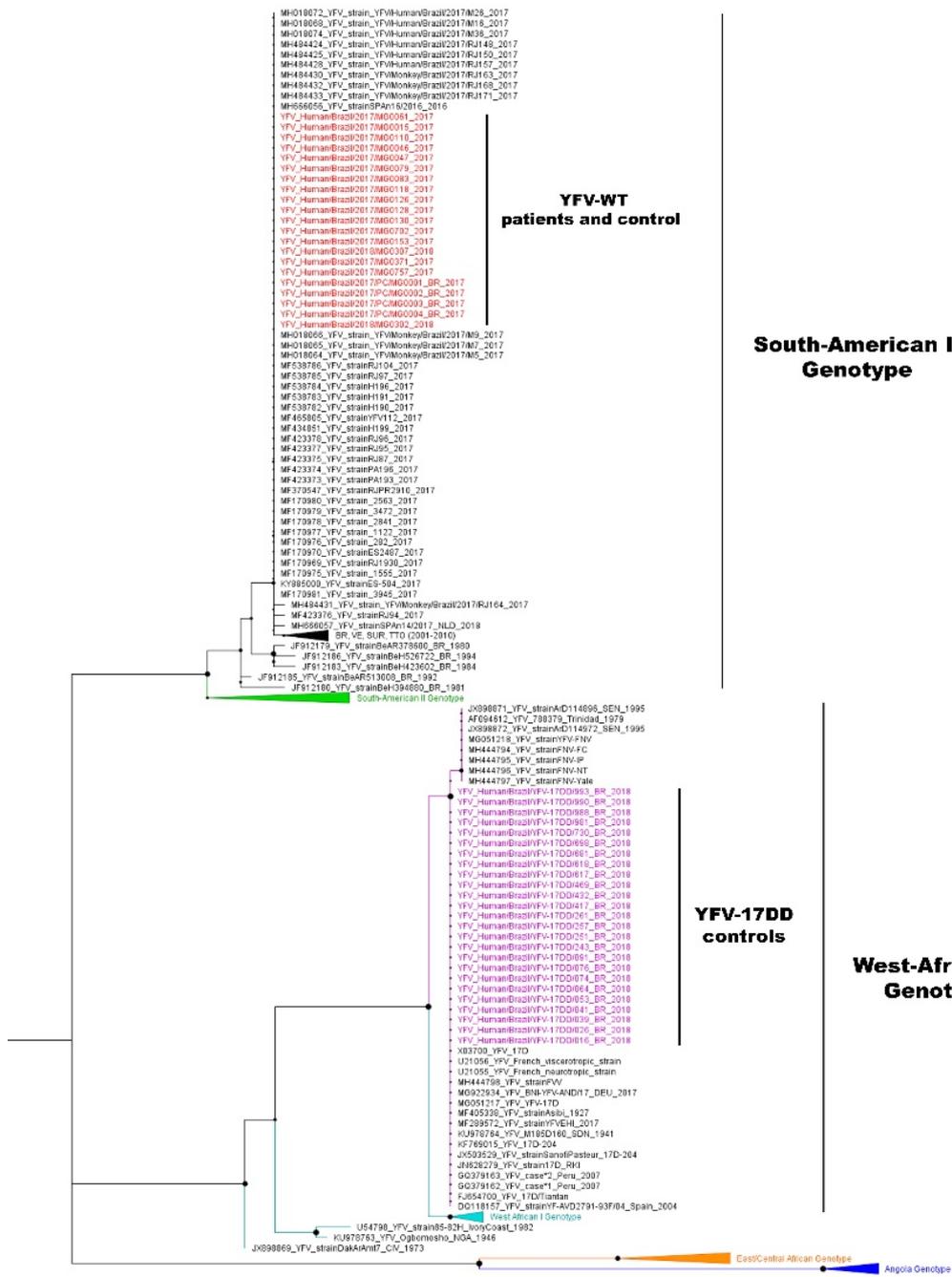


Figura 7: Árvore de Máxima Verossimilhança do vírus da febre amarela. As inferências filogenéticas inferidas usando 157 sequências do vírus da febre amarela (YFV) (213 nt) é mostrada (correspondendo à posição 9020 a 9232 em comparação com a sequência de nucleotídeos do YFV-17D, número de acesso do GenBank: X03700). Os valores de bootstrap estão representados por círculos, em escala nos nós. Amostras do YFV selvagem e as sequências de YFV-17DD geradas neste estudo são mostradas em vermelho e rosa, respectivamente. O clado contendo amostras do genótipo South-American I está representado em preto (algumas amostras do Brasil, Venezuela, Suriname e Trinidad e Tobago de 2011 a 2010 estão foram colapsadas). Alguns ramos representando diferentes genótipos foram colapsados e coloridos da seguinte forma:

South-American II (verde), West-African I (azul claro), East/West-African (laranja) e Angola (azul escuro), respectivamente. A árvore foi reconstruída usando o modelo de substituição de nucleotídeos Kimura 2 parâmetros com distribuição gama de 4 categorias. A análise foi realizada usando MEGA7 e a árvore visualizada e editada no FigTree v1.4.3.

De maneira geral, os casos de reação adversa vacinal mais leves ocorrem de 5-7 dias após a vacinação. Casos graves, como os casos de viscerotropismo grave e neurotropismo, podem ocorrer em uma média de 11 dias após a vacinação (intervalo de 2-23 dias) (MONATH, 2005). Porém, pelo protocolo da OMS e do Ministério da Saúde do Brasil, são testadas todos os casos em que o paciente tomou a vacina e apresentou qualquer sintoma relacionado a infecção pelo YFV no prazo de até 30 dias após a vacinação (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Apesar dos possíveis casos de reação adversa vacinal, a vacina YFV-17DD possui alta taxa de segurança e efetividade e é a melhor forma de prevenção contra a febre amarela (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). Segundo a OMS, a proporção de casos de reação adversa vacinal é de 1:250.000 doses de vacina aplicadas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). Em MG, desde 2007, já foram aplicadas aproximadamente 18 milhões de doses da vacina YFV-17DD e essa proporção de casos de reação adversa vacinal não foi observada nos casos analisados (SES-MG, 2018a). No período de 2016 a 2018, a incidência de casos suspeitos de reação adversa após vacinação foi de 3,67 casos para cada 100.000 doses aplicadas.

Cabe ressaltar que em nenhum outro período da história de MG foram aplicadas tantas doses da vacina contra febre amarela YFV-17DD em um período tão curto de tempo (SES-MG, 2018c). Apenas o aumento de doses aplicadas já seria suficiente para observar um aumento no número de casos de reação adversa vacinal. Apesar disso, nesse estudo não foram detectados nenhum caso de reação adversa após vacinação com YFV-17DD e segundo a SES-MG apenas um caso de reação adversa após vacinação foi confirmado em um homem de 30 anos de idade, natural de Caxias de Sul/RS e que estava de passagem pela cidade de Barbacena/MG. O home foi vacinado com a vacina

YFV-17DD e três dias após apresentou febre, mialgia, cefaleia, vômitos e dor abdominal. O paciente evoluiu para cura (SES-MG, 2018c).

No início de 2017, o Ministério da Saúde passou a seguir a recomendação da OMS (WHO, 2005), do uso de apenas uma dose da vacina YFV-17DD, para
5 conferir proteção por toda a vida em 99% dos vacinados (SES-MG, 2017b).

Esses resultados foram publicados pelo periódico científico *Vaccines*, no artigo “*Yellow Fever Virus Genotyping Tool and Investigation of Suspected Adverse Events Following Yellow Fever Vaccination*”, em dezembro/2019 (Anexo
10 II).

5.4. Conclusões

- ∴ Foi padronizada uma nova ferramenta para genotipagem do YFV baseado em RT-qPCR e sequenciamento dideoxi.
- 15 ∴ Análises *in silico* demonstraram que essa ferramenta de genotipagem pode ser aplicada para diferenciar os sete genótipos do YFV;
- ∴ Dos 21 casos suspeitos de febre amarela devido a possível reação adversa vacinal, foi possível genotipar o vírus em 17 casos, sendo encontrado o YFV selvagem.

20

6. CAPÍTULO 3: Análise de aspectos clínico-epidemiológicos e virológicos de pacientes com febre amarela, durante a fase aguda da doença, atendidos no HEM, em 2017-2018

Com o início do surto de febre amarela em MG no ano de 2017, foi
25 estabelecida uma parceria entre o HEM, Laboratório de Vírus, Instituto René Rachou (Fiocruz Minas), Secretaria de Estado de Saúde e Fundação Ezequiel Dias com o objetivo de entender melhor o surto que estava acontecendo no estado. Quando os casos de febre amarela em humanos retornaram em 2018, essa parceria deu continuidade ao trabalho que já estava sendo desenvolvido
30 desde 2017 e posteriormente deu origem ao Grupo de Estudos da Febre Amarela. Esse grupo de estudos da febre amarela se encarregou de analisar diversos parâmetros, no contexto do surto de febre amarela que aconteceu em

MG, nos anos de 2017 e 2018, na tentativa de preencher lacunas sobre a doença e o YFV. Algumas dessas análises serão apresentadas em subtópicos a seguir:

- 5 ▪ Análise de aspectos clínico-epidemiológicos de pacientes atendidos no HEM, em 2017-2018;
- Análise de casos de pacientes que foram vacinados e tiveram falha na proteção contra YFV, atendidos no HEM, em 2017-2018;
- Análise da presença de RNA do YFV em amostras de LCR e urina;
- 10 ▪ Análise de marcadores de diagnóstico de pacientes com febre amarela atendidos no HEM, em 2017 e 2018;
- Análise se valores de carga genômica viral podem ser utilizados como prognóstico da febre amarela;
- Análise da carga genômica viral durante a fase aguda da febre amarela, em pacientes do HEM tratados com o antiviral Sofosbuvir.

15

20

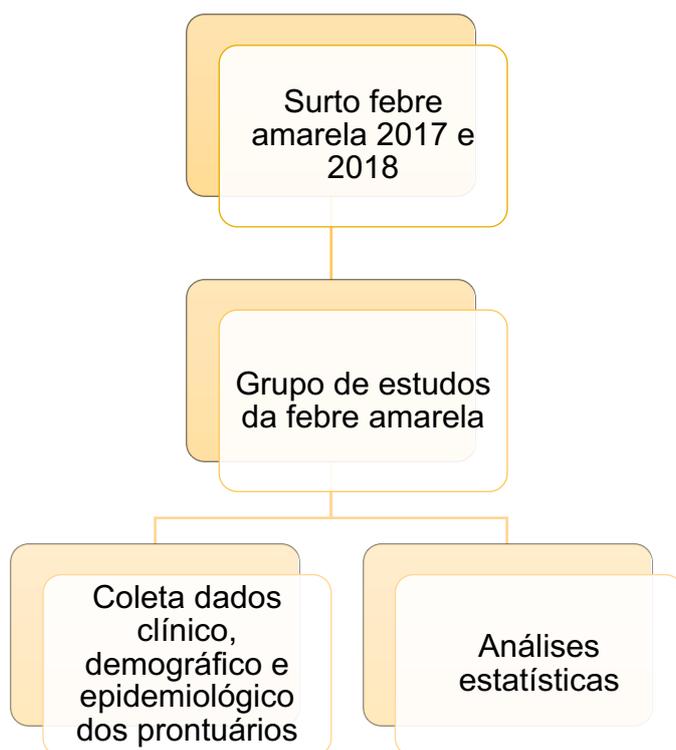
25

30

6.1. Fluxogramas

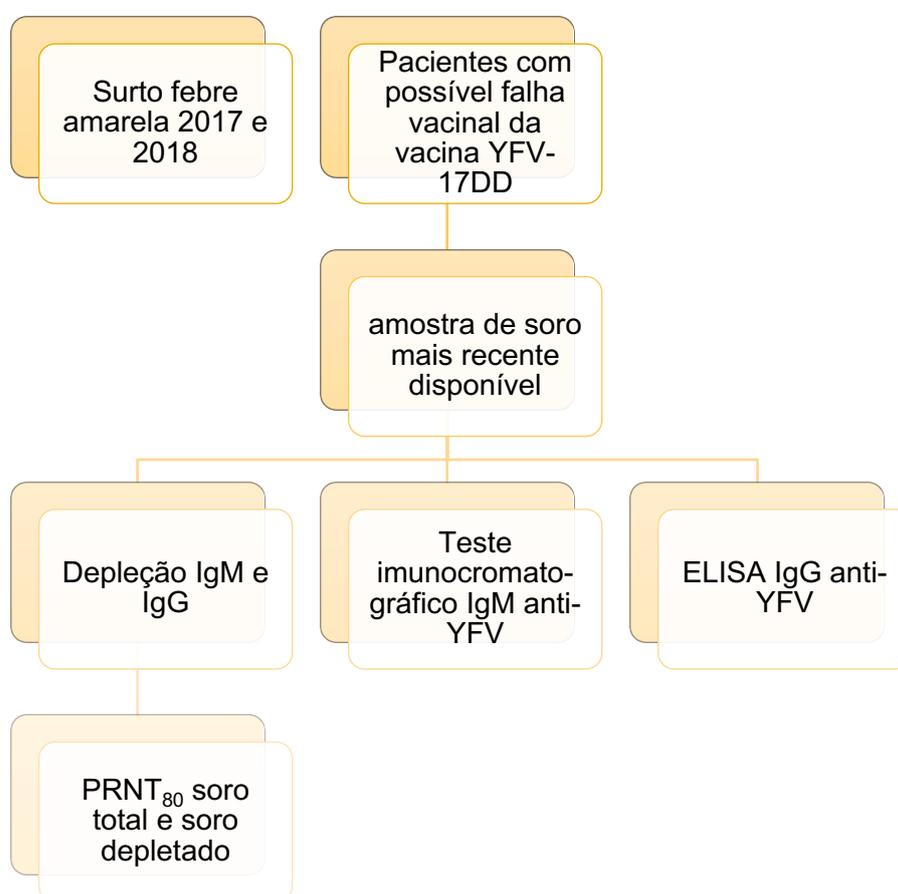
a. Análise de aspectos clínico-epidemiológicos de pacientes atendidos no HEM, em 2017-2018

5 De acordo com o fluxograma abaixo, dados de prontuários dos pacientes atendidos no HEM e com confirmação de febre amarela foram coletados para análise estatística de algumas dessas variáveis.



b. Análise de casos de pacientes que foram vacinados e tiveram falha na proteção contra YFV, atendidos no HEM, em 2017-2018

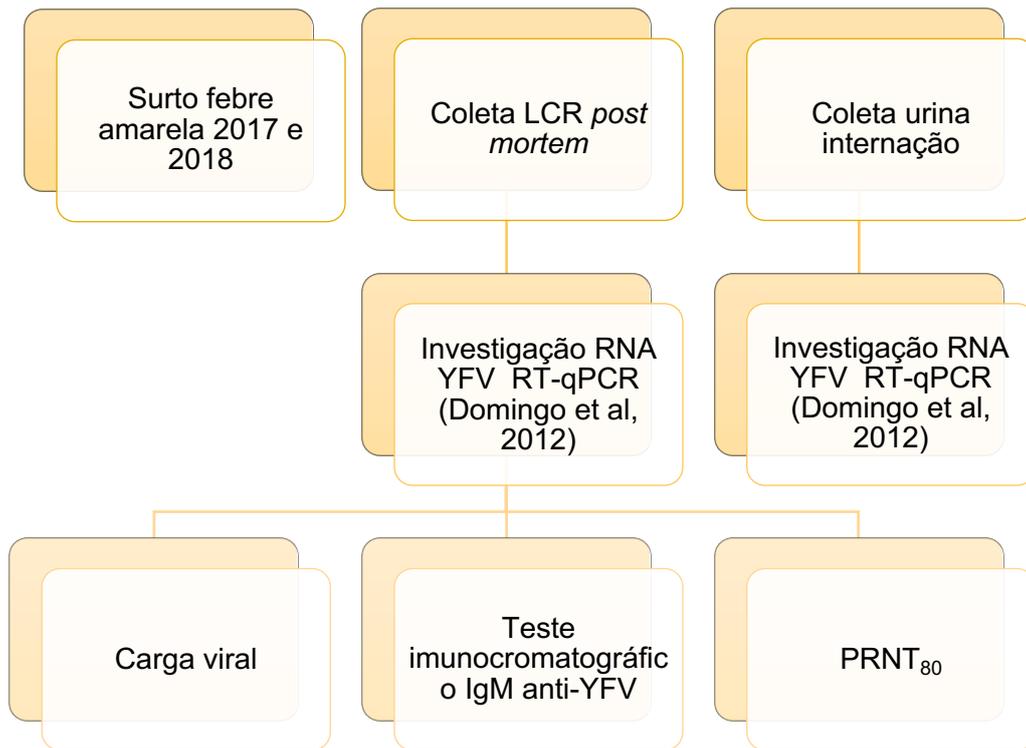
De acordo com o fluxograma abaixo, amostras de pacientes com possível falha de imunização após vacinação com YFV-17DD há pelo menos um ano, foram investigadas quanto a presença de RNA do YFV e IgM anti-YFV na amostra mais recente disponível. Em seguida essas amostras tiveram IgM e IgG depletados. Os títulos de anticorpos neutralizantes do soro total e no soro depletado será calculado pela técnica de PRNT. O título de IgG anti-YFV será mensurado por ELISA.



c. Análise da presença de RNA do YFV em amostras de LCR e urina

De acordo com o fluxograma abaixo, as amostras de LCR e urina foram utilizadas para investigação da carga genômica do YFV.

5



d. Análise de marcadores de diagnóstico de pacientes com febre amarela atendidos no HEM, em 2017 e 2018

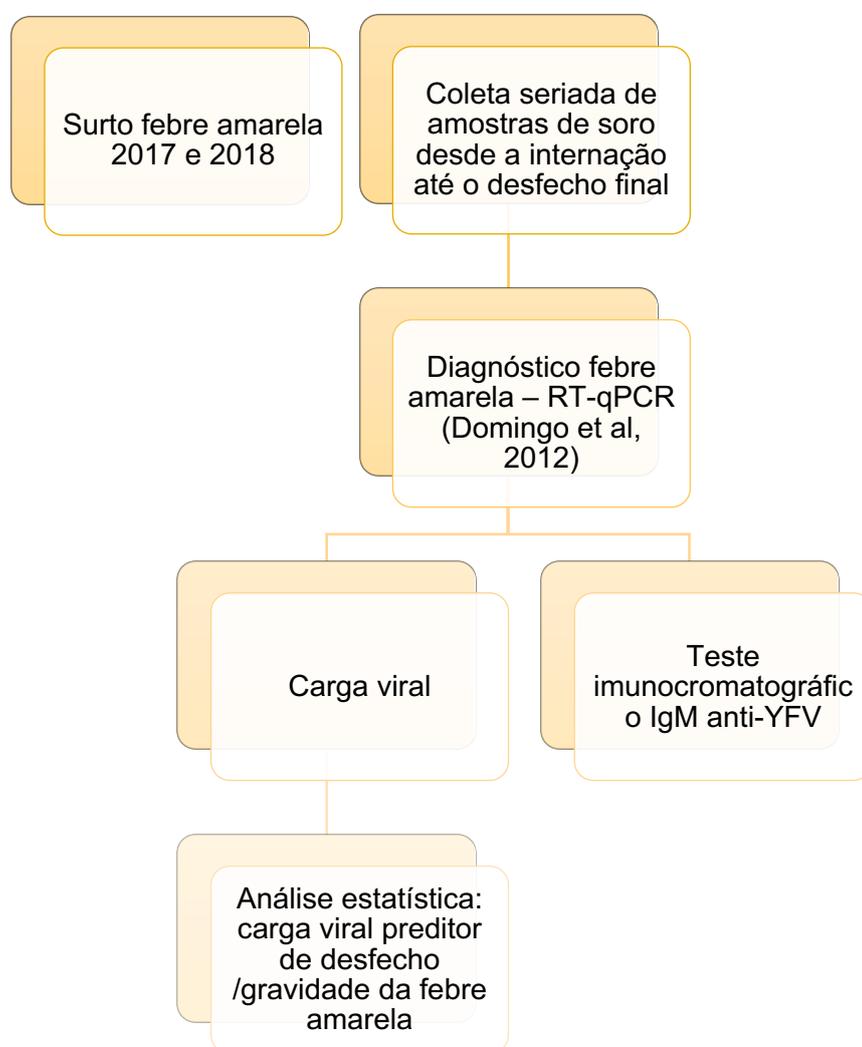
&

e. Análise se valores de carga genômica viral pode ser utilizado como prognóstico da febre amarela

5

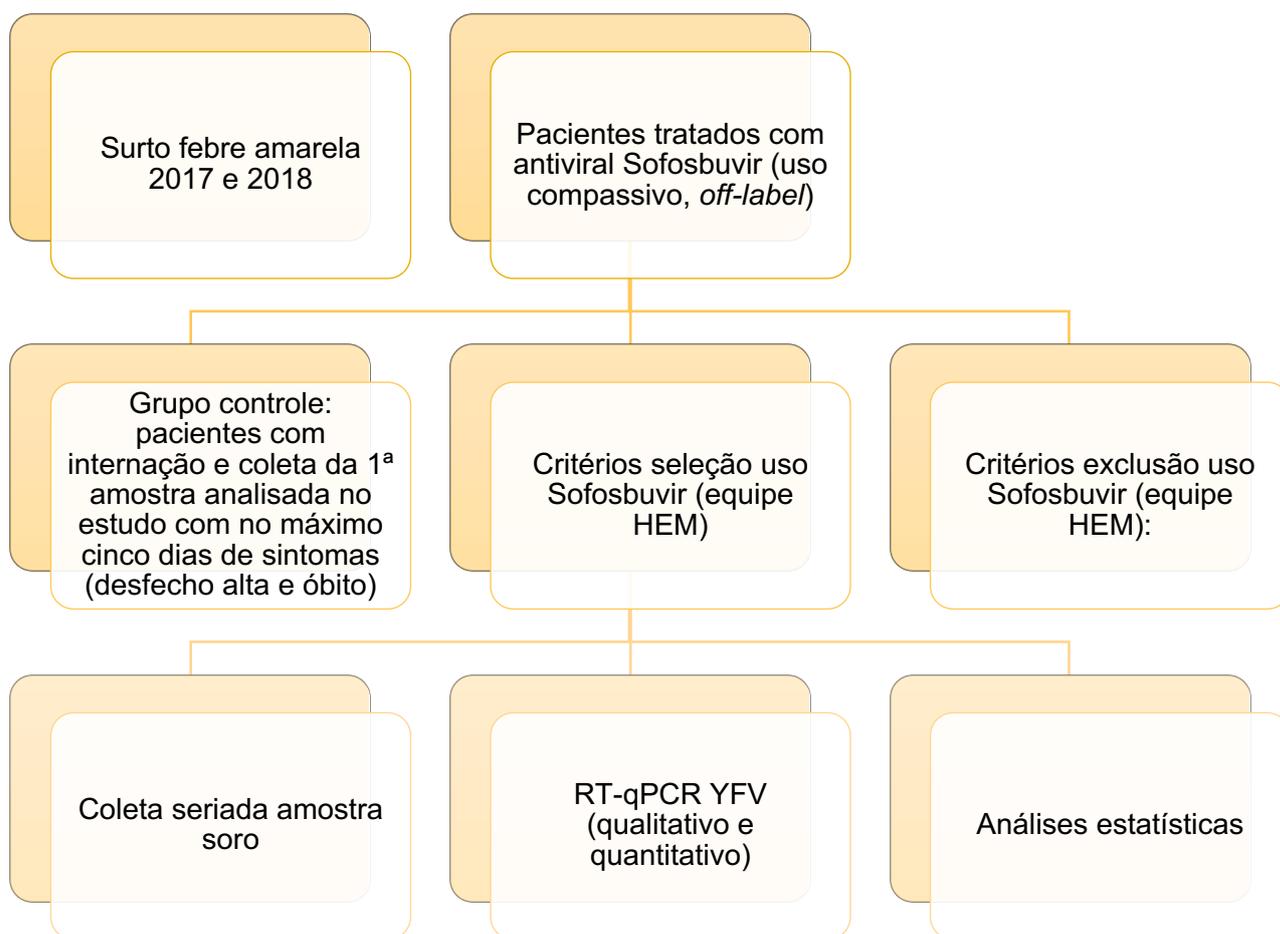
De acordo com o fluxograma abaixo, as amostras de soro foram utilizadas para diagnóstico da febre amarela e estimativa de carga genômica viral. Esses valores de carga genômica viral foram usados em análises estatísticas na procura por preditores de gravidade da febre amarela.

10



- f. Análise da carga genômica viral durante a fase aguda da febre amarela, em pacientes do HEM tratados com o antiviral Sofosbuvir

5 De acordo com o fluxograma abaixo, optamos por mensurar a eficácia do uso do antiviral Sofosbuvir através da carga genômica do YFV. Os critérios de inclusão e exclusão no tratamento foi definido pela equipe médica do HEM.



6.2. Metodologia

6.2.1 Amostras biológicas:

As amostras de soro, saliva, urina, LCR, coágulo e RNA já extraído de pacientes com suspeita de febre amarela são provenientes de pacientes atendidos no HEM. As amostras foram coletadas nos anos de 2017 e 2018, em Minas Gerais. Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto René Rachou (CAAE 72569317.2.0000.5091, CAAE: 65910317.0000.5071). Todas as amostras e os dados referentes aos pacientes atendidos no HEM foram coletados em colaboração com a equipe do HEM, principalmente a técnica de laboratório Tayrine Araújo dos Santos e os médicos Leonardo Soares Pereira, Maria Rita Teixeira Dutra e Dario Brock Ramalho.

As amostras coletadas foram aliquotadas em microtubos e armazenadas em botijão de nitrogênio líquido no HEM, com a colaboração da técnica de laboratório Tayrine Araújo dos Santos, até o transporte para o Laboratório de Vírus da UFMG. No Laboratório de Vírus, essas amostras foram armazenadas em freezer -70°C até o momento da utilização.

6.2.2 Análise de dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes

Os dados utilizados para essas análises foram coletados dos prontuários dos pacientes atendidos no HEM por bolsistas colaboradores desse projeto. Os dados contemplam informações como sexo, idade, local de procedência, profissão, histórico de vacinação contra febre amarela, comorbidades, data de início dos sintomas, desfecho, dados de reinternação e dados de exames bioquímicos e laboratoriais durante a internação, reinternação e o seguimento ambulatorial dos pacientes.

Esses dados poderão auxiliar na busca por relações epidemiológicas da doença com o paciente, melhor entendimento do grupo acometido pela febre amarela e entendimento da circulação viral em 2017-2018. No presente trabalho, foi realizada uma descrição quantitativa dos dados sócio-demográficos dos pacientes.

6.2.3 Titulação viral

Em placas de 6 poços foram implantadas $4,0 \times 10^5$ células VERO/poço. As células VERO foram cultivadas por 24 horas, em meio MEM, suplementado com 5% de SFB. Diluições seriadas do vírus na base 10 (10^{-1} a 10^{-7}) foram feitas e
5 300 µl das diluições de 10^{-3} a 10^{-7} foram inoculadas nas monocamadas com aproximadamente 90% de confluência. As duplicatas foram feitas em placas “espelho”. Um dos poços foi utilizado como controle celular. Após uma hora de adsorção, com homogeneização a cada 10 minutos, foi adicionado meio semissólido 199 1x (GIBCO, EUA) contendo 1% de carboximetilcelulose (CMC)
10 (SIGMA, EUA). As placas foram incubadas a 37 °C, em estufa com 5% de CO₂, por 5 dias, para titulação do YFV. Após o período de incubação, as células foram fixadas em solução 10% de formaldeído por no mínimo 90 minutos. Em seguida, as monocamadas foram lavadas e coradas com solução a 1% (p/v) de cristal violeta por 30 minutos. O título foi expresso pelo número de unidades formadoras
15 de placas (PFU), obtidas nas câmaras cujas diluições apresentaram entre 30 e 300 placas de lise, multiplicado pelo inverso da diluição, e convertido para PFU/ml (FIGUEIREDO, 2009).

6.2.4 Isolamento viral

20 Para o isolamento do YFV de amostras de pacientes, foram utilizadas garrafas de 25 cm² semeadas com C6/36 e mantidas em meio L-15, suplementado com 10% de SFB por 24 horas em estufa com demanda biológica de oxigênio (B.O.D.). No dia seguinte, com a monocamada apresentando 80% de confluência, foram inoculados 500 µl da amostra, na diluição de 1:10 em meio
25 L-15 (50 µl da amostra em 450 µl de meio L-15 sem SFB). As células foram mantidas por 1 hora em agitador do tipo orbital (4 a 6 rpm), em temperatura ambiente, para adsorção do vírus. Após esse período, foi adicionado 5 ml de meio L-15 suplementado com 2% de SFB. As células foram observadas diariamente. Após sete dias, caso o efeito citopático não tenha sido observado,
30 o meio foi coletado e uma nova passagem cega foi realizada. Quando a monocamada apresentou efeito citopático, o sobrenadante foi coletado e utilizado para extração de RNA total e reação de PCR para detecção do YFV (FIGUEIREDO, 2009).

6.2.5 Detecção molecular de YFV

A extração de RNA total a partir de soro, urina ou LCR foi realizada a partir de 140 µl de amostra, utilizando o kit Qlamp Viral RNA Minikit (QIAGEN, USA),
5 seguindo as instruções do fabricante. A extração de RNA a partir de coágulo foi realizada utilizando TRIzol (Invitrogen, USA), seguindo as informações do fabricante. O RNA total extraído foi armazenado até o momento do uso em ultra freezer a -70 °C.

Para prospecção do YFV foi empregada a metodologia de RT-qPCR descrita
10 por DOMINGO et al (2012) nas amostras de soro, urina, LCR e coágulo. A reação de RT-qPCR foi realizada nas seguintes condições: a 10 µl de tampão 2x (GoTaq 1step, Promega, USA) foram adicionados 0,5 µl de cada iniciador (10µM) 0,4 µl YFV-probe-HEX (10µM), 0,5 µl da Transcriptase Reversa, 5,0 µl de RNA e água ultrapura q.s.p. 20 µl. A reação ocorreu em termociclador StepOne (Applied
15 Biosystems), nas seguintes condições: 42°C – 15 minutos, 95°C – 10 minutos e 40 ciclos: 95°C – 10 segundos / 60°C – 60 segundos. Amostras com *quantification cycle* (Cq) abaixo de 38 foram consideradas positivas.

Para investigação do antígenoma do YFV, foi realizada a metodologia descrita a seguir: 1×10^5 células Vero foram implantadas em placas de 24 poços,
20 24 horas antes da infecção. As células foram infectadas no dia seguinte, com o YFV-17DD (Bio-Manguinhos, Brasil), MOI 0,01. Foram coletados o sobrenadante e o raspado celular nos tempos de 12h, 16h, 24h, 36h, 48h e 72h. O RNA total extraído a partir do sobrenadante e do raspado celular foi utilizado para síntese de cDNA, utilizando o primer senso específico, descrito por Patel et al (2013), e
25 a enzima transcriptase reversa GoScript (Promega), seguindo as instruções do fabricante. Posteriormente o cDNA foi utilizado em qPCR, utilizando os iniciadores descritos por Patel et al (2013). Amostras positivas foram purificadas e enviadas para sequenciamento. Indiretamente, a detecção do antígenoma indica a multiplicação viral na amostra testada. A reação de RT-PCR foi realizada
30 nas seguintes condições: a 10 µl de tampão 2x (GoTaq 1step, Promega, USA) foram adicionados 0,5 µl de cada iniciador (10 µM), 3,0 µl de cDNA e água ultrapura q.s.p. 20 µl. A reação ocorreu em termociclador StepOne (Applied Biosystems), nas seguintes condições: 95°C – 10 minutos e 40 ciclos 95°C – 10

segundos / 60°C – 60 segundos, seguido de curva de dissociação (*Melt curve*). Amostras com Cq abaixo de 38 e temperatura de *melt* (T_m) correspondente ao do controle positivo, foram consideradas positivas.

5 6.2.6 Inferências filogenéticas

Os amplicons de interesse para sequenciamento foram purificados, como descrito no item 4.2.1 e enviados para sequenciamento pelo método de Sanger (SANGER & NICKLEN, 1977).

10 Após a purificação (tópico 4.2.1), 5 ng de DNA (aproximadamente 7,5 µl), juntamente com 0,5 µM do iniciador específico senso ou antissenso, foram utilizados para sequenciamento pelo método dideoxi, descrito por SANGER e NICKLEN (1977). O sequenciamento foi realizado em sequenciador automático ABI 3700 (Applied Biosystems). Cada amplicon foi enviado para sequenciamento pelo menos duas vezes com cada iniciador específico. Os demais passos para
15 o sequenciamento foram realizados no laboratório da Plataforma de Sequenciamento de DNA Sanger/Fiocruz. O sequenciamento foi realizado em parceria com os pesquisadores Jaqueline Germano de Oliveira e Pedro Augusto Alves, do Instituto René Rachou – Fiocruz Minas.

Os dados brutos do sequenciador foram analisados e as sequências finais
20 montadas e visualizadas utilizando os programas SeqTrace (STUCKY, 2012), Phred (EWING *et al.*, 1998; EWING e GREEN, 1998) e Phrap (GORDON *et al.*, 1998), implementados na plataforma CENARGEN, da EMBRAPA (www.cenargen.embrapa.br), ou com o programa Geneious v9 (www.geneious.com). Para o estabelecimento das sequências finais, foram
25 consideradas as bases que apresentaram valor de Phred, ou valor correspondente, de qualidade igual ou superior a 30.

Para início das análises, todas as sequências finais geradas foram comparadas com sequências depositadas no GenBank, utilizando os programas BLASTN (ALTSCHUL *et al.*, 1990; www.ncbi.nlm.nih.gov/blast). Sequências de
30 nt relativas às regiões analisadas dos genomas dos vírus detectados nesta pesquisa foram obtidas do GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) para análises comparativas. Os alinhamentos das sequências de nt foram feitos com o auxílio

dos programas Clustal W implementado no pacote MEGA7 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016).

Os alinhamentos foram usados para construção de árvores filogenéticas. Previamente às análises filogenéticas, o programa DAMBE (XIA; XIE, 2001) foi
5 utilizado para a verificação de saturação nas sequências e para a verificação do sinal filogenético, juntamente com o programa TreePuzzle v5.3.

O melhor modelo evolutivo para cada conjunto de sequências de nt foi selecionado através do programa JModel Test (DARRIBA *et al.*, 2012). Em seguida, árvores de máxima verossimilhança (ML – *maximum likelihood*) foram
10 construídas com busca heurística, partindo de uma árvore construída pelo método de Neighbor-Joining (NJ). Perturbações foram feitas nas árvores, com o objetivo de se encontrar a melhor árvore, usando o algoritmo TBR (“tree bisection and reconnection”). Testes de bootstrap, com 1000 replicatas, foram realizados de forma a checar a confiabilidade dos ramos das árvores. A árvore final foi
15 visualizada e editada no FigTree v.1.4.3 (RAMBAUT, 2016).

6.2.7 Detecção de anticorpos contra febre amarela

Com o objetivo de se conhecer o perfil sorológico dos pacientes com suspeita de febre amarela, foi realizado um teste imunocromatográfico para uma
20 análise preliminar da presença de anticorpos IgM anti-YFV (Febre Amarela IgM ECO teste), seguindo as instruções do fabricante. Esses testes foram realizados em soro e LCR dos pacientes. Os testes foram gentilmente doados pela empresa ECO diagnóstica. Em amostras de LCR testadas pelo teste imunocromatográfico e que foram IgM reagentes, foi realizado um ensaio de soroneutralização e
25 titulação de anticorpos neutralizantes (WIETEN *et al.*, 2016). Amostras de pacientes com relato de vacinação prévia contra febre amarela (há pelo menos um ano de vacinação) e com possível falha de imunização também foram testadas pelo teste de soroneutralização para análise da presença ou ausência de anticorpos neutralizantes IgM e IgG anti-YFV. Para a soroneutralização
30 desses pacientes, previamente foi feita a depleção de IgM total ou IgG total na amostra de soro a ser testada.

A metodologia de soroneutralização e titulação de anticorpos neutralizantes foi realizada segundo descrito por WIETEN e colab. (2016), com algumas

modificações, descritas a seguir: Um total de $4,0 \times 10^5$ células Vero foram
semeadas em placas de 6 poços, 24 horas antes da realização do experimento.
Foi feita diluição seriada do soro a ser testado, na base 2, a partir da diluição
1:20 até a diluição 1:1280. Foram utilizados 150 PFUs do vírus vacinal YFV-
5 17DD por poço. Trezentos microlitros foram utilizados para adsorção, em cada
poço, amostras em duplicata, na monocamada de células Vero. No 5º dia, as
monocamadas de células foram fixadas com solução de formaldeído a 10%, por
90 minutos. O formaldeído foi descartado e as monocamada celular foi corada
com cristal violeta 1% (p/v), por 30 minutos e as placas de lise foram contadas.

10

6.2.8 Depleção de IgM total e de IgG total

Protocolo adaptado por Ana Carolina Terzian – FAMERP/SJRP.

Essa metodologia foi utilizada em amostras de soro de pacientes com
histórico vacinal contra febre amarela há pelo menos um ano, com o intuito
15 de analisar a presença de anticorpos neutralizantes IgG (resultante da
vacinação prévia contra febre amarela) ou IgM (resultante da infecção
recente pelo YFV). Para essa técnica, foram utilizadas as amostras de soro
mais recentes desses pacientes (Tabela 2).

6.2.8.1 Depleção de IgM total

20 Agarose anti-IgM humana (A9935, Sigma-Aldrich, EUA) foi usada para
depleção de IgM total da amostra de soro. Para o ensaio de depleção de
IgM, lavou-se 210 µl de solução de agarose anti-IgM humana 5 vezes com
tampão PBS frio (pH 7,4) contendo Tween-20 a 0,05%. Uma sexta lavagem
foi realizada utilizando apenas tampão PBS frio (pH 7,4). Em cada lavagem,
25 centrifugou-se a agarose 10.000 x g, 5 min a 4°C e o sobrenadante foi
descartado. Após a centrifugação final, o sobrenadante foi removido e 200
µl de amostra de soro (diluído a 1:10 em tampão PBS) foram misturados
com a agarose. A mistura foi incubada a 4°C, durante a noite com rotação
orbital suave. No dia seguinte, a mistura agarose/amostra foi centrifugada
30 a 10.000 x g, 5 min, 4°C, e o sobrenadante (*200 µl, amostra IgM -) foi
coletado para titulação de anticorpos pela técnica de soroneutralização
(PRNT₈₀).

6.2.8.2 Depleção de IgG total

Para o ensaio de depleção de IgG total da amostra de soro, incubou-se 15 µl de *Dynabeads Protein G* (Life Technologies, EUA) com 200 µl de amostra de soro (diluída a 1:10 em tampão PBS) por 10 min à temperatura ambiente, com rotação orbital suave. O sobrenadante sérico (*200 µl, amostra IgG -) foi coletado para titulação de anticorpos pela técnica de soroneutralização (PRNT₈₀).

Para a técnica de soroneutralização (PRNT₈₀) (WIETEN *et al.*, 2016), todas as amostras que tiveram anticorpos depletados (IgM - e IgG -) e o soro total foram utilizados a partir da diluição 1:20 até a diluição de 1:640, como descrito no item 6.2.7

6.2.9 Determinação de carga genômica viral do YFV

Testes para quantificação genômica do RNA do YFV em amostras de pacientes com febre amarela foram realizados com o kit Bio Gene Research Yellow Fever PCR kit (Bioclin), seguindo as instruções do fabricante.

A carga genômica viral (cg) foi calculada multiplicando-se o valor de quantificação informado pelo equipamento pelo volume de eluição do RNA, após a extração (em µl) e dividindo-se esse valor pelo volume (ou peso) total de amostra utilizado para extração (em ml ou g), como descrito abaixo:

$$\frac{\text{quantificação (equipamento)} \times \text{eluição } (\mu\text{l})}{\text{volume total amostra utilizado na extração (ml)}} = \text{cg/ml}$$

25 6.2.10 Parâmetros bioquímicos analisados

Diferentes marcadores bioquímicos podem ser utilizados para avaliar o dano da infecção pelo YFV e o dano hepático da febre amarela. A ALT é uma enzima presente nos hepatócitos, principalmente no citoplasma e seus níveis sanguíneos aumentam quando há dano hepático (GOWDA *et al.*, 2009; LIMDI, 2003). Os valores normais de ALT variam de 10-40 U/L (ABIM, 2020). A AST também está presente nos hepatócitos, majoritariamente nas mitocôndrias, mas

também é encontrada em outros órgãos (GOWDA *et al.*, 2009; LIMDI, 2003). Os valores normais de AST variam de 10-40 U/L (ABIM, 2020).

5 Outro marcador de dano hepático é a bilirrubina, que é um produto produzido da quebra da porção heme da hemoglobina. A bilirrubina é absorvida pelos hepatócitos, conjugada com albumina (bilirrubina indireta) e excretada pela bile. Em caso de dano hepático, essa função fica comprometida, ocasionando em acúmulo de bilirrubina no sangue, que pode gerar icterícia (GOWDA *et al.*, 2009; LIMDI, 2003). Os valores normais de BT variam de 0,3 a 1,0 mg/dl e os valores de bilirrubina direta BD variam de 0,1 a 0,3 mg/dl (ABIM, 2020). Os valores de
10 BT são calculados pela soma dos valores da bilirrubina indireta, que é a bilirrubina insolúvel que chega até o fígado, e os valores da BD, que é sua forma solúvel, liberada na corrente sanguínea para eliminação pelo corpo (GOWDA *et al.*, 2009; LIMDI, 2003).

15 A fosfatase alcalina (ALP) é uma enzima com função de remover grupos fosfatos de diversas moléculas. É produzida no fígado e está presente nas células ao redor dos ductos biliares do fígado. Em casos de obstrução desses ductos, por colestase ou infiltrados, por exemplo, a concentração dessa enzima no sangue irá aumentar (GOWDA *et al.*, 2009; LIMDI, 2003). Os níveis normais de ALP podem variar de 30-120 U/L (ABIM, 2020).

20 A Gama glutamil-transferase (GGT) é uma enzima envolvida na transferência de aminoácidos através da membrana celular, presente nos hepatócitos e vias biliares. É um marcador razoavelmente específico para medir danos hepáticos (GOWDA *et al.*, 2009; LIMDI, 2003).. Os valores normais de GGT variam de 9-50 U/L (ABIM, 2020).

25 O teste de coagulação (avaliado pelo RNI – razão normalizada internacional) é uma medida para avaliação da via extrínseca de coagulação e também pode ser indicador de lesão hepática, já que o fígado é responsável pela produção de fatores de coagulação (GOWDA *et al.*, 2009; LIMDI, 2003). O RNI mensura a velocidade de coagulação que se deseja avaliar, com o tempo de uma
30 coagulação normal. Valores maiores do que 1 indicam que a velocidade de coagulação está mais lenta do que o esperado.

A ureia é formada no fígado como um dos principais produtos finais do metabolismo de substâncias contendo nitrogênio e é excretada pelos rins

(BAUM; DICHOSO; CARLTON, 1975). Os valores normais da ureia variam de 8 a 20 mg/dl (ABIM, 2020).

5 A Cr é um produto do metabolismo muscular, e como a ureia, é excretada pelos rins. É um fator relativamente estável e mais sensível para medir dano renal do que os níveis de ureia (BAUM; DICHOSO; CARLTON, 1975). Os valores normais de creatinina variam de 0,7 a 1,3 mg/dl (ABIM, 2020).

Com o intuito de se procura por marcadores de prognóstico/gravidade da febre amarela, foram analisados marcadores bioquímicos durante a fase aguda da infecção.

10 Para avaliação de dano hepático, foram analisados os marcadores ALT, AST, BT, BD, ALP, GGT, RNI e também os marcadores de dano renal ureia e Cr. Além dos exames bioquímicos, em alguns casos também foram avaliados valores obtidos a partir de hemograma dos pacientes, como hemoglobina, hematócrito, contagem de plaquetas, leucócitos, neutrófilos, eosinófilos e
15 linfócitos.

6.2.11 Análise estatística

Todas as análises estatísticas deste trabalho foram realizadas utilizando os programas SPSS v25 (ARMONK, 2017), GraphPad Prisma v7 e o software R,
20 considerando 95% de nível de significância.

Para análises entre grupos, foram realizados teste t (teste de Student). Essas análises foram realizadas para determinação de prognóstico da febre amarela baseado na carga genômica viral, eficácia do antiviral Sofosbuvir, também mensurada pela carga genômica viral e na análise exploratório de fatores de
25 risco da hepatite tardia após febre amarela. Essa última análise foi realizada em colaboração com o Dr. Marcelo Pascoal Xavier, do Instituto René Rachou – Fiocruz/MG.

O teste de qui-quadrado foi utilizado para investigação da relação de presença prévia de comorbidades e o desfecho na febre amarela.

30 Para análises de variáveis que não cumpriam a premissa de possuírem distribuição normal, ou quaisquer outras premissas que impedissem a realização de testes paramétricos, foram realizados testes não-paramétricos para

comparação dos valores estabelecidos. Os testes não paramétricos utilizados serão detalhados na seção de resultados e discussão.

6.3. Resultados e Discussão

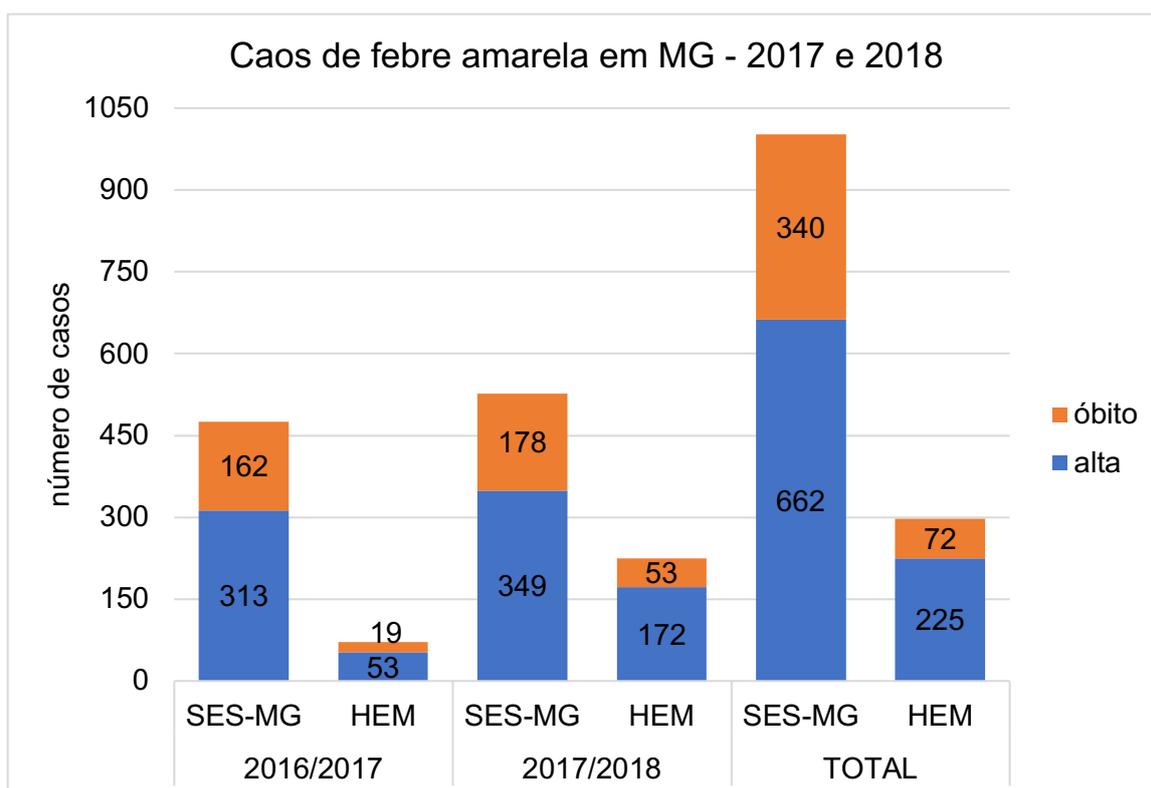
5 **a. Análise de aspectos clínico-epidemiológicos de pacientes atendidos no HEM, em 2017-2018**

Com o início do surto de febre amarela em MG no ano de 2017, foi estabelecida uma parceria entre o HEM e Laboratório de Vírus com o objetivo de entender melhor o surto que estava acontecendo no estado. Quando os casos
10 de febre amarela em humanos retornaram em 2018, essa parceria deu continuidade ao trabalho que já estava sendo desenvolvido desde 2017. Essa parceria também envolveu o Instituto René Rachou e a Universidade de Stanford e posteriormente deu origem ao Grupo de Estudos da Febre Amarela. Esse grupo de estudos da febre amarela se encarregou de analisar diversos
15 parâmetros, no contexto do surto de febre amarela que aconteceu em MG, nos anos de 2017 e 2018, na tentativa de preencher lacunas sobre a doença e o YFV.

No anos de 2017-2018, Minas Gerais foi cenário do maior surto de febre amarela desde o final do ciclo urbano do YFV no Brasil, com o relato do último
20 caso reportado em 1942 (SES-MG, 2018a; SOPER, 1942). Durante os meses de janeiro a abril de 2017, foram atendidos 94 pacientes com suspeita de febre amarela no HEM. Do total de pacientes atendidos, a infecção pelo YFV foi confirmada em 72 pacientes, através de exames realizados no Laboratório de Vírus da UFMG e pelo LACEN/FUNED. O diagnóstico laboratorial foi feito por
25 RT-qPCR, ELISA e/ou isolamento viral. Dos pacientes negativos para febre amarela, dois foram confirmados com infecção pelo DENV e dois com CHIKV. Os demais (18 pacientes) apresentaram outras etiologias não causadas por arbovírus. Com relação ao surto de 2018, durante os meses de janeiro a junho, 380 pacientes foram internados no HEM com suspeita de febre amarela. Do total
30 de pacientes internados, a infecção pelo YFV foi confirmada em 230 pacientes, através de exames realizados pelo Laboratório de Vírus e pelo LACEN-MG (FUNED). O diagnóstico laboratorial foi feito por RT-qPCR e/ou ELISA.

Em 2017 e 2018, do total de 302 pacientes atendidos no HEM com infecção confirmada pelo YFV, 21 pacientes foram transferidos para outros hospitais ou evadiram do HEM e por isso não serão considerados em algumas das análises realizadas neste estudo.

5 No período epidemiológico de 2016/2017 (julho/2016 a junho/2017), foram registrados 475 casos de febre amarela em MG, com 162 óbitos. Já para o período epidemiológico de 2017/2018 (julho/2017 a outubro/2018), o número de casos confirmados foi de 527, com 178 óbitos. Considerando o total de casos confirmados em MG de 2016-2018 (1002 casos e 340 óbitos), o grupo amostral
 10 deste estudo corresponde a 30% do total de casos confirmados de febre amarela no estado de MG, durante os últimos surtos, sendo uma parcela significativa do total de casos no estado (Figura 8).



15 Figura 8: Número total de casos de febre amarela em Minas Gerais. Comparação entre o número total de casos de febre amarela confirmados em MG, pela SES-MG e o número total de casos de febre amarela atendidos no HEM, durante o surto de febre amarela entre os anos de 2017/2018, classificados por ano e desfecho.

20 Os pacientes com febre amarela em 2017 eram provenientes de 36 cidades de MG, localizadas nas mesorregiões do Vale do Rio Doce, Vale do

Mucuri, Zona da Mata, Sul/Sudoeste e Metropolitana de BH (Figura 9). Em 2018, os 230 pacientes eram provenientes de 41 cidades de MG, localizadas nas mesorregiões Campo das Vertentes, Zona da Mata, Sul/Sudoeste, Oeste de Minas e Metropolitana de BH (Figura 9).

5 De fato, durante o surto de 2017, o YFV estava circulando principalmente nas mesorregiões do Vale do Rio Doce e Mucuri e em parte da Zona da Mata e Vale do Jequitinhonha (SES-MG, 2018b). Já em 2018, a circulação do YFV se manteve mais concentrada nas mesorregiões Metropolitana de BH, Zona da Mata, Campo das Vertentes, Oeste e Sul (SES-MG, 2018b), corroborando o
10 elevado número de pacientes provenientes dessas mesorregiões nos respectivos anos.

No início 2017, a cobertura vacinal nas cidades de origem dos pacientes de febre amarela variou de 19,73% a 67,61%. Após o início do surto, a SES-MG, juntamente com o Ministério da Saúde, intensificaram a vacinação em todo o
15 estado de MG. Ao final de 2017, a cobertura vacinal nessas cidades aumentou e variou de 46,91% a 86,74%.

Em 2018 a cobertura vacinal nas cidades de origem dos pacientes desse ano variou de 35,45% a 86,74%. Mesmo com a intensa campanha de vacinação durante o surto de febre amarela, as cidades de MG ainda possuíam taxas de
20 cobertura vacinal abaixo dos 95% (ao fim de 2017 e início de 2018) recomendados pela OMS, fato que pode ter favorecido a ocorrência do surto em 2018. Além disso, durante o período não epidêmico de 2017-2018, ocorreu a detecção ininterrupta de PNHs infectados pelo YFV em MG, incluindo o período não-epidêmico (SES-MG, 2018a; Livia Sacchetto - dados não publicados). A
25 confirmação dessas epizootias aponta para a manutenção da circulação do YFV em período não epidêmico, em populações de PNHs de MG.

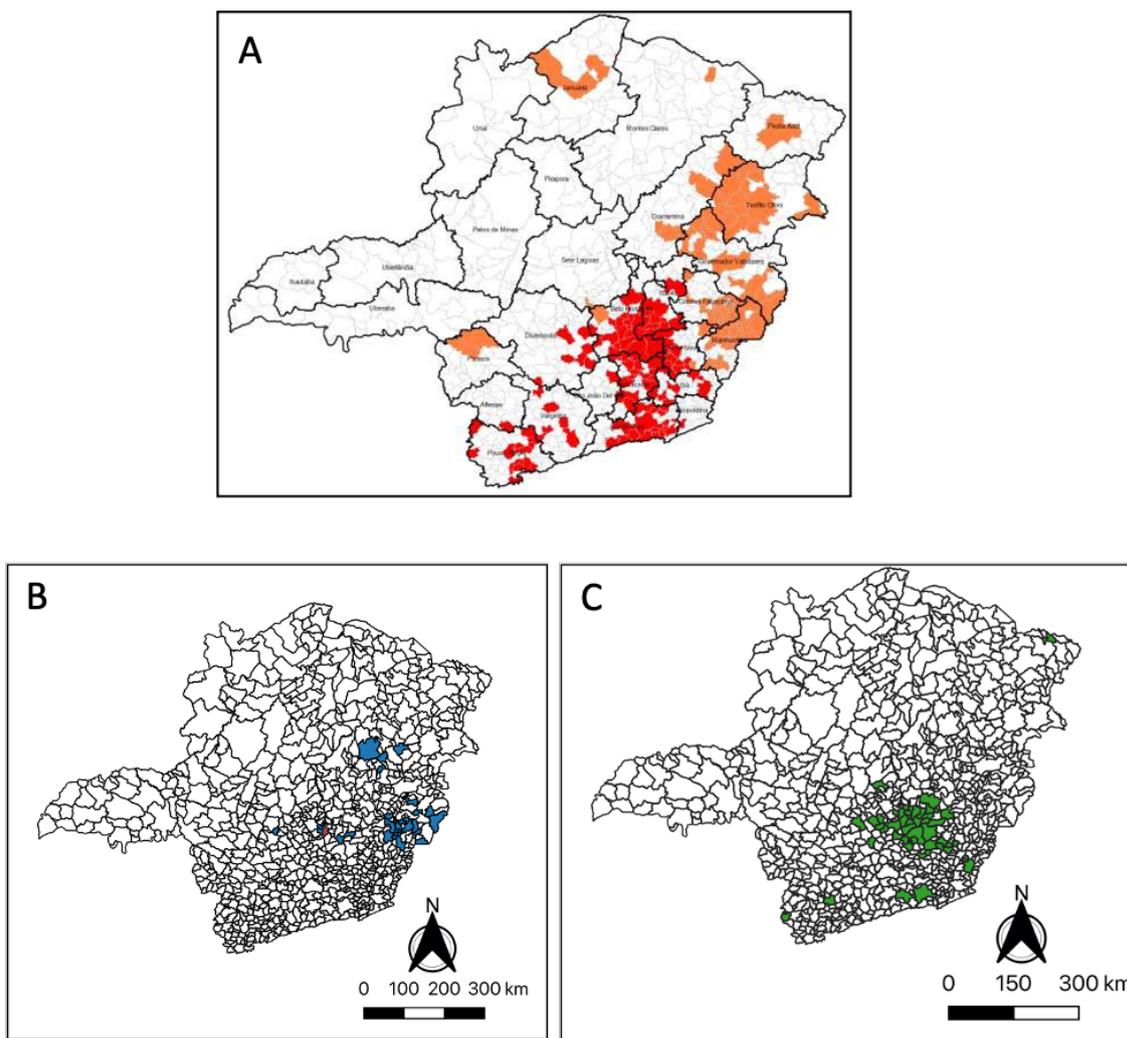


Figura 9: Municípios com casos confirmados de febre amarela em Minas Gerais. **A:** Municípios confirmados pela Secretaria de Estado de Saúde em 2016-2018. Laranja: municípios com casos de febre amarela confirmados no período epidemiológico de 2016-2017. Vermelho: municípios com casos de febre amarela confirmados no período epidêmico 2017-2018. Fonte: SES-MG, 2018b. **B:** Municípios com casos de febre amarela deste estudo, em 2017. **C:** Municípios com casos de febre amarela deste estudo, em 2018.

10 Ainda com relação ao perfil sócio-demográfico dos pacientes, aqui serão apresentados conjuntamente os dados de 2017 e 2018 referentes a sexo, idade e procedência dos pacientes atendidos no HEM. Dos 302 pacientes, 262 (86,75%) eram do sexo masculino e 40 (13,25%) do sexo feminino. O intervalo de idades variou de 15 a 86 anos, com média e mediana de 46 anos. Cento e

15 trinta e um pacientes (43,47%) afirmaram trabalhar ou morar na zona rural, 92 (30,46%) na zona urbana e 3 pacientes (1%) afirmaram ter contato com zona rural e zona urbana no seu dia-a-dia. Esses dados estão de acordo com o

esperado para a circulação de febre amarela silvestre no Brasil, com a maioria dos casos ocorrendo em homens, com idade entre 40 a 49 anos e que mantém contato com a zona rural de alguma forma (por viver ou trabalhar nesta área) (MONATH; VASCONCELOS, 2015). Perfil semelhante a esse foi descrito por

5 Ribeiro et al (2019), a partir de dados coletados de pacientes com febre amarela internados no Instituto de Infectologia Emílio Ribas (SP) durante os meses de janeiro a março de 2018. Nesse estudo a maioria dos pacientes era do sexo masculino (80,6%), apresentavam idade entre 30-59 anos (56,9%) e todos eles viviam ou trabalhavam em área rural (RIBEIRO *et al.*, 2019).

10 Corroborando esses achados sobre a possível circulação silvestre do YFV nos últimos surtos de febre amarela no Brasil, segundo Faria et al (2018), o perfil de circulação do YFV durante a epidemia de 2017 em MG, foi predominantemente silvestre. Segundo os autores, o perfil de pessoas infectadas com o YFV em 2017 foi distinto de dois modelos de circulação de

15 arbovírus testados. O primeiro modelo (M1), propunha uma distribuição de casos (idade entre 20-25 anos e acometimento dos sexos igualmente distribuídos) segundo a transmissão hipotética de arbovírus com circulação urbana. Já o segundo modelo (M2) analisado foi baseado na distribuição de casos de CHIKV, quanto a idade e sexo, em áreas onde o YFV também estava circulando. Como

20 houve uma discrepância entre os modelos analisados e a distribuição observada do YFV, esses dados indicam que a circulação do YFV em 2017 foi predominantemente silvestre. Além da análise desses modelos, as análises filogenéticas não demonstraram um ramo da árvore formado somente por sequências provenientes de humanos e outro apenas com sequências

25 provenientes de PNHs, evidenciando a circulação silvestre do YFV em 2017 (FARIA *et al.*, 2018).

Quanto à sintomatologia, os pacientes reportaram principalmente febre (88,25%), mialgia (71,88%), cefaleia (67,25%), icterícia (física ou bioquímica) (48,39%), vômitos (40,56%) e fraqueza (40,21%) (Figura 10). Esses dados estão

30 em acordo com o descrito na literatura, em que os principais sintomas para febre amarela são febre, calafrios, dores de cabeça, mialgia, prostração, náusea e tontura (MONATH, 2001b). Estudos realizados com pacientes com febre amarela do surto de 2018 demonstraram que os principais sintomas relatados pelos pacientes internados foram febre, mialgia, dores de cabeça, vômito,

icterícia, dor abdominal, sangramento, calafrios, diarreia e artralgia (KALLAS et al., 2019; RIBEIRO et al., 2019; revisado por SILVA et al., 2020), como visto neste trabalho. Embora neste trabalho não tenha sido analisada a relação de sintomatologia com o desfecho do paciente, alguns estudos demonstraram não
5 haver diferenças na sintomatologia de pacientes com desfecho de cura ou óbito (KALLAS *et al.*, 2019; RIBEIRO *et al.*, 2019).

Em relação às doenças de base apresentadas pelos pacientes, 114 (40,81%) dos pacientes apresentaram ao menos uma doença de base no momento da internação. Desse total, 89 pacientes (78%) evoluíram para cura e
10 25 (22%) para óbito. As doenças de base mais comumente relatadas foram tabagismo, hipertensão arterial sistêmica, etilismo e diabetes (Figura 11). É importante ressaltar que um mesmo paciente pode ter apresentado mais de uma doença de base e no momento da admissão no HEM. Dentre os pacientes internados no HEM com mais de 60 anos (55 pacientes, 19,57%), 29
15 apresentaram algum tipo de doença de base e nove desses evoluíram para óbito.

Análises estatísticas (teste qui-quadrado) não mostraram evidências de relação entre o desfecho alta ou óbito e a presença de doenças de base ($p = 0,9$). Essa falta de associação ocorreu em pacientes acima ou abaixo de 60 anos ($p = 0,9$). Em um estudo realizado no Instituto de Infectologia Emílio Ribas (SP),
20 31,4% dos pacientes internados com febre amarela apresentaram algum tipo de doença de base no momento da admissão no hospital. Essa prevalência aumentou para 66,7% considerando apenas pacientes acima de 60 anos de idade. Dentro de cada grupo, a prevalência do desfecho cura ou óbito foi de aproximadamente 50% (RIBEIRO *et al.*, 2019). Apesar disso, em outro estudo
25 realizado com esse mesmo grupo de pacientes, foi demonstrado que não houve diferença significativa entre a existência prévia de alguma doença de base e o desfecho da febre amarela (KALLAS *et al.*, 2019), assim como foi demonstrado neste trabalho.

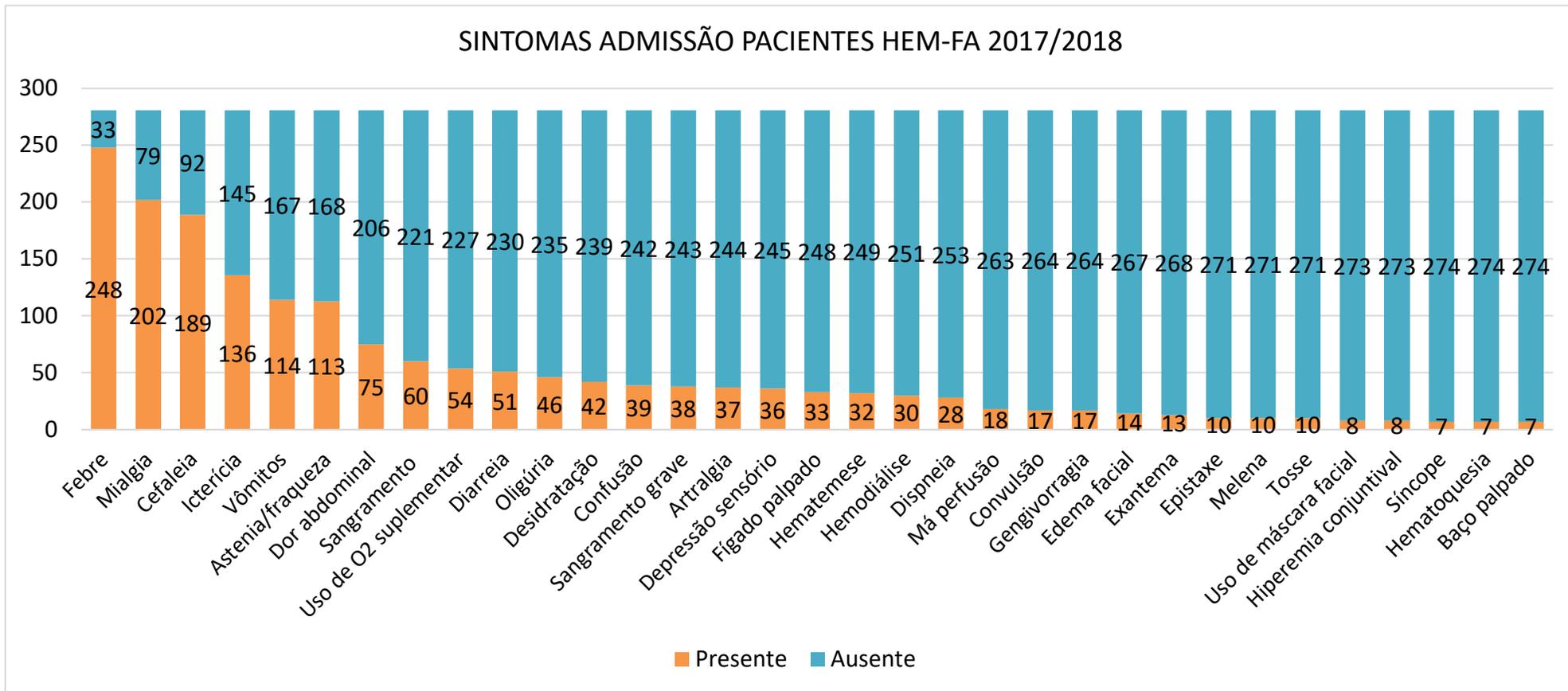


Figura 10: Sinais e sintomas apresentados pelos pacientes com febre amarela atendidos no HEM no período de 2017-2018.

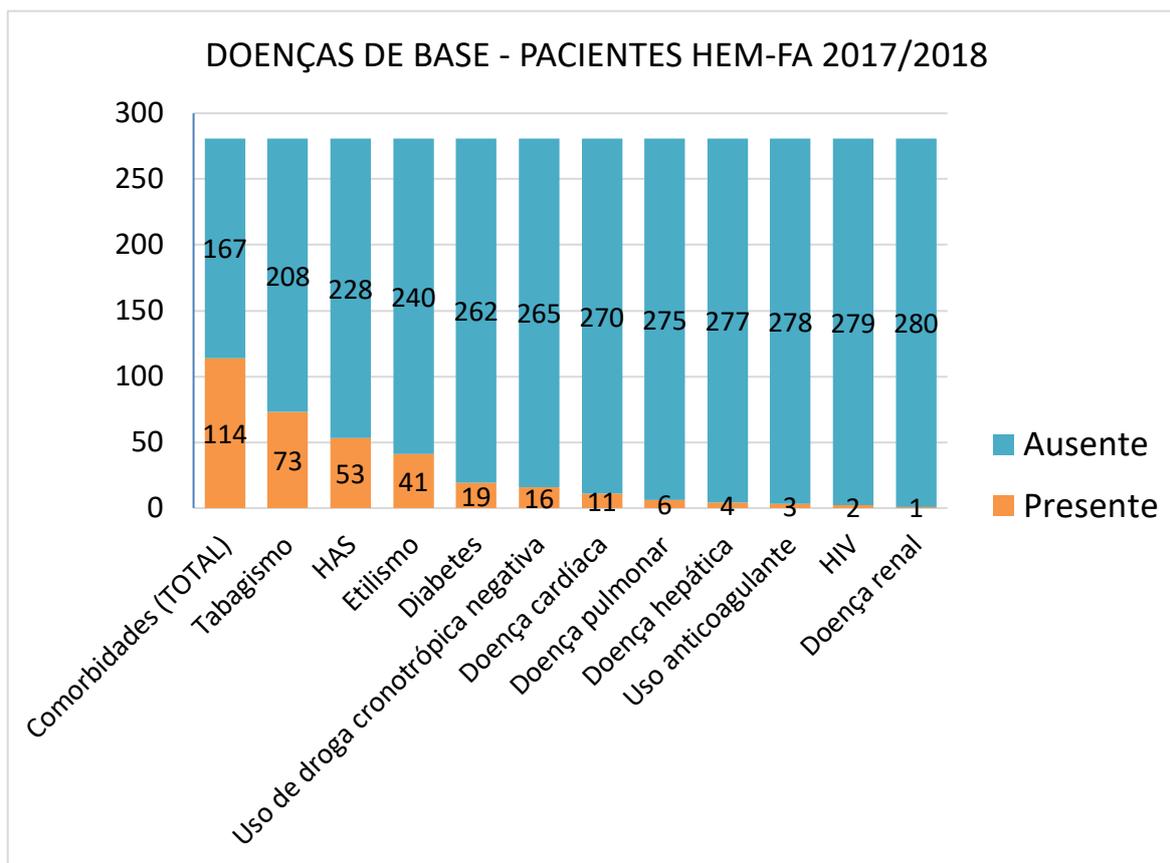


Figura 11: Tipos de comorbidades apresentadas pelos pacientes com febre amarela atendidos no HEM no período de 2017-2018. HAS: hipertensão arterial sistêmica.

5 Os pacientes atendidos no HEM eram provenientes de diferentes regiões de MG, distantes de Belo Horizonte, onde fica o HEM (Figura 9). Assim, muitos pacientes tiveram um atendimento inicial em suas cidades e alguns casos foram tardiamente transferidos para o HEM. O período entre o início dos sintomas e atendimento no HEM em 2017 variou de 2 a 21 dias, com média e mediana de

10 cinco dias (Figura 12). Nesse mesmo ano, os pacientes ficaram internados de 1 a 56 dias, com mediana de internação de cinco dias para os pacientes que receberam alta ou evoluíram a óbito.

15 Durante o surto de 2018, o período entre o início dos sintomas e atendimento no HEM variou de 0 a 15 dias, com mediana de quatro dias. O tempo de internação dos pacientes variou de 1 a 67 dias, com mediana de seis dias para os pacientes que receberam alta e sete dias de internação para os pacientes que evoluíram a óbito (Figura 12). Isso pode ter ocorrido, principalmente pelo fato do surto de 2018 ter acontecido mais próximo da região

metropolitana de Belo Horizonte (Figura 9), facilitando o primeiro atendimento do paciente no HEM.

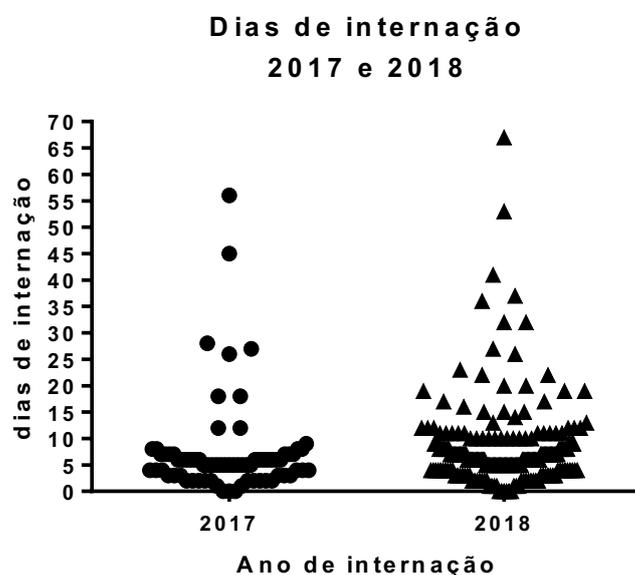


Figura 12: Distribuição do número de dias de internação dos pacientes com febre amarela internados no HEM, em 2017 e 2018.

Quando foi realizada a comparação entre o dia do início dos sintomas e a procura pelo atendimento médico, houve uma diminuição de 21 para 15 dias entre a data de início de sintomas e a procura pelo atendimento no HEM quando se compara o surto em 2017 com o surto em 2018. Além disso, em 2018 a mediana de dias de internação até a data de alta ou óbito aumentou em um e dois dias, respectivamente. A diferença entre o total de dias de internação de 2017 e 2018 foi maior em 2018 (teste não-paramétrico de Mann-Whitney, $p=0,008$).

Com relação ao desfecho, dos 72 pacientes com febre amarela em 2017, 53 recuperaram-se e 19 evoluíram para óbito. A taxa de mortalidade foi de 26,38%. Dos 230 pacientes positivos para YFV em 2018, 53 evoluíram para óbito, 172 receberam alta e cinco foram transferidos para outros hospitais. A taxa de mortalidade dos pacientes internados no HEM, em 2018, foi de 23,04%, semelhante à taxa observada no mesmo hospital em 2017.

Além da chegada mais precoce dos pacientes ao HEM no ano de 2018 devido a proximidade do surto da região metropolitana de BH, a epidemia de 2017 serviu como experiência para toda a equipe da SES-MG e do HEM.

Quando a febre amarela retornou em 2018, a logística de diagnóstico, deslocamento, manejo e capacidade de atendimento dos pacientes no HEM eram maiores e mais eficazes. Apesar dessa experiência e preparo durante a epidemia de 2018, a taxa de letalidade em 2018 se manteve muito próxima à de 2017. Em um estudo realizado na cidade de SP, a média de dias de sintomas dos pacientes atendidos no hospital estudado foi de oito dias, com média de sete dias de período de internação. Esses valores se aplicam a pacientes com desfecho de cura ou óbito e não foi observada diferença estatística entre esses dados (dias de sintomas e período de internação) e o desfecho da febre amarela (KALLAS *et al.*, 2019), o que poderia explicar a taxa de letalidade semelhante entre os anos de 2017 e 2018 no estudo aqui apresentado.

No total acumulado de 2017-2018, a taxa de letalidade de febre amarela no HEM foi de 23,84%. Os casos de óbito ocorreram predominantemente em homens (n=63; 87,5%), com média e mediana de idade de 48 anos (variando de 22 a 86 anos). Apenas 13 pacientes possuíam idade inferior a 40 anos, demonstrando uma taxa de letalidade maior no grupo acima de 40 anos. Segundo a SES-MG, em MG durante os anos de 2016-2018, a taxa de letalidade da febre amarela chegou a 33,93%, sendo maior em homens acima de 40 anos (SES-MG, 2018b). Neste mesmo surto, em SP foi descrita uma taxa de letalidade de 29,2% em um hospital dessa cidade (RIBEIRO *et al.*, 2019). A taxa de letalidade descrita para os casos de YFV varia de 20% a 60%, dependendo da região onde ocorrem os surtos (MONATH; VASCONCELOS, 2015). No último surto de YFV que ocorreu na África, em 2016, a taxa de mortalidade foi de 13,7% em Angola e de 21% na República Democrática do Congo (WHO, 2016). A taxa de mortalidade na África tende a ser menor (20%) quando comparada com a taxa de mortalidade na América do Sul (40%-60%). Algumas hipóteses foram levantadas para explicar estes fatos, como a falta de diagnóstico rápido e eficaz, principalmente em áreas remotas de ocorrência da febre amarela, a predisposição genética do indivíduo e diferenças nas linhagens do YFV, que circulam em cada região, que podem estar relacionadas com maiores taxas de letalidade (DOUAM; PLOSS, 2018; MONATH; VASCONCELOS, 2015).

Segundo a SES-MG, 1002 casos foram confirmados em todo o estado de MG, em 2017-2018. Esse total corresponde à ponta do iceberg das infecções de febre amarela, que são as infecções sintomáticas e representa de 45% a 60%

do total de casos (MONATH; VASCONCELOS, 2015; PIERSON; DIAMOND, 2013; QUARESMA *et al.*, 2013). Com esses valores, pode-se inferir que o total de pessoas infectadas pelo YFV, nesses anos, no estado de MG, variou de 1670 a 2260 casos.

5

b. Análise de casos de pacientes que foram vacinados e tiveram falha na proteção contra o YFV, atendidos no HEM em 2017 e 2018

A vacina YFV-17DD é produzida com o YFV atenuado (YFV vacinal) e é considerada uma das vacinas mais eficazes já produzidas até a presente data (PAHO, 2005; WHO, 2005). Desde a mudança no protocolo de doses de vacina contra febre amarela, quando Brasil passou a adotar a política de dose única recomendada pela OMS (WHO, 2005), muito foi discutido sobre a real eficácia de uma única dose da vacina YFV-17DD em regiões endêmicas para a febre amarela. Isso porque alguns estudos já demonstraram que há uma queda no título de anticorpos neutralizantes após uma única dose da vacina YFV-17DD (BASTOS CAMACHO *et al.*, 2014; COSTA-PEREIRA *et al.*, 2018).

Por isso, nos anos de 2017 e 2018, durante o surto de febre amarela, decidiu-se investigar os casos de pacientes que haviam sido vacinados com a vacina YFV-17DD, com cartão de vacinação checado pela equipe médica do HEM (e com registro fotográfico do cartão de vacinação) há pelo menos um ano e que possivelmente tiveram falha na imunização.

Quando analisados os cartões de vacinação disponíveis de alguns pacientes com febre amarela nos anos de 2017-2018, nove pacientes apresentaram vacinação prévia contra febre amarela, há pelo menos um ano antes do início dos sintomas (Tabela 2). Esses nove pacientes tinham idade entre 14 e 42 anos quando ficaram doentes. Do total, seis pacientes eram do sexo masculino e três do sexo feminino, oito receberam alta e um evoluiu para óbito (paciente com detecção de RNA do YFV em LCR, descrito no item 6.3 c). Cinco pacientes tomaram a vacina YFV-17DD antes de um ano de vida. Um dentre esses nove pacientes tomou uma 2ª dose da vacina aos 9 anos de idade (Tabela 2). Desses nove pacientes, um paciente não possuía amostra de soro para análises posteriores e por isso será desconsiderado a partir deste momento.

Dos oito pacientes restantes, foi realizado o teste de RT-qPCR, na amostra mais precoce disponível, para confirmação da infecção pelo YFV. Todos os pacientes foram positivos para febre amarela. Para esses oito pacientes, foi realizado também um teste preliminar, para verificar presença de anticorpos IgM anti-YFV, usando teste imunocromatográfico (Febre Amarela IgM ECO Teste) na amostra mais recente disponível de cada paciente (1-10 dias após o início dos sintomas). Das amostras testadas, seis foram IgM reagentes e duas foram IgM não-reagentes. As amostras IgM reagentes eram do 2º ao 10º dia após o início dos sintomas, enquanto as amostras IgM não-reagentes eram do 1º e do 2º dia após o início dos sintomas (Tabela 2). Foi realizado um ensaio de soroneutralização (PRNT) com as amostras dos pacientes com falha vacinal. Foi observado neutralização do vírus vacinal YFV-17DD, utilizado para a PRNT, em seis pacientes testados (Tabela 2). Não foi observada neutralização viral a partir das amostras de soro (0% de soroneutralização) de pacientes IgM não reagentes, indicando a real ausência de anticorpos neutralizantes contra o YFV nessas amostras (Tabela 2 e Figura 13).

Tabela 2: Relação dos pacientes provenientes do HEM, durante o surto de febre amarela, em 2017-2018, com vacinação prévia contra febre amarela há pelo menos um ano antes do início dos sintomas.

ID	Início sintomas	Data vacina YFV-17DD	Idade na vacinação	Tempo entre vacina e doença (anos)	Amostra testada - DPS	PCR Febre Amarela (Domingo et al, 2012)	IgM anti-YFV	Resultado (<i>in house</i> MAC-ELISA)	PRNT ₈₀	Desfecho
011/2017	08/01/2017	1 dose - 2003	1 ano	15	2	pos	neg	IgM reagente	Não detectado	ALTA
20/2017	08/01/2017	2 doses - 2001 e 2010	<1 A e 9 A	8	5	pos	pos	IgM reagente	1:320	ALTA
010/2017	09/01/2017	1 dose - 2011	17 A	7	1	pos	neg	IgM reagente	Não detectado	ALTA
251/2018	22/01/2018	1 dose - 2017	38 A	1	6	pos	pos	ND	1:20	ALTA
55/2018	10/02/2018	1 dose - 2001	< 1 A	17	10	pos	pos	IgM reagente	>1:640	ALTA
192/2018	16/02/2018	1 dose - 1999	< 1 A	19	2	pos	pos	ND	1:20	ALTA
109/2018	24/02/2018	1 dose - 2001	7 anos	17	9	pos	pos	ND	>1:640	ÓBITO
256/2018	05/03/2018	1 dose - 2001	25 A	17	6	pos	pos	ND	1:20	ALTA

Legenda: DPS: dias pós sintomas. ND: não disponível. NR: Não realizado. Pos: positivo. Neg: negativo.

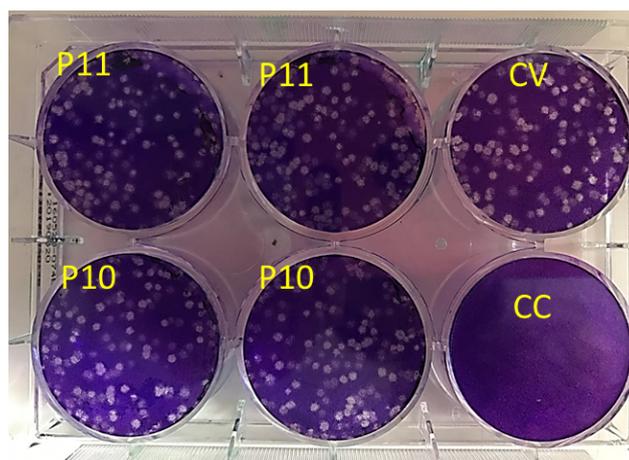


Figura 13: Placa ilustrativa de ensaio de soroneutralização das amostras IgM não reagentes (P010/2017 e P011/2017 –Tabela 2). Nos dois pacientes é possível observar que não houve neutralização do YFV-17DD. CV: Controle de vírus. CC: Controle de célula

A resposta imune humoral produzida pela vacina contra o YFV é a forma mais eficaz para neutralizar e eliminar o vírus durante uma infecção (WATSON; KLIMSTRA, 2017). Como esses pacientes já haviam sido vacinados, era esperado que eles tivessem IgG de memória logo no início da infecção pelo YFV, o que auxiliaria no controle de uma infecção natural, impedindo o desenvolvimento do quadro clínico da febre amarela.

Para analisar a ausência de IgM e/ou IgG anti-YFV no soro desses pacientes, foi feita a depleção dos anticorpos totais IgM ou IgG da amostra de soro mais precoce disponível de cada paciente, seguido de ensaio de soroneutralização contra o YFV-17DD nas amostras depletadas e também na amostra de soro total desses pacientes. A depleção iria ajudar a elucidar o perfil sorológico desses pacientes durante a infecção natural pelo YFV. Foi utilizada a mesma amostra usada no teste imunocromatográfico IgM anti-YFV e na PRNT de soro total (Tabela 2). Esse experimento foi realizado na Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), em colaboração com o Dr. Maurício Lacerda Nogueira e a Dra. Ana Carolina Terzian.

Os testes de depleção de PRNT foram realizados da FAMERP, mas os resultados da PRNT apresentaram algumas incongruências e por isso esse experimento precisa ser repetido. Por esse motivo os resultados não estão apresentados neste trabalho. A repetição estava sendo conduzida no

Laboratório de Vírus quando se iniciou a pandemia do SARS-CoV-2, o que impossibilitou sua continuação.

Além da repetição do ensaio de PRNT e titulação de anticorpos neutralizantes, testes ELISA anti-IgG serão conduzidos em parceria com o
5 Laboratório de Tecnologia Imunológica, Bio-Manguinhos -FIOCRUZ/RJ com o objetivo de quantificar os anticorpos IgG anti-YFV nas amostras desses pacientes.

Embora desde 2014 a OMS preconize que apenas uma dose de vacina
10 contra a febre amarela é capaz de conferir proteção por toda a vida (WHO, 2005), estudos já demonstraram que ocorre a queda e até mesmo a completa ausência dos títulos de anticorpos e da imunidade celular dez anos após a aplicação de uma única dose da vacina 17DD-YFV (BASTOS CAMACHO et al., 2014; COSTA-PEREIRA et al., 2018). Sendo assim, a aplicação de uma segunda dose seria necessária para manter a resposta imune protetora contra YFV,
15 principalmente de pessoas que vivem em áreas de risco (CAMPI-AZEVEDO et al., 2016).

c. Análise da presença de RNA do YFV em amostras de LCR e urina

Com o intuito de investigar a presença do RNA do YFV em amostras
20 alternativas, foram testadas amostras de LCR de pacientes que evoluíram a óbito e de urina, coletados durante a fase aguda da febre amarela.

É sabido que casos de reação adversa após vacinação contra febre
amarela podem levar a casos de doença neurotrópica (DE MENEZES MARTINS;
DA LUZ FERNANDES LEAL; HOMMA, 2015; DOKE *et al.*, 2016; FLORCZAK-
25 WYSPIAŃSKA; NAWOTCZYŃSKA; KOZUBSKI, 2017; SILVA *et al.*, 2010). Apesar disso, os casos de infecção natural pelo YFV são geralmente associados a doença viscerotrópica (DOUAM; PLOSS, 2018; MONATH, 2001b).

No contexto do surto de febre amarela em MG em 2017-2018, objetivou-se
30 analisar se o YFV do surto em questão poderia estar relacionado a infecção no SNC em pacientes naturalmente infectados. Para isso, de 53 pacientes com febre amarela que evoluíram para óbito em 2018, 14 tiveram LCR coletado *post-mortem*. As amostras de LCR foram usadas para investigação molecular qualitativa e quantitativa do YFV. Quatro dos pacientes testados foram positivos

para a presença de RNA do YFV no LCR, com Cqs variando de 30 a 33 e carga genômica viral variando de $1,7 \times 10^3$ a $5,4 \times 10^3$ cópias genômicas/ml (Tabela 3).

5 Dos quatro pacientes com detecção de RNA do YFV no LCR, um deles chegou ao HEM e morreu no mesmo dia, e por isso não foi realizada anamnese ou coleta de sangue para realização de exames bioquímicos. Os outros três pacientes apresentavam quadros graves de febre amarela, com valores alterados das principais enzimas que avaliam dano hepático e renal, e todos foram internados no centro de terapia intensiva (CTI). Os três pacientes apresentaram febre e vômitos e um paciente apresentou confusão mental e
10 convulsão (P1). Os pacientes, por apresentarem quadro grave de febre amarela, poderiam estar desenvolvendo um quadro de encefalopatia hepática, que é um importante fator de morbidade em pacientes com dano hepático (SWAMINATHAN; ELLUL; CROSS, 2018).

Um dos pacientes com LCR positivo apresentou sinais de confusão mental,
15 relatado pelos médicos, durante a internação em CTI no HEM. Demais pacientes não apresentaram alterações neurológicas aparentes. Os sinais clínicos de uma infecção no SNC por flavivírus podem se apresentar apenas como uma meningite branda até os casos mais graves, de meningoencefalomielite (MAXIMOVA; PLETNEV, 2018). Apesar disso, a confusão mental relatada pela
20 equipe médica também pode ser devido à internação em ambiente de CTI, que por si só é mais estressante.

Tabela 3: Informações dos pacientes com amostra de LCR positiva em RT-qPCR para YFV.

ID	Sexo	Idade	Histórico vacinal	Início sintomas	Óbito ¹	detecção YFV (Domingo et al, 2012)	Carga viral (cópias genômicas/mL)	IgM anti-YFV ²	PRNT ₅₀
1	M	23	Vacinado - 2001	24/02/2018	05/03/2018	Detectado	3,85E+03	reagente	1:40
2	M	61	Sem vacina	09/02/2018	13/02/2018	Detectado	1,75E+03	não reagente	ND
3	M	44	Sem vacina	30/01/2018	05/02/2018	Detectado	4,47E+03	reagente	1:640
4	M	41	Sem vacina	08/01/2018	19/01/2018	Detectado	5,42E+03	não reagente	ND

¹ dia de coleta do LCR = data do óbito. ² Teste imunocromatográfico IgM anti-YFV. Pos: positivo. Neg: negativo NR: não realizado. ND: não detectado.

5

10

Esse caso de confusão mental pode também estar relacionado ao desenvolvimento de um quadro de encefalopatia hepática causada pela febre amarela. A encefalopatia hepática pode ser definida como uma disfunção cerebral causada por insuficiência aguda ou crônica do fígado (HADJIHAMBI *et al.*, 2018). Os casos de encefalopatia hepática podem ser divididos em três grandes grupos: (A) dano hepático agudo; (B) manobras hepáticas portossistêmicas e (C) cirrose. Os pacientes deste trabalho estão enquadrados no tipo A, que geralmente é associado ao aumento da pressão intracraniana e desenvolvimento de hérnia cerebral. A principal hipótese para o desenvolvimento desse quadro clínico envolve a capacidade limitada do fígado de remover resíduos de nitrogênio da corrente sanguínea, resultando em seu acúmulo e possíveis danos graves ao cérebro (revisado por SWAMINATHAN; ELLUL; CROSS, 2018). Esse quadro pode gerar casos de distúrbios de consciência, convulsões e coma (WIJDICKS, 2016). Citocinas inflamatórias que são produzidas durante a infecção aguda da febre amarela, que geralmente provoca uma tempestade de citocinas no paciente infectado (MONATH, 2001a), podem aumentar a neurotoxicidade induzida pela amônia, através do aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica (WIJDICKS, 2016). Todos esses fatores poderiam explicar não só a confusão mental de um dos pacientes, bem como a possível presença do YFV no LCR, pelo aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica.

As 14 amostras de LCR foram utilizadas em teste imunocromatográfico para detecção de IgM anti-YFV. Dentre as 14 amostras testadas, duas amostras foram IgM anti-YFV reagentes e 12 amostras foram IgM anti-YFV não-reagentes, sendo que os dois pacientes com IgM anti-YFV reagentes tiveram detecção de RNA do YFV no LCR (Tabela 3). Três dos quatro pacientes com detecção de RNA do YFV no LCR relataram nunca ter tomado vacina contra febre amarela. Um dos pacientes apresentou cartão de vacinação, com confirmação vacinação (vacina YFV-17DD) em 2001 (Tabela 3, P1). Esse paciente (P1) será também explorado no item 6.3b, que discursa sobre casos de possível falha vacinal da vacina YFV-17DD.

Os LCRs positivos no RT-qPCR foram utilizados em ensaios de soroneutralização (PRNT₅₀). Foram detectados anticorpos neutralizando até

50% das partículas virais nas diluições 1:20 até 1:40 no P1 e da diluição 1:20 até a diluição 1:640 no P3 (Tabela 3).

A detecção de IgM anti-YFV em LCR, até o momento só foi relatada em casos de reação adversa vacinal (CHAVES *et al.*, 2009; PIRES-MARCZESKI *et al.*, 2011). Neste estudo, IgM anti-YFV foram detectadas em amostras de LCR de pacientes naturalmente infectados pelo YFV. Já é sabido que as imunoglobulinas do tipo M não ultrapassam as barreiras hematoencefálicas, indicando que essa imunoglobulina possivelmente foi produzida no local da infecção pelo YFV, provavelmente a partir de células B que migraram dos linfonodos para a zona de infecção (GRIFFIN; METCALF, 2011).

Com relação ao YFV, já se é conhecido que o YFV vacinal está relacionado a casos de doença neurotrópica, com uma grande variedade de sintomas (DE MENEZES MARTINS; DA LUZ FERNANDES LEAL; HOMMA, 2015; MARTINS *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2010). Até o momento, existe apenas um estudo que indica que o YFV silvestre pode estar relacionado a um quadro de infecções no SNC, descrito em uma criança com suspeita de meningoencefalite (MARINHO *et al.*, 2019). Estudos recentes detectaram a presença do RNA do YFV silvestre em 10 amostras de cérebro coletadas *post-mortem* de pacientes com febre amarela de um hospital da cidade de SP, porém sem estabelecer algum vínculo de doença neurotrópica associada a esse achado (KALLAS *et al.*, 2019; RIBEIRO *et al.*, 2019). Além disso, outros flavivírus já foram encontrados em LCR de pacientes com quadros de infecção no SNC (CAROD-ARTAL *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2015; MAXIMOVA; PLETNEV, 2018; MINER; DIAMOND, 2017; PUCCIONI-SOHLER; ROSADAS, 2015). Esses achados, conjuntamente com os dados deste trabalho, corroboram uma possível infecção do YFV em LCR de pacientes naturalmente infectados.

Neste trabalho foram feitas tentativas de isolamento do YFV a partir das amostras de LCR com Cq mais precoce e também tentativas de investigação do antígeno nessas amostras. Porém, em ambos os casos os resultados não foram satisfatórios. Não foi possível isolar o YFV das amostras de LCR e a padronização da PCR para investigação de antígeno ainda está sendo conduzida. Esses experimentos continuarão, para investigar a presença de partículas infecciosas no LCR e atividade de multiplicação viral nessas amostras. Além disso, experimentos para avaliar a biologia do YFV que conseguiu alcançar

o SNC podem ser conduzidos a fim de comparação com outras linhagens do YFV.

Amostras de urina coletadas durante o período de internação na fase aguda da infecção, foram testadas por RT-qPCR. Das 57 amostras testadas, 15 foram positivas para RNA do YFV. Essas amostras foram coletadas do 2º ao 38º DPS (Tabela 4).

Tabela 4: Amostras de urinas testadas por RT-qPCR e positivas, durante a internação.

ID	urina internação	data coleta	Data desfecho/ alta	Dias após sintomas
1	pos	17/01/2018	25/01/2018	2
2	pos	17/01/2018	21/01/2018	3
3	pos	26/01/2018	30/01/2018	4
4	pos	01/02/2018	05/02/2018	4
5	pos	17/02/2018	22/02/2018	5
6	pos	08/02/2018	15/02/2018	7
7	pos	20/02/2018	21/02/2018	8
8	pos	15/01/2018	16/01/2018	9
9	pos	21/02/2018	22/02/2018	12
10	pos	06/02/2018	26/02/2018	21
11	pos	11/04/2018	23/04/2018	27
12	pos	05/03/2018	12/03/2018	38
13	pos	01/02/2018	ND	ND
14	pos	19/02/2018	ND	ND
15	pos	ND	ND	ND

Legenda: ND: não disponível. * Paciente apresentou o quadro de hepatite tardia após febre amarela (descrito no Capítulo 7)

A procura por amostras alternativas e menos invasivas, como amostras de urina, podem facilitar o diagnóstico em áreas remotas, uma vez que a coleta é menos laboriosa (não necessita de mão-de-obra especializada para coleta de sangue e posterior separação do soro), facilitando todo o processo de coleta. Outros estudos já demonstraram a persistência do RNA do YFV selvagem em urina até 45 dias após o início dos sintomas (BARBOSA *et al.*, 2018; REUSKEN *et al.*, 2017).

d. Análise de marcadores de diagnóstico de pacientes com febre amarela atendidos no HEM, em 2017 e 2018

Um grande número de flavivírus são patogênicos ao homem e de forma geral, causa desde infecções assintomáticas àquelas sintomáticas caracterizadas por uma variedade de sinais clínicos e sintomas. Os sintomas podem ser inespecíficos como evoluírem para febres, febres hemorrágicas e encefalites (PIERSON; DIAMOND, 2013; VASCONCELOS *et al.*, 2005). Devido à essa sobreposição e a falta de especificidades de sintomas, se faz necessária a confirmação laboratorial diferencial, para o diagnóstico das flaviviroses.

Durante o início do surto em 2017, o LACEN/FUNED ainda não realizava o teste diagnóstico molecular para febre amarela, através de RT-qPCR. O diagnóstico era feito pela detecção de IgM anti-YFV, pela técnica de MAC-ELISA caseiro. Do total de amostras testadas pelo LACEN/FUNED, em 34 foi confirmada a infecção pelo YFV através do teste de MAC-ELISA caseiro para detecção de IgM anti-YFV.

Com a necessidade de se realizar um teste mais rápido e sensível para o diagnóstico da febre amarela, uma colaboração foi estabelecida entre os médicos do HEM e o Laboratório de Vírus/UFMG. Em 2017, amostras do total de 46 pacientes foram testados por RT-qPCR no Laboratório de Vírus e 43 pacientes foram positivos. Com relação a 2018, amostras de 44 pacientes foram testados no Laboratório de Vírus, através da técnica de RT-qPCR com intuito de auxiliar no diagnóstico laboratorial, e 42 foram positivos. As amostras testadas no Laboratório de Vírus, com finalidade de diagnóstico, foram escolhidas de acordo com a demanda dos médicos colaboradores do HEM, sendo testadas as amostras mais precoces disponíveis. Estes resultados foram repassados à equipe médica do HEM, dentro de um período de até 48 horas, auxiliando no diagnóstico e manejo clínico dos pacientes de febre amarela durante o surto.

As amostras coletadas de forma seriada durante a internação foram analisadas quanto à presença do YFV e carga do genoma viral. As amostras de soro testadas em 2017 (n=127, provenientes de 43 pacientes) foram coletadas do 4º ao 25º dia após início dos sintomas e testadas por RT-qPCR qualitativo. As amostras positivas foram testadas pelo método quantitativo. Após a RT-qPCR, foram detectadas amostras positivas para YFV do 4º ao 25º dia. Foi

possível estimar a carga genômica de RNA do YFV nestas amostras, com valores de cargas virais variando de 15,75 cópias genômicas/ml a $3,9 \times 10^6$ cópias genômicas/ml (Tabela 5).

5 De alguns pacientes de 2017, foi obtida informação do resultado do teste sorológico MAC-ELISA IgM anti-YFV, realizado pelo LACEN/FUNED. Os pacientes internados no HEM em 2017, apresentaram IgM reagente, pela técnica de MAC-ELISA, do 2º ao 23º dia após o início dos sintomas (Tabela 5).

10 Dos pacientes de 2018, foi possível testar por RT-qPCR qualitativo, 286 amostras de 68 pacientes, as quais foram coletadas do dia 1º ao 16º dia após início dos sintomas. Desse total, 211 amostras foram positivas. Essas amostras foram coletadas do 1º ao 16º dia após o início dos sintomas (Tabela 6). Foi possível estimar a carga genômica de RNA do YFV nestas amostras, com valores de cargas virais variando de 34,10 cópias genômicas/ml a $5,8 \times 10^9$ cópias genômicas/ml (Tabela 6).

15 Do total de amostras PCR positivas para YFV em 2018, 50 amostras escolhidas aleatoriamente foram testadas pelo teste imunocromatográfico Febre Amarela IgM ECO Teste (ECO Diagnóstica). Nove amostras foram IgM não reagentes. Essas amostras foram coletadas do 4º ao 7º dia após início de sintomas e os resultados indicam que nesses pacientes ainda não foi detectada
20 a presença de anticorpos IgM anti-YFV pela técnica utilizada. As 41 amostras IgM anti-YFV reagentes foram coletadas no período de 3 a 13 dias após o início dos sintomas (Tabela 6).

Tabela 5: Valores de carga genômica viral do YFV obtidos a partir de amostras de pacientes internados no HEM no ano de 2017.

ID	INÍCIO SINTOMAS	DATA INTERNAÇÃO	DATA DESFECHO	DESFECHO	4DPS	5 DPS	6 DPS	7 DPS	8 DPS	9 DPS	10 DPS	11 DPS	12 DPS	13 DPS	14 DPS	15 DPS	17 DPS	18 DPS	19 DPS	20 DPS	21 DPS	23 DPS	24 DPS	25 DPS
1	16/01/2017	23/01/2017	30/01/2017	ALTA					NEG			3,66E+02	NEG		NEG									
2	15/01/2017	18/01/2017	25/01/2017	ALTA		6,25E+02	2,94E+03	2,15E+02	1,75E+02	2,15E+02	NEG													
3	13/01/2017	19/01/2017	23/01/2017	ALTA					NEG	NEG	6,54E+02													
4	23/01/2017	27/01/2017	31/01/2017	ALTA		pos		1,51E+04	1,11E+03															
5	20/01/2017	23/01/2017	31/01/2017	ALTA	7,42E+04	2,88E+03	9,78E+03	1,70E+03				1,39E+02	NEG											
6	21/01/2017	26/01/2017	30/01/2017	ALTA			1,16E+03			NEG														
7	15/01/2017	23/01/2017	26/01/2017	ALTA						1,87E+03	6,26E+02													
8	13/01/2017	16/01/2017	24/01/2017	ALTA				4,25E+03	5,96E+02		3,79E+02	5,50E+02												
9	12/01/2017	18/01/2017	24/01/2017	ALTA					6,70E+03	2,00E+02	NEG			2,00E+02	1,00E+02									
10	08/01/2017	18/01/2017	24/01/2017	ALTA								2,12E+03												
11	04/01/2017	10/01/2017	07/03/2017	ALTA													6,42E+02	NEG	NEG					
12	16/01/2017	19/01/2017	24/01/2017	ALTA	7,19E+04	5,75E+02	1,88E+02																	
13	10/01/2017	14/01/2017	23/01/2017	ALTA						NEG	3,50E+02	NEG	9,45E+02											
14	21/01/2017	25/01/2017	31/01/2017	ALTA			8,50E+02	1,50E+02		NEG														
15	11/03/2017	15/03/2017	29/04/2017	ALTA							3,23E+03			NEG										
16	18/01/2017	23/01/2017	26/01/2017	ALTA			2,07E+04																	
17	09/01/2017	11/01/2017	19/01/2017	ALTA																				
18	19/01/2017	23/01/2017	26/01/2017	ALTA		1,96E+02																		
19	13/01/2017	18/01/2017	30/01/2017	ALTA				1,12E+02	3,50E+02	1,35E+02	4,36E+02		3,37E+03		5,50E+02									
20	09/01/2017	12/01/2017	08/02/2017	ALTA					8,28E+03		9,87E+02	5,22E+03												
21	07/01/2017	12/01/2017	30/01/2017	ALTA										NEG	1,77E+03	NEG	4,57E+02		6,34E+03	5,95E+02	1,13E+03			
22	06/01/2017	12/01/2017	18/01/2017	ALTA					NEG	2,14E+02	1,58E+01	NEG		NEG										
23	25/01/2017	27/01/2017	02/02/2017	ALTA		pos		1,80E+02	1,00E+02															
24	14/01/2017	18/01/2017	25/01/2017	ALTA			3,95E+02	9,00E+02		4,50E+02	7,00E+01													
25	19/02/2017	23/02/2017	01/03/2017	ALTA	6,26E+02	2,62E+02		3,15E+03		2,16E+03														
26	07/01/2017	12/01/2017	17/01/2017	ALTA																				
27	19/01/2017	22/01/2017	28/01/2017	ALTA	1,22E+04	5,81E+03		1,38E+03																
28	27/02/2017	04/03/2017	05/03/2017	ALTA	3,92E+05			NEG																
29	05/01/2017	11/01/2017	19/01/2017	ALTA	js																			
30	06/01/2017	14/01/2017	20/01/2017	ALTA																				
31	08/01/2017	12/01/2017	17/01/2017	ALTA																				
32	15/01/2017	19/01/2017	26/01/2017	ÓBITO		pos																		
33	22/01/2017	24/01/2017	11/02/2017	ÓBITO	1,91E+05																			
34	08/01/2017	11/01/2017	14/01/2017	ÓBITO	pos																			
35	01/01/2017	10/01/2017	12/01/2017	ÓBITO									2,51E+02											
36	27/02/2017	04/03/2017	05/03/2017	ÓBITO				1,38E+05																
37	05/01/2017	11/01/2017	19/01/2017	ÓBITO				2,25E+04																
38	23/01/2017	28/01/2017	02/02/2017	ÓBITO	3,31E+03	5,78E+02	6,70E+01																	
39	27/01/2017	01/02/2017	13/02/2017	ÓBITO		2,22E+02																		
40	06/01/2017	11/01/2017	17/01/2017	ÓBITO					3,97E+02															
41	06/01/2017	10/01/2017	12/01/2017	ÓBITO		pos																		
42	19/02/2017	23/02/2017	01/03/2017	ÓBITO			1,93E+03	1,32E+03																
43	13/01/2017	18/01/2017	23/01/2017	ÓBITO																				

Legenda: NEG: resultado negativo no RT-qPCR qualitativo para YFV. Azul: IgM anti-YFV reagente (ELISA-FUNED). Rosa: data da alta.

Vermelho: data do óbito. Pacientes com data de alta ou óbito após 25 dias de sintomas, não estão indicados na tabela.

Tabela 6: Valores de carga genômica viral do YFV obtidos a partir de amostras de pacientes internados no HEM no ano de 2018.

ID	INÍCIO SINTOMAS	DATA INTERNAÇÃO	DATA DESFECHO	DESFECHO	1 DPS	2 DPS	3 DPS	4 DPS	5 DPS	6 DPS	7 DPS	8 DP's	9 DPS	10 DPS	11 DPS	12 DPS	13 DPS	14 DPS	15 DPS	16 DPS	
1	14/02/2018	17/02/2018	21/02/2018	ALTA				1,11E+04	1,20E+03			NEG									
2	21/01/2018	22/01/2018	10/02/2018	ALTA		3,42E+02	3,70E+02	6,82E+02		2,67E+02											
3	28/01/2018	31/01/2018	05/02/2018	ALTA	5,14E+03	1,16E+03	8,79E+02														
4	14/01/2018	17/01/2018	21/01/2018	ALTA				8,15E+05	8,70E+04	3,39E+02											
5	25/01/2018	26/01/2018	01/02/2018	ALTA			4,25E+04		3,00E+02	NEG											
6	14/01/2018	19/01/2018	26/01/2018	ALTA						4,90E+01		NEG	1,93E+02	2,30E+02	NEG						
7	13/01/2018	17/01/2018	23/01/2018	ALTA					5,78E+02	7,16E+02	5,75E+02										
8	22/01/2018	24/01/2018	31/01/2018	ALTA				1,15E+03	7,71E+02		NEG	NEG									
9	26/01/2018	28/01/2018	02/02/2018	ALTA			8,53E+04	2,06E+03	6,29E+02	4,31E+04											
10	16/01/2018	17/01/2018	23/01/2018	ALTA	8,62E+06		1,09E+04	4,72E+03		NEG	NEG										
11	30/01/2018	04/02/2018	10/02/2018	ALTA					2,21E+02	5,90E+02			6,67E+02								
12	17/01/2018	19/01/2018	26/01/2018	ALTA			6,87E+05	5,15E+03	5,53E+03	3,96E+02	3,91E+02										
13	19/01/2018	21/01/2018	27/01/2018	ALTA				1,56E+03	6,82E+03	4,24E+02	5,60E+02										
14	23/01/2018	25/01/2018	02/02/2018	ALTA			1,11E+06	1,29E+04	3,12E+02	4,03E+02	3,57E+02										
15	12/02/2018	15/02/2018	21/02/2018	ALTA				2,56E+04	2,12E+03	3,18E+02	NEG	3,41E+01	NEG								
16	15/01/2018	16/01/2018	30/01/2018	ALTA			8,84E+05		3,77E+01	1,05E+02	NEG	3,90E+01			7,41E+01				3,57E+01		
17	31/01/2018	01/02/2018	09/02/2018	ALTA	3,12E+03	3,35E+02	NEG	NEG	NEG	NEG											
18	15/01/2018	17/01/2018	25/01/2018	ALTA			7,93E+04	7,34E+03	NEG	NEG	NEG	NEG									
19	16/01/2018	20/01/2018	26/01/2018	ALTA					5,38E+05			1,09E+03	8,93E+01	1,26E+02							
20	16/01/2018	18/01/2018	22/01/2018	ALTA			1,24E+05	3,82E+03	7,99E+02	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG						
21	15/01/2018	20/01/2018	26/01/2018	ALTA					1,94E+03	2,19E+02	5,37E+01	NEG	NEG	NEG	NEG						
22	11/02/2018	13/02/2018	20/02/2018	ALTA																	
23	12/02/2018	13/02/2018	19/02/2018	ALTA	3,25E+03		4,02E+04		5,82E+04												
24	15/01/2018	19/01/2018	24/01/2018	ALTA					6,04E+03		5,90E+02	4,81E+02	NEG								
25	20/01/2018	30/01/2018	22/02/2018	ALTA											4,25E+02					6,75E+02	6,21E+02
26	18/01/2018	25/01/2018	02/02/2018	ALTA											NEG	NEG	NEG				
27	06/02/2018	12/02/2018	22/02/2018	ALTA								6,99E+02	NEG	NEG		NEG	NEG				
28	22/01/2018	25/01/2018	06/02/2018	ALTA				1,15E+04	2,79E+03	1,32E+03	1,36E+03	4,01E+02									
29	13/01/2018	17/01/2018	29/01/2018	ALTA					2,41E+03	5,87E+02	5,76E+02			2,14E+02							
30	16/02/2018	17/02/2018	27/02/2018	ALTA		NEG	1,97E+02	1,68E+02	NEG	NEG											
31	13/01/2018	18/01/2018	06/02/2018	ALTA							NEG			1,22E+02	NEG						
32	24/01/2018	26/01/2018	06/02/2018	ALTA			6,86E+06	1,10E+03	2,80E+04		6,83E+03										
33	09/02/2018	14/02/2018	21/02/2018	ALTA							1,61E+02		1,86E+02	NEG	NEG	1,64E+02					
34	11/01/2018	13/01/2018	24/01/2018	ALTA			3,38E+03		1,05E+03		3,26E+02		1,21E+02	3,48E+01		NEG					

Tabela 6: continuação

ID	INÍCIO SINTOMAS	DATA INTERNAÇÃO	DATA DESFECHO	DESFECHO	1 DPS	2 DPS	3 DPS	4 DPS	5 DPS	6 DPS	7 DPS	8 DPS	9 DPS	10 DPS	11 DPS	12 DPS	13 DPS	14 DPS	15 DPS	16 DPS
35	05/01/2018	11/01/2018	02/02/2018	ALTA						6,42E+02		NEG	4,92E+02	NEG	NEG	NEG				
36	15/01/2018	19/01/2018	20/02/2018	ALTA						2,65E+04		8,73E+01	NEG	NEG						
37	10/01/2018	14/01/2018	21/01/2018	ALTA						1,47E+04	1,77E+04	1,54E+03		6,33E+02	5,51E+02					
38	18/01/2018	21/01/2018	05/02/2018	ALTA				1,05E+05	2,13E+04	6,71E+03	1,17E+03	1,99E+02	1,20E+02							
39	19/01/2018	22/01/2018	07/02/2018	ÓBITO				1,38E+05	4,15E+02	1,34E+02	1,46E+02	3,05E+02		NEG						
40	13/01/2018	16/01/2018	22/01/2018	ÓBITO				3,30E+07		3,68E+03	3,19E+03		2,00E+03							
41	10/01/2018	15/01/2018	19/01/2018	ÓBITO						4,78E+09	5,86E+09	5,96E+08	1,31E+06	7,23E+05						
42	15/02/2018	18/02/2018	22/02/2018	ÓBITO					6,96E+04			3,02E+04								
43	19/01/2018	23/01/2018	28/01/2018	ÓBITO					4,83E+06		6,49E+04	4,14E+04	8,58E+03							
44	20/01/2018	23/01/2018	27/01/2018	ÓBITO				2,82E+07	3,44E+04		1,87E+04									
45	05/02/2018	08/02/2018	12/02/2018	ÓBITO					4,31E+04	4,31E+04	4,31E+04									
46	17/01/2018	20/01/2018	27/01/2018	ÓBITO					5,28E+05	3,11E+05		1,31E+05	2,09E+04	3,84E+03						
47	02/02/2018	05/02/2018	24/02/2018	ALTA/TRATADO				1,83E+04		2,04E+04	4,50E+03		4,29E+02	2,51E+02	1,44E+02					
48	05/02/2018	08/02/2018	15/02/2018	ALTA/TRATADO					5,84E+06	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG						
49	07/02/2018	10/02/2018	22/02/2018	ALTA/TRATADO						6,61E+03		4,80E+03								
50	22/01/2018	29/01/2018	06/02/2018	ALTA/TRATADO																
51	31/01/2018	03/02/2018	11/04/2018	ALTA/TRATADO					2,68E+04	2,54E+03	2,08E+03		2,86E+02	1,67E+02		NEG	NEG	NEG		
52	24/01/2018	29/01/2018	08/02/2018	ALTA/TRATADO						6,00E+06	5,29E+04	9,95E+04								
53	05/02/2018	07/02/2018	13/02/2018	ALTA/TRATADO			NEG	4,40E+03	3,13E+04	1,17E+08										
54	12/02/2018	16/02/2018	22/2/2018	ALTA/TRATADO				2,26E+03	2,23E+03	1,37E+03			NEG	NEG						
55	28/01/2018	29/01/2018	07/03/2018	ALTA/TRATADO	2,61E+06	6,63E+03		2,75E+03		3,30E+02										
56	01/02/2018	04/02/2018	09/02/2018	ALTA/TRATADO			2,52E+02	8,26E+01		NEG	NEG	NEG								
57	26/01/2018	01/02/2018	10/02/2018	ALTA/TRATADO							5,19E+02	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG				
58	25/01/2018	28/01/2018	05/02/2018	ALTA/TRATADO				2,78E+05	6,55E+04		5,72E+02	2,48E+02								
59	15/03/2018	18/03/2018	23/04/2018	ALTA/TRATADO					4,75E+04	3,57E+02		NEG								
60	08/02/2018	09/02/2018	19/02/2018	ALTA/TRATADO						4,94E+02	NEG									
61	14/02/2018	17/02/2018	23/2/2018	ALTA/TRATADO				3,29E+03												
62	21/02/2018	23/02/2018	06/03/2018	ALTA/TRATADO					1,50E+03	4,73E+04										
63	03/02/2018	07/02/2018	16/02/2018	ALTA/TRATADO					8,35E+01				NEG	9,60E+01	3,42E+02					
64	13/02/2018	17/02/2018	22/02/2018	ALTA/TRATADO					1,63E+02		2,54E+02	NEG	NEG							
65	11/02/2018	13/02/2018	19/02/2018	ÓBITO/TRATADO			1,23E+05		3,18E+04	6,62E+04										
66	29/01/2018	01/02/2018	06/02/2018	ÓBITO/TRATADO				6,06E+05	1,22E+05		1,53E+04	2,85E+04								
67	03/02/2018	06/02/2018	12/02/2018	ÓBITO/TRATADO																
68	28/01/2018	30/01/2018	04/02/2018	ÓBITO/TRATADO				2,09E+05	3,75E+04		8,21E+03	1,34E+04								

Legenda: NEG: resultado negativo no RT-qPCR qualitativo para YFV. Azul: IgM anti-YFV reagente (teste Imunocromatográfico). Rosa: data da alta. Vermelho: data do óbito. Pacientes com data de alta ou óbito após 16 dias de sintomas, não estão indicados na tabela.

Os testes diagnósticos devem ser realizados de acordo com a fase da doença em que o paciente se encontra. Na fase virêmica da doença, que dura de 1-10 dias aproximadamente, testes devem ser priorizados visando a detecção do genoma viral (PCR), do antígeno viral ou a detecção da partícula viral através do isolamento do vírus. Após a soroconversão, que pode acontecer a partir do 5º dia após o início dos sintomas, o diagnóstico deve preconizar a busca por anticorpos através de testes sorológicos, como ELISA, testes rápidos imunocromatográficos e ensaios de soroneutralização (NORONHA *et al.*, 2017).

Apesar do diagnóstico molecular ser recomendado em pacientes com até 10 dias após início de sintomas (PAHO, 2005), nesse trabalho foram detectadas amostras positivas no PCR até o 25º dia após o início dos sintomas, mesmo em pacientes já apresentando anticorpos contra o YFV (Tabela 5 e Tabela 6). Muitos desses pacientes são provenientes de áreas remotas e por isso eles chegam mais tardiamente ao atendimento médico. Em alguns desses casos, apenas o teste sorológico pode não ser suficiente para a resolução do diagnóstico. Principalmente em locais hiperepidêmicos para dengue, considerando que pode ocorrer reação cruzada entre os anticorpos anti-DENV e anti-YFV (HALSTEAD, 2007). Dessa forma, aliar o teste sorológico com PCR, mesmo em dias mais avançados da infecção, pode contribuir para um diagnóstico mais assertivo, para um manejo clínico adequado do paciente e para uma melhor epidemiologia da febre amarela

e. Análise se valores de carga genômica viral pode ser utilizado como prognóstico da febre amarela

Além das análises do curso natural da infecção pelo YFV para entendimento do curso natural da febre amarela, buscou-se por marcadores de prognóstico/gravidade, através da realização de RT-qPCR quantitativo, com o objetivo de estimar a carga genômica do YFV em soro de pacientes de 2017 e 2018.

Para alcançar esse objetivo, foram utilizados os valores de carga genômica do YFV calculados para os pacientes com diferentes desfechos dos anos de 2017 e 2018 (Tabela 5 e Tabela 6). Os pacientes foram separados em grupos, de acordo com o desfecho alta ou óbito. Esses grupos foram constituídos por:

(1) pacientes com desfecho alta e valores da transaminase AST menores que 2000 U/L no dia da internação; (2) pacientes com desfecho alta e valores da transaminase AST maiores que 2000 U/L no dia da internação e (3) pacientes com desfecho óbito. De cada grupo, foram selecionados pacientes que possuíam o maior número de amostras seriadas coletadas. Após algumas análises exploratórias iniciais desse grupo de dados percebeu-se que a classificação anteriormente feita limitava o número de pacientes dentro dos grupos e em alguns casos os grupos inclusive não cumpriam as premissas para realização de testes estatísticos paramétricos. Por isso, as análises apresentadas nesse trabalho serão baseadas apenas em dois grupos, divididos pelo desfecho alta (70 pacientes) ou óbito (20 pacientes).

Foram analisadas 312 amostras, provenientes de 90 pacientes com febre amarela. Essas amostras foram coletadas do 1º ao 25º DPS. Os valores de carga viral variaram de 15,75 cópias genômicas/ml a 8×10^9 cópias genômicas/ml (Tabela 5 e Tabela 6). Os níveis de carga genômica viral observados nas diferentes fases (dias após sintomas - DPS) estão de acordo com o esperado, uma vez que a literatura científica descreve cargas genômicas 10^2 a 10^7 (cópias de RNA/ml) durante a fase virêmica da doença (KLITTING *et al.*, 2018; MONATH, 2001b).

Análises entre os dois grupos não mostraram diferença estatística (teste t, $p > 0,05$) nos valores de média de carga genômica do YFV entre os grupos que evoluíram para cura ou óbito, comparando valores por DPS. Nessas análises foram considerados apenas os valores do 4º ao 10º dia após o início dos sintomas da febre amarela, por se tratar do período de dias que apresentaram maior número de carga genômica viral de diferentes pacientes (Figura 14).

VALORES DE MÉDIA DE CARGA GENÔMICA VIRAL

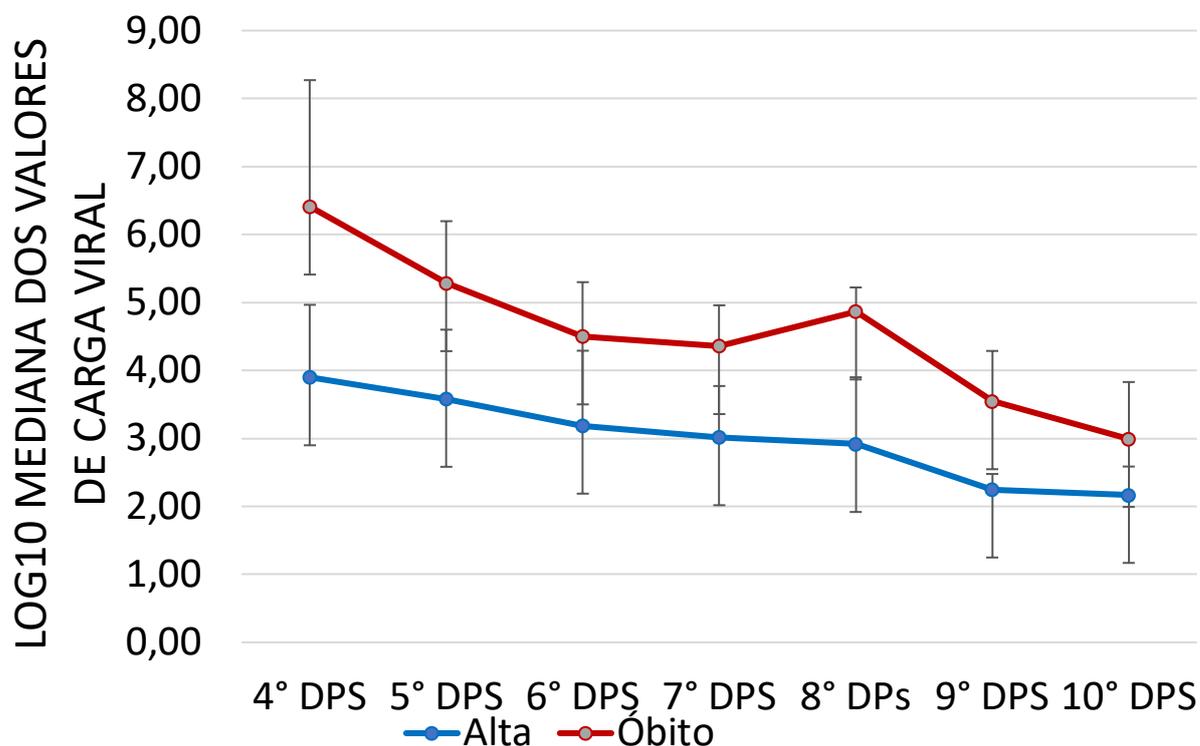


Figura 14: Valores da média (em log₁₀) dos valores de carga genômica viral, em cada grupo analisado, por dia de sintomas. DPS: dias pós sintomas.

5 Esses resultados demonstram que o valor de carga genômica viral não pode ser utilizada como um marcador de gravidade da febre amarela durante a internação do paciente. Apesar desses resultados, Kallas et al (2019) demonstraram que valores de carga genômica viral maiores que 5,1 log₁₀ cópias/ml pode ser um fator de risco independentemente associado a

10 mortalidade de pacientes com febre amarela (KALLAS *et al.*, 2019). Essa diferença nos resultados obtidos pode ser devido ao tipo de análise realizada e também pela a fase da infecção analisada em cada estudo. Enquanto a média de dia de sintomas dos pacientes analisado por Kallas et al (2019) era de 8 dias (KALLAS *et al.*, 2019), neste estudo foram analisados os valores de carga

15 genômica viral de 4 a 10 dias após o início dos sintomas da febre amarela. Cabe ressaltar que a diferença entre os desfechos alta e óbito podem estar associados a outros fatores como a resposta imune do hospedeiro (QUARESMA *et al.*, 2013;

TER MEULEN *et al.*, 2004) e a susceptibilidade genética do paciente (BLAKE; GARCIA-BLANCO, 2014).

Uma vez que já se tem os valores de carga genômica do YFV nesses pacientes, mais estudos são necessários com a finalidade de investigar a correlação desses valores, como estudos que correlacionem a estimativa de genoma viral com partículas infecciosas do YFV. Além disso, pretende-se realizar análises estatísticas considerando os valores de carga viral por paciente e por dia após sintomas e não apenas média e mediana desses pacientes.

10 f. **Análise da carga genômica viral durante a fase aguda da febre amarela, em pacientes do HEM tratados com o antiviral Sofosbuvir**

Vários estudos foram e estão sendo conduzidos com o objetivo de demonstrar a atividade antiviral do Sofosbuvir também em infecções causadas por flavivírus, como ZIKV e YFV (FERREIRA *et al.*, 2017; MENDES *et al.*, 2019; SACRAMENTO *et al.*, 2017b). Esse empenho se deve, principalmente, a alta conservação da região do genoma que codifica para a RNA polimerase viral entre os membros da família Flaviviridae (PIPERNO *et al.*, 2014). No sítio de ligação do Sofosbuvir, existe apenas uma substituição de aminoácido entre HCV e YFV (Phe:Trp) e ambos os vírus compartilham resíduos conservados e mesma carga de aminoácidos na região de interação com o antiviral Sofosbuvir (MENDES *et al.*, 2019).

Em 2018, dos 230 pacientes internados no HEM com infecção confirmada pelo YFV, 46 foram selecionados pela equipe médica do hospital para utilizar o medicamento Sofosbuvir, durante a fase aguda da infecção pelo YFV. Como critério de seleção ao uso do medicamento, os candidatos ao tratamento com Sofosbuvir deveriam preencher um ou mais dos requisitos a seguir: estar com níveis de AST superiores a 1.000 UI/L, apresentar quadro de encefalopatia hepática, estar com sangramento moderado a grave, níveis de RNI superiores a 1,5, níveis de creatinina maiores que 2 ou oligúria, desconforto respiratório e/ou sinais de má perfusão tecidual. Os pacientes eram imediatamente excluídos se já estavam com mais de cinco dias de sintomas, se faziam uso de aminas vasoativas e/ou se estavam em terapia dialítica. Amostras seriadas desses pacientes foram coletadas durante o uso do antiviral Sofosbuvir. Esse estudo foi

conduzido no modelo de uso compassivo *off-label* do Sofosbuvir, de forma não aleatória. Todos os pacientes consentiram com a utilização do medicamento pela equipe do HEM.

5 Como o estudo foi não aleatorizado, o grupo utilizado como controle apresenta limitações, principalmente por ser formado pelos demais pacientes com febre amarela e não tratados internados no HEM, sem uma seleção prévia dos pacientes. Foram testadas de 2 a 7 amostras de cada paciente, coletadas do 1º ao 16º dia após o início dos sintomas. As amostras testadas do grupo tratado foram coletadas antes do início do uso do antiviral Sofosbuvir ou no dia 10 de início de uso do medicamento. Após RT-qPCR, os valores de carga genômica viral variaram de 34,10 cópias genômicas/ml a $5,86 \times 10^9$ cópias genômicas/ml (Tabela 7 e Figura 15).

15 Tabela 7: Valores máximo e mínimo de carga genômica viral do YFV em cada grupo analisado, por dia de sintoma, a partir do 4º dia.

DPS/valor cg viral	NT-A		NT-O		T	
	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo
4º DPS	$1,68 \times 10^2$	$8,15 \times 10^5$	$1,38 \times 10^5$	$3,3 \times 10^7$	$8,26 \times 10^1$	$6,06 \times 10^5$
5º DPS	$3,77 \times 10^1$	$5,38 \times 10^5$	$4,15 \times 10^2$	$4,83 \times 10^6$	$8,35 \times 10^1$	$5,84 \times 10^6$
6º DPS	$4,9 \times 10^1$	$2,65 \times 10^4$	$1,34 \times 10^2$	$4,78 \times 10^9$	$3,30 \times 10^2$	$1,17 \times 10^8$
7º DPS	$5,37 \times 10^1$	$1,77 \times 10^4$	$1,46 \times 10^2$	$5,86 \times 10^9$	$2,54 \times 10^2$	$5,29 \times 10^4$
8º DPS	$3,41 \times 10^1$	$1,54 \times 10^3$	$3,05 \times 10^2$	$5,98 \times 10^8$	$2,48 \times 10^2$	$9,95 \times 10^4$
9º DPS	$8,93 \times 10^1$	$4,92 \times 10^2$	$2,00 \times 10^3$	$1,31 \times 10^6$	$2,86 \times 10^2$	$4,29 \times 10^2$
10º DPS	$3,48 \times 10^1$	$6,33 \times 10^2$	$3,84 \times 10^3$	$7,23 \times 10^5$	$9,60 \times 10^1$	$2,51 \times 10^2$

Legenda: DPS: dias após sintomas. cg: carga genômica. NT-A: grupo não-tratado, desfecho alta. NT-O: grupo não-tratado, desfecho óbito. T: grupo tratado

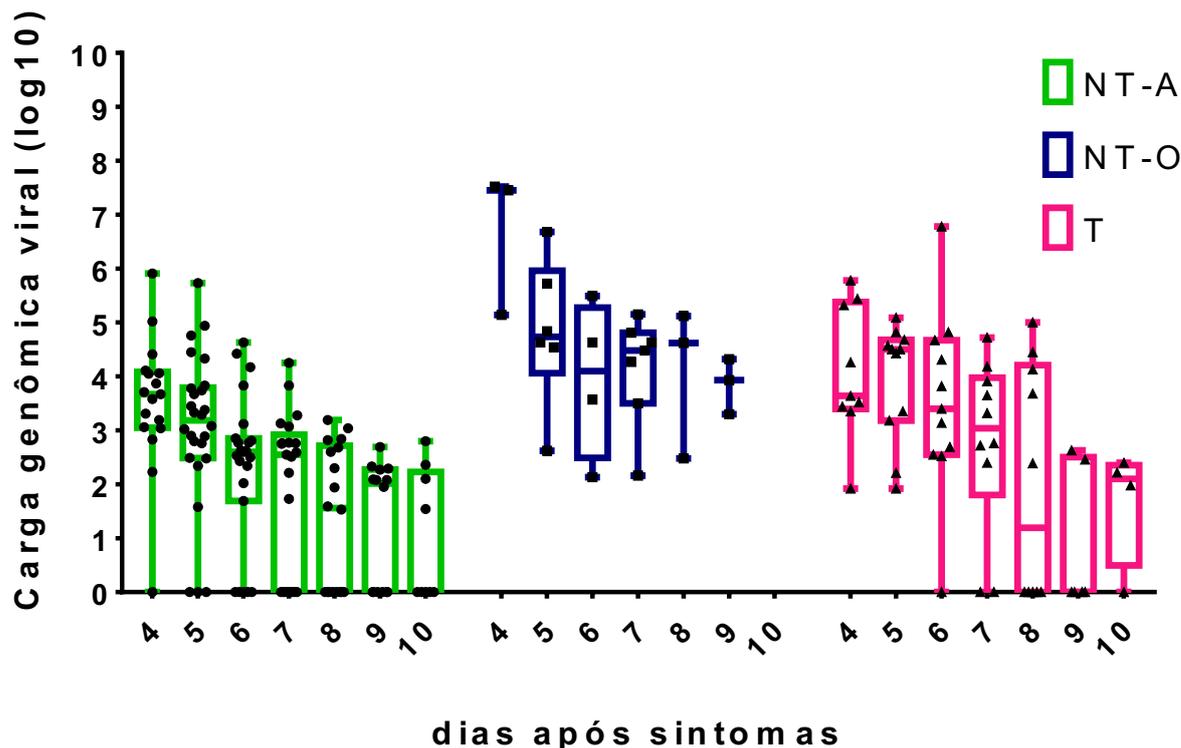


Figura 15: Valores de carga genômica viral, por grupo analisado e por dia de sintomas. As barras indicam valores de máximo e mínimo. NT-A: não tratado alta. NT-O: Não tratado óbito. T: tratado.

5

Análises estatísticas mais robustas e aprofundadas ainda serão realizadas com esses dados. Além disso, a possível melhora do paciente também será correlacionada ao quadro clínico no decorrer da infecção. Devido a isso, esses resultados não serão apresentados neste trabalho de tese.

10

6.4. Conclusões

- ∴ O perfil sócio-demográfico e epidemiológico dos pacientes com febre amarela atendidos no HEM, em 2017 e 2018, estava de acordo com o perfil de febre amarela silvestre no Brasil;
- ∴ O tempo de internação dos pacientes com febre amarela foi significativamente maior em 2018, quando comparado com 2017;
- ∴ A taxa de letalidade de pacientes com febre amarela atendidos no HEM, em 2017 e em 2018, foram semelhantes (com taxa de letalidade acumulada de 23,84%);

- .: Amostras de nove pacientes com vacinação prévia contra febre amarela há pelo menos um ano foram positivas para RNA do YFV;
- .: Seis amostras apresentaram anticorpos IgM anti-YFV na amostra de soro mais recente testada;
- 5 .: Amostras de soro IgM reagentes apresentaram anticorpos neutralizantes contra o YFV;
- .: Amostras de LCR de quatro pacientes de óbito de 2018 foram positivas em RT-qPCR para YFV, com carga genômica viral variando de $1,8 \times 10^4$ a $5,2 \times 10^4$, indicando uma possível presença do YFV no LCR;
- 10 .: Duas amostras de LCR, coletadas *posts mortem* foram IgM anti-YFV reagentes e apresentaram títulos de neutralização de anticorpos até 1:40 em um paciente e até 1:640 em outro paciente;
- .: O RNA de YFV foi detectado em pacientes com febre amarela do 1º até o 25º dia após o início dos sintomas.
- 15 .: Em alguns casos, a janela de detecção molecular de YFV ultrapassou 10 dias de sintomas, podendo auxiliar no diagnóstico laboratorial de febre amarela, nesses casos.
- .: A detecção do genoma do YFV foi possível em pacientes que já apresentavam IgM anti-YFV reagente.
- 20 .: O RNA do YFV foi detectado na urina do 1º ao 32º de infecção, durante a fase aguda da febre amarela.
- .: Foram observados valores de carga genômica viral do YFV de 15,75 cópias genômicas/ml a $5,8 \times 10^9$ cópias genômicas/ml, em pacientes de 2017 e de 2018.
- 25 .: Análises estatísticas não demonstraram diferença nos valores de carga genômica do YFV entre pacientes com os desfechos de alta e óbito.

7. CAPÍTULO 4: Analisar o curso natural da febre amarela durante a fase de convalescença da doença, avaliando aspectos clínicos, bioquímicos e persistência viral em diferentes amostras de pacientes de febre amarela com desfecho alta e pelo menos um retorno ambulatorial no HEM

5

Devido à escassez de informação sobre a fase de convalescença da febre amarela, a equipe médica do HEM decidiu acompanhar os pacientes com febre amarela atendidos no hospital em 2017 e 2018 após a alta hospitalar. Com isso, os médicos poderiam acompanhar a clínica dos pacientes após a fase aguda da febre amarela e os demais integrantes do grupo de estudos da Febre Amarela poderia acompanhar aspectos virais, sorológicos imunológicos, dentre outros, durante a fase de convalescença da doença.

10

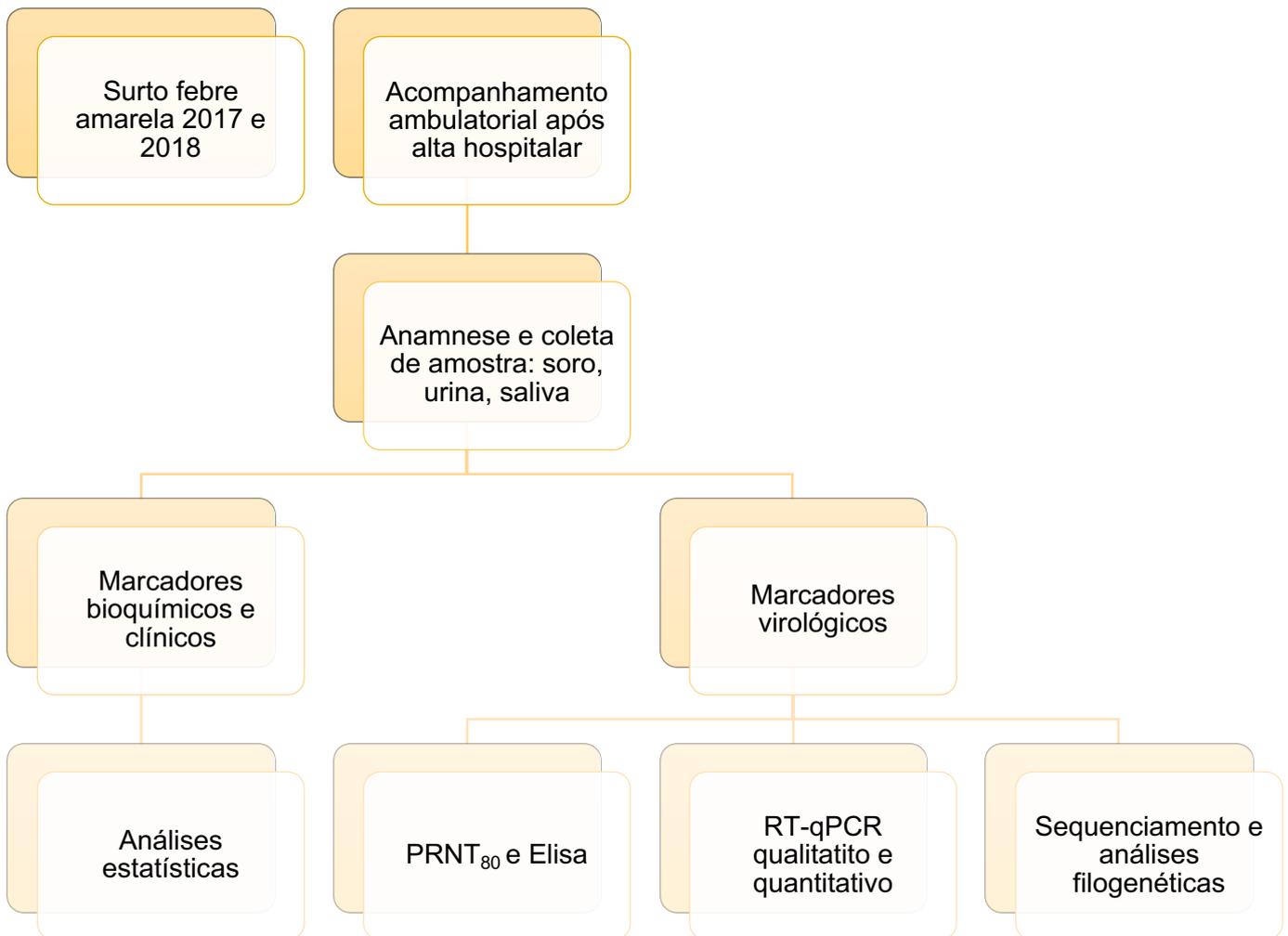
Os pacientes foram instruídos a retornarem ao hospital para seguimento ambulatorial após 15, 30, 45 e 60 dias da alta hospitalar. Os critérios para alta hospitalar eram: completar ao menos sete dias de sintomas, estar sem febre por pelo menos 48 horas, melhora clínica, ausência de manifestações hemorrágicas, RNI < 1,5, aminotransferases com valores abaixo de 1000 U/L ou em queda e função renal normalizada.

15

20

7.1. Fluxograma

De acordo com o fluxograma abaixo, os pacientes passaram por uma nova anamnese e tiveram amostra de sangue (para posterior separação do soro), urina e saliva coletadas durante o retorno. Esses dados foram usados para análises de marcadores dessa fase da doença.



7.2 Metodologia

7.2.1 Amostras biológicas

Pacientes atendidos no HEM e com pelo menos um retorno ambulatorial após a alta hospitalar tiver amostras de soro, urina, saliva e biópsia coletadas durante a fase de convalescença da febre amarela.

7.2.2 Detecção molecular de YFV

A extração de RNA total a partir de soro, urina, saliva ou LCR foi realizada a partir de 140 µl de amostra, utilizando o kit Qlamp Viral RNA Minikit (QIAGEN, USA), seguindo as instruções do fabricante. O RNA total extraído foi armazenado até o momento do uso em ultra freezer a -70 °C.

A extração de RNA a partir de tecido foi realizada a partir de no máximo 30 mg de tecido, utilizando o kit RNeasy MiniKit (QIAGEN, USA), seguindo as instruções do fabricante. O RNA total extraído foi armazenado até o momento do uso em ultra freezer a -70 °C.

Para prospecção do YFV nas amostras coletadas durante a fase de convalescença da febre amarela, foi empregada a metodologia de RT-qPCR descrita por DOMINGO et al (2012) nas amostras de soro, urina e tecido coletadas. A reação de RT-qPCR foi realizada nas seguintes condições: a 10 µl de tampão 2x (GoTaq 1step, Promega, USA) foram adicionados 0,5 µl de cada iniciador, 0,4 µl YFV-probe-HEX, 0,5 µl da Transcriptase Reversa, 5,0 µl de RNA e água ultrapura q.s.p. 20 µl. A reação ocorreu em termociclador StepOne (Applied Biosystems), nas seguintes condições: 42°C – 15 minutos, 95°C – 10 minutos e 40 ciclos: 95°C – 10 segundos / 60°C – 60 segundos. Amostras com *quantification cycle* (Cq) abaixo de 38 foram consideradas positivas.

Para genotipagem do YFV nas amostras positivas na triagem descrita acima, para amplificação de parte do genoma de YFV, para posterior sequenciamento, foram utilizados os iniciadores pan-flavivírus descritos por Patel et al (2013). Após a amplificação, as amostras positivas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 8%. Os fragmentos correspondentes ao tamanho esperado (260 pb) foram purificados e sequenciados. As sequências finais geradas foram

utilizadas em análises filogenéticas, para a conclusão da genotipagem (REZENDE *et al.*, 2019).

7.2.3 Sequenciamento e Inferências filogenéticas

5 O sequenciamento foi realizado em sequenciador automático ABI 3700 (Applied Biosystems). Cada amplicon foi enviado para sequenciamento pelo menos duas vezes com cada iniciador específico. Os demais passos para o sequenciamento foram realizados no laboratório da Plataforma de Sequenciamento de DNA Sanger/Fiocruz. O sequenciamento foi realizado em
10 parceria com os pesquisadores Jaqueline Germano de Oliveira e Pedro Augusto Alves, do Instituto René Rachou – Fiocruz Minas.

Os dados brutos do sequenciador foram analisados e as sequências finais montadas e visualizadas utilizando os programas SeqTrace (STUCKY, 2012), Phred (EWING *et al.*, 1998; EWING e GREEN, 1998) e Phrap (GORDON *et al.*,
15 1998), implementados na plataforma CENARGEN, da EMBRAPA (www.cenargen.embrapa.br), ou com o programa Geneious v9 (www.geneious.com). Para o estabelecimento das sequências finais, foram consideradas as bases que apresentaram valor de Phred, ou valor correspondente, de qualidade igual ou superior a 30.

20 Para início das análises, todas as sequências finais geradas foram comparadas com sequências depositadas no GenBank, utilizando os programas BLASTN (ALTSCHUL *et al.*, 1990; www.ncbi.nlm.nih.gov/blast). Sequências de nucleotídeos (nt) relativas às regiões analisadas dos genomas dos vírus detectados nesta pesquisa foram obtidas do GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov)
25 para análises comparativas. Os alinhamentos das sequências de nt foram feitos com o auxílio dos programas Clustal W implementado no pacote MEGA7 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016).

Os alinhamentos foram usados para construção de árvores filogenéticas. Previamente às análises filogenéticas, o programa DAMBE (XIA; XIE, 2001) foi
30 utilizado para a verificação de saturação nas sequências e para a verificação do sinal filogenético, juntamente com o programa TreePuzzle v5.3.

O melhor modelo evolutivo para cada conjunto de sequências de nt foi selecionado através do programa JModel Test (DARRIBA *et al.*, 2012). Em

seguida, árvores de máxima verossimilhança (ML – *maximum likelihood*) foram construídas com busca heurística, partindo de uma árvore construída pelo método de Neighbor-Joining (NJ). Perturbações foram feitas nas árvores, com o objetivo de se encontrar a melhor árvore, usando o algoritmo TBR (“tree bisection and reconnection”). Testes de bootstrap, com 1000 replicatas, foram realizados de forma a checar a confiabilidade dos ramos das árvores.

7.2.4 Detecção de anticorpos contra febre amarela

Com o objetivo de se conhecer o perfil sorológico dos pacientes com suspeita de febre amarela, foi realizado um teste imunocromatográfico para uma análise preliminar da presença de anticorpos anti-YFV IgM (Febre Amarela IgM ECO teste), seguindo as instruções do fabricante. Esses testes foram realizados em soro e LCR dos pacientes. Os testes foram gentilmente doados pela empresa ECO diagnóstica.

A metodologia de soroneutralização e titulação de anticorpos neutralizantes foi realizada segundo descrito por WIETEN e colab. (2016), com algumas modificações, descritas a seguir: Um total de $4,0 \times 10^5$ células Vero foram semeadas em placas de 6 poços, 24 horas antes da realização do experimento. Foi feita diluição seriada do soro a ser testado, na base 2, a partir da diluição 1:20 até a diluição 1:1280. Foram utilizados 150 PFUs do vírus vacinal YFV-17DD por poço. Trezentos microlitros foram utilizados para adsorção, em cada poço, amostras em duplicata, na monocamada de células Vero. No 5º dia, as monocamadas de células foram fixadas com solução de formaldeído a 10%, por 90 minutos. O formaldeído foi descartado e as monocamada celular foi corada com cristal violeta 1% (p/v), por 30 minutos e as placas de lise foram contadas.

7.2.5 Detecção de IgG anti-YFV pela técnica de ELISA

Esta técnica foi realizada em parceria com as pesquisadoras Ana Paula Dinis Ano Bom, Andrea Marques Vieira da Silva e Camilla Bayma Fernandes no Laboratório de Tecnologia Imunológica, Bio-Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Rio de Janeiro. Este ELISA *in-house* foi realizado nas amostras

do paciente do relato de caso da síndrome hepática tardia após febre amarela, descrito no capítulo 7.

Os anticorpos IgG anti-YFV foram investigados usando soros coletados nos dias 8, 36, 78, 83, 197 e 396 após o início dos sintomas pela técnica de ELISA *in-house*. A placa de 96 poços foi revestida com 2,5 µg/ml de YFV-17DD diluído em 50 µl/poço de tampão de revestimento (tampão de carbonato-bicarbonato, pH=9,6) e incubada durante a noite a 4° C. Depois, a placa foi lavada mecanicamente cinco vezes com 300 µl/poço usando tampão de lavagem (PBS pH=7,4 acrescido de Tween-20 0,05% – PBS/T). Todas as etapas de lavagem subsequentes foram realizadas como descrito acima. A placa foi então bloqueada com 100 µl/poço usando solução de bloqueio/diluente (BDS) (PBS/T, BSA a 0,05%, SFB a 3% e leite em pó desnatado a 5%), durante 1 hora a 37° C. As amostras de soro foram diluídas de 1:20 até 1:160. Para a curva padrão, o anticorpo *Anti-Yellow Fever Serum* (YF - NIBSC) foi diluído em duas diluições seriadas usando BDS, variando de 1 a 0,015 UI/ml. Após 1 hora à temperatura ambiente, a placa foi lavada e incubada com 100 µl/poço com anticorpo comercial HRP Anti-IgG Humano (BD Bioscience) diluído 1:3000 em BDS e incubado por 1 hora à temperatura ambiente. A placa foi lavada e foram adicionados 100 µl/poço de solução de substrato (TMB mais TM). A placa foi incubada por 15 min à temperatura ambiente e, em seguida, foram adicionados 100 µl /poço de solução de parada (H₂SO₄ 2M). As medições dos parâmetros foram realizadas a 450 nm, utilizando espectrofotômetro. Os valores de absorbância das diluições da amostra de soro foram plotados na curva padrão. Os títulos de anticorpos foram calculados utilizando o software SoftMax Pro® por regressão logística para quatro parâmetros e expressos em UI/ml, em relação ao antissor de referência.

7.2.6 Parâmetros bioquímicos analisados

Diferentes marcadores bioquímicos podem ser utilizados para avaliar o dano da infecção pelo YFV e o dano hepático da febre amarela. A ALT é uma enzima presente nos hepatócitos, principalmente no citoplasma e seus níveis sanguíneos aumentam quando há dano hepático (GOWDA *et al.*, 2009; LIMDI, 2003). Os valores normais de ALT variam de 10-40 U/L (ABIM, 2020). A AST

também está presente nos hepatócitos, majoritariamente nas mitocôndrias, mas também é encontrada em outros órgãos (GOWDA *et al.*, 2009; LIMDI, 2003). Os valores normais de AST variam de 10-40 U/L (ABIM, 2020).

5 Outro marcador de dano hepático é a bilirrubina, que é um produto produzido da quebra da porção heme da hemoglobina. A bilirrubina é absorvida pelos hepatócitos, conjugada com albumina (bilirrubina indireta) e excretada pela bile. Em caso de dano hepático, essa função fica comprometida, ocasionando em acúmulo de bilirrubina no sangue, que pode gerar icterícia (GOWDA *et al.*, 2009; LIMDI, 2003). Os valores normais de BT variam de 0,3 a 1,0 mg/dl e os valores
10 de bilirrubina direta BD variam de 0,1 a 0,3 mg/dl (ABIM, 2020). Os valores de BT são calculados pela soma dos valores da bilirrubina indireta, que é a bilirrubina insolúvel que chega até o fígado, e os valores da BD, que é sua forma solúvel, liberada na corrente sanguínea para eliminação pelo corpo (GOWDA *et al.*, 2009; LIMDI, 2003).

15 A fosfatase alcalina (ALP) é uma enzima com função de remover grupos fosfatos de diversas moléculas. É produzida no fígado e está presente nas células ao redor dos ductos biliares do fígado. Em casos de obstrução desses ductos, por colestase ou infiltrados, por exemplo, a concentração dessa enzima no sangue irá aumentar (GOWDA *et al.*, 2009; LIMDI, 2003). Os níveis normais
20 de ALP podem variar de 30-120 U/L (ABIM, 2020).

A Gama glutamil-transferase (GGT) é uma enzima envolvida na transferência de aminoácidos através da membrana celular, presente nos hepatócitos e vias biliares. É um marcador razoavelmente específico para medir danos hepáticos (GOWDA *et al.*, 2009; LIMDI, 2003).. Os valores normais de GGT variam de 9-
25 50 U/L (ABIM, 2020).

O teste de coagulação (avaliado pelo RNI – razão normalizada internacional) é uma medida para avaliação da via extrínseca de coagulação e também pode ser indicador de lesão hepática, já que o fígado é responsável pela produção de fatores de coagulação (GOWDA *et al.*, 2009; LIMDI, 2003). O RNI mensura a
30 velocidade de coagulação que se deseja avaliar, com o tempo de uma coagulação normal. Valores maiores do que 1 indicam que a velocidade de coagulação está mais lenta do que o esperado.

A ureia é formada no fígado como um dos principais produtos finais do metabolismo de substâncias contendo nitrogênio e é excretada pelos rins

(BAUM; DICHOSO; CARLTON, 1975). Os valores normais da ureia variam de 8 a 20 mg/dl (ABIM, 2020).

5 A Cr é um produto do metabolismo muscular, e como a ureia, é excretada pelos rins. É um fator relativamente estável e mais sensível para medir dano renal do que os níveis de ureia (BAUM; DICHOSO; CARLTON, 1975). Os valores normais de creatinina variam de 0,7 a 1,3 mg/dl (ABIM, 2020).

Com o intuito de se procura por marcadores de prognóstico/gravidade da febre amarela, foram analisados marcadores bioquímicos durante a fase aguda da infecção.

10 Para avaliação de dano hepático, foram analisados os marcadores ALT, AST, BT, BD, ALP, GGT, RNI e também os marcadores de dano renal ureia e Cr. Além dos exames bioquímicos, em alguns casos também foram avaliados valores obtidos a partir de hemograma dos pacientes, como hemoglobina, hematócrito, contagem de plaquetas, leucócitos, neutrófilos, eosinófilos e
15 linfócitos.

7.2.7 Análise estatística

Todas as análises estatísticas deste trabalho foram realizadas utilizando os programas SPSS v25 (ARMONK, 2017), GraphPad Prisma v7 e o software R,
20 considerando 95% de nível de significância.

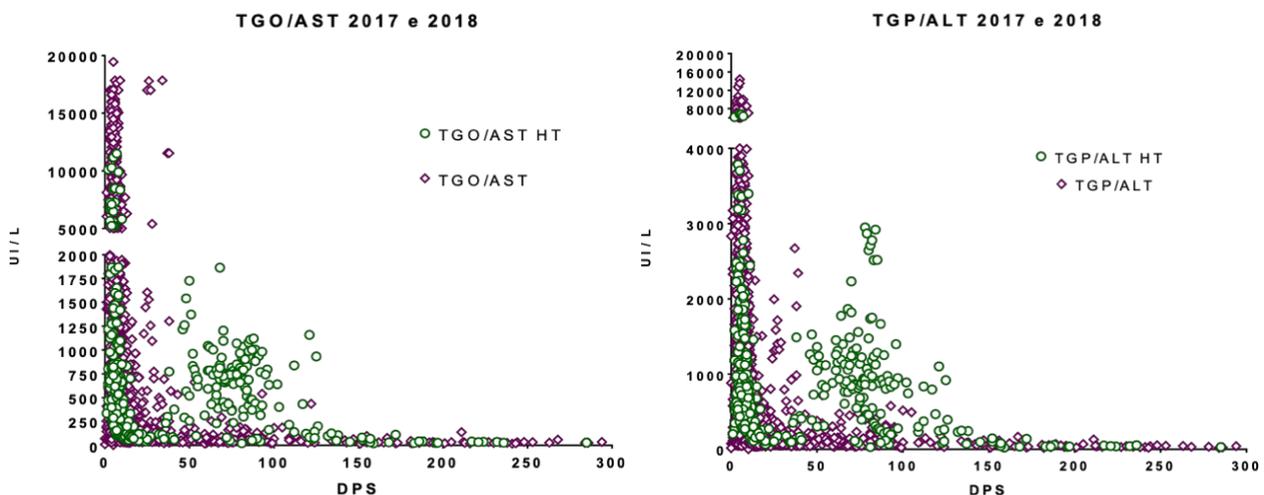
Para análises entre grupos, foram realizados teste t (teste de Student). Essas análises foram realizadas para determinação de prognóstico da febre amarela baseado na carga genômica viral, eficácia do antiviral Sofosbuvir, também mensurada pela carga genômica viral e na análise exploratório de fatores de
25 risco da hepatite tardia após febre amarela. Essa última análise foi realizada em colaboração com o Dr. Marcelo Pascoal Xavier, do Instituto René Rachou – Fiocruz/MG.

Para análises de variáveis que não cumpriam a premissa de possuírem distribuição normal, ou quaisquer outras premissas que impedissem a realização
30 de testes paramétricos, foram realizados testes não-paramétricos para comparação dos valores estabelecidos. Os testes não paramétricos utilizados serão detalhados na seção de resultados e discussão.

7.3 Resultados e Discussão

Dos 54 pacientes que receberam alta do HEM em 2017, 49 (90,74%) pacientes compareceram em pelo menos um retorno ambulatorial. Em 2018, dos 173 pacientes que receberam alta hospitalar, 144 (83,23%) retornaram a pelo menos um acompanhamento ambulatorial após a alta hospitalar.

Nos primeiros retornos (15, 30 e 45 dias após a alta hospitalar), os pacientes apresentaram melhora clínica e diminuição dos valores de AST e ALT (Figura 16). Porém, quando os pacientes voltaram para o retorno ambulatorial de aproximadamente 60 dias após a alta, os médicos do HEM observaram que um grupo de 38 pacientes (2017 n=9 e 2018 n=29), correspondente a aproximadamente 12% do total de pacientes atendidos no HEM em cada ano, reportou piora clínica, relatando intensa fadiga e fraqueza, além de 13 pacientes terem apresentado icterícia na data do retorno. Esses pacientes apresentaram valores das enzimas AST e ALT > 500 UI/L (Figura 16), os valores de RNI estavam alterados em alguns pacientes, mas esses valores não ultrapassaram 1,66, além de apresentarem alterações em outros marcadores de dano hepático e renal.



20 Figura 16: Valores de AST e ALT dos pacientes atendidos no HEM em 2017-2018. Comparação entre os níveis de AST e ALT em pacientes com quadro clínico de hepatite tardia após febre amarela e os pacientes que não apresentaram esse quadro clínico. É possível observar os elevados valores de AST e ALT dos pacientes com o quadro clínico da hepatite tardia após febre amarela (círculo verde), próximo aos 60 dias após a o início

dos sintomas. DPS: Dias pós sintomas. HT: hepatite tardia após febre amarela. TGO: transaminase glutâmico oxalacética. TGP: transaminase glutâmico-pirúvica.

Dentro da rotina hospitalar, os pacientes fizeram testes para exclusão de
5 outras possíveis causas de hepatite, como exames para agentes virais
hepatotrópicos (hepatites A, B e C), citomegalovírus, HIV, Epstein-Barr vírus,
Herpes Simplex vírus, Herpes Zoster vírus, toxoplasmose e para doenças
autoimunes. Todos os pacientes com esse quadro clínico foram negativos nos
10 exames indicativos de fase aguda de infecção, sendo descartada outra fonte
causadora da hepatite observada 60 dias após alta hospitalar. Esses dados
indicaram que o dano hepático poderia estar vinculado ao quadro de febre
amarela apresentado por esses pacientes.

Devido a alterações de enzimas hepáticas, este quadro clínico foi
denominado de “Hepatite Tardia Após Febre Amarela”. Segundo a equipe
15 médica do HEM, os critérios para inclusão no quadro clínico de hepatite tardia
após febre amarela eram: transaminases acima de 500 UI/L após a melhora
clínica e laboratorial (redução de AST abaixo de 250 UI/L), ALT > AST e elevação
das transaminases acima de 4x o valor mais baixo durante a fase de
convalescência da febre amarela. Outro trabalho que analisou pacientes do surto
20 de 2018-2019 no estado de SP e com quadro clínico semelhante a esse, definiu
hepatite tardia como um aumento dos valores das transaminases até seis meses
após a melhor clínica ou normalização da função hepática dos pacientes
(CASADIO *et al.*, 2020).

Como os valores de AST e ALT dos pacientes com hepatite tardia eram
25 visivelmente maiores durante a fase desse quadro clínico, foi feita uma análise
estatística entre esses valores nos grupos de pacientes. Valores de AST e ALT
durante a fase da hepatite tardia (fase de convalescência) eram maiores no grupo
que apresentou esse quadro clínico do que no grupo com pacientes que não
desenvolveram o quadro clínico da hepatite tardia ($p=0,003$).

30 Na busca por fatores de prognóstico para hepatite tardia ainda durante a
fase aguda da febre amarela, foi realizado um estudo exploratório das variáveis
bioquímicas em pacientes que desenvolveram ou não o quadro clínico da
hepatite tardia após febre amarela. Para isso, foram considerados os valores
coletados nos primeiros seis dias de internação dos pacientes, das variáveis

bioquímicas AST, ALT, ALP , GGT, BT, BD, hemoglobina (Hb), hematócrito (Ht), leucócitos, neutrófilos, plaquetas, RNI, PTTA, ureia e Cr de dois grupos de pacientes: (1) pacientes que evoluíram para o quadro de hepatite tardia após febre amarela (HT) e (2) pacientes que não apresentaram o desenvolvimento desse quadro clínico Como foram considerados todos os pacientes internados com febre amarela no HEM, nos anos de 2017 e 2018, que evoluíram para cura e que preencheram o critério de possuir ao menos quatro valores para as variáveis analisadas, dentro dos seis dias analisados.

Para análise das variáveis, foi calculada a mediana dos valores obtidos de cada variável, dentro de cada grupo, por dia de sintoma (Quadro 1). A partir desses valores foram realizados teste t, considerando as variáveis bioquímicas dentro de cada grupo (HT e GC) e por dia de internação (D1 a D6). Para cada variável foi plotado um gráfico, em que o eixo x representa os dias de sintomas e o eixo y representa os valores das medianas para a variável correspondente (Figura 17).

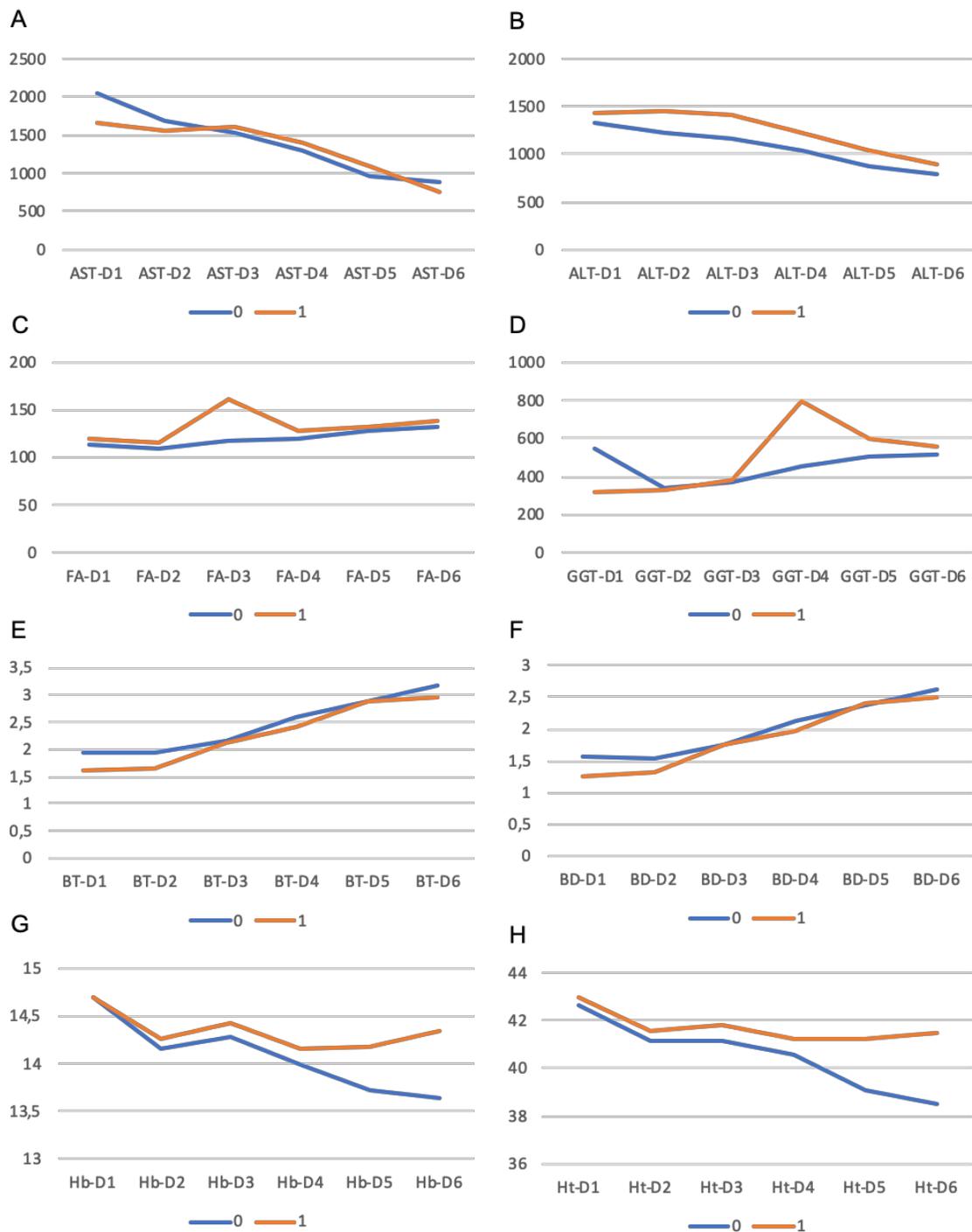
Quadro 1: Valores de medianas, por dia de internação, das variáveis bioquímicas analisadas no estudo de fatores de prognóstico durante fase aguda da febre amarela para desenvolvimento da hepatite tardia após febre amarela.

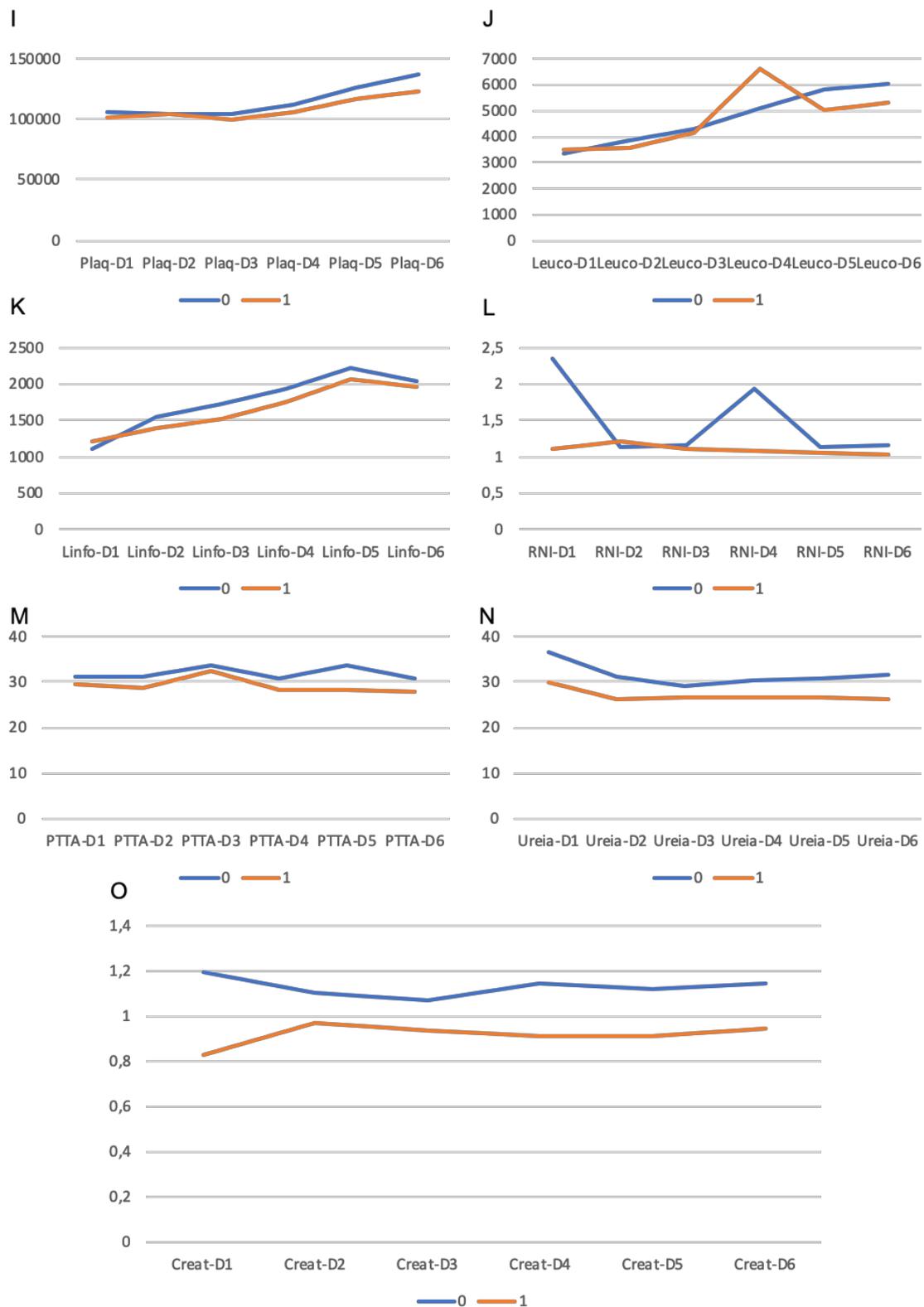
Variável	Desfecho	D1	D2	D3	D4	D5	D6
AST (10–40U/L)	SEM HT	2061	1688	1526	1297	958	882
	HT	1651	1568	1609	1404	1104	762
ALT (10–40U/L)	SEM HT	1323	1236	1166,9	1034,4	883,9	791,6
	HT	1440	1455	1421	1219	1040	896
febre amarela (30–120U/L)	SEM HT	113	109,74	117,46	119,42	128,38	132,33
	HT	120,3	114,7	161,7	128,8	133	138,8
GGT (9–50U/L)	SEM HT	548	342	375,4	450,4	505,2	517,3
	HT	319,2	327,5	385,6	798	598,6	558,3
BT (0,3–1,0 mg/dl)	SEM HT	1,939	1,942	2,16	2,611	2,871	3,159
	HT	1,596	1,648	2,125	2,416	2,882	2,96
BD (0,1–0,3 mg/dl)	SEM HT	1,566	1,546	1,738	2,113	2,358	2,634
	HT	1,252	1,33	1,738	1,978	2,404	2,485
Hemoglobina (14-18 g/dl)	SEM HT	14,695	14,156	14,285	13,999	13,725	13,641
	HT	14,697	14,261	14,435	14,162	14,189	14,352
HT (42 - 50%)	SEM HT	42,612	41,174	41,174	40,591	39,076	38,48
	HT	43,011	41,533	41,806	41,25	41,241	41,49
Leuco (4.000 - 11.000 mm ³)	SEM HT	3357	3877	4287	5066	5842	5999
	HT	3486	3576	4148	6589	5007	5319
Linfócitos (30% - 45%)	SEM HT	1104,5	1556,8	1733,9	1946,3	2226	2037,2
	HT	1201	1384	1517	1766	2068	1962
Plaq (150.000- 450.000 mm ³)	SEM HT	105477	104013	104252	111994	126031	137704
	HT	101889	104606	100377	105188	117296	123341
RNI	SEM HT	2,349	1,1249	1,157	1,941	1,1388	1,161
	HT	1,1046	1,1994	1,1026	1,0743	1,0661	1,0317
PTTA	SEM HT	31,355	31,17	33,57	30,79	33,86	30,73
	HT	29,64	28,73	32,26	28,14	28,36	27,96
Ureia (8–20 mg/dl)	SEM HT	36,76	31,23	29,04	30,22	30,96	31,83
	HT	29,95	26,2	26,79	26,77	26,45	26,23
Cr (0,7– 1,30mg/dl)	SEM HT	1,194	1,1	1,0661	1,147	1,1171	1,147
	HT	0,8297	0,969	0,939	0,91	0,914	0,945

Legenda: D = dia. GC = grupo controle. HT = grupo hepatite tardia após febre amarela. Pla_q = plaquetas. Leuco = leucócitos. Linfo = linfócitos. Cr = creatinina. Valores de referência apresentados em unidades do sistema internacional (SI), a seguir: Creatinina: 0,7–1,30 UI/L

5

Figura 17: Gráficos plotados a partir dos valores das medianas das variáveis consideradas na análise de fatores de prognóstico para hepatite tardia após febre amarela (eixo Y), por dia de sintomas (eixo x).





Legenda: as medidas dos valores dos eixos y são: AST, ALT, ALP e GGT = UI/L; BT, BD, ureia e creat = mg/dL; Hb = g/dL; Ht e Linfo = %; Leuco e Plaq = mm³. D = dia. 0 = grupo controle. 1 = grupo hepatite tardia após febre amarela. Plaq = plaquetas. Leuco = leucócitos. Linfo = linfócitos. Creat = creatinina.

5

Foi encontrada diferença entre os grupos HT e GC quando comparadas as medianas dos valores de Cr por dia de sintoma ($p=0,031$). Apesar dos grupos GC e HT apresentarem diferença estatística nos valores de Cr, o valores da mediana calculados ainda se encontram dentro da faixa de valores normais, que varia de 0,7 – 1,30 UI/L (ABIM, 2020).

Apesar da síndrome aguda renal já ter sido associada com o quadro grave da febre amarela, não se tem dados sobre sua frequência, fatores de risco e imunopatogênese (revisado por BURDMANN; JHA, 2017). Alguns estudos indicam que esse órgão é afetado durante a infecção pelo YFV, sendo um sítio de multiplicação viral (MONATH, 2001b). Um estudo nos EUA descreveu quatro casos de febre amarela após vacinação com a vacina YFV-17D-204. Os quatro pacientes analisados apresentaram disfunção renal e evoluíram a óbito. Nesses pacientes, os valores de creatinina estavam elevados e foram os seguintes: 362,4 $\mu\text{mol/L}$, 123,8 $\mu\text{mol/L}$, 114,9 $\mu\text{mol/L}$, 141,4 $\mu\text{mol/L}$ (MARTIN *et al.*, 2001). Apesar da doença ter sido provocada pelo YFV vacinal, o quadro clínico de febre amarela nesses pacientes foi similar a uma infecção natural causada pelo YFV silvestre. Esses dados mostram uma possível insuficiência renal causada pelo YFV, com aumento dos valores de creatinina durante a fase aguda da febre amarela. Outros estudos, como análise multivariada dos dados dos dois grupos de pacientes, são necessários para melhor entendimento desse novo quadro clínico descrito pelo nosso grupo de estudos da febre amarela em MG.

Para avaliação de presença do genoma viral e análise de marcadores bioquímicos de dano hepático dos pacientes com febre amarela internado no HEM em 2017 e 2018, no retorno ambulatorial dos pacientes era coletada nova amostra de sangue (para posterior separação de soro) e urina. A urina era geralmente coletada no 1º retorno do paciente. Amostras de soro e urina de 17 pacientes de 2017, incluindo oito pacientes do quadro de hepatite tardia, foram testadas por RT-qPCR. Foi possível detectar o genoma do YFV em amostras de urina de dois pacientes coletadas 68 e 66 dias após início dos sintomas, respectivamente, durante a hepatite tardia após febre amarela, (Tabela 8). Os dois pacientes haviam sido vacinados em janeiro de 2017 (14/01/2017 e 16/01/2017).

Tabela 8: Amostras de soro e urina testadas por RT-qPCR para YFV. Pacientes com amostra de urina e/ou soro coletadas durante o seguimento ambulatorial, durante surto de febre amarela em 2017

ID	urina retorno	soro retorno	data coleta	Dias após sintomas	AST	ALT
1*	pos	neg	24/03/2017	68	ND	ND
2*	pos	neg	29/03/2017	66	671	1489
3*	neg	neg	24/03/2017	66	613	1112
4*	neg	neg	24/03/2017	79	744	862
5*	neg	neg	17/03/2017	68	889	1427
6*	neg	neg	24/03/2017	76	381	584
7*	neg	neg	24/03/2017	77	448	440
8*	neg	neg	17/03/2017	68	633	1435
9	neg	neg	24/03/2017	80	NR	NR
10	neg	NR	24/03/2017	72	77	147
11	neg	NR	10/03/2017	54	73	132
12	neg	NR	17/03/2017	63	83	99
13	neg	NR	17/03/2017	49	NR	NR
14	neg	NR	24/03/2017	76	57	46
15	neg	NR	24/03/2017	62	94	234
16	neg	NR	10/03/2017	44	NR	NR
17	neg	NR	24/03/2017	61	NR	NR

* Pacientes classificados no quadro de hepatite tardia. Neg: resultado negativo no RT-qPCR qualitativo para YFV. Pos: resultado positivo no RT-qPCR qualitativo para YFV. ND: não disponível. NR: não realizado.

Além das amostras urina, foram testadas amostras de coágulo dos nove pacientes do grupo de hepatite tardia após febre amarela em diferentes fases da infecção da febre amarela. Sete amostras testadas foram positivas para o RNA do YFV. Os coágulos positivos são provenientes de amostras de sangue coletadas do 1º ao 32º DPS (Tabela 9).

Tabela 9: Amostras de coágulo testadas por RT-qPCR para YFV, do grupo que apresentou o quadro clínico da hepatite tardia após febre amarela.

ID	RT-qPCR coágulo	data coleta	DPS
1	pos	03/02/2017	19
2	pos	30/01/2017	10
3	pos	10/02/2017	23
4	pos	10/02/2017	32
5	pos	03/02/2017	25
6	pos	03/01/2017	1
7	neg	ND	ND
8	pos	03/02/2017	25
18	neg	31/03/2017	69

Legenda: DPS: dia após sintomas. Neg: resultado negativo no RT-qPCR qualitativo para YFV. Pos: resultado positivo no RT-qPCR qualitativo para YFV ND: não disponível. A numeração da ID é correspondente com a tabela 11.

Para investigar se o RNA viral encontrado na urina era de vírus vacinal ou selvagem, foi realizado o protocolo de genotipagem do YFV, seguindo a metodologia descrita neste presente estudo (tópico 6.2, REZENDE et al., (2019) (anexo III). A análise das sequências de nucleotídeos indicou que a sequências agruparam com outras sequências do YFV silvestre, no clado Sul-Americano I (Figura 18), indicando a presença do YFV silvestre nas amostras de urina analisadas.

A persistência do RNA do YFV já havia sido indiretamente demonstrada em pacientes naturalmente infectados que tiveram RNA detectado na urina até 45 dias após o início dos sintomas, durante a fase de convalescença da febre amarela (BARBOSA et al., 2018; REUSKEN et al., 2017). Amostras de urina coletadas dos pacientes de 2018 ainda serão testadas, para avaliação da presença e persistência de RNA de YFV em pacientes com e sem hepatite tardia. Apesar de estudos sobre investigação de RNA do YFV em coágulos serem escassos, a presença do RNA de DENV já foi demonstrada em coágulos de doadores de sangue previamente positivos para DENV (AÑEZ et al., 2016).

Embora a doença causada pelo YFV seja caracterizada por um período agudo de infecção seguido pela fase de convalescência, nesse grupo de 38 pacientes foi observado a hepatite tardia, representando 12,5% do total de casos de pacientes atendidos durante a fase aguda no HEM, em 2017 e 2018.

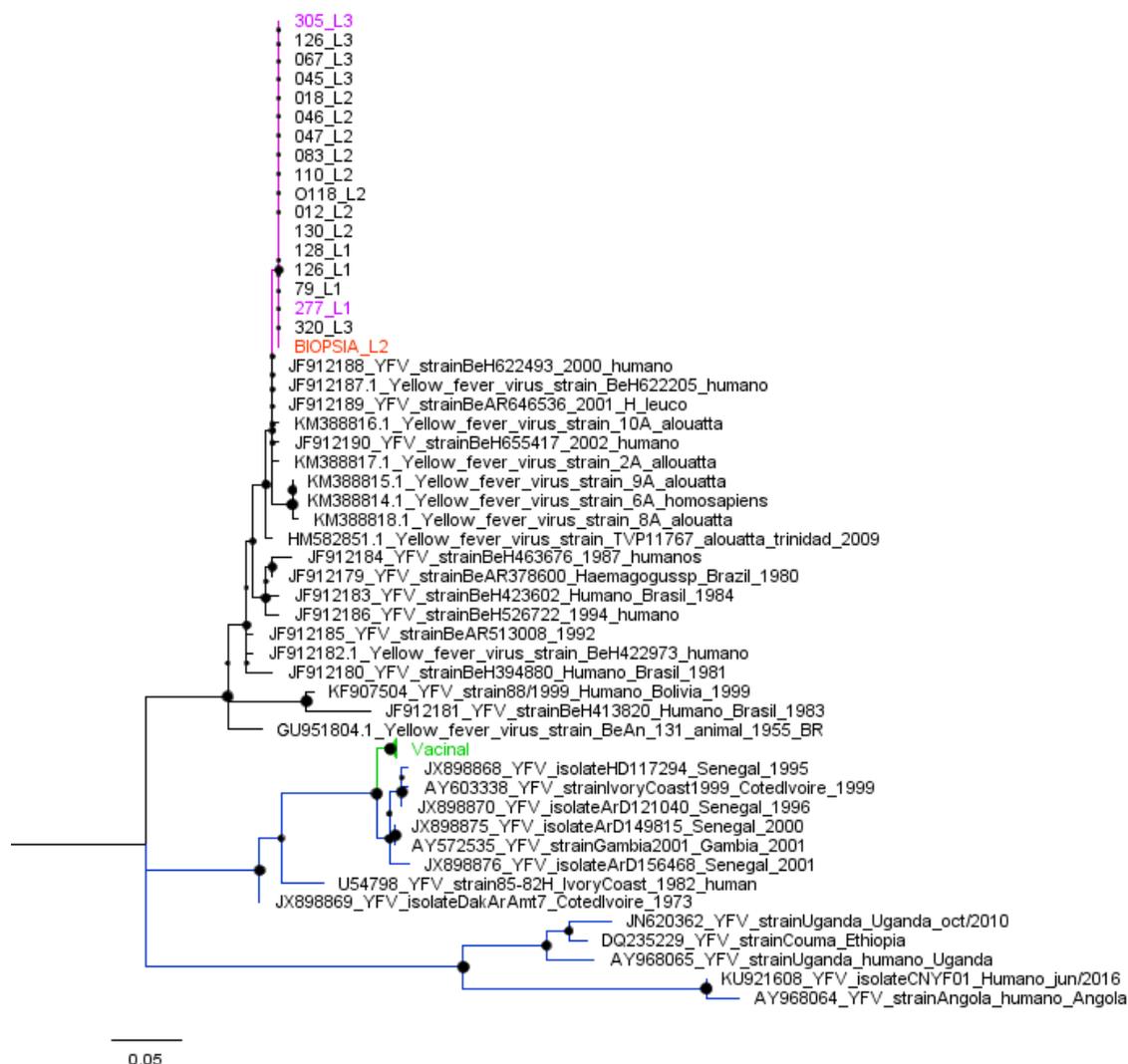
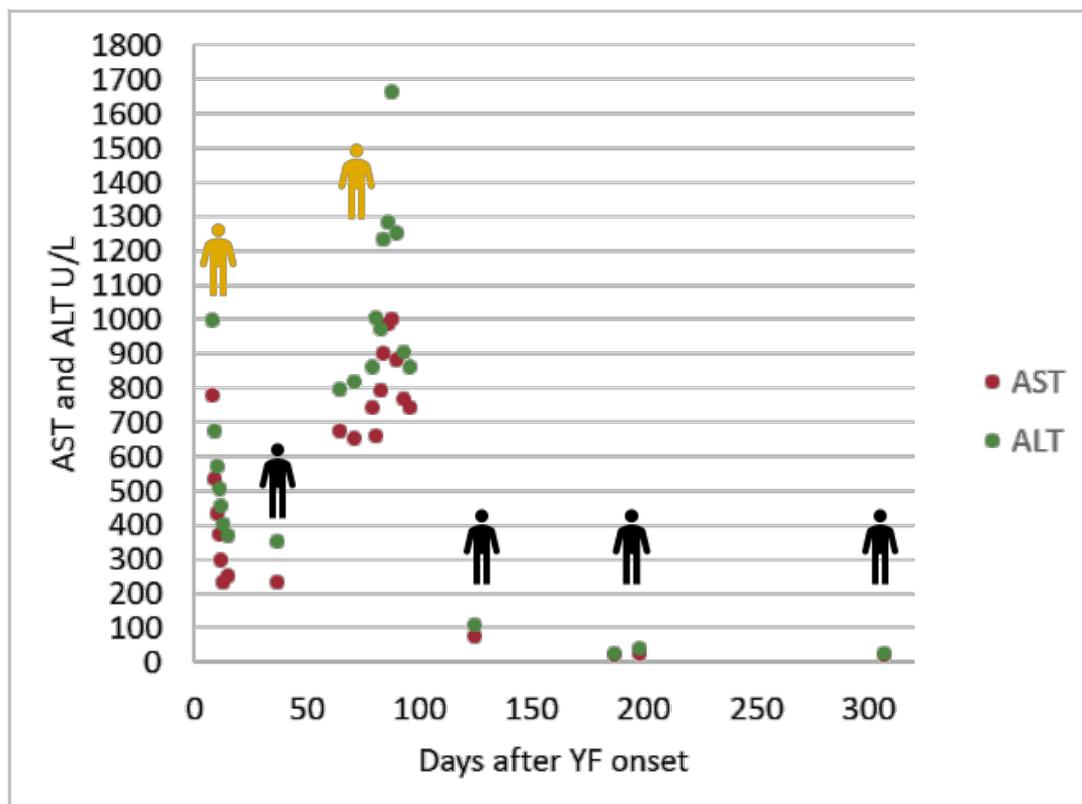


Figura 18: Inferências filogenéticas de YFV (213 nt) de amostras sequenciadas a partir de soro, urina e biópsia de paciente atendidos no HEM em 2017. As análises foram feitas pelo método de Máxima Verossimilhança e modelo de substituição Tamura Nei, usando o programa ClustalW, implementado no MEGA7. A árvore foi editada usando o programa FigTree. As amostras de urina YFV positivas estão representadas em vermelho. A amostra da biópsia YFV positiva está representada em laranja. O clado das amostras sequenciadas neste trabalho está indicado em rosa. Os clados das demais amostras brasileiras estão indicadas em preto. O clado das sequências vacinais foi colapsado e está representado em verde. Amostras africanas estão indicadas em azul. Valores de bootstrap estão representados pelo tamanho dos círculos. A escala representa a taxa de substituição de nt por sítio.

15 Dentre os pacientes que desenvolveram o quadro clínico da hepatite tardia, foi possível avaliar melhor o quadro clínico, um fragmento de biópsia hepática e

biomarcadores da resposta imunológica de um deles. O paciente 4 (Tabela 10) apresentou o início dos sintomas da febre amarela em 5 de janeiro de 2017, sendo admitido no HEM no dia 11 de janeiro de 2017. Neste dia (7º DPS), o paciente apresentava-se icterício, com elevados níveis de bilirrubina, AST e ALT (Figura 19 e Tabela 10). Este paciente foi apresentando melhora clínica progressiva e teve alta no dia 19 de janeiro de 2017 (15º DPS). Dois dias antes da alta, o paciente apresentava diminuição dos níveis de bilirrubina, AST e ALT (Figura 19 e Tabela 10).



10

Figura 19: Valores de AST e ALT do paciente 4, durante o curso da infecção e do seguimento ambulatorial após a alta hospitalar. O eixo X representa os dias após o início dos sintomas do paciente. O eixo Y representa os valores de AST e ALT em U/L. Os bonecos em amarelo representam quando o paciente apresentou icterícia.

15

20

Tabela 10: Evolução temporal do quadro clínico durante febre amarela aguda e fase da hepatite tardia após febre amarela do paciente 4.

Timeline	Testes Laboratoriais (seguido pelos valores normais /unidade) #										
	AST	ALT	BT	BD	ALP	GGT	RNI	Ureia	Cr	CK	
Mês/ DPS	10–40 U/L	10–40 U/L	0,3– 1,0 mg/dl	0,1– 0,3 mg/dl	30– 120 U/L	9–50 U/L*		8–20 mg/dl	0,7– 1,30 mg/dl*	55 -170 U/L*	
4	4560	3710	ND	ND	ND	ND	ND	118	2,17	ND	
Jan	7 ^A	781	999	9,8	8,9	139	495	1	85,1	2	42
	8 ^B	537	674	9,5	8,4	144	855	0,88	47	1,3	ND
	9	434	571	9,1	8	154	9399	ND	53,6	1,4	ND
	10	375	508	8,3	7,2	145	1057	1	39,1	1,2	38
	11	297	456	6,7	5,8	159	1103	ND	ND	ND	ND
	12	235	401	5,2	4,4	173	1074	ND	40,2	1,4	ND
14 ^C	253	371	5,1	4,2	149	869	1	39,7	1,2	ND	
Fev	36 ^D	233	353	1,5	0,9	147	530	1,02	33,5	1,5	ND
Mar	64	677	797	10,4	6,5	142	355	1	44	1,3	ND
	70	655	819	13,9	7	485	401	1,06	51	1,2	ND
	78 ^E	744	862	7,2	6,2	210	431	1,03	43,5	1,4	ND
	80 ^F	660	1007	6,5	5,5	164	624	1	ND	ND	ND
	82 ^G	793	973	6,4	5,5	163	447	1,24	ND	ND	ND
	83 ^H	903	1235	6,1	5,2	171	572	1	ND	ND	ND
Abr	85 ^I	987	1285	5,7	4,9	182	448	1	ND	ND	ND
	87	1002	1666	6,5	5,4	193	444	1	ND	ND	ND
	89 ^J	883	1252	5,9	4,9	192	525	1	48	1,4	ND
	92	769	904	3,8	3,3	207	554	1	51,4	1,4	ND
	93	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Mai	95	743	863	3,6	3,1	229	547	ND	45	1,3	ND
	124	78	108	1,3	1	139	199	1	34,9	1,2	ND
Jul	186	21	28	0,84	0,2	ND	71	ND	44	1,05	ND
	197 ^K	27	39	1	0,4	65	72	1	43,1	1,2	ND
Nov	306 ^L	22	26	0,8	0,2	72	ND	1,12	37,1	1,1	ND

DPS: dia após primeiros sintomas da febre amarela. ND: não disponível. AST: aspartato aminotransferase, ALT: alanina aminotransferase, ALP: fosfatase alcalina, GGT: gamma glutamil transferase, BT: bilirrubina total, BD: bilirrubina direta, Cr: Creatinina, CK: Creatina quinase, RNI: razão normalizada internacional para tempo de protrombina. Os dias que o paciente ficou hospitalizado estão em destaque azul. O período que o paciente apresentou valores elevados de AST e ALT estão em destaque verde e período que o paciente apresentou icterícia estão destacados de amarelo. **A:** anti-HIV-1 e anti-HIV-2 não reagente. **B:** anti-YFV IgM e IgG reagente; anti-DENV IgM não reagente. **C:** anti-YFV IgM reagente. Alta hospitalar. **D:** anti-YFV IgG reagente. **E:** Soro e urina foram testados por RT-qPCR para

5

10

YFV (DOMINGO *et al.*, 2012) e os resultados foram negativos. Soro foi testado e foi negative para DENV (ALM *et al.*, 2015; SANTIAGO *et al.*, 2013), CHIKV (PASTORINO *et al.*, 2005), e pan-flavivirus (PATEL *et al.*, 2013). Anti-YFV IgM e IgG reagente. Anticorpos neutralizantes anti-YFV foram detectados por PRNT₈₀ (até a diluição 1:80) (WIETEN *et al.*, 2016). Paciente
5 foi rehospitalizado e exames de tomografia computadorizada indicaram discreta hepatomegalia, sem obstrução biliar. **F:** Testes não reagentes para anti-smooth muscle, anti-mitochondrial, anti-nuclear HEP2, anti-neutrophil cytoplasm antibodies (P-ANCA and C-ANCA). Total IgG = 962 mg/dL (6417.6 µmol/L) (normal range: 800–1500 mg/dL), erythrocyte sedimentation rate = 41 mm/hour (normal range for male: 0 – 15 mm/hour),
10 serum copper=138 µg/dL (21.72 µmol/L) (normal range= 100–200 µg/dL), tree T4=0.98 ng/dL (12.61 pmol/L) (normal range: 0.8–1.8 ng/dL), thyroid-stimulating hormone =2.53 µU/mL (normal range: 0.5–4.0 µU/mL), ferritin 7.46 ng/mL (16.76 µg/L) (normal range for male: 24–336 ng/mL), and ceruloplasmin= 29,1mg/dL (2.17 µmol/L) (normal range: 25–43 mg/dL). **G:** Testes não-reagentes para: anti HIV-1 e HIV-2; anti-HCV; anti-HAV IgM e IgG; anti-Epstein Barr não-reagente IgM e IgG; anti-toxoplasma IgM. Reagente para anti-toxoplasma IgG. **H:** Anti-YFV IgM e IgG reagente. Anticorpos neutralizantes anti-YFV foram detectados por PRNT₈₀ (até a diluição 1:80) (WIETEN *et al.*, 2016). **I:** Ultrassonografia indicou aumento inespecífico da ecogenicidade periportal e hepatomegalia leve. **J:** Testes não-reagentes para IgM anti-HBc, total anti-HBc, e HBsAg. A ressonância magnética de Colangio indicou esplenomegalia leve. **K:** anti-YFV IgG reagente. **L:** anti-YFV IgM e IgG reagente. # Os valores de referência normal são apresentados de acordo com os valores de referência de testes de laboratório da American Board —janeiro 2020 (ABIM, 2020). *valores de referência para o sexo masculino. Valores de referência estão apresentados em unidades do sistema internacional (SI), calculado pela multiplicação de valores em unidades convencionais por fator de conversão (CF), a seguir: AST: 10–40 UL x 0.0166 (CF) = 0.17-0.66 microkatal units/L, ALT: 10–40 UL x 0.0166 (CF) = 0.17- 0.66 microkatal units/L, Tbil: 0.3–1.0 mg/dL x 17.1 (CF) = 5.13- 17.1 µmol/L, Dbil: 0.1–0.3 mg/dL x 17.1 (CF) = 1.71 – 5.13 µmol/L, AP: 30–120 U/L x 0.01667 (CF) =0.5 – 2.0 microkatal units/L, GGT: 9–50 U/L x 0.016667 (CF) = 0.15 – 0.83 microkatal units/L, Urea: 8–20 mg/dL x 357.146 (CF) = 2857.14 – 7142.86 µmol/L, Creatinine: 0.7–1.30 x 88.42 (CF) = 61.89–114.95 µmol/L, CK: 55–170 U/L x 0.01667 (CF) = 0.92–2.83 microkatal units/L, total IgG:800–1500 mg/dL x 6.67 (CF) = 5336.9 – 10,006.7 µmol/L, ferritin: 24–336 ng/mL x 1.0 (CF)= 24–336 µg/L, free T4= 0.8–1.8 ng/dL x 12.86 (CF) = 10.29 – 23.16 pmol/L, ceruloplasmin= 25–43 mg/dL x 0.6667 (CF) = 1.86 – 3.20 µmol/L, serum copper: 100–200 µg/dL x 0.157 (CF)= 15.74 – 31.47
25
30
35 µmol/L).

Tabela 11: Contagem de hemoglobina e células sanguíneas durante febre amarela aguda e hepatite tardia após febre amarela do paciente 4.

Timeline Mês/DPS	Testes Laboratoriais (seguido pelos valores normais /unidade) ##					
	Plaquetas (150.000- 450.000 mm ³)	Hemoglobina (14-18 g/dl*)	Hematócrito (42 - 50%*)	Leucócitos (4.000 - 11.000 mm ³)	Neutrófilos (2.000 - 8.250 mm ³)	Linfócitos (30% - 45%)
4	73.000	17	50	4250	2.550	34,0
7	88.000	13,7	41,8	2.900	1.711	21,0
8	136.000	13,1	40,2	4.800	2.688	28,0
9	142.000	12,6	ND	4.700	ND	ND
10	143.000	12,3	38,1	4.600	2.944	31,3
11	152.000	11,8	36,7	4.400	2.860	27,0
12	174.000	11,8	36,5	5.500	3.850	24,0
14	178.000	12,5	39,6	6.300	4.473	21,0
Fev 36	158.000	11,6	34,8	4.700	2820	29,0
64	171.000	14,2	ND	ND	ND	ND
70	189.000	14,8	ND	ND	ND	ND
Mar 78	189.000	13,4	39,3	4.900	3.479	25,0
82	144.000	12,9	38,5	5.100	2.805	35,0
89	153.000	14	41,1	7.400	5.180	20,0
Abr 92	131.000	12,2	35,1	3.400	1.938	31,0
93	105.000	13,5	38,8	3.700	2.183	32,0
95	164.000	13,2	38,6	4.900	2.989	30,0
Mai 124	185.000	13,3	37,9	7.000	4.690	26,0
Jul 186	150.000	16,5	46,8	7.280	ND	28,8
197	159.000	17,7	52,3	7.600	5.092	26,0
Nov 306	145.000	17,4	49,9	7.000	4.760	25,0

DPS: dia após primeiros sintomas da febre amarela. ND: não disponível. Os dias que o paciente ficou hospitalizado estão em destaque azul. O período que o paciente apresentou valores elevados de AST e ALT estão em destaque verde e período que o paciente apresentou icterícia estão destacados de amarelo. ##Os valores de referência normal são apresentados de acordo com os valores de referência de testes de laboratório da American Board —janeiro 2020 (ABIM, 2020). *valores de referência para o sexo masculino. Valores de referência estão apresentados em unidades do sistema internacional (SI), calculado pela multiplicação de valores em unidades convencionais por fator de conversão (CF), a seguir: platelet: 150,000-450,000 mm³ x 0.001 (CF) = 150-450 x 10⁹/L, hematocrit: 41-53% x 0.01 (CF) = 0.41-0.53 fraction, leukocyte: 3,500 - 10,000 mm³ x 0.001 (CF) = 3.5 -10 x 10⁹ cell/L, and neutrophil: 1,600 – 8,000 mm³ x 1.0 (CF) = 1,600 – 8,000 cell/ μ l.

15

No momento em que o paciente 4 teve alta hospitalar, o diagnóstico da febre amarela se baseava apenas no quadro clínico. Como o paciente morava

em uma área com surto de febre amarela, o paciente foi orientado e vacinado com a vacina YF-17DD (Bio-Manguinhos, FIOCRUZ), no dia seguinte após a alta hospitalar (15º DPS). Os testes de diagnóstico de rotina realizados pelo LACEN/FUNED confirmaram posteriormente a infecção pelo YFV através da
5 detecção de IgM anti-YFV e isolamento viral seguido de teste de imunofluorescência indireto. Essa amostra de soro foi não reagente para IgM anti-DENV (Tabela 10).

No 36º DPS, o paciente 4 retornou ao HEM. Os exames laboratoriais hepáticos indicaram a persistência de níveis elevados de AST, ALT, ALP (níveis
10 semelhantes aos observados na alta hospitalar), GGT, BT, BD, ureia e Cr (Tabela 10 e Tabela 11). O paciente recebeu alta e foi aconselhado a retornar ao HEM dentro de um mês. No 64º DPS, o paciente procurou atendimento médico em um hospital local (Caratinga). Os exames laboratoriais indicaram lesão hepática, com aumento acentuado dos níveis de AST, ALT, BT e BD
15 (Tabela 10 e Tabela 11). No 78º DPS o paciente foi encaminhado para internação no HEM. Durante o tempo em que o paciente foi reinternado no HEM (78º a 96º DPS), ele apresentou icterícia persistente, ALT, AST, ALP, GGT, BT e BD alterados (Tabela 10 e Tabela 11). Como o paciente apresentou melhora no perfil clínico (Tabela 10 e Tabela 11), ele recebeu alta no 96º DPS e foi
20 aconselhado a retornar em 15 dias.

Quando o paciente 4 foi reinternado no HEM, soro e urina coletados 78 DPS foram testados para presença de YFV e foram negativos (Tabela 10 – paciente 4). Foi realizada a coleta de biópsia hepática 93 DPS e um fragmento dessa biópsia hepática foi utilizado para investigar a presença de RNA do YFV.
25 A amostra testou positivo para a presença de RNA de YFV por RT-qPCR qualitativo e quantitativo (364 cópias genômicas/grama/fígado). Foram feitas tentativas de padronização de uma PCR para investigação de antígeno na amostra de biópsia desse paciente. Porém os resultados não foram satisfatórios. Foram utilizadas diferentes metodologias, combinações de iniciadores e de
30 ciclos de PCR, e ainda assim não foi detectada amplificação no controle positivo utilizado (raspado células de células infectadas com o YFV-17D). Por esse motivo o PCR para investigação de antígeno não foi realizado com o RNA da biópsia desse paciente.

A análise filogenética do sequenciamento de nucleotídeos (com base na sequência parcial do gene NS5) indicou o agrupamento do vírus dentro dos genótipos sul-americanos, demonstrando a presença do YFV silvestre na biópsia de fígado do paciente 4 (Figura 20).

5

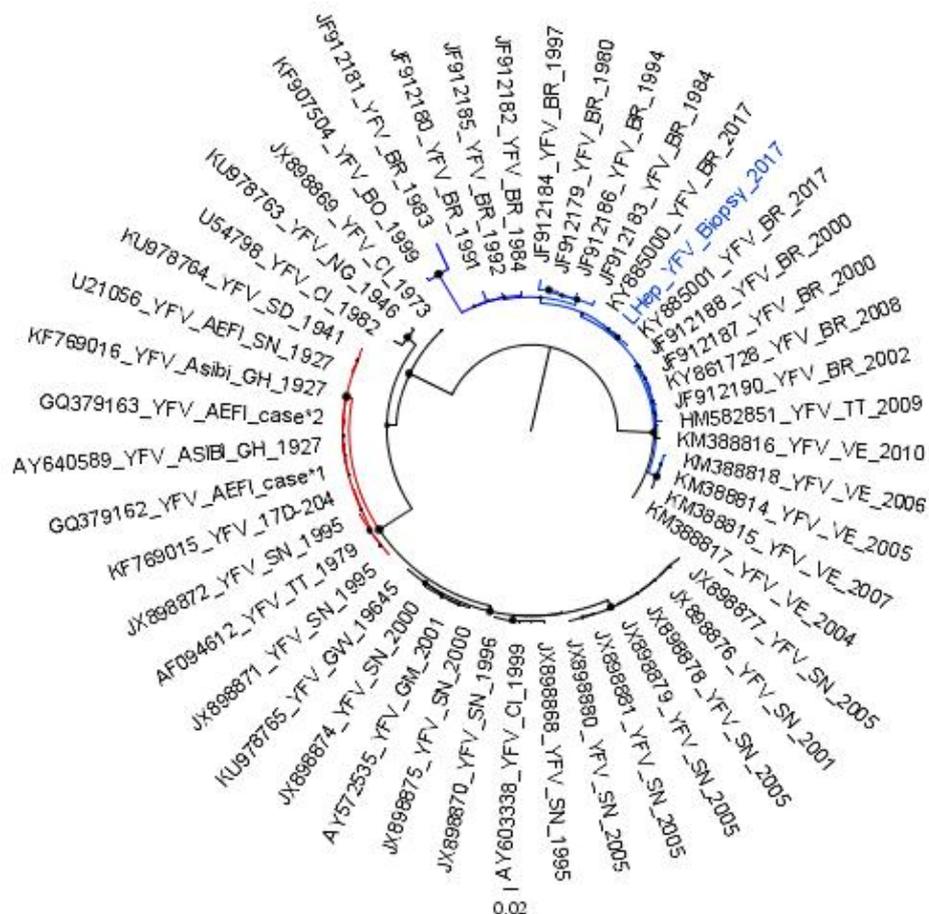


Figura 20: Análise filogenética das sequências de RNA do YFV na biópsia hepática coletada no 93º dia após o início dos sintomas de febre amarela. É mostrada uma sub-
 10 árvore da árvore de máxima verossimilhança inferida usando sequências do YFV (211 nucleotídeos). As linhagens de YFV dos genótipos sul-americanos são mostradas em azul. O YFV detectado na biópsia hepática (destacado em azul) é agrupado no clado sul-americano, além das cepas da vacina e das cepas relacionadas à vacina (vermelho). As linhagens do YFV pertencentes aos genótipos africanos são mostradas em preto, exceto as amostras vacinais e as amostras relacionadas aos casos de reação adversa
 15 vacinal, que estão coloridas em vermelho. As linhagens do YFV estão identificadas pelo número de identificação do Genbank e pelo ano em que foram detectadas. Os valores de bootstrap são representados por círculos desenhados em escala, nos nós. A escala indica substituição de nucleotídeos por sítio. A árvore foi reconstruída usando o modelo de substituição de nucleotídeos Kimura-2 parâmetros, com distribuição gama (quatro

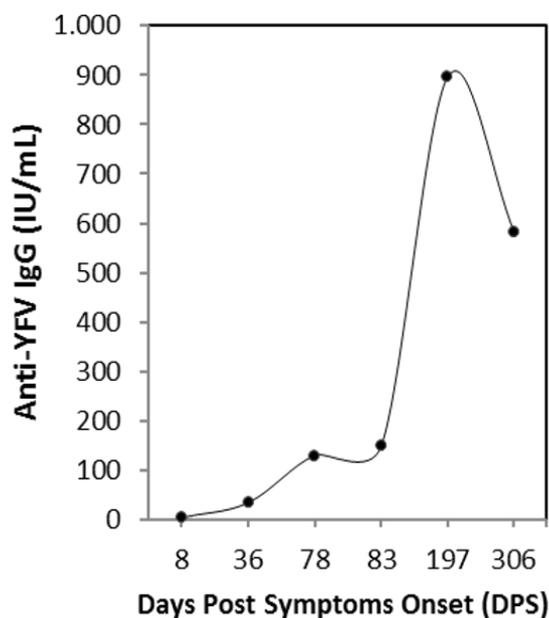
categorias), e as análises foram realizadas usando MEGA7 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016).

Essa mesma biópsia foi enviada para o colaborador do grupo de estudos da febre amarela, Dr. Marcelo Pascoal Xavier, que realizou análises histológicas e imunohistoquímicas. As análises histológicas revelaram infiltrado mononuclear lobular, predominantemente nas zonas 2 e 3 dos ácinos hepáticos e degeneração vacuolar. As análises imunohistoquímicas demonstraram reatividade hepática ao anti-YFV em pequenos focos, principalmente nas zonas 2 e 3 dos ácinos hepáticos (REZENDE et al., 2019). Análises de biópsia de fígado de nove pacientes com febre amarela atendidos no Hospital da Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e que apresentaram quadro clínico semelhante ao descrito neste trabalho foram analisadas durante a fase da hepatite tardia e também apresentaram alterações histológicas. Essas biópsias mostraram necroinflamação lobular, com muitos focos de necrose irregular, apoptose e degeneração de hepatócitos hidrópicos em todas as zonas lobulares, juntamente com extensa hiper celularidade e hipertrofia das células de Kupffer (CASADIO *et al.*, 2020). As mesmas amostras foram positivas para o antígeno do YFV nas análises imunohistoquímicas, principalmente no citoplasma das células de Kupffer (CASADIO *et al.*, 2020).

A análise de quimiocinas, citocinas e fatores de crescimento séricos foram realizadas pelo grupo de pesquisa coordenado pela Dra. Andréa Teixeira, também colaborador do grupo de estudos da febre amarela. As análises sugeriram um aumento maciço de muitos mediadores solúveis no 36º DPS da febre amarela e uma redução relevante na maioria dos biomarcadores na última fase (ao mesmo tempo em que os níveis de transaminases e bilirrubinas atingiram a normalidade). Esses resultados podem indicar que perfis alterados de mediadores reguladores inflamatórios circulantes estão associados ao quadro clínico descrito (REZENDE et al., 2019).

Amostras de soro do paciente 4 coletadas nos 8º, 78º, 83º e 306º DPS foram testadas e positivas para a presença de IgM anti-YFV (teste imunocromatográfico). Amostras de soro coletadas nos 8º, 36º, 78º, 83º, 197º e 306º DPS foram testadas e positivas para a presença de IgG anti-YFV (ELISA) (Figura 21). Os soros coletados no 8º, 78º e 83º DPS foram testados por PRNT.

Os soros coletados no 78º e 83º DPS também apresentaram resultados positivos quanto à presença de anticorpos neutralizantes anti-YFV: PRNT₈₀ até diluição de soros 1:80.



5

Figura 21: Níveis séricos de IgG anti-YFV do paciente 4. Os anticorpos IgG anti-YFV foram investigados por ELISA *in-house*, utilizando diferentes amostras de soro coletadas no 8º, 36º, 78º, 83º, 197º e 306º dia após o início dos sintomas. Os títulos de anticorpos foram calculados usando o software SoftMax Pro® por regressão logística para quatro parâmetros e expressos em UI/ml em relação ao antissoro de referência.

10

Após 30 dias da alta médica da segunda internação (124º DPS) os exames laboratoriais indicaram uma diminuição significativa nos níveis de AST, ALT, ALP, GGT, BT e BD, e o paciente 4 foi aconselhado a retornar em 45 dias (Tabela 10 e Tabela 11). Os testes hepáticos realizados no 186º DPS em um hospital local (Caratinga) indicaram níveis normais ou levemente elevados de marcadores de lesão hepática (Tabela 10). O paciente retornou ao HEM (197º DPS) e relatou a persistência de sintomas e dificuldades para trabalhar, mas apresentou níveis normais de AST e ALT (Tabela 10). O paciente foi liberado, retornou no 306º DPS ao HEM e os exames hepáticos estavam normais. Dada a melhora do estado clínico (Figura 19, Tabela 10 e Tabela 11), o paciente recebeu alta hospitalar.

15

20

Esse estudou relatou um caso de um paciente com febre amarela aguda típica, seguida de hepatite tardia após febre amarela. Este caso foi caracterizado por níveis mais elevados de ALT em relação aos níveis de AST, com valores semelhantes ou até mais altos do que os observados durante a primeira hospitalização (6º DPS da febre amarela), indicando um dano elevado e persistente nas células hepáticas. Em contraste com dois casos anteriores de hepatite tardia dois meses após o início da febre amarela (DENIS *et al.*, 2019), o paciente descrito aqui era sintomático, apresentou aumento nos valores de bilirrubina total e direta e, diferente dos casos de hepatite tardia descritos por Casadio *et al.* (2020), o paciente neste trabalho também apresentou icterícia. Quando o paciente foi reinternado, alguns testes foram realizados para investigar a causa da hepatite tardia após febre amarela. Os testes de laboratório descartaram a ocorrência de hepatite autoimune, doenças inflamatórias do fígado, doença metabólica do fígado ou novas infecções por agentes hepatotrópicos. Foi possível analisar uma biópsia hepática (coletada no 93º DPS) e foi detectado antígenos do YFV (REZENDE *et al.*, 2019) e RNA do YFV silvestre. Infelizmente, foi possível realizar sequenciamento do genoma completo do YFV ou realizar testes para detectar partículas infecciosas na biópsia hepática, devido à escassez de amostra biológica. No entanto, os resultados até o momento sugerem a persistência do YFV no fígado até três meses após o início da febre amarela. A ausência de RNAmia (indicando a falta de viremia) e a presença de IgM e IgG anti-YFV a partir do 8º dia dos primeiros sintomas são consistentes com o padrão esperado para febre amarela, com IgM aparecendo após uma semana do início da doença (MONATH, 2001b) e os níveis de IgG aumentando alguns dias depois (WAGGONER; ROJAS; PINSKY, 2018).

Os dados do presente estudo, juntamente com outros estudos (CASADIO *et al.*, 2020; DENIS *et al.*, 2019; FRANCIS *et al.*, 1972), reforçam a ocorrência de hepatite tardia após a infecção pelo YFV. Aqui, esse quadro clínico foi concomitante ao aumento das transaminases séricas (ALT e AST) e bilirrubina, o reaparecimento da icterícia, a persistência de antígenos do YFV e RNA do YFV no fígado e características histopatológicas indicando dano contínuo nas células hepáticas. Apesar do rebote, as transaminases e a bilirrubina permaneceram elevadas por pelo menos 124 dias após o início dos sintomas da febre amarela.

Além disso, a ocorrência de hiporexia, astenia e adinâmia foi relatada por pelo menos 197 dias após o início da febre amarela.

Esses resultados trazem novos dados sobre o curso clínico da febre amarela e destacam a necessidade de um acompanhamento prolongado do paciente, especificamente em relação aos cuidados de suporte hepático e ao monitoramento da função hepática. São necessários mais estudos, incluindo os demais pacientes que apresentaram o quadro clínico da hepatite tardia após febre amarela, para melhor entendimento da patogênese da hepatite tardia, para investigar o papel da possível persistência viral e respostas imunes que podem causar a hepatite tardia após a febre amarela. O isolamento e sequenciamento de vírus a partir de amostras de pacientes com e sem o quadro da hepatite tardia podem trazer informações sobre a genética, a biologia e a dinâmica evolutiva do YFV nesses pacientes.

15

8 CONCLUSÕES FINAIS

Aqui serão apresentadas, de forma conjunta, todas as conclusões finais do trabalho.

- 5 ∴ O RNA de YFV foi detectado em pacientes com febre amarela do 1º até o 25º dia após o início dos sintomas.
- ∴ Em alguns casos, a janela de detecção molecular de YFV ultrapassou 10 dias de sintomas, podendo auxiliar no diagnóstico laboratorial de febre amarela, nesses casos.
- 10 ∴ A detecção do genoma do YFV foi possível em pacientes que já apresentavam IgM anti-YFV reagente.
- ∴ O RNA do YFV foi detectado na urina do 1º ao 32º de infecção, durante a fase aguda da febre amarela.
- ∴ Foram observados valores de carga genômica viral do YFV de 15,75
- 15 cópias genômicas/ml a $5,8 \times 10^9$ cópias genômicas/ml, em pacientes de 2017 e de 2018.
- ∴ Análises estatísticas não demonstraram diferença nos valores de carga genômica do YFV entre pacientes com os desfechos de alta e óbito.
- ∴ Amostras de LCR de quatro pacientes de óbito de 2018 foram positivas
- 20 em RT-qPCR para YFV, com carga genômica viral variando de $1,8 \times 10^4$ a $5,2 \times 10^4$, indicando uma possível presença do YFV no LCR.
- ∴ Duas amostras de LCR, coletadas *posts mortem* foram IgM anti-YFV reagentes e apresentaram títulos de neutralização de anticorpos até 1:40 em um paciente e até 1:640 em outro paciente.
- 25 ∴ Dentro do grupo de pacientes tratados com o antiviral Sofosbuvir, foram encontradas diferenças nos valores de carga genômica viral, entre os grupos NT-A x T, NT-O x T e NT-A x NT-O.
- ∴ Foram observados maiores valores de carga genômica viral até o 6º DPS, quando comparado com os valores a partir do 7º DPS, para todos os
- 30 grupos analisados de pacientes tratados com o antiviral Sofosbuvir.
- ∴ Nas comparações de pacientes tratados com o antiviral Sofosbuvir, entre grupos e DPS, o grupo NT-O apresentou maiores valores que o grupo NT-A em todos os DPS analisados. Na comparação NT-O e T, maiores valores

do grupo NT-O foram observados no 4º DPS, 7º DPS, 8º DPS e 9º DPS. Na comparação entre os valores NT-A e T, maiores valores do grupo T foram observados no 5º DPS e 6º DPS.

- 5 ∴ Dentro de um mesmo grupo de pacientes tratados com o antiviral Sofosbuvir, houve diminuição da carga genômica viral a partir do 7º DPS.
- 10 ∴ Análises dos pacientes durante a fase de convalescença, mostraram que uma parte dos pacientes (12,5% em 2017 e 12,17% em 2018) apresentaram um quadro clínico denominada “hepatite tardia após febre amarela”, por volta de 60 dias após o início dos sintomas. Estes dados indicam a persistência dos sintomas da febre amarela, durante a fase de convalescença da doença.
- 15 ∴ Houve diferença estatística dos valores de AST e ALT durante a fase de convalescença da febre amarela, comparando os grupos com o quadro clínico da hepatite tardia e o grupo que não desenvolveu esse quadro, sendo os valores das transaminases maiores naquele grupo.
- ∴ Houve diferença estatística nos valores de creatinina durante a fase aguda, entre o grupo controle e o grupo que desenvolveu hepatite tardia após febre amarela.
- 20 ∴ A detecção de YFV selvagem na urina de dois pacientes com hepatite tardia, durante a fase de convalescença (66 e 68 dias após sintomas) indica uma possível persistência viral nestes pacientes, durante este período.
- Houve a detecção do RNA de YFV em coágulo de oito pacientes com o quadro clínico da hepatite tardia, coletados em diferentes fases da febre amarela, indicando a presença desse RNA em coágulo em diferentes dias após os sintomas
- 25 ∴ A detecção de antígenos do YFV e RNA do YFV silvestre na biópsia de fígado de um paciente com hepatite tardia, durante a fase de convalescença (93 dias após sintomas) indica uma possível persistência viral neste paciente, durante esse período.
- 30

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Apesar dos impactos negativos, a ocorrência dos surtos recentes de febre amarela no Brasil trouxe uma oportunidade ímpar de estudo da febre amarela. Após o surto de febre amarela em MG nos anos de 2017 e 2018, grandes
5 perguntas puderam começar a ser respondidas sobre a origem do vírus desse surto, sobre o curso natural da infecção durante a fase aguda da doença, sobre possíveis marcadores de prognóstico/gravidade da doença, sobre novas abordagens terapêuticas e até o relato de observação e análise de um novo quadro clínico durante a fase de convalescença.

10 Mas ainda assim, sempre fica muito trabalho a ser feito. Estudos que investiguem a correlação entre carga genômica viral e partícula infecciosa precisam ser conduzidos, para esclarecimento dessa lacuna existente sobre a titulação do YFV em pacientes naturalmente infectados.

A presença do YFV no LCR de pacientes que evoluíram a óbito mostrou que
15 o YFV selvagem provavelmente conseguiu romper a barreira hematoencefálica e causar infecção no SNC. Para comprovar essa hipótese, é preciso tentar isolar o vírus das amostras de LCR e também investigar a presença do antigenoma viral nessas amostras, o que indicaria uma replicação do genoma viral e possível multiplicação viral neste sítio. Modelos *in vivo* e *in vitro* para melhor entendimento
20 da biologia do YFV que conseguiu alcançar o SNC também devem ser conduzidos.

Estudo de falha de indução de resposta protetora pela vacina YFV-17DD são escassos e por isso, essas amostras devem ser mais exploradas. A repetição da PRNT das amostras IgM e IgG anti-YFV depletadas e a titulação de IgG anti-
25 YFV poderão trazer um melhor entendimento sobre essa falha vacinal. Além disso, cabe avaliar também o fato da maioria dos pacientes com falha vacinal terem sido primo-vacinados com menos de um ano de idade (5/9), e apenas um deles ter recebido uma dose reforço da vacina YFV-17DD.

A eficácia da nova abordagem terapêutica durante esse surto, com o uso do
30 antiviral Sofosbuvir em pacientes graves internados no HEM, precisa ser melhor estudada usando dados clínicos de pacientes em conjunto com análises estatísticas mais completas, considerando modelos multivariados, curva de ROC, dentre outros.

E, finalmente, mais estudos sobre o no quadro clínico descrito pelo grupo de estudos da febre amarela, denominado Hepatite Tardia Após Febre Amarela devem ser conduzidos focando na busca de fatores predisponentes durante a fase aguda da febre amarela, patogênese, persistência viral, marcadores da resposta imune dentre tantos outros questionamentos que ainda poderão surgir com os desdobramentos deste trabalho.

Essa tese foi o início de um longo trabalho que ainda se tem pela frente, na busca para melhor entender uma antiga doença.

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIM. **Laboratory Test Reference Ranges**. [s. l.], 2020. Disponível em: https://www.abim.org/~media/ABIM_Public/Files/pdf/exam/laboratory-reference-ranges.pdf. Acesso em: 13 jan. 2020.
- ALM, Erik *et al.* One-step real-time RT-PCR assays for serotyping dengue virus in clinical samples. **BMC Infectious Diseases**, [S. l.], v. 15, n. 1, p. 493, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12879-015-1226-z>
- ALTSCHUL, Stephen F. *et al.* Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, [S. l.], v. 215, n. 3, p. 403–410, 1990. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- AÑEZ, Germán *et al.* Distribution of Dengue Virus Types 1 and 4 in Blood Components from Infected Blood Donors from Puerto Rico. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [S. l.], v. 10, n. 2, p. e0004445, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004445>
- ARAÚJO, Francisco Anilton Alves *et al.* Epizootias em primatas não humanos durante reemergência do vírus da febre amarela no Brasil, 2007 a 2009. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, [S. l.], v. 20, n. 4, p. 527–536, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.5123/S1679-49742011000400012>
- ARMONK, NY: IBM Corp. **IBM SPSS Statistics for Windows**. New York: [s. n.], 2017.
- BARBOSA, Carla M. *et al.* Yellow fever virus RNA in urine and semen of convalescent patient, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, [S. l.], v. 24, n. 1, p. 176–178, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3201/eid2401.171310>
- BASTOS-CAMACHO, Luiz Antonio *et al.* Duration of post-vaccination immunity against yellow fever in adults. **Vaccine**, [S. l.], v. 32, n. 39, p. 4977–4984, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.07.021>
- BAUM, Neil; DICHOSO, Carmelo C.; CARLTON, C. Eugen. Blood urea nitrogen and serum creatinine. **Urology**, [S. l.], v. 5, n. 5, p. 583–588, 1975. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0090-4295\(75\)90105-3](https://doi.org/10.1016/0090-4295(75)90105-3)
- BLAKE, Lauren E.; GARCIA-BLANCO, Mariano A. Human Genetic Variation and Yellow Fever Mortality during 19th Century U.S. Epidemics. **mBio**, [S. l.], v. 5, n. 3, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/mBio.01253-14>
- BRYANT, Juliet E.; HOLMES, Edward C.; BARRETT, Alan D. T. Out of Africa: A

Molecular Perspective on the Introduction of Yellow Fever Virus into the Americas. **PLoS Pathogens**, [S. l.], v. 3, n. 5, p. e75, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030075>

BULLARD-FEIBELMAN, Kristen M. *et al.* The FDA-approved drug sofosbuvir inhibits Zika virus infection. **Antiviral Research**, [S. l.], v. 137, p. 134–140, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.11.023>

BURDMANN, Emmanuel A.; JHA, Vivekanand. Acute kidney injury due to tropical infectious diseases and animal venoms: a tale of 2 continents. **Kidney International**, [S. l.], v. 91, n. 5, p. 1033–1046, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.kint.2016.09.051>

CÂMARA, Fernando Portela *et al.* Dynamic behavior of sylvatic yellow fever in Brazil (1954-2008). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [S. l.], v. 44, n. 3, p. 297–299, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0037-86822011005000024>

CAMPI-AZEVEDO, Ana Carolina *et al.* Booster dose after 10 years is recommended following 17DD-YF primary vaccination. **Human Vaccines and Immunotherapeutics**, [S. l.], v. 12, n. 2, p. 491–502, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/21645515.2015.1082693>

CAROD-ARTAL, Francisco Javier *et al.* Neurological complications of dengue virus infection. **The Lancet Neurology**, [S. l.], v. 12, n. 9, p. 906–919, 2013. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(13\)70150-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(13)70150-9)

CARRINGTON, Christine V. F.; AUGUSTE, Albert J. Evolutionary and ecological factors underlying the tempo and distribution of yellow fever virus activity. **Infection, Genetics and Evolution**, [S. l.], v. 13, p. 198–210, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.08.015>

CASADIO, Luciana *et al.* Late-Onset Relapsing Hepatitis Associated with Yellow Fever. **New England Journal of Medicine**, [S. l.], v. 382, n. 21, p. 2059–2061, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1056/NEJMc1913036>

CATHEY, John T.; MARR, John S. Yellow fever, Asia and the East African slave trade. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, [S. l.], v. 108, n. 5, p. 252–257, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/trstmh/tru043>

CHAVES, M. *et al.* Longitudinal myelitis associated with yellow fever vaccination. **Journal of Neurovirology**, [S. l.], v. 15, n. 4, p. 348–350, 2009. Disponível em:

<https://doi.org/10.1080/13550280903062805>

COSTA-PEREIRA, Christiane *et al.* Multi-parameter approach to evaluate the timing of memory status after 17DD-YF primary vaccination. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [S. l.], v. 12, n. 6, p. e0006462, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006462>

DARRIBA, Diego *et al.* jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature Methods**, [S. l.], v. 9, n. 8, p. 772–772, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/molbev/msn083>

DAVIS, Nelson C.; SHANNON, Raymond C. STUDIES ON YELLOW FEVER IN SOUTH AMERICA. **Journal of Experimental Medicine**, [S. l.], v. 50, n. 6, p. 803–808, 1929.

DE FREITAS, Caroline S. *et al.* Yellow fever virus is susceptible to sofosbuvir both in vitro and in vivo. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [S. l.], v. 13, n. 1, p. e0007072, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007072>

DE MENEZES MARTINS, Reinaldo; DA LUZ FERNANDES LEAL, Maria; HOMMA, Akira. Serious adverse events associated with yellow fever vaccine. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, [S. l.], v. 11, n. 9, p. 2183–2187, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/21645515.2015.1022700>

DELATORRE, Edson *et al.* Distinct YFV Lineages Co-circulated in the Central-Western and Southeastern Brazilian Regions From 2015 to 2018. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 10, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01079>

DENIS, Blandine *et al.* Hepatitis Rebound after Infection with Yellow Fever Virus. **Emerging Infectious Diseases**, [S. l.], v. 25, n. 6, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3201/eid2506.190069>

DOKE, P. *et al.* Yellow fever vaccine associated neurotropic disease (YEL - AND). **International Journal of Infectious Diseases**, [S. l.], v. 45, p. 204, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2016.02.469>

DOMINGO, C. *et al.* Detection of Yellow Fever 17D Genome in Urine. **Journal of Clinical Microbiology**, [S. l.], v. 49, n. 2, p. 760–762, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/JCM.01775-10>

DOMINGO, C. *et al.* Advanced Yellow Fever Virus Genome Detection in Point-of-Care Facilities and Reference Laboratories. **Journal of Clinical Microbiology**, [S. l.], v. 50, n. 12, p. 4054–4060, 2012. Disponível em:

<https://doi.org/10.1128/JCM.01799-12>

DOUAM, Florian; PLOSS, Alexander. Yellow Fever Virus: Knowledge Gaps Impeding the Fight Against an Old Foe. **Trends in Microbiology**, [S. l.], p. 1–16, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.05.012>

DRUMMOND, Alexei J. *et al.* Bayesian Phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. **Molecular Biology and Evolution**, [S. l.], v. 29, n. 8, p. 1969–1973, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/molbev/mss075>

ESPINOZA VILLAR, Jhan Carlo *et al.* Spatio-temporal rainfall variability in the Amazon basin countries (Brazil, Peru, Bolivia, Colombia, and Ecuador). **International Journal of Climatology**, [S. l.], v. 29, n. 11, p. 1574–1594, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/joc.1791>

FARIA, N. R. *et al.* Genomic and epidemiological monitoring of yellow fever virus transmission potential. **Science**, [S. l.], v. 361, n. 6405, p. 894–899, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.aat7115>

FARM, Winches; STATION, Fiem; ALBANS, St. Comparison of Neurovirulence of Different Strains of Yellow Fever Virus in Mice Arbovirus Research Unit , Winches Farm FieM Station , London School of Hygiene and Tropical. **Journal of General Virology**, [S. l.], n. 67, p. 631–637, 1986.

FERREIRA, André C. *et al.* Sofosbuvir protects Zika virus-infected mice from mortality, preventing short- And long-term sequelae. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 1–9, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09797-8>

FIGUEIREDO, Leandra Barcelos. **Caracterização de amostras de Dengue virus 1, 2 e 3 e análise completa do genoma do Dengue virus 1 e 3 circulantes no Estado de Minas Gerais e Piauí.** 2009. - Univeridade Federal de Minas Gerais, [s. l.], 2009.

FIGUEIREDO, Luiz Tadeu Moraes. **Emergent arboviruses in Brazil.** [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0037-86822007000200016>

FLORCZAK-WYSPIAŃSKA, Jolanta; NAWOTCZYŃSKA, Ewa; KOZUBSKI, Wojciech. Yellow fever vaccine-associated neurotropic disease (YEL-AND) – A case report. **Neurologia i Neurochirurgia Polska**, [S. l.], v. 51, n. 1, p. 101–105, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pjnns.2016.09.002>

FRANCIS, T. I. *et al.* A clinicopathological study of human yellow fever. **Bulletin of the World Health Organization**, [S. l.], v. 46, n. 5, p. 659–667, 1972.

FRANCO, Odair. **História da Febre Amarela no Brasil**. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 1969. *E-book*. Disponível em: https://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/0110historia_febre.pdf

GÓMEZ, Mariela Martínez *et al.* Genomic and structural features of the yellow fever virus from the 2016–2017 Brazilian outbreak. **Journal of General Virology**, [S. l.], v. 99, n. 4, p. 536–548, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001033>

GOWDA, Shivaraj *et al.* A review on laboratory liver function tests. **The Pan African medical journal**, [S. l.], v. 3, p. 17, 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21532726>

GRIFFIN, Diane E.; METCALF, Talibah. Clearance of virus infection from the CNS. **Current Opinion in Virology**, [S. l.], v. 1, n. 3, p. 216–221, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2011.05.021>

GUINDON, Stéphane *et al.* New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. **Systematic Biology**, [S. l.], v. 59, n. 3, p. 307–321, 2010. Disponível em: <http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/binaries.php>

HADJIHAMBI, Anna *et al.* Hepatic encephalopathy: a critical current review. **Hepatology International**, [S. l.], v. 12, n. s1, p. 135–147, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12072-017-9812-3>

HALSTEAD, Scott B. Dengue. **Lancet**, [S. l.], v. 370, n. 9599, p. 1644–1652, 2007. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)61687-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)61687-0)

ICTV. **International Committee on Taxonomy of Viruses**. [s. l.], 2019. Disponível em: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>. Acesso em: 20 jun. 2019.

ICTV. **International Committee on Taxonomy of Viruses**. [s. l.], 2020. Disponível em: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>. Acesso em: 18 maio. 2020.

KALLAS, Esper G. *et al.* Predictors of mortality in patients with yellow fever: an observational cohort study. **The Lancet Infectious Diseases**, [S. l.], v. 19, n. 7, p. 750–758, 2019. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(19\)30125-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(19)30125-2)

KATOH, Kazutaka; ASIMENOS, George; TOH, Hiroyuki. Multiple Alignment of DNA Sequences with MAFFT. *In*: [S. l.: s. n.], p. 39–64. *E-book*. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-1-59745-251-9_3

KEATING, Gillian M. Ledipasvir/Sofosbuvir: A Review of Its Use in Chronic

Hepatitis C. **Drugs**, [S. l.], v. 75, n. 6, p. 675–685, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s40265-015-0381-2>

KLITTING, Raphaëlle *et al.* What Does the Future Hold for Yellow Fever Virus? (II). **Genes**, [S. l.], v. 9, n. 9, p. 425, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/genes9090425>

KRAEMER, Moritz U. G. *et al.* Spread of yellow fever virus outbreak in Angola and the Democratic Republic of the Congo 2015 – 16 : a modelling study. **The Lancet Infectious Diseases**, [S. l.], v. 17, n. 3, p. 330–338, 2017. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30513-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30513-8)

KUMAR, Sudhir; STECHER, Glen; TAMURA, Koichiro. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Molecular Biology and Evolution**, [S. l.], v. 33, n. 7, p. 1870–1874, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>

LANCIOTTI, Robert S. *et al.* Genetic and Serologic Properties of Zika Virus Associated with an Epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. **Emerging Infectious Diseases**, [S. l.], v. 14, n. 8, p. 1232–1239, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.3201/eid1408.080287>

LEFORT, Vincent; LONGUEVILLE, Jean-Emmanuel; GASCUEL, Olivier. SMS: Smart Model Selection in PhyML. **Molecular Biology and Evolution**, [S. l.], v. 34, n. 9, p. 2422–2424, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/molbev/msx149>

LEMOS, Fernanda de Oliveira *et al.* Molecular Mechanism for Protection Against Liver Failure in Human Yellow Fever Infection. **Hepatology Communications**, [S. l.], v. 0, n. 0, p. 1–13, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/hep4.1504>

LI, Fang *et al.* Viral Infection of the Central Nervous System and Neuroinflammation Precede Blood-Brain Barrier Disruption during Japanese Encephalitis Virus Infection. **Journal of Virology**, [S. l.], v. 89, n. 10, p. 5602–5614, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/JVI.00143-15>

LIMDI, J. K. Evaluation of abnormal liver function tests. **Postgraduate Medical Journal**, [S. l.], v. 79, n. 932, p. 307–312, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1136/pmj.79.932.307>

LINDENBACH, Brett *et al.* Flaviviridae. *In*: FIELDS, Bernard N.; KNIPE, David M.; HOWLEY, Peter M. (org.). **Fields Virology**. 6th. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2013. p. 712–746. *E-book*.

LUCENA, Adriana Regina Farias Pontes *et al.* Fatores associados à gravidade dos eventos adversos pós-vacinação contra a febre amarela durante o maior surto da doença registrado no Brasil, 2016-2017. **Epidemiologia e serviços de saúde : revista do Sistema Unico de Saude do Brasil**, [S. l.], v. 29, n. 1, p. e2018331, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.5123/S1679-49742020000100017>

MACKENZIE, John S.; GUBLER, Duane J.; PETERSEN, Lyle R. Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. **Nature Medicine**, [S. l.], v. 10, n. S12, p. S98–S109, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nm1144>. Acesso em: 21 dez. 2013.

MAGUIRE, Helen C. F.; HEYMANN, David L. Yellow fever in Africa. **BMJ**, [S. l.], v. 354, p. i3764, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1136/bmj.i3764>

MARINHO, Paula E. S. *et al.* Wild-type yellow fever virus rna in cerebrospinal fluid of child. **Emerging Infectious Diseases**, [S. l.], v. 25, n. 8, p. 1567–1570, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3201/eid2508/181479>

MARTIN, Michael *et al.* Fever and multisystem organ failure associated with 17D-204 yellow fever vaccination: a report of four cases. **The Lancet**, [S. l.], v. 358, n. 9276, p. 98–104, 2001. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)05327-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)05327-2)

MARTINS, Reinaldo de Menezes *et al.* Adverse events following yellow fever immunization: Report and analysis of 67 neurological cases in Brazil. **Vaccine**, [S. l.], v. 32, n. 49, p. 6676–6682, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.05.003>

MAXIMOVA, Olga A.; PLETNEV, Alexander G. Flaviviruses and the Central Nervous System: Revisiting Neuropathological Concepts. **Annual Review of Virology**, [S. l.], v. 5, n. 1, p. 255–272, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-092917-043439>

MENDES, Érica Araújo *et al.* Sofosbuvir inhibits yellow fever virus in vitro and in patients with acute liver failure. **Annals of Hepatology**, [S. l.], v. 18, n. 6, p. 816–824, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aohep.2019.09.001>

MINER, Jonathan J.; DIAMOND, Michael S. Zika Virus Pathogenesis and Tissue Tropism. **Cell Host and Microbe**, [S. l.], v. 21, n. 2, p. 134–142, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.01.004>

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Situação epidemiológica da febre amarela no

monitoramento 2019/2020. **Boletim Epidemiológico**, [S. l.], v. 51, n. 15, p. 11–20, 2020.

MIR, Daiana *et al.* Phylodynamics of Yellow Fever Virus in the Americas : new insights into the origin of the 2017 Brazilian outbreak. [S. l.], n. May, p. 1–9, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07873-7>

MONATH, Thomas P. Reviews Yellow fever : an update. **The Lancet Infectious Diseases**, [S. l.], v. 1, n. August, p. 11–20, 2001 a.

MONATH, Thomas P. Yellow fever: an update. **The Lancet Infectious Diseases**, [S. l.], v. 1, n. 1, p. 11–20, 2001 b. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(01\)00016-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(01)00016-0)

MONATH, Thomas P. Yellow fever vaccine. **Expert Review of Vaccines**, [S. l.], v. 4, n. 4, p. 553–574, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1586/14760584.4.4.553>

MONATH, Thomas P.; BARRETT, Alan D. T. Pathogenesis and Pathophysiology of Yellow Fever. [S. l.], v. 60, p. 3527, 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(03\)60009-6](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(03)60009-6)

MONATH, Thomas P.; VASCONCELOS, Pedro F. C. Yellow fever. **Journal of Clinical Virology**, [S. l.], v. 64, p. 160–173, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2014.08.030>

MOREIRA-SOTO, Andres *et al.* Evidence for Multiple Sylvatic Transmission Cycles During the 2016-2017 Yellow Fever Virus Outbreak, Brazil. **Clinical Microbiology and Infection**, [S. l.], 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.01.026>

MS-BR. **Manual de Vigilância Epidemiológica de Eventos Adversos Pós-Vacinação**. 3a edição ed. Brasília - DF: [s. n.], 2014. *E-book*. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_epidemiologica_eventos_adversos_pos_vacinacao.pdf

MS-BR. **Monitoramento do Período Sazonal da Febre Amarela Brasil, 2016/2017**. [s. l.], 2017. Disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/junho/02/COES-FEBRE-AMARELA---INFORME-43---Atualiza---o-em-31maio2017.pdf>. Acesso em: 10 out. 2019.

MS-BR. **DATASUS - Febre Amarela**. [s. l.], 2018a. Disponível em: <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0203&id=29892110&V>

Obj=<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defthtm.exe?sinannet/cnv/febreamarela>.

Acesso em: 23 abr. 2018.

MS-BR. **Monitoramento do período sazonal da Febre Amarela - Brasil 2017/2018.** [s. l.], 2018b. Disponível em:

<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/abril/12/Informe-FA-21-11abr18-c.pdf>.

MS-BR. **Monitoramento do Período Sazonal da Febre Amarela Brasil, 2018/2019.** [s. l.], 2019. Disponível em:

<https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/janeiro/28/informe-FA-n.3-21jan19.pdf>. Acesso em: 3 out. 2019.

MS. **Nota Técnica do Ministério da Saúde sobre a dose única da vacina contra a Febre Amarela.** [S. l.: s. n.] Disponível em:

[http://www.saude.mg.gov.br/images/documentos/Nota Informativa dose única FA.pdf](http://www.saude.mg.gov.br/images/documentos/Nota%20Informativa%20dose%20única%20FA.pdf)

NOGUEIRA, Rita Maria Ribeiro *et al.* Dengue Virus Type 3, Brazil, 2002.

Emerging Infectious Diseases, [S. l.], v. 11, n. 9, p. 1376–1381, 2005.

Disponível em: <https://doi.org/10.3201/eid1109.041043>

NORONHA, Tatiana Guimarães de *et al.* **Febre amarela - GUIA para Profissionais de Saúde.** Brasília - DF: [s. n.], 2017. v. 33E-book. Disponível em:

<https://doi.org/10.1590/0102-311x00060917>

LOUDART, J. L.; REY, M. Proteinuria, proteinaemia, and serum transaminase activity in 23 confirmed cases of yellow fever. **Bulletin of the World Health Organization**, [S. l.], v. 42, n. 1, p. 95–102, 1970.

PAHO/WHO. **Control of Yellow Fever, Field Guide 2005.** Washington, DC: [s. n.], 2005. E-book. Disponível em:

[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)79439-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)79439-6)

PAHO/WHO. **Laboratory Diagnosis of Yellow Fever Virus Infection.** [s. l.], 2018.

PASTORINO, Boris *et al.* Development of a TaqMan® RT-PCR assay without RNA extraction step for the detection and quantification of African Chikungunya viruses. **Journal of Virological Methods**, [S. l.], v. 124, n. 1–2, p. 65–71, 2005.

Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2004.11.002>

PATEL, Pranav *et al.* Development of one-step quantitative reverse transcription PCR for the rapid detection of flaviviruses. **Virology Journal**, [S. l.], v. 10, n. 1,

p. 58, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1743-422X-10-58>

PIERSON, Theodore C.; DIAMOND, Michael S. Flaviviruses. In: FIELDS, Bernard N.; KNIPE, David M.; HOWLEY, Peter M. (org.). **Fields Virology**. 6th. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2013. p. 747–794. *E-book*.

PIERSON, Theodore C.; DIAMOND, Michael S. The continued threat of emerging flaviviruses. **Nature Microbiology**, [S. l.], 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0714-0>

PIPERNO, A. *et al.* Recent Highlights in the Synthesis of Anti-HCV Ribonucleosides. **Current Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 21, n. 16, p. 1843–1860, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/0929867321666131228205935>

PIRES-MARCZESKI, Fanny Clara *et al.* Intrathecal antibody production in two cases of yellow fever vaccine associated neurotropic disease in Argentina. **Journal of Medical Virology**, [S. l.], v. 83, n. 12, p. 2208–2212, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jmv.22236>

PUCCIONI-SOHLER, Marzia; ROSADAS, Carolina. Avanços e novos aspectos na neuropatogênese da dengue. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, [S. l.], v. 73, n. 8, p. 698–703, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0004-282X20150074>

QUARESMA, Juarez A. S. *et al.* Immunity and immune response, pathology and pathologic changes: progress and challenges in the immunopathology of yellow fever. **Reviews in Medical Virology**, [S. l.], v. 23, n. 5, p. 305–318, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/rmv.1752>

RAMBAUT, A.; DRUMMOND, A. J. **TreeAnnotator**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <http://beast.bio.ed.ac.uk>

RAMBAUT, Andrew. **FigTree**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://github.com/rambaut/figtree/releases/tag/v1.4.3>

RAMBAUT, Andrew *et al.* Exploring the temporal structure of heterochronous sequences using TempEst (formerly Path-O-Gen). **Virus Evolution**, [S. l.], v. 2, n. 1, p. vew007, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/ve/vew007>

RAMBAUT, Andrew *et al.* Posterior Summarization in Bayesian Phylogenetics Using Tracer 1.7. **Systematic Biology**, [S. l.], v. 67, n. 5, p. 901–904, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/sysbio/syy032>

REED, W.; CARROLL, J.; AGRAMONTE, A. Experimental yellow fever. 1901.

Military medicine, [S. l.], v. 166, n. 9 Suppl, p. 55–60, 1901. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11569393>

REUSKEN, Chantal B. E. M. *et al.* Urine as Sample Type for Molecular Diagnosis of Natural Yellow Fever Virus Infections. **Journal of Clinical Microbiology**, [S. l.], v. 55, n. 11, p. 3294–3296, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/JCM.01113-17>

REZENDE, Izabela Maurício *et al.* Yellow fever virus genotyping tool and investigation of suspected adverse events following yellow fever vaccination. **Vaccines**, [S. l.], v. 7, n. 4, p. 1–10, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/vaccines7040206>

REZENDE, Izabela Maurício *et al.* Late-relapsing hepatitis after yellow fever. **Viruses**, [S. l.], v. 12, n. 2, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/v12020222>

RIBEIRO, Ana Freitas *et al.* Yellow fever: Factors associated with death in a hospital of reference in infectious diseases, São Paulo, Brazil, 2018. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, [S. l.], v. 101, n. 1, p. 180–188, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.18-0882>

RICCIARDI, Taissa *et al.* Acta Tropica Isolation and characterization of a Brazilian strain of yellow fever virus from an epizootic outbreak in 2009. **Acta Tropica**, [S. l.], v. 166, p. 114–120, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.09.030>

SACRAMENTO, Carolina Q. *et al.* The clinically approved antiviral drug sofosbuvir inhibits Zika virus replication. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 7, n. December 2016, p. 1–11, 2017 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/srep40920>

SACRAMENTO, Carolina Q. *et al.* The clinically approved antiviral drug sofosbuvir inhibits Zika virus replication. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 40920, 2017 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/srep40920>

SANGER, F.; NICKLEN, S. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of National Academy of Science USA**, [S. l.], v. 74, n. 12, p. 5463–5467, 1977.

SANTIAGO, Gilberto A. *et al.* Analytical and Clinical Performance of the CDC Real Time RT-PCR Assay for Detection and Typing of Dengue Virus. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [S. l.], v. 7, n. 7, p. e2311, 2013. Disponível em:

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002311>

SECRETARIA ESTADUAL DE SAÚDE / SES-MG. **NOTA INFORMATIVA Nº 118-SEI / 2017-CGPNI / DEVIT / SVS / MS.** [S. l.: s. n.].

SES-MG. **Febre Amarela Silvestre em Minas Gerais julho/2016 a junho/2017.** [s. l.], 2017. Disponível em: https://www.saude.mg.gov.br/images/noticias_e_eventos/000_2018/Boletim_Febre_Amarela__30.01.2018.pdf.

SES-MG. **Febre Amarela Silvestre em Minas Gerais Julho/2017 a Junho/2018.** [s. l.], 2018a.

SES-MG. **Boletim Epidemiológico - Febre Amarela Silvestre em Minas Gerais.** [s. l.], 2018b.

SES-MG. **Eventos Adversos Pós-Vacinação Associados à Vacina Febre Amarela (EAPV-VFA) Minas Gerais, 2016 a 2018.** [s. l.], 2018c. Disponível em: http://www.saude.mg.gov.br/images/noticias_e_eventos/000_2018/BoletinsEpidemiologicos/Boletim_epidemiológico_EAPV_finalv3.pdf. Acesso em: 10 out. 2019.

SES-MG. Febre Amarela Silvestre em Minas Gerais 19/02/2019. **Secretaria do Estado de Saúde de Minas Gerais.**, [S. l.], p. 1–12, 2019. Disponível em: http://www.saude.mg.gov.br/images/noticias_e_eventos/000_2018/BoletinsEpidemiologicos/Boletim_-_Febre_Amarela_2018_-_Consolidado_V3.pdf

SILVA, Maria Luiza *et al.* Clinical and immunological insights on severe, adverse neurotropic and viscerotropic disease following 17D yellow fever vaccination. **Clinical and Vaccine Immunology**, [S. l.], v. 17, n. 1, p. 118–126, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/CVI.00369-09>

SILVA, Natalia Ingrid Oliveira *et al.* Recent sylvatic yellow fever virus transmission in Brazil: The news from an old disease. **Virology Journal**, [S. l.], v. 17, n. 1, p. 1–12, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12985-019-1277-7>

SIMMONDS, Peter *et al.* ICTV Virus Taxonomy Profile : Flaviviridae. **Journal of General Virology**, [S. l.], n. 98, p. 2–3, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000672>

SOPER, F. L. Febre amarela panamericana, 1938-1942. **Pan American Sanitary Bureau**, [S. l.], p. 1027–22, 1942.

SOUZA, Kátia Paulino Ribeiro de. **Neurovirulência do Dengue virus em**

modelo murino: fatores virais e resposta do hospedeiro. 2012. - Universidade Federal de Minas Gerais, [S. l.], 2012.

STUCKY, Brian J. Seqtrace: A graphical tool for rapidly processing DNA sequencing chromatograms. **Journal of Biomolecular Techniques**, [S. l.], v. 23, n. 3, p. 90–93, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.7171/jbt.12-2303-004>

SWAMINATHAN, Mirashini; ELLUL, Mark; CROSS, Tim. Hepatic encephalopathy: current challenges and future prospects. **Hepatic Medicine: Evidence and Research**, [S. l.], v. Volume 10, p. 1–11, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/hmer.s118964>

TER MEULEN, Jan *et al.* Activation of the Cytokine Network and Unfavorable Outcome in Patients with Yellow Fever. **The Journal of Infectious Diseases**, [S. l.], v. 190, n. 10, p. 1821–1827, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1086/425016>

VAN DER STUYFT, P. *et al.* Urbanisation of yellow fever in Santa Cruz, Bolivia. **The Lancet**, [S. l.], v. 353, n. 9164, p. 1558–1562, 1999. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(99\)03291-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(99)03291-2)

VASCONCELOS, PFC. Yellow Fever. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [S. l.], v. 36, n. 2, p. 275–293, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0037-86822003000200012>

VASCONCELOS, PFC *et al.* Arboviroses. In: **Tratado de Infectologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 289–302. *E-book*.

VOLKOV, Lev *et al.* Viscerotropic disease and acute uveitis following yellow fever vaccination: A case report. **BMC Infectious Diseases**, [S. l.], v. 20, n. 1, p. 1–5, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12879-020-4838-x>

WAGGONER, Jesse J.; ROJAS, Alejandra; PINSKY, Benjamin A. Yellow Fever Virus: Diagnostics for a Persistent Arboviral Threat. **Journal of Clinical Microbiology**, [S. l.], v. 56, n. 10, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/JCM.00827-18>

WATSON, Alan M.; KLIMSTRA, William B. T cell-mediated immunity towards yellow fever virus and useful animal models. **Viruses**, [S. l.], v. 9, n. 4, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/v9040077>

WEAVER, Scott C.; REISEN, William K. Present and future arboviral threats. **Antiviral research**, [S. l.], v. 85, n. 2, p. 328–345, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.10.008>. Acesso em: 29 out. 2012.

WHO. **Situation Report Yellow Fever**. [s. l.], 2016. Disponível em: www.who.int/emergencies/yellow-fever/situation-reports/%0A28-october-2016/en/. Acesso em: 13 set. 2018.

WIETEN, Rosanne W. *et al.* Comparison of the PRNT and an immune fluorescence assay in yellow fever vaccinees receiving immunosuppressive medication. **Vaccine**, [S. l.], v. 34, n. 10, p. 1247–1251, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.01.037>

WIJDICKS, Eelco F. M. Hepatic Encephalopathy. **New England Journal of Medicine**, [S. l.], v. 375, n. 17, p. 1660–1670, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1056/NEJMra1600561>

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **International health regulations**. [s. l.], 2005. Disponível em: <http://www.who.int/ihr/publications/9789241580496/en/>.

XIA, X.; XIE, Z. DAMBE: software package for data analysis in molecular biology and evolution. **The Journal of heredity**, [S. l.], v. 92, n. 4, p. 371–373, 2001. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11535656>

11 RELAÇÃO DA PRODUÇÃO CIENTÍFICA E OUTRAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O DOUTORADO – AGOSTO/2016 A JUNHO/2020

Artigos publicados

1ª autoria:

1. **Rezende, I.M.***; Pereira, L.S.*; Fradico, J.R.B.*; Pascoal Xavier, M.A.*; Alves, P.A.; Campi-Azevedo, A.C.; Speziali, E.; dos Santos, L.Z.M.; Albuquerque, N.S.; Penido, I.; Santos, T.A.; Bom, A.P.D.A.; da Silva, A.M.V.; Fernandes, C.B.; Calzavara, C.E.; Kroon, E.G.; Martins-Filho, O.A.; Teixeira-Carvalho, A.#; Drumond, B.P.#. *Late-Relapsing Hepatitis after Yellow Fever*. **Viruses** 2020, 12, 222. *, # These authors contributed equally to this work
2. Silva, N. I. O. S*., Sacchetto, L*.; **Rezende, I. M***; Trindade, G. S.; LaBeaud, A. D.; Thoisy, B.; Drumond, B. P. *Recent sylvatic yellow fever virus transmission in Brazil: the news from an old disease*. Review. **Virology Journal**, 2020. *These authors contributed equally to this work.
3. **Rezende, I.M.**; Alves, P.A.; Arruda, M.S.; Gonçalves, A.P.; Oliveira, G.F.G.; Pereira, L.S.; Dutra, M.R.T.; Campi-Azevedo, A.C.; Valim, V.; Tourinho, R.; Oliveira, J.G.; Calzavara, C.E.; Said, R.F.C.; Kroon, E.G.; Martins-Filho, O.A.; Teixeira-Carvalho, A.; Drumond, B.P. *Yellow Fever Virus Genotyping Tool and Investigation of Suspected Adverse Events Following Yellow Fever Vaccination*. **Vaccines** 2019, 7, 206.
4. **Rezende, Izabela Maurício De***; Sacchetto, Lívia* ; Munhoz De Mello, Érica ; Alves, Pedro Augusto ; Iani, Felipe Campos De Melo ; Adelino, Talita Émile Ribeiro ; Duarte, Myrian Morato ; Cury, Ana Luísa Furtado ; Bernardes, André Felipe Leal ; Santos, Tayrine Araujo ; Pereira, Leonardo Soares ; Dutra, Maria Rita Teixeira ; Ramalho, Dario Brock ; De Thoisy, Benoit ; Kroon, Erna Geessien ; Trindade, Giliane De Souza ; Drumond, Betânia Paiva. *Persistence of Yellow fever virus outside the Amazon Basin, causing epidemics in Southeast Brazil, from 2016 to 2018*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, p. e0006538, 2018. *These authors contributed equally to this work

Colaborações:

5. Cardoso, F. D. ; **Rezende, I. M.** ; Barros, E. L. T. ; Sacchetto, L. ; Silva, N. I. O. ; Garces, T. C. C. S. ; Soares, J. O. ; Pereira, A. C. T. C. ; Alves, P. A. ; Kroon, E. G. ; Drumond, B.P. ; Ferreira, G. P. *Circulation of Chikungunya virus East-Central-South Africa genotype during an outbreak in 2016-17 in Piauí, Northeast Brazil*. **Revista do Instituto De Medicina Tropical de São Paulo**. 2019.
6. Faria, N. R. Kraemer, M. U. G. Hill, S. C. Goes De Jesus, J. Aguiar, R. S. Iani, F. C. M. Xavier, J. Quick, J. Du Plessis, L. Dellicour, S. Thézé, J. Carvalho, R. D. O. Baele, G. Wu, C.-H. Silveira, P. P. Arruda, M. B. Pereira, M. A. Pereira, G. C. Lourenço, J. Obolski, U. Abade, L. Vasylyeva, T. I. Giovanetti, M. Yi, D. Weiss, D. J. , Wint, G. R. W. Shearer, F. M. Funk, S. Nikolay, B. Fonseca, V. Adelino, T. E. R. Oliveira, M. A. A. Silva, M. V. F. Sacchetto, L. Figueiredo, P. O. **Rezende, I.M.** Mello, E. M. Said, R. F. C. Santos, D. A. Ferraz, M. L. Brito, M. G. Santana, L. F. Menezes, M. T. Brindeiro, R. M. Tanuri, A. Dos Santos, F.

- C. P. Cunha, M. S. Nogueira, J. S. Rocco, I. M. Da Costa, A. C. Komninakis, S. C. V. Azevedo, V. Chieppe, A. O. Araujo, E. S. M. Mendonça, M. C. L. Dos Santos, C. C. Dos Santos, C. D. Mares-Guia, A. M. Nogueira, R. M. R. Sequeira, P. C. Abreu, R. G. Garcia, M. H. O. Abreu, A. L. Okumoto, O. Kroon, E. G. De Albuquerque, C. F. C. Lewandowski, K. Pullan, S. T. Carroll, M. De Oliveira, T. Sabino, E. C. Souza, R. P. Suchard, M. A. Lemey, P. Trindade, G. S. Drumond, B. P. Filippis, A. M. B. Loman, N. J. Cauchemez, S. Alcantara, L. C. J. Pybus, O. G.. *Genomic and epidemiological monitoring of yellow fever virus transmission potential*. **SCIENCE**, v. 361, p. eaat7115, 2018.
7. Ana Carolina B. Terzian, Nathalia Zini, Lívia Sacchetto, Rebeca Froes Rocha, Maisa Carla Pereira Parra, Juliana Lemos Del Sarto, Ana Carolina Fialho Dias, Felipe Coutinho, Jéssica Rayra, Rafael Alves Da Silva, Vivian Vasconcelos Costa, Natália Coelho Couto De Azevedo Fernandes, Rodrigo Réssio, Josué Díaz-Delgado, Juliana Guerra, Mariana S. Cunha, José Luiz Catão-Dias, Cintia Bittar, Andréia Francesli Negri Reis, Izalco Nuremberg Penha Dos Santos, Andréia Cristina Marascalchi Ferreira, Lilian Elisa Arão Antônio Cruz, Paula Rahal, Leila Ullmann, Camila Malossi, João Pessoa De Araújo Jr, Steven Widen, **Izabela Mauricio De Rezende**, Érica Mello, Carolina Colombelli Pacca, Erna Geessien Kroon, Giliane Trindade, Betânia Drumond, Francisco Chiaravalloti-Neto, Nikos Vasilakis, Mauro M. Teixeira & Maurício Lacerda Nogueira. *Evidence of natural Zika virus infection in neotropical non-human primates in Brazil*. **Scientific Reports**, v. 8, p. 1-15, 2018.

Artigos submetidos:

1. SACCHETTO, L.; SILVA, N.; **REZENDE, I. M.**; ARRUDA, M.S.; COSTA, T.A.; MELLO, E.M.; OLIVEIRA, G.F.G; ALVES, P.A.; MENDONÇA, V.E.; STUMPP, R.G.A.V.; PRADO, A.I.A.; PAGLIA, A.P.; PERINI, F.A.; NOGUEIRA, M.L.; KROON, E.G.; THOISY, B.; TRINDADE, G.S.; DRUMOND, B.P. Neighbor danger: yellow fever virus epizootics in urban and urban-rural transition areas of Minas Gerais state, during 2017-2018 yellow fever outbreaks in Brazil. **Plos Neglected and Tropical Disease**.
2. Jonatas Santos Abrahao, Livia Sacchetto Pengo, **Izabela Mauricio Rezende**, Rodrigo Rodrigues, Ana Paula Correia Crispim, Cesar Moura, Diogo Correa Mendonca, Erik Reis, Fernanda Souza, Gabriela Fernanda Garcia Oliveira, Iago Jose da Silva Domingos, Paulo Boratto, Pedro Henrique Bastos e Silva, Victoria Fulgencio Queiroz, Thais Barbara de Souza Silva, Grazielle Pereira Oliveira, Viviane de Souza Alves, Pedro Augusto Alves, Erna Geessien Kroon, Giliane de Souza Trindade, Betania Paiva Drumond. Detection of SARS-CoV-2 RNA on public surfaces in a densely populated urban area of Brazil. Preprint (10.1101/2020.05.07.20094631). **Emerging Infectious and Disease**.

Premiações

- **2020:** Highlighted poster abstract- Late-Relapsing hepatitis after yellow fever, 7th PanAmerican Dengue Research Network Meeting.
- **2019:** Travel grant for course - 16th International Course on Dengue, Zika and other Emergent Arboviruses (CUBA)., Pan American Health Organization and Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí (Dra. Maria Gúzman).

- **2019:** Oral abstract presentation - IV FAMERP-UTMB: Emerging infections in the Americas - common interests and collaboration between Brazil and USA, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto.
- **2018:** Travel grant for oral abstract presentation - Yellow fever: clinical, virological and immunological aspects, 6th PanDengue Meeting - Galveston, Texas.
- **2018:** Prêmio Professor Claudio Bonjardim - Investigação de casos de Febre Amarela em pacientes com vacinação prévia, em 2017/2018, em Minas Gerais, UFMG/ICB - V Simpósio de Microbiologia.

Formação complementar

2019

- Vacinação contra Febre Amarela. (Carga horária: 2h). Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Brasil.
- Transmissão, vigilância, controle e prevenção da febre amarela. (Carga horária: 2h). Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Brasil.
- Investigação de surtos. (Carga horária: 8h). Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, SBMT, Brasil.
- Comunicação e Divulgação Científica. (Carga horária: 8h). American Society For Microbiology, Estados Unidos.
- Experiência educativa baseada em PBL. (Carga horária: 6h). Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Brasil.
- Tutoria online. (Carga horária: 20h). Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Brasil.
- 16th International course on Dengue, Zika and other emergent arboviruses. (Carga horária: 45h). Instituto Pedro Kourí, IPK, Cuba.

2017

- São Paulo School of Advanced Science in Arbovirology. (Carga horária: 36h). Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, FAMERP, Brasil.
- I Curso Internacional de Bioinformática, Epidemiologia Molecular, Evolução. (Carga horária: 40h). Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Brasil.

2016

- I Curso de Inverno de Bioinformática. (Carga horária: 36h). Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Brasil.

Editor de periódico

- Jan/2020: Editora-Chefe da Revista Docência do Ensino Superior.
- Nov/2018 – dez/2019: Editora adjunta da Revista Docência do Ensino Superior.

Revisor de periódico

- New Microbes and New Infections
- Journal of Medical Virology.
- Brazilian Journal of Microbiology

Organização de Eventos Científicos

- VI Simpósio de Microbiologia da UFMG. 2019.
- IV Congresso de Inovações e Metodologias do Ensino Superior. 2019
- Mesa Redonda: Febre Amarela: Desafios Presentes. UFMG, BH, MG, BR. 2018.
- XXVIII Congresso Brasileiro de Virologia e XII Encontro de Virologia do Mercosul. UFMG, BH, MG, BR. 2017.
- IV Simpósio de Microbiologia da UFMG. 2017.

Apresentação de Trabalhos e Participação em eventos científicos

- 55° Congresso de Medicina Tropical. Yellow fever virus genotyping: a tool to investigate suspected adverse events following yellow fever immunization. 2019. (Pôster).
- IV FAMERP-UTMB: Emerging infections in the Americas - common interests and collaboration between Brazil and USA. Late relapsing hepatitis after yellow fever. 2019. (Oral).
- VI Simpósio de Microbiologia da UFMG - Microbiologia Interligada. Síndrome hepática tardia após febre amarela. 2019. (Pôster).
- Febre Amarela: Desafios Presentes. 2018.
- V Simpósio de Microbiologia - Desafios Atuais no Enfrentamento de Doenças Microbianas. Investigação de casos de Febre Amarela em pacientes com vacinação prévia, em 2017/2018, em Minas Gerais. 2018. (Oral).
- XXIX Congresso Brasileiro de Virologia e XIII Encontro de Virologia do Mercosul. Yellow fever virus vaccination profile in a cohort with yellow fever from a public hospital in Belo Horizonte, Minas Gerais, in 2017-2018. 2018. (Pôster).
- II Encontro Científico do Laboratório de Vírus / UFMG - Comemoração dos 55 anos. 2017.
- III FAMERP-UTMB: Emerging infections in the Americas - common interests and collaboration between Brazil and USA. Molecular surveillance and characterization of dengue virus in Juiz de Fora, Southern Minas Gerais, during a huge dengue outbreak in 2016. 2017. (Pôster).

- IV Simposio de Microbiologia da UFMG - Metabolismo Microbiano. Followig up infected Yellow fever virus patients: a prospective study and new discoveries about this virus and the disease, during an outbreak in Minas Gerais, 2017. 2017. (Pôster).
- XXVIII Congresso Brasileiro de Virologia e XII Encontro de Virologia do Mercosul. Followig up infected Yellow fever virus patients: a prospective study and new findings about the disease, during an outbreak in Minas Gerais, 2017. 2017. (Pôster).
- II FAMERP-UTMB: Emerging infections in the Americas common interests and collaboration between Brazil and USA. FAMERP, São José do Rio Preto, SP, BR. Prospective Study of Zoonotic Flaviviruses In Birds, in Rio Grande do Norte, Brazil. 2016. (Pôster).
- III Simpósio de Microbiologia da UFMG. Primeiro caso de infecção autóctone em humano pelo Dengue vírus tipo 1, genótipo II, no Brasil. 2016. (Pôster).
- XXVIII Congresso Brasileiro de Virologia e XII Encontro de Virologia do Mercosul. UFMG, BH, MG, BR. Prospection of Yellow Fever virus in humans during an outbreak in Minas Gerais, Brazil, in 2017. 2017. (Pôster).
- IV Simpósio de Microbiologia da UFMG. UFMG, BH, MG, BR. Following up infected Yellow Fever virus patients: a prospective study and new discoveries about this virus and the disease, during an outbreak in Minas Gerais, in 2017. 2017. (Pôster).
- 6th Pan-American Dengue Research Network Meeting. UTMB, Galveston, Texas, Estados Unidos da América. Yellow fever: clinical, virological and immunological aspects. 2018. (Pôster).
- V Simpósio de Microbiologia da UFMG. UFMG, BH, MG, BR. Investigação de casos de febre amarela em pacientes com vacinação prévia, em 2017-2018, em Minas Gerais. 2018. (Pôster).
- XXIX Congresso Brasileiro de Virologia e XIII Encontro de Virologia do Mercosul. Centro de Eventos da febre amarela URGs, Gramado, RS, BR. Investigation of yellow fever cases in patients with previous vaccination record, in 2017/2018, Minas Gerais, Brazil. 2018. (Pôster).

Palestras e Minicursos

- Palestra: Novas descobertas sobre antigas doenças: os arbovírus. Faculdade Pará de Minas, Pará de Minas, MG, BR. 2018.
- Minicurso: Diagnóstico Molecular de doenças infecciosas. FUMEC. 2019

- Palestra: Febre amarela: vírus, doença e vacina. Faculdade Pará de Minas, Pará de Minas, MG, BR. 2018.

Aulas Ministradas

- Vírus do Sistema Respiratório. Curso de Especialização em Diagnóstico e Controle Microbiológico. UFMG. 2019 (4h/aula)
- Arbovírus: Novas descobertas sobre antigas doenças. UniBH. 2019 (12h/aula)
- Antivirais: da pesquisa básica ao uso, para turma de graduação em Farmácia UFMG a convite do Professor Cláudio Bonjardim. 2018. (2h/aula)

Participação em programa de rádios e televisão

- Pesquisa encontra molécula do coronavírus em espaços públicos de BH. 2020. (Programa de TV / Comentário). Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=pz2JVcWEsbU&feature=youtu.be>
- O mundo dos vírus - COVID-19. 2020. (Programa de rádio). Disponível em: <https://ufmg.br/comunicacao/noticias/o-mundo-dos-virus?fbclid=IwAR1DIaAx5Oo417L7oS8vRaes0ywnrpgHiMXX6ROVrR6CaetYh195wMHGibE>

Co-orientações e supervisões

- Supervisão dos alunos de Iniciação Científica Matheus Soares Arruda e Gabriela Fernanda Garcia Oliveira (Em andamento).

Atividades extracurriculares

- Integra a equipe de enfrentamento a pandemia da COVID-19 no Laboratório de Vírus/UFMG, auxiliando no diagnóstico molecular do SARS-CoV-2 junto a Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais. 2020.
- Atuou no enfrentamento do surto de febre amarela em Minas Gerais, em 2017-2018, juntamente com a Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais e o Hospital Eduardo de Menezes, contribuindo diretamente com o diagnóstico molecular dos casos suspeitos de febre amarela no estado. 2017-2018.
- Outubro/2018: Seleção e aprovação para participação da Comissão Editorial da Revista Docência do Ensino Superior, como editora adjunta e da Comissão do Congresso de Inovação e Metodologias do Ensino Superior - Atividade de complementação de Bolsa do Programa de Incentivo à Formação Docente (PFID) da Diretoria de Inovação e Metodologias de Ensino - GIZ, vinculada à Pró-Reitoria de Graduação.

- Auxílio na evisceração de 400 PNHs que fazem parte da coleção de tecidos animais do Laboratório de Vírus. 2017.

12 ANEXOS

Anexo I: Persistence of Yellow fever virus outside the Amazon Basin, causing epidemics in Southeast Brazil, from 2016 to 2018.

RESEARCH ARTICLE

Persistence of Yellow fever virus outside the Amazon Basin, causing epidemics in Southeast Brazil, from 2016 to 2018

Izabela Maurício de Rezende¹*, Lívia Sacchetto¹*, Érica Munhoz de Mello², Pedro Augusto Alves³, Felipe Campos de Melo Iani⁴, Talita Émile Ribeiro Adelino⁴, Myrian Morato Duarte⁴, Ana Luísa Furtado Cury⁴, André Felipe Leal Bernardes⁴, Tayrine Araújo Santos⁵, Leonardo Soares Pereira⁵, Maria Rita Teixeira Dutra⁵, Dario Brock Ramalho⁵, Benoit de Thoisy⁶, Erna Geessien Kroon¹, Giliane de Souza Trindade¹, Betânia Paiva Drumond¹*



1 Laboratório de Vírus, Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, 2 Centro de Controle de Zoonoses da Prefeitura de Belo Horizonte, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, 3 Laboratório de Imunologia de Doenças Virais, Instituto René Rachou-Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, 4 Serviço de Virologia e Riquetsioses, Fundação Ezequiel Dias- LACEN/MG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, 5 Hospital Eduardo de Menezes, Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, 6 Laboratoire des Interaction Virus-Hôtes, Institut Pasteur, Cayenne, French Guiana

* These authors contributed equally to this work.

* betaniadrumond@ufmg.br, betaniadrumond@gmail.com

OPEN ACCESS

Citation: Rezende IMd, Sacchetto L, Munhoz de Mello É, Alves PA, Iani FcDM, Adelino TÉR, et al. (2018) Persistence of Yellow fever virus outside the Amazon Basin, causing epidemics in Southeast Brazil, from 2016 to 2018. *PLoS Negl Trop Dis* 12 (6): e0006538. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006538>

Editor: Benjamin Althouse, Institute for Disease Modeling, UNITED STATES

Received: March 6, 2018

Accepted: May 17, 2018

Published: June 4, 2018

Copyright: © 2018 Rezende et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by grant APQ01574-17, received by BPD from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG; <http://www.fapemig.br>) and from Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (PRPq-UFMG; <https://www.ufmg.br/prpq>). Grants 440593/2016-6 and 440911/2016-8

Abstract

Background

Yellow fever (YF) is endemic in the Brazilian Amazon Basin, and sporadic outbreaks take place outside the endemic area in Brazil. Since 2016, YF epidemics have been occurring in Southeast Brazil, with more than 1,900 human cases and more than 1,600 epizootics of non-human primates (NHPs) reported until April 2018. Previous studies have demonstrated that Yellow fever virus (YFV) causing outbreaks in 2017 formed a monophyletic group.

Methodology/Principal findings

Aiming to decipher the origin of the YFV responsible for the recent epidemics, we obtained nucleotide sequences of YFV detected in humans ($n = 6$) and NHPs ($n = 10$) from Minas Gerais state during 2017–2018. Next, we performed evolutionary analyses and discussed the results in the light of epidemiological records (official numbers of YFV cases at each Brazilian Federative unit, reported by the Brazilian Ministry of Health). Nucleotide sequences of YFV from Southeast Brazil from 2016 to 2018 were highly conserved and formed a monophyletic lineage (BR-YFV_2016/18) within the genotype South America I. Different clusters were observed within lineage BR-YFV_2016/18, one containing the majority of isolates (from humans and NHPs), indicating the sylvatic transmission of YFV. We also detected a cluster characterized by two synapomorphies (amino acid substitutions) that contained YFV only associated with NHP what should be further investigated. The topology of lineage BR-YFV_2016/18 was congruent with epidemiological and temporal patterns of the ongoing

Anexo II: Yellow Fever Virus Genotyping Tool and Investigation of Suspected Adverse Events Following Yellow Fever Vaccination.



Article

Yellow Fever Virus Genotyping Tool and Investigation of Suspected Adverse Events Following Yellow Fever Vaccination

Izabela Maurício de Rezende ¹, Pedro Augusto Alves ², Matheus Soares Arruda ¹,
Andreza Parreiras Gonçalves ², Gabriela Fernanda Garcia Oliveira ¹,
Leonardo Soares Pereira ^{1,3}, Maria Rita Teixeira Dutra ³, Ana Carolina Campi-Azevedo ²,
Valéria Valim ⁴, Renata Tourinho ⁵, Jaqueline Germano de Oliveira ²,
Carlos Eduardo Calzavara ², Rodrigo Fabiano do Carmo Said ^{6,7}, Erna Geessien Kroon ¹,
Olindo Assis Martins-Filho ², Andrea Teixeira-Carvalho ² and Betânia Paiva Drumond ^{1,*}

¹ Department of Microbiology, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil; izabelamauriciorezende@gmail.com (I.M.d.R.); matheusmts@hotmail.com (M.S.A.); gabrielafernandag@gmail.com (G.F.G.O.); leosoaresgallo@yahoo.com.br (L.S.P.); ernagkroon@gmail.com (E.G.K.)

² Instituto René Rachou/Fundação Oswaldo Cruz, 30190-002 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil; pedroaugustoalves@yahoo.com.br (P.A.A.); andreza.parreiras@hotmail.com (A.P.G.); campiazevedo@gmail.com (A.C.C.-A.); jaqueline.oliveira@fiocruz.br (J.G.d.O.); calzavara@gmail.com (C.E.C.); oamfilho@gmail.com (O.A.M.-F.); atcteixeira@gmail.com (A.T.-C.)

³ Hospital Eduardo de Menezes, Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais, 30622-020 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil; mariaritatdutra@gmail.com

⁴ Hospital Universitário Cassiano Antônio Moraes - Empresa Brasileira de Serviços Hospitalares, Universidade Federal do Espírito Santo, 29075-910 Vitória, Espírito Santo, Brazil; val.valim@gmail.com

⁵ Biomanguinhos/Fundação Oswaldo Cruz, 21040-900 Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil; renata.tourinho@bio.fiocruz.br

⁶ Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais, 31630-900 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil; rodrigo.said@saude.gov.br

⁷ Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis, Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, 70058-900 Brasília, Distrito Federal, Brazil

* Correspondence: betaniadrumond@gmail.com or betaniadrumond@ufmg.br

Received: 30 October 2019; Accepted: 29 November 2019; Published: 4 December 2019



Abstract: The yellow fever (YF) vaccine consists of an attenuated virus, and despite its relative safety, some adverse events following YF vaccination have been described. At the end of 2016, Brazil experienced the most massive sylvatic yellow fever outbreak over the last 70 years and an intense campaign of YF vaccination occurred in Minas Gerais state in Southeast Brazil from 2016 to 2018. The present study aimed to develop a genotyping tool and investigate 21 cases of suspected adverse events following YF vaccination. Initial *in silico* analyses were performed using partial NS5 nucleotide sequences to verify the discriminatory potential between wild-type and vaccine viruses. Samples from patients were screened for the presence of the YFV RNA, using 5'UTR as the target, and then used for amplification of partial NS5 gene amplification, sequencing, and phylogenetic analysis. Genotyping indicated that 17 suspected cases were infected by the wild-type yellow fever virus, but four cases remained inconclusive. The genotyping tool was efficient in distinguishing the vaccine from wild-type virus, and it has the potential to be used for the differentiation of all yellow fever virus genotypes.

Keywords: yellow fever virus; YFV-17DD; adverse event; arbovirus; yellow fever; vaccination; immunisation; vaccine; genotyping; wild-type virus



Case Report

Late-Relapsing Hepatitis after Yellow Fever

Izabela Maurício de Rezende¹‡, Leonardo Soares Pereira²‡, Jordana Rodrigues Barbosa Fradico³‡, Marcelo Antônio Pascoal Xavier⁴‡, Pedro Augusto Alves⁵, Ana Carolina Campi-Azevedo³, Elaine Speziali³, Lívia Zignago Moreira dos Santos², Natalia Soares Albuquerque², Indiara Penido², Tayrine Araujo Santos², Ana Paula Dinis Ano Bom⁶, Andrea Marques Vieira da Silva⁶, Camilla Bayma Fernandes⁶, Carlos Eduardo Calzavara⁷, Erna Geessien Kroon¹, Olindo Assis Martins-Filho³, Andréa Teixeira-Carvalho³# and Betânia Paiva Drumond¹*#

‡ These authors contributed equally to this work

These authors contributed equally to this work

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

² Eduardo de Menezes Hospital, Minas Gerais, Brazil.

³ Grupo Integrado de Pesquisas em Biomarcadores, Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Minas Gerais, Brazil.

⁴ Imunologia de Doenças Virais, Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Minas Gerais, Brazil and Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, Brazil.

⁵ Imunologia de Doenças Virais, Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Minas Gerais, Brazil.

⁶ Laboratório de Tecnologia Imunológica, Bio-Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil

⁷ Imunologia Celular e Molecular, Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Minas Gerais, Brazil.

* Correspondence: betaniadrumond@gmail.com, betaniadrumond@ufmg.br; phone: +55 31 98835 1194, +55 31 3409 2539

Received: date; Accepted: date; Published: date

Abstract: One patient presented hyporexia, asthenia, adynamia, and jaundice two months after acute yellow fever (YF) onset; plus, laboratory tests indicating hepatic cytolysis were rebounded by alanine and aspartate transaminases, and total and direct bilirubin levels. Laboratory tests discarded autoimmune hepatitis, inflammatory or metabolic liver disease, and new infections caused by hepatotropic agents. Anti-YFV IgM, IgG and neutralizing antibodies were detected in different times, but no viremia. A liver biopsy was collected three months after YF onset and tested positive for YFV antigens and wild-type YFV-RNA (364 RNA-copies/gram/liver). Transaminases and bilirubin levels remained elevated for five months, and the arresting of symptoms persisted for six months after the acute YF onset. Several serum chemokines, cytokines, and growth factors were measured. A similar immune response profile was observed in the earlier phases of the disease, followed by more pronounced changes in the later stages, when transaminases levels returned to normal. The results indicated viral persistence in the liver and continual liver cell damage three months after YF onset, and reinforced the need for extended follow-ups of YF patients. Further studies to investigate the role of possible viral persistence and the immune response causing relapsing hepatitis following YF are also necessary.

Keywords: yellow fever virus; yellow fever; liver damage; viral persistence; hepatitis; liver biopsy; persistent infection; relapsing hepatitis; emerging virus; flavivirus

1. Introduction