

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Microbiologia

Natalia Ingrid Oliveira da Silva

**DINÂMICA DE CIRCULAÇÃO DE VÍRUS ZONÓTICOS EMERGENTES:
investigação de arbovírus em primatas não humanos no Brasil**

Belo Horizonte

2021

Natalia Ingrid Oliveira da Silva

**DINÂMICA DE CIRCULAÇÃO DE VÍRUS ZONÓTICOS EMERGENTES:
investigação de arbovírus em primatas não humanos no Brasil**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação
em Microbiologia da Universidade Federal de
Minas Gerais como requisito parcial para
obtenção do título de doutor em Ciências:
Microbiologia

Orientadora: Profa. Dra. Betânia Paiva Drumond

Belo Horizonte
2021

043

Silva, Natalia Ingrid Oliveira da.

Dinâmica de circulação de vírus zoonóticos emergentes: investigação de arbovírus em primatas não humanos no Brasil [manuscrito] / Natalia Ingrid Oliveira da Silva. - 2021.

227 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. Microbiologia. 2. Zoonoses. 3. Arbovirus. 4. Vírus da Febre Amarela. 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
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ATA DE DEFESA DE TESE

ATA DA DEFESA DE TESE DE NATALIA INGRID OLIVEIRA DA SILVA

Nº REGISTRO: **2017757840**

Às 14:00 horas do dia **16 de agosto de 2021**, reuniu-se, por via remota, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Cintia Lopes de Brito Magalhães (Universidade Federal de Ouro Preto), Bruno Eduardo Fernandes Mota (Faculdade de Farmácia - UFMG), Ana Carolina Bernardes Terzian (Instituto René Rachou - FIOCRUZ/Minas), Galileu Barbosa Costa (Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Bahia) e a Profa. Dra. Betânia Paiva Drumond - Orientadora para julgar o trabalho final "DINÂMICA DE CIRCULAÇÃO DE VÍRUS ZOONÓTICOS EMERGENTES: Investigação de arbovírus em primatas não humanos no Brasil", da aluna **Natalia Ingrid Oliveira da Silva**, requisito final para a obtenção do Grau de **DOCTOR EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profa. Dra. Betânia Paiva Drumond, 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 pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 16 de agosto de 2021.

MINUTES OF DISSERTATION DEFENSE

MINUTES OF DISSERTATION DEFENSE of Natalia Ingrid Oliveira da Silva

At 2:00pm on **AUGUST 16, 2021**, at the Institute of Biological Sciences of UFMG, Bruno Eduardo Fernandes Mota (Faculty of Pharmacy - UFMG), Ana Carolina Bernardes Terzian (René Rachou Institute-FIOCRUZ/Minas), Galileu Barbosa Costa (State University of Santa Cruz, Ilhéus, Bahia), Prof. Cintia Lopes de Brito Magalhães (Federal University of Ouro Preto - UFOP), and Prof. Betânia Paiva Drumond (advisor) composed the evaluation committee, as indicated by the Graduate Program in Microbiology, to evaluate the thesis : "*Circulation dynamics of emerging zoonotic viruses: investigation of arboviruses in non-human primates in Brazil*", of the doctoral candidate **Natalia Ingrid Oliveira da Silva**, as a final requirement for obtaining the degree of DOCTOR IN BIOLOGICAL SCIENCES: MICROBIOLOGY. The session was opened by the Chair of the Committee, Prof. Prof. Betânia Paiva Drumond. After explaining the rules for the thesis to the audience, the chair opened the session and the doctoral candidate presented her work. Following, each member of the committee evaluated the candidate with the doctoral candidate's respective defense. Afterwards, the Committee gathered in private to judge and issue the final result. The doctoral candidate

was considered **APPROVED**. The final result was publicly communicated to the candidate by the Chair of the Committee. There being no further issues to discuss, this minute was drawn up and signed by the members of the Evaluation Committee. Belo Horizonte, August the 16th, 2021. The doctoral candidate has 60 (sixty) days from this date to deliver the final version of the thesis to the Graduate Program in Microbiology at UFMG and request her diploma.

Membros da banca:

(Members of the examining board)

Dra. Cintia Lopes de Brito Magalhães
Dr. Bruno Eduardo Fernandes Mota
Dra. Ana Carolina Bernardes Terzian
Dr. Galileu Barbosa Costa

De acordo:

Profa. Dr. Betânia Paiva Drumond
(Orientadora - Advisor)

Profa. Danielle da Glória de Souza
(Coordenadora -
Coordinator of the Graduate Program in Microbiology/UFMG)

Belo Horizonte, 16 de agosto de 2021.

(Belo Horizonte, August 16, 2021.)



Documento assinado eletronicamente por **Betania Paiva Drumond, Professora do Magistério Superior**, em 17/08/2021, às 10:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Bruno Eduardo Fernandes Mota, Membro**, em 17/08/2021, às 11:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Galileu Barbosa Costa, Usuário Externo**, em 17/08/2021, às 13:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ana Carolina Bernardes Terzian, Usuário Externo**, em 17/08/2021, às 13:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Cintia Lopes de Brito Magalhães, Usuário Externo**, em 17/08/2021, às 16:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniele da Gloria de Souza, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 17/08/2021, às 16:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0840709** e o código CRC **19DD611B**.

Dedico esse trabalho a todos os mentores que tive ao longo da vida. Aos meus pais, meus primeiros mentores e meu exemplo de vida, que me ensinaram o valor da educação, da gentileza e da empatia. Aos meus irmãos e amigos que me ensinaram a enxergar a vida com alegria, diversão e acolhimento. E aos meus professores, que me guiaram e me guiam pelo caminho do conhecimento, da ciência e da busca pela verdade. Obrigada a todos por fazerem parte desta jornada e por contribuírem para o desenvolvimento do ser que sou hoje, dentro e fora da academia. Deixo aqui meu sincero e enorme obrigado!

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dra. Betânia Drumond pela oportunidade de desenvolver esse trabalho sob sua orientação. Obrigada por todo conhecimento transmitido, pela paciência, pelos puxões de orelha, por ter me guiado e por ter acreditado no meu trabalho.

Aos membros da banca avaliadora Dras. Mariana Sequetin, Ana Carolina Terzian, Cintia Magalhães, Giliane Trindade, e Drs. Galileu Barbosa e Bruno Mota, por aceitarem o convite de participar e avaliar esta tese e, principalmente pelas excelentes contribuições a este trabalho.

Aos professores e colegas do Laboratório de Vírus pelo acolhimento, toda contribuição e pelo espírito de coletivismo durante esses 4 anos. Aos professores pela inspiração, ética e, por todo ensinamento. Aos colegas, à toda a ajuda e todo o carinho que recebi, a cada momento de “desespero” e de alegria que estiveram comigo.

Aos colegas do grupo GPARbo por todo trabalho realizado juntos, pela parceria, por me ajudarem a construir este trabalho e por darem continuidade a ele.

Aos Professores da Pós Graduação em Microbiologia-UFMG pela sua excelência no ensino, reflexões em suas disciplinas e pela incansável luta em prol da Ciência no Brasil. E aos técnicos administrativos do ICB que contribuíram direta e indiretamente para a realização deste trabalho.

À CNPq, CAPES, FAPEMIG e demais órgãos de fomento pelo auxílio financeiro. Ao ICB-UFMG e seus pesquisadores por proporcionar a infraestrutura e auxílio necessários para a realização deste trabalho.

Aos colaboradores, Decit/SCTIE/MoH, Cetas/BH e às Secretarias de Estado de Saúde (SES-MG) e de Planejamento (SEPLAG-MG) de Minas Gerais, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Prefeitura de Belo Horizonte, LZOON-PBH, CCZ-PBH, e colaboradores dos Laboratórios de Vírus e de Evolução de Mamíferos do ICB-UFMG. E aos pesquisadores Dr. Sergio Lucena e equipe (UFES), Dra. Desiree LaBeaud, Dr. Benôit de Thoisy e Dr. Pedro Augusto Alves.

Aos queridos amigos Ana Gabriela, Ana Luiza, Natália, Nídia, Jaqueline, Walter e Mateus pelo apoio (essencial!) desde o início. Obrigada pela amizade, por todo companheirismo, pela ajuda e discussões dentro e fora do laboratório e por caminharem ao meu lado durante essa jornada.

À minha amada família! Aos meus pais, Julio e Branca pelo despertar do conhecimento, por serem meus grandes mestres na vida, pelo amor incondicional, pela confiança e, principalmente por acreditarem no meu amor pela Ciência. Ao meu irmão Lucas pelo apoio e à minha irmã Julia, por ser minha melhor amiga e meu suporte. Ao Vidy, meu maior companheiro e incentivador, por todo o apoio, amor e carinho e por compartilhar comigo ideias e conhecimentos na profissão e na vida. Sem este apoio nada disso seria possível!

Por fim, agradeço especialmente a todos os cientistas, pesquisadores, profissionais da saúde e de linha de frente que trabalham incansavelmente para salvar vidas e combater a pandemia que vivemos neste momento. Que a ciência, sabedoria, a verdade e a empatia guiem os líderes mundiais e locais, responsáveis pela vida de tantas pessoas.

*“The Road goes ever on and on
Down from the door where it began.
Now far ahead the Road has gone,
And I must follow, if I can,
Pursuing it with eager feet,
Until it joins some larger way
Where many paths and errands meet.
And whither then? I cannot say”*
— J.R.R. Tolkien, *The Fellowship of the Ring*

RESUMO

A distribuição global e os casos associados às zoonoses virais emergentes têm aumentado nas últimas décadas, se tornando uma das principais ameaças à saúde pública em todo mundo. No Brasil, as arboviroses se destacam como as zoonoses de maior impacto. Os surtos recentes de febre amarela (FA) em humanos e primatas não humanos (PNH) fora da bacia Amazônica geraram um alerta quanto à reemergência e manutenção do vírus da febre amarela (YFV) fora dessa região. Além disso, a emergência de novos vírus como os vírus Chikungunya (CHIKV) e Zika (ZIKV) marcam o cenário epidemiológico das arboviroses no país. Os maiores surtos de FA no Brasil ocorreram entre 2016/2018, principalmente no Sudeste, com milhares de casos e mortes de PNH e humanos. Com o objetivo de investigar a circulação de YFV e outros arbovírus [CHIKV, ZIKV, e os vírus Mayaro (MAYV) e Oropouche OROV)] em PNH nos estados de Minas Gerais (MG) e Espírito Santo (ES), foram analisadas através RT-qPCR *OneStep*, amostras de carcaças de PNH de diferentes áreas dos dois estados. O RNA de YFV foi detectado em 144 (n=550) amostras de fígado e pulmão de PNH (gêneros *Alouatta*, *Callithrix* e família Cebidae), em 85 municípios de MG entre janeiro-abril de 2018. Não foram detectadas amostras de PNH YFV-positivas em 2019. Em junho de 2020 foi detectada uma amostra de PNH YFV-positiva coletada em ambiente rural no município de Curvelo. Nenhuma amostra de PNH (MG) testada foi positiva para o genoma dos outros arbovírus analisados. No ES o genoma de YFV foi detectado em 100% (n=36) das amostras de fígado de PNH testadas. As amostras foram coletadas em sete municípios de três regiões do estado durante o período epidêmico para FA em 2017, demonstrando a ampla circulação do vírus no estado. Estes resultados demonstram a extensa circulação do YFV nos estados de MG e ES, além da circulação do vírus em PNH em áreas urbanas, principalmente grandes centros urbanos da região Metropolitana de MG. Embora até o momento não exista evidência epidemiológica do ciclo de transmissão urbano no país no recente surto de FA, a detecção de PNH YFV-positivos nesses ambientes associados à presença de vetores competentes podem contribuir para a reurbanização da FA no Brasil. Além disso, foi detectada uma amostra YFV-positiva em 2020 pertencente à mesma linhagem circulante no estado durante os surtos de 2016/2018, podendo demonstrar uma manutenção do YFV no estado de MG.

Palavras-chave: Vírus zoonóticos. Zoonoses. Arbovírus. Febre Amarela. *Yellow fever virus*. Primatas não humanos.

ABSTRACT

The global distribution and cases associated with emerging viral zoonoses have increased in recent decades, becoming one of the main threats to public health worldwide. In Brazil, arboviruses stand out as the zoonoses with the greatest impact. Recent outbreaks of yellow fever (YF) in humans and non-human primates (NHP) outside the Amazon basin have raised an alert regarding the re-emergence and maintenance of the *Yellow fever virus* (YFV) outside this region. In addition, the emergence of new viruses such as *Chikungunya virus* (CHIKV) and *Zika virus* (ZIKV) mark the epidemiological scenario of arboviruses in Brazil. The largest YF outbreaks in Brazil occurred between 2016/2018, mainly in the Southeast region, with thousands of human and NHP cases and deaths. To investigate the circulation of YFV and other arboviruses [CHIKV, ZIKV, *Mayaro virus* (MAYV), and *Oropouche virus* (OROV)] in NHP in Minas Gerais (MG) and Espírito Santo (ES) states, samples of NHP carcasses from different areas of the two states were analyzed by *OneStep* RT-qPCR. YFV-RNA was detected in 144 (n = 550) liver and lung samples of NHP (genus *Alouatta*, *Callithrix* and family Cebidae), in 85 municipalities of MG between January-April/2018. No YFV-positive NHP samples were detected in 2019. In June/2020, one YFV-positive NHP sample was detected, collected in a rural environment in the municipality of Curvelo. None NHP sample tested (MG) was positive for the genome of the other arboviruses analyzed. In ES, the YFV genome was detected in 100% (n = 36) of the NHP liver samples tested. The samples were collected in seven municipalities in three regions of the state during the epidemic period for YFV in 2017, demonstrating the wide circulation of the virus in the state. These results demonstrate an extensive YFV circulation in MG and ES states, in addition to the YFV circulation in NHP in urban areas, mainly large urban centers in the Metropolitan region of MG. Although so far there is no epidemiological evidence of the urban transmission cycle in Brazil in the recent YF outbreaks, a detection of a NHP YFV-positive in urban environments, associated with the presence of competent vectors may contribute to a re-urbanization of YF in the country. In addition, a YFV-positive sample was detected in 2020 belonging to the same lineage circulating in the state during the 2016/2018 outbreaks, which may demonstrate a maintenance of the YFV in MG state.

Keywords: Zoonotic viruses. Zoonoses. Arboviruses. Jungle fever. *Yellow fever virus*. Non-human primates.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclos de transmissão de arbovírus.....	25
Figura 2: Distribuição geográfica de algumas arboviroses emergentes de importância à saúde pública no mundo, 2017	27
Quadro 1: Arbovírus zoonóticos circulantes no Brasil.....	29
Figura 3: Organização do genoma do YFV	33
Figura 4: Áreas endêmicas e com ocorrência de febre amarela, na América do Sul e África	35
Figura 5: Casos de febre amarela em humanos e primatas não-humanos PNH no Brasil, 2016-2019	37
Figura 6: Ciclos de transmissão do YFV	38
Figura 7: Famílias de primatas não humanos do Brasil.....	40
Figura 8: Regiões com risco de transmissão do vírus zika.....	45
Figura 9: Regiões onde foram reportados casos de transmissão do vírus chikungunya.....	48
Figura 10: Ciclos de transmissão do vírus oropouche.....	52
Fluxograma 1: Fluxograma de metodologia de trabalho.....	59
Figura 12: Associação entre a taxa de positividade de YFV em PNH e o ambiente de coleta, 2018	80
Figura 13: Regiões de coleta de PNH positivos para RNA de YFV em áreas urbanas de Minas Gerais, 2018.....	81
Figura 14: Associação entre gênero/família de PNH positivo para RNA de YFV e o ambiente de coleta.....	83
Figura 15: Árvore de Máxima Verossimilhança (ML) do gene parcial do envelope de YFV (669pb).....	84
Figura 16: Municípios de Minas Gerais com casos de epizootias de YFV, 2018 – 2019	89

Figura 17: Ensaio piloto para avaliação qualitativa da atividade neutralizante e teste rápido para YFV em amostras de PNH, 2018	92
Figura 18: Detecção de RNA de YFV em amostras de PNH coletadas no estado do Espírito Santo, 2017	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sequências de iniciadores (<i>primers</i>) utilizados na detecção de arbovírus e controle endógeno.....	66
Tabela 2: Mesorregiões com coletas de carcaças de PNH suspeitos de infecção por YFV	73
Tabela 3: Primatas não humanos positivos para presença de RNA de YFV em amostras de fígado e pulmão, provenientes de Minas Gerais em 2018 e 2020	75
Tabela 4: Primatas não humanos positivos para presença de RNA de YFV em amostras de fígado (ES), 2017.....	94

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BUSV: vírus bussuquara

CPCV: vírus cacipacore

Cat: Categoria

CCHN/UFES: Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Espírito Santo

cDNA: DNA complementar

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

CHIKV: vírus chikungunya

CMC: Carboximetilcelulose

CONCEA: Conselho de Experimentação Animal

COVID-19: *Coronavirus disease - 2019*

CPXV: vírus cowpox

Cq: *Quantification cycle*

DENV: vírus da dengue

E: proteína do envelope

E1: Proteína 1 do Envelope

ECSA: Linhagem Leste/Central/Sul Africana

EEEV: vírus da encefalite equina oriental

ES: Estado do Espírito Santo

EUA: Estados Unidos da América

FA: Febre amarela

GPArbo: Grupo de Prospecção de Arbovírus

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IC: Intervalo de confiança

ICB: Instituto de Ciências Biológicas

ICMBio: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade

ICTV: *International Committee on Taxonomy of Viruses*

IGUV: vírus Iguape

ID: identificação

ILHV: vírus de Ilhéus

IUCN: *International Union for Conservation of Nature*

kb: kilobase

LV: Laboratório de Vírus – UFMG

LZOO: Laboratório de Zoonoses da Prefeitura de Belo Horizonte

MAYV: vírus mayaro

MEM: Meio Mínimo Essencial *Eagle*

MG: Estado de Minas Gerais

ML: Máxima Verossimilhança

MPXV: vírus monkeypox

MSBR: Ministério da Saúde do Brasil

MTT: Ensaio de redução de MTT (brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio)

NB2: Nível de Biossegurança 2

NHP: *Non-human primate*

NS: Não estrutural

nt: nucleotídeos

OMS: Organização Mundial da Saúde

OR: *Odds ratio*

ORF: *Open reading frame*

OROV: vírus oropouche

PAHO: Organização Pan Americana da Saúde

pb: Pares de base

PBS: Tampão fosfato alcalino

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

PNH: Primata não humano

PNI-MS: Plano Nacional de Imunização – Ministério da Saúde

prM: precursora de proteína membrana

PRNT: Teste de Neutralização por Redução de Placa

qPCR: Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real

RIFD: Reação de Imunofluorescência Direta

RT-qPCR: Reação da transcriptase reversa seguida da reação em cadeia da polimerase em tempo real

ROCV: vírus rocio

Rpm: Rotações por minuto

RT: Transcrição reversa

SARS-CoV-2: *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*

SES: Secretaria de Estado da Saúde

SEVS: Serviço Estadual de Vigilância em Saúde

SFB: Soro Fetal Bovino

SISBIO: Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade

SLEV: vírus da encefalite de *Saint Louis*

SINAN: Sistema de Informação de Agravos de Notificação

Sub-Cat: Sub-categoria

SVS: Secretaria de Vigilância em Saúde

TR: *transframe*

UFES: Universidade Federal do Espírito Santo

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

PFU: Unidades formadoras de placa

UTR: *Untranslated region*

VACV: vírus vaccínia/vírus tipo vaccínia

VARV: vírus da varíola

YFV: vírus da febre amarela

WHO: *World Health Organization*

WNV: vírus do Oeste do Nilo

ZIKV: vírus zika

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
2.1. Arbovírus	24
2.2. Vírus da febre amarela	33
2.2.1. <i>Vírus, taxonomia e epidemiologia</i>	33
2.2.2. <i>Ciclos de transmissão do YFV e epizootias de febre amarela em PNH no Brasil</i>	38
2.3. Vírus da zika	44
2.4. Vírus chikungunya	47
2.5. Vírus oropouche	50
2.6. Vírus mayaro	53
2.7. Importância dos PNH na vigilância da emergência e reemergência de arboviroses	54
3. JUSTIFICATIVA	57
4. OBJETIVOS	59
4.1. Objetivo geral	59
4.2. Objetivos específicos	59
5. MATERIAIS E MÉTODOS	60
5.1. Fluxo de trabalho	60
5.2. Aspectos Éticos	60
5.3. Caracterização do local de estudo e das amostras biológicas	61
5.3.1. <i>Espírito Santo</i>	61
5.3.2. <i>Minas Gerais</i>	61
5.3.3. <i>Amostras biológicas</i>	62
5.4. Levantamento molecular de arbovírus em amostras de PNH	64
5.4.1. <i>Extração de RNA viral total</i>	64
5.4.2. <i>Detecção de arbovírus através de RT-qPCR One Step (tempo real) e PCR Endpoint (convencional)</i>	64
5.4.3. <i>Eletroforese em gel de poliacrilamida</i>	67
5.4.4. <i>Purificação de produtos de PCR</i>	67
5.4.5. <i>Sequenciamento e análises filogenéticas</i>	68

5.5. Ensaio piloto para avaliação qualitativa da atividade neutralizante viral usando amostras de tecidos sólidos	69
5.5.1. <i>Células Vero</i>	69
5.5.2. <i>Ensaio piloto para avaliação qualitativa da atividade neutralizante de YFV</i>	69
5.6. Análises estatísticas	71
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	72
6.1. Distribuição dos primatas não humanos amostrados e locais de coleta em Minas Gerais, 2018 - 2020	71
6.2. Investigação do vírus da febre amarela em carcaças de primatas não humanos em Minas Gerais, 2018-2020	74
6.3. Investigação de do vírus da febre amarela em carcaças de primatas não humanos no Espírito Santo, 2017	89
6.4. Investigação dos vírus chikungunya, zika, mayaro e oropouche em carcaças de primatas não humanos em Minas Gerais, 2017-2019	97
7. CONCLUSÕES	101
8. PERSPECTIVAS	102
9. PRODUÇÃO CIENTÍFICA E OUTRAS ATIVIDADES	103
9.1. Artigos aceitos em periódicos científicos	103
9.2. Produção técnica	104
9.3. Organização de eventos e congressos	104
9.4. Orientações	104
9.5. Palestras e Entrevistas	104
9.6. Revisão de artigos para Periódicos Científicos	105
9.7. Projetos de extensão	105
9.8. Participação em eventos científicos e cursos de capacitação	105
9.9. Resumos publicados em anais de eventos científicos	106

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	109
ANEXO A – Tabela Suplementa 1	131
ANEXO B – Tabela Suplementar 2	145
ANEXO C - Artigo aceito em periódico internacional.....	147
ANEXO D – Artigo aceito em periódico internacional.....	159
ANEXO E - Artigo aceito em periódico internacional.....	175
ANEXO F - Artigo aceito em periódico nacional	197
ANEXO G - Artigo aceito em periódico internacional	206

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos 50 anos o mundo observou um aumento expressivo da emergência e reemergência de doenças infecciosas, sendo estas atualmente consideradas algumas das principais ameaças à saúde humana e animal globalmente (GUBLER, 2010b). Mais da metade dos patógenos responsáveis por causar doenças em humanos têm sua origem em um hospedeiro animal, silvestre ou doméstico, sendo estas doenças denominadas zoonoses (BIRD; MAZET, 2018a; MORALES *et al.*, 2017). As doenças virais zoonóticas sempre fizeram e ainda fazem parte da história da humanidade, apesar dos esforços para controlar e prevenir aquelas que apresentam impactos mais significativos na saúde pública e na economia em todo o mundo.

Durante o último século, fatores antropogênicos como, o aumento da movimentação humana desde a expansão agrícola até a globalização comercial, o aumento populacional e da urbanização, assim como a destruição de habitats silvestres, a utilização de animais para trabalho e domesticação e o tráfico ilegal de animais, foram os principais fatores associados ao aumento da disseminação e expansão geográfica das zoonoses globalmente (GIBB *et al.*, 2020a; GUTH *et al.*, 2020; SMITH *et al.*, 2007). O homem atua como um dos principais canais de dispersão de patógenos pelo mundo, seja através da sua própria movimentação, através da translocação de animais domésticos e silvestres e mosquitos vetores para novas regiões, gerando um desequilíbrio no ecossistema no ambiente (PERRY; GRACE; SONES, 2013a). Dessa forma, há um maior risco de que estes novos patógenos encontrem hospedeiros susceptíveis, principalmente na fauna silvestre, estabeleça na região um ciclo enzoótico de transmissão e persista no local (GUTH *et al.*, 2020).

Dentre os vírus emergentes de grande importância em todo o mundo estão os arbovírus, responsáveis por causarem doenças conhecidas como arboviroses. Os arbovírus (do inglês, *arthropod-borne virus*), são mantidos na natureza principalmente através de ciclos de transmissão que envolvem vetores artrópodes hematófagos. Os vetores, em sua maioria mosquitos e carrapatos, podem tanto transmitir o vírus à sua progênie através da via transovariana, assim como a hospedeiros vertebrados através da hematofagia (MAYER; TESH; VASILAKIS, 2017a; WEAVER, S. C., 2006; WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 1989; YOUNG, 2018). A distribuição global e o número de casos associados às arboviroses têm aumentado durante as últimas décadas e vem se tornado uma das principais ameaças à saúde pública em muitos países (BLAIR; ADELMAN; OLSON, 2000; FAILLOUX *et al.*, 2017). Aproximadamente 17% das doenças infecciosas conhecidas até

hoje que afetam a saúde pública são causadas por arbovírus (KADING; BRAULT; BECKHAM, 2020). Assim como para outras doenças zoonóticas, o aumento da incidência de casos e de epidemias de arboviroses está relacionado a vários fatores ambientais e antropogênicos, como práticas de agricultura e caça, crescimento populacional exacerbado, urbanização e aproximação dos habitats silvestre, desmatamento e fragmentação de habitats naturais, criação de reservatórios artificiais que podem levar a uma maior prevalência do vetor e o aumento das práticas de ecoturismo e viagens intercontinentais (BLAIR; ADELMAN; OLSON, 2000; FIGUEIREDO, 2007; GIBB *et al.*, 2020b; VASCONCELOS, *et al.*, 2001; VASILAKIS; GUBLER, 2016).

O Brasil é um país que oferece condições climáticas tropicais ideais para a propagação dos vetores artrópodes, além de alta densidade populacional e da presença de hospedeiros amplificadores nas áreas urbanas e periurbanas (interface entre as áreas rural e urbana), o que justifica as altas incidências dessas doenças no país. Além disso, outros fatores socioeconômicos estão diretamente relacionados com a incidência de arboviroses na população brasileira, como por exemplo, as condições sanitárias, falta de investimento em saúde pública e de acesso à informação (DE THOISY, *et al.*, 2020; LOWE *et al.*, 2020). Existem cerca de 200 diferentes espécies de arbovírus isolados no Brasil, sendo ~100 espécies responsáveis por causar doenças em humanos (TRAVASSOS DA ROSA *et al.*, 1997; FIGUEIREDO, 2007; MUSSO *et al.*, 2018). Atualmente os arbovírus de maior relevância na saúde pública do país e com alta incidência são os vírus: da dengue (*Dengue virus* – DENV); febre amarela (*Yellow fever virus/YFV*); chikungunya (*Chikungunya virus/CHIKV*); e zika (*Zika virus/ZIKV*). A vigilância sentinela é uma das ferramentas que permite a detecção precoce da presença de arbovírus como, o YFV, na natureza antes destes chegarem às áreas urbanas gerando risco à população humana. Dentre os hospedeiros vertebrados do YFV, os primatas não humanos (PNH) desempenham papel de animais sentinelas na vigilância epidemiológica, alertando as autoridades da saúde a agirem para evitar possíveis epidemias (WOLFE, *et al.*, 1998; SVOBODA, 2007; KOWALEWSKI *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2020).

Durante a recente epidemia de YFV no Brasil (2016-2018), que atingiu principalmente a região sudeste do país, foram reportados mais de 2.500 casos de epizootias em PNH na região, além de mais 2.200 casos confirmados de febre amarela (FA) em humanos. Os boletins epidemiológicos do Ministério da Saúde (MSBR) e das Secretarias Estaduais de Saúde (SES) começaram a reportar os primeiros casos de epizootias em PNH e casos humanos confirmados para FA no fim do ano de 2016 e início de 2017 (DE THOISY, B. *et*

al., 2020; SACCHETTO *et al.*, 2020; SECRETARIA DO ESTADO DE SAÚDE DE SÃO PAULO, 2017; SECRETARIA DO ESTADO DE SAÚDE, 2017; SECRETARIA ESTADUAL DE SAÚDE/SES-MG, 2017; SESA-ES, 2017b). Estudos mostram que os casos em PNH precederam os primeiros relatos de casos de FA em humanos em regiões do estado de Minas Gerais (MG) (FARIA, *et al.*, 2018). Além da reemergência do YFV existe a co-circulação de diferentes arbovírus [DENV, CHIKV, ZIKV, *Mayaro virus* (MAYV), *Oropouche virus* (OROV)] no país que podem, assim como o YFV, ter PNH como possíveis hospedeiros reservatórios, apresentando uma ameaça de futuras pandemias ou de manutenção desses vírus na natureza.

10 O aumento do número de casos e as contínuas epidemias de arboviroses no Brasil e em outros países de clima tropical e sub-tropical demonstram a importância da vigilância epidemiológica para identificação e ações de mitigação contra esses vírus. Desde o final de 2016 o Brasil vem enfrentando uma das maiores epidemias de febre amarela ocorrendo fora da região endêmica da bacia Amazônica. De 2016 a 2018 o país foi atingido de forma
15 significativa pelo surto, com altos números de casos e mortes confirmadas em humanos e casos de epizootias em PNH causadas pela infecção por YFV. Embora os números de casos na região sudeste tenham diminuído a partir do final de 2018, surtos de FA foram reportados em 2019/2020 no estado de São Paulo e ao sul do país, com casos sendo reportados na região sul em 2021 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, MSBR, 2020c, 2021b; SVS-MS (MINISTÉRIO
20 DA SAÚDE/SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE)., 2019a).

Uma das principais regiões brasileiras atingidas pela epidemia de 2016/2018 foi a região sudeste, com destaque para o alto número de casos reportados no estado de Minas Gerais (SES-MG, 2017, 2018a, c; SES/MG, 2017). Foi a partir deste cenário de altas taxas de ocorrência de casos de FA em MG que se formou uma parceria entre o Laboratório de
25 Zoonoses de Belo Horizonte (LZOON-BH) e o Laboratório de Vírus da UFMG (LV-UFMG) com o objetivo de investigar a dinâmica de circulação do YFV em PNH em ambientes rurais/silvestres, na interface entre os ambientes urbano-rural, e em áreas urbanas durante (2017-2018) e após a epidemia (2019-2020) de YFV, no estado de MG. Além deste estudo, as amostras foram testadas para a presença de outros arbovírus zoonóticos como CHIKV, ZIKV,
30 MAYV e OROV que possam ter como reservatório hospedeiros os PNH. Neste presente estudo, foram testadas para YFV amostras referentes aos anos de 2018 a 2020, que juntamente com os resultados obtidos na tese de doutorado de Lívia Sacchetto Pengo (SACCHETTO, 2020), deram origem a um manuscrito intitulado “*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” (ANEXO D) (SACCHETTO et al., 2020).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Arbovírus

5 Os arbovírus, responsáveis por causar doenças conhecidas como arboviroses, são vírus transmitidos a hospedeiros vertebrados através de vetores artrópodes hematófagos como mosquitos e carrapatos, que se infectam com o vírus ao se alimentar do sangue de um hospedeiro vertebrado reservatório que se encontra em estado virêmico (Figura 1) (HERVÉ; TRAVASSOS DA ROSA, 1983; LOPES; NOZAWA; LINHARES, 2014; MAYER; TESH; 10 VASILAKIS, 2017b; TRAVASSOS DA ROSA *et al.*, 1997; WEAVER; REISEN, 2010; WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 1989). O ciclo de transmissão continua com este vetor infectado se alimentando do sangue de outros animais vertebrados não infectados como, aves, roedores, edentatos, marsupiais, primatas e até humanos, infectando-os. Os humanos são considerados hospedeiros finais não reservatórios (*dead-end*) para a maioria dos 15 arbovírus, uma vez que não apresentam viremia suficiente para infectarem um vetor. Porém, para alguns arbovírus como os vírus da dengue, febre amarela, chikungunya e zika, já foram descritas transmissão através do ciclo mosquito-humano-mosquito (GUBLER, 2002; WEAVER; REISEN, 2010; WEAVER *et al.*, 2018). Outra forma de manutenção dos arbovírus na natureza é através da transmissão vertical que ocorre em algumas espécies de 20 mosquitos hematófagos, que transmitem os vírus à sua progênie através da via transovariana (FAILLOUX *et al.*, 2017; HUBÁLEK; RUDOLF; NOWOTNY, 2014; WEAVER; REISEN, 2010; WHO, 1989)

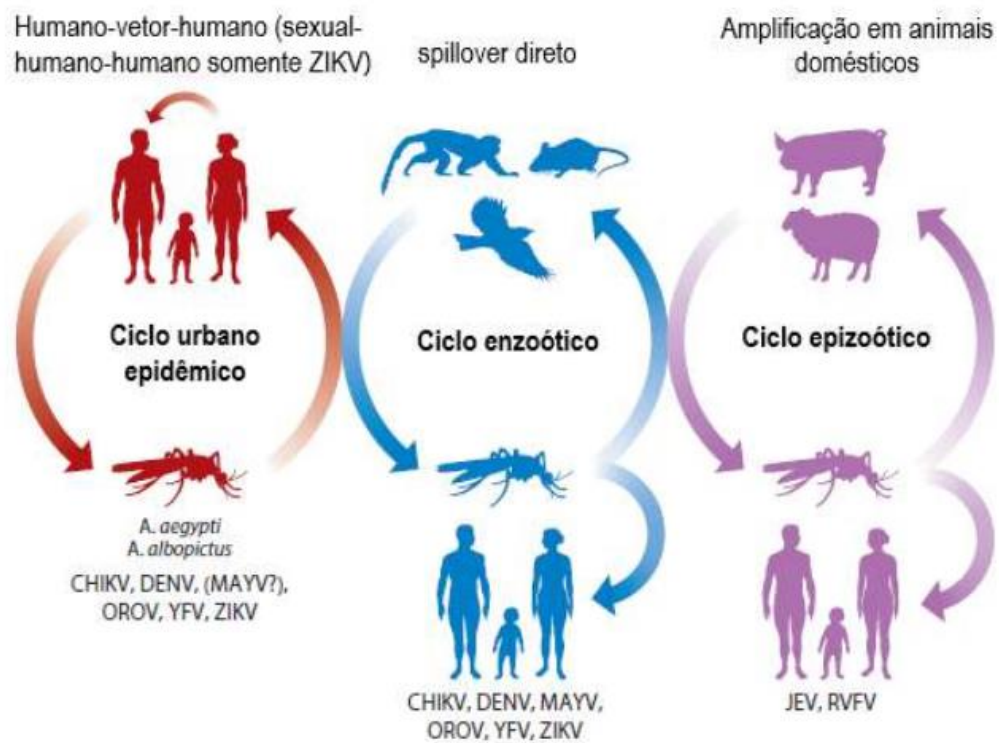


Figura 1: Ciclos de transmissão de arbovírus. Ao centro um ciclo enzoótico envolvendo hospedeiros vertebrados reservatórios e/ou amplificadores como, aves, roedores e primatas não humanos e o vetor artrópode. Os humanos se tornam infectados ao ter contato com habitats enzoóticos ou áreas epidêmicas para os arbovírus. A transmissão para humanos envolve picadas de artrópodes hematófagos infectados com arbovírus. O ciclo epidêmico urbano de algumas arboviroses pode envolver a transmissão humano-vetor-humano, como é o caso dos vírus da dengue e zika. A transmissão sexual-humano-humano foi descrito somente para o vírus da zika (à esquerda).
 Fonte: Adaptado de Weaver e colaboradores (2017).

5

10

Existem aproximadamente 545 espécies de arbovírus descritos atualmente no *Catalogue of Arthropod-borne and Selected Vertebrate Viruses of the World*, sendo grande parte espécies de ciclos de transmissão zoonótica, dentre as quais mais de 100 estão relacionadas com doenças que acometem humanos, levando a uma variedade de sinais clínicos dependendo do vírus causador da infecção (GUBLER, 2002; KARABATSOS, 1985; MONATH, 2019; MUSSO *et al.*, 2018). Os quadros clínicos em humanos podem variar de estado febril sistêmico até quadros hemorrágicos e infecções neurológicas que podem deixar sérias sequelas e até mesmo levar a óbito (TRAVASSOS DA ROSA *et al.*, 1997; VASILAKIS; GUBLER, 2016).

15

A maioria dos arbovírus está classificada dentro de poucas famílias e gêneros de vírus de RNA, sendo as principais famílias: *Peribunyaviridae*, *Flaviviridae*, *Reoviridae*, *Rhabdoviridae*, *Togaviridae* e *Orthomyxoviridae*. O único arbovírus com genoma de DNA conhecido até o momento é o vírus da peste suína africana (FIGUEIREDO, 2007; KARABATSOS, 1985; WEAVER, S. C., 2006b; YOUNG, 2018). O fato de haver apenas

uma espécie de arbovírus de DNA sugere que a plasticidade genética e as altas taxas de mutação exibidas em vírus de RNA podem facilitar sua capacidade de se multiplicar alternadamente em hospedeiros invertebrados e vertebrados, demonstrando seu sucesso e justificando a emergência e reemergência desses vírus na natureza (FIGUEIREDO, 2007; 5 HOLLAND; DOMINGO, 1998; WEAVER, 2006b).

A dispersão das espécies de arbovírus pelo mundo está relacionada diretamente à distribuição dos seus vetores artrópodes e seus habitats, principalmente em regiões tropicais e subtropicais como Américas, Caribe, África e Ásia, que já enfrentaram ou enfrentam grandes epidemias de YFV e DENV (Figura 2) (BLAIR; ADELMAN; OLSON, 2000; GOLDANI, 10 2017). Além destes, foram identificadas nestas regiões a emergência de novos arbovírus que são rapidamente transmitidas entre humanos em áreas urbanas, como CHIKV e ZIKV. Porém, esses vírus têm se espalhado geograficamente para regiões antes consideradas indenes para estes e outras arbovírus, como alguns países da Europa (GIRARD *et al.*, 2020; YOUNG, 2018). O aumento da dispersão dos arbovírus para países onde essas doenças não 15 são consideradas endêmicas ocorre principalmente devido a viagens intercontinentais de pessoas e o transporte ilegal de animais que estejam infectadas pelos arbovírus, além da introdução de vetores competentes para novas regiões, estabelecendo um ciclo enzoótico de transmissão e causando um desequilíbrio ecológico nesse ambiente (COUTO-LIMA *et al.*, 2017; GUTH *et al.*, 2020; MARCONDES *et al.*, 2017; PERRY; GRACE; SONES, 2013).

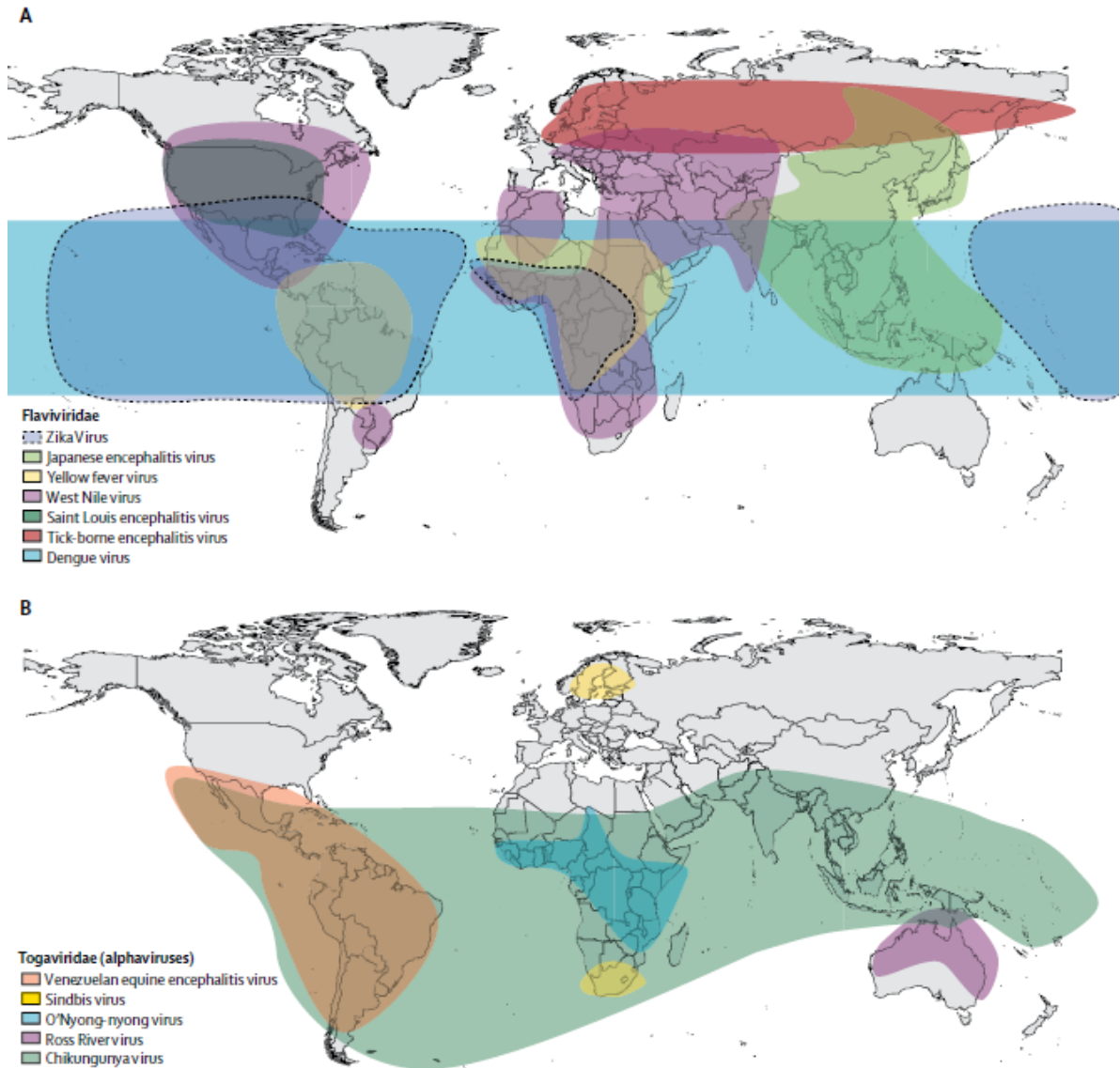


Figura 2: Distribuição geográfica de algumas arboviroses emergentes de importância à saúde pública no mundo, 2017. (A) Distribuição de algumas espécies de arbovírus da família *Flaviviridae* responsáveis por causar epidemias em diferentes países: vírus da zika (azul claro), vírus da encefalite japonesa (verde claro), vírus da febre amarela (amarelo), vírus do Oeste do Nilo (roxo), vírus da encefalite de *Saint Louis* (verde escuro), vírus da encefalite do carrapato (vermelho), e vírus da dengue (ciano). (B) Distribuição de algumas espécies de arbovírus da família *Togaviridae* responsáveis por causar epidemias em diferentes países: vírus da encefalite equina venezuelana (laranja), vírus Sindbis (amarelo), vírus O'Nyong-nyong (ciano), vírus do rio Ross (roxo), e vírus chikungunya (verde). (CHARLIER *et al.*, 2017).

O Brasil é um país predominante de clima tropical e com grandes extensões de floresta na região Amazônica, além de outras regiões de litoral, possuindo uma grande biodiversidade com a presença de várias espécies de animais vertebrados. Este ecossistema oferece condições ideais para a proliferação de muitos arbovírus (FIGUEIREDO, 2007; LOPES; NOZAWA; LINHARES, 2014). A existência de populações humanas em áreas rurais e de interface entre

áreas urbanas e rurais, e a presença de grandes populações de mosquitos vetores para arbovírus como os do gênero *Culex* e *Aedes*, favorece a emergência de arbovirose no país.

Um dos arbovírus de maior impacto mundial é o vírus da dengue, com cerca de 50% da população global vivendo em áreas de risco de infecção principalmente em países tropicais e subtropicais (BHATT *et al.*, 2013). O DENV é amplamente conhecida por causa epidemias de dengue de forma cíclicas (BHATT *et al.*, 2013; BRITO *et al.*, 2021). Contudo, entre 2017-2018 foi observado um declínio nos casos de infecção pelo vírus em países das Américas, incluindo o Brasil. Em 2019, o país observou uma ressurgência no número de casos de infecção por DENV, sendo registrados 1.544.987 casos prováveis de dengue até a semana epidemiológica 52 (30/12/2019) e em 2020, cerca de 987.173 casos prováveis da doença até a semana epidemiológica 53 (02/01/2021) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, MSBR, 2017b, 2020a, 2021a). Contudo, as recentes epidemias de febre amarela causadas pelo YFV no país (2016-2019) com altos números de mortes em humanos e PNH principalmente na região sudeste, geraram um alerta quanto à reemergência deste vírus no Brasil (DE THOISY, *et al.*, 2020; GIOVANETTI *et al.*, 2019; GOLDANI, 2017; HILL *et al.*, 2020; REZENDE, *et al.*, 2018; SACCHETTO *et al.*, 2020).

Mais recentemente, foi observada a emergência e expansão de dois arbovírus de relevância para a saúde pública no país: o CHIKV associado principalmente à casos de artralgias; e o ZIKV associado principalmente a desordens neurológicas e a malformações neonatais (Quadro 1). No Brasil, os primeiros casos de CHIKV ocorreram em 2015, com sua introdução no país ocorrendo em 2014. Dois anos depois (2016) foram registrados 271.824 casos prováveis de infecção por CHIKV no país e em 2020 foram registrados 82.419 casos prováveis até a semana epidemiológica 53 (02/01/2021) (CARDOSO, *et al.*, 2015; MINISTÉRIO DA SAÚDE, MSBR, 2021). Em 2013 o ZIKV foi introduzido no país contudo a primeira detecção oficial do vírus no país ocorreu apenas em 2015 (ZANLUCA *et al.*, 2015). Em 2016 foram registrados 215.319 casos prováveis de infecção pelo ZIKV, contudo, os casos de infecção por este vírus vêm diminuindo no país, sendo que em 2019 foram registrados 10.768 casos prováveis, e em 2020 (29/12/20) foram reportados 7.387 casos prováveis de febre do zika no Brasil (DONALISIO; FREITAS; ZUBEN, 2017; MINISTÉRIO DA SAÚDE, MSBR, 2020b, 2021a).

Quadro 1: Arbovírus zoonóticos circulantes no Brasil

Família	Vírus	Sigla	Vetor ou rota de transmissão	Reservatório zoonótico	Distribuição geográfica	Doença causada em humanos
<i>Flaviviridae</i>	<i>Dengue virus</i>	DENV	<i>Aedes aegypti</i> , <i>Aedes albopictus</i> (ciclo urbano) <i>Aedes</i> spp.	Primata não-humano (ciclo silvestre) Humano (ciclo urbano)	América do Sul América Central América do Norte África Ásia Austrália	Febre moderada Febre hemorrágica (extravasamento vascular, choque)
<i>Flaviviridae</i>	<i>Yellow fever virus</i>	YFV	<i>Aedes aegypti</i> (ciclo urbano) <i>Haemagogus</i> spp. e <i>Sabethes</i> spp. (ciclo silvestre)	Primata não-humano (ciclo silvestre) Humano (ciclo urbano)	América do Sul África	Síndrome febril Insuficiência hepática Síndrome hemorrágica
<i>Flaviviridae</i>	<i>Zika virus</i>	ZKV	<i>Aedes aegypti</i> <i>Aedes albopictus</i> Transmissão sexual Transmissão vertical (mãe para o feto)	Primata não-humano (ciclo silvestre) Humano (ciclo urbano)	América Central América do Sul América do Norte Ásia África	Síndrome febril Síndrome de Guillain-Barré Anomalia congênita Microcefalia
<i>Flaviviridae</i>	<i>Saint Louis encephalitis virus</i>	SLEV	<i>Culex</i> spp.	Aves silvestres Primatas não-humanos	América do Norte América Central América do Sul	Meningite Encefalite
<i>Flaviviridae</i>	<i>Rocio virus</i>	ROCV	<i>Aedes</i> spp. <i>Psorophora</i> spp. <i>Culex</i> spp.	Aves silvestres	América do Sul (Brasil)	Síndrome febril Encefalite
<i>Flaviviridae</i>	<i>West Nile virus</i>	WNV	<i>Culex</i> spp.	Aves silvestres Aves migratórias	América do Norte Oriente Médio Europa África Austrália	Síndrome febril Meningite Encefalite Paralisia flácida aguda

Família	Vírus	Sigla	Vetor ou rota de transmissão	Reservatório zoonótico	Distribuição geográfica	Doença causada em humanos
<i>Flaviviridae</i>	<i>Bussuquara virus</i>	BSQV	<i>Culex</i> spp.	Roedores Primatas não-humanos (?)	América Central América do Sul	Síndrome febril
<i>Flaviviridae</i>	<i>Cacipacore virus</i>	CPCV	<i>Aedes</i> spp. (?) <i>Culex</i> spp. (?) <i>Anopheles</i> spp. (?)	Primata não-humano Aves silvestre Equinos (?) Búfalo Marinho (?)	América do Sul (Brasil)	Sem descrição
<i>Flaviviridae</i>	<i>Ilheus virus</i>	ILHV	<i>Aedes</i> spp. <i>Psorophora</i> spp. <i>Culex</i> spp.	Aves silvestres Primatas não-humanos (?) Equinos	América do Sul América Central	Síndrome febril Encefalite
<i>Flaviviridae</i>	<i>Iguape virus</i>	IGUV	<i>Anopheles</i> spp. (?)	Aves silvestres Aves domésticas/ galinhas (?)	América do Sul (Brasil)	Sem descrição
<i>Togaviridae</i>	<i>Mayaro virus</i>	MAYV	<i>Haemagogus</i> spp. <i>Aedes</i> spp. <i>Culex</i> spp. (?)	Primatas não-humanos Aves migratórias Roedores Bichos-preguiça	América do Sul América Central	Síndrome febril Artralgias
<i>Togaviridae</i>	<i>Eastern equine encephalitis virus</i>	EEEV	<i>Culiseta melanura</i> <i>Culex pedroi</i> <i>Aedes</i> spp.	Aves/pássaros	América do Norte América do Sul	Síndrome neurológica

Família	Vírus	Sigla	Vetor ou rota de transmissão	Reservatório zoonótico	Distribuição geográfica	Doença causada em humanos
<i>Togaviridae</i>	<i>Chikungunya virus</i>	CHIKV	<i>Aedes aegypti</i> <i>Aedes albopictus</i>	Primata não-humano (ciclo silvestre) Humano (ciclo urbano)	América do Norte América Central América do Sul África Ásia Europa (Itália, França) Oceania/Ilhas do Pacífico	Síndrome febril Febre hemorrágica Poliartralgias
<i>Peribunyaviridae</i>	<i>Oropouche virus</i>	OROV	<i>Culicoides paraensis</i>	Primatas não-humanos Aves silvestres Aves domésticas Roedores Bichos-preguiça	América do Sul América Central	Síndrome febril Febre hemorrágica Síndrome neurológica

Fonte: Figueiredo (2007); Barret e Weaver (2012); Lopes, Linhares e Nozawa (2014); Neves e Machado (2015); Weaver e Lecuit (2015); Figueiredo et al (2017); Acosta-Ampudia et al (2018); Sakkas et al (2018); Cunha et al (2020); Pierson e Diamond (2020). Legenda: (?) Possíveis vetores devido a casos de detecção molecular ou isolamento descrito em alguns trabalhos na literatura/ Possíveis hospedeiros devido a detecção molecular, detecção de anticorpos ou isolamento descrito em alguns trabalhos na literatura.

Além destes, outros arbovírus já foram isolados em humanos no Brasil (Quadro 1), como o MAYV. Este vírus tem sido responsável por casos de doença febril principalmente na região Amazônica e Central do Brasil, sendo caracterizada por um quadro clínico de febre, dor de cabeça, mialgia, dores nas juntas e casos menos frequentes de artrites. O MAYV possui um ciclo silvestre de transmissão semelhante à febre amarela, que inclui PNH como hospedeiros, além de poder ser transmitido por mosquitos *Aedes aegypti* e eventualmente infectar humanos em ambiente urbano (BRUNINI *et al.*, 2017; DA COSTA *et al.*, 2017; FIGUEIREDO, 2007; MACKAY; ARDEN, 2016; SAATKAMP *et al.*, 2021).

Outras arbovírus descritos no Brasil são: o vírus rocio (ROCV), vírus da encefalite de *Saint Louis* (SLEV) e vírus oropouche (OROV) (Quadro 1). O vírus rocio foi isolado pela primeira vez em 1975, após uma explosiva epidemia de encefalite afetando cerca de 1,000 habitantes de municípios litorâneos do estado São Paulo (COIMBRA *et al.*, 2008). O vírus da encefalite *Saint Louis* foi isolado no Brasil pela primeira vez, em 1960 de um *pool* de mosquitos na bacia Amazônica. A maioria das infecções por este vírus, em humanos, não é diagnosticada e muitas vezes confundida com outras arboviroses devido aos sinais clínicos semelhantes (MONDINI *et al.*, 2007). O OROV, isolado pela primeira vez no país em 1961, causa um quadro febril semelhante a dengue, além de meningite. A infecção pelo vírus oropouche está entre as mais descritas no Brasil, além da dengue, chikungunya e do zika. O vírus oropouche possui um ciclo de transmissão silvestre que inclui os bichos-preguiça como reservatório mais comum e os mosquitos *Aedes serratus* e *Culex quinquefasciatus* como vetores. O seu ciclo epidêmico urbano inclui o homem como reservatório e como vetor, o mosquito *Culicoides paraensis* (*Ceratopogonidae*) (LUNA *et al.*, 2017; ROMERO-ALVAREZ; ESCOBAR, 2018; SAKKAS *et al.*, 2018).

O impacto das altas incidências de arbovírus emergentes e a reemergência de vírus causadores de epidemias que haviam sido previamente controladas não é apenas uma ameaça à saúde pública, mas também gera consequências diretas e indiretas na economia de um país. Este deve investir em leitos e tratamentos hospitalares nos casos mais graves, em campanhas de combate ao vetor e sistemas de vigilância que permitam identificar e prevenir possíveis emergências de vírus com potencial pandêmico na população (MAYER; TESH; VASILAKIS, 2017a).

2.2. Vírus da febre amarela

2.2.1. Vírus, taxonomia e epidemiologia

5 A febre amarela (FA) é causada pelo vírus da febre amarela (YFV), o qual pertence ao gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae*, reino *Riboviria* (ICTV, 2021). O YFV é um vírus de RNA fita simples, polaridade positiva, de aproximadamente 11 kb, com um genoma que codifica uma poliproteína que é traduzida em três proteínas estruturais (C: capsídeo; E: envelope; prM: precursora de proteínas de membrana) e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (LINDENBACH *et al.*, 2013) (Figura 3). Até o

10 momento foram descritos um sorotipo e sete genótipos para YFV, sendo cinco deles encontradas na África (genótipos: África Ocidental I, África Ocidental II, África Oriental e Central, Africano do Leste e genótipo Angola) e dois deles encontrados nas Américas (Sul Americana I e II) (MONATH, 2019; MONATH; VASCONCELOS, 2015; SILVA, *et al.*,

15 2020)

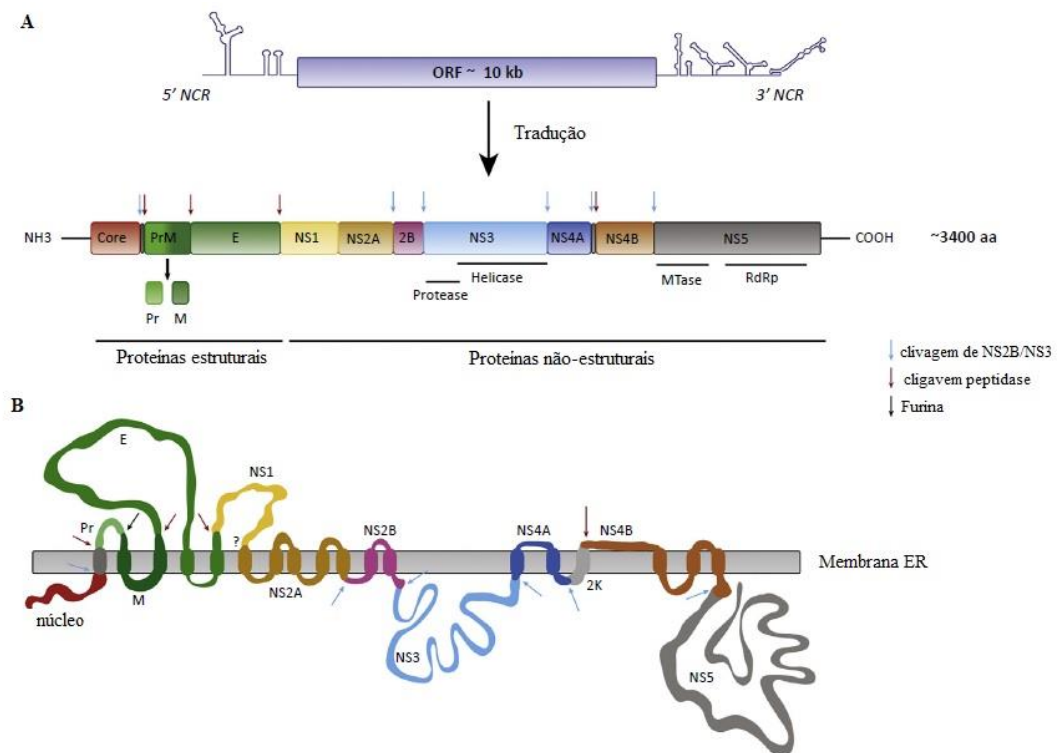


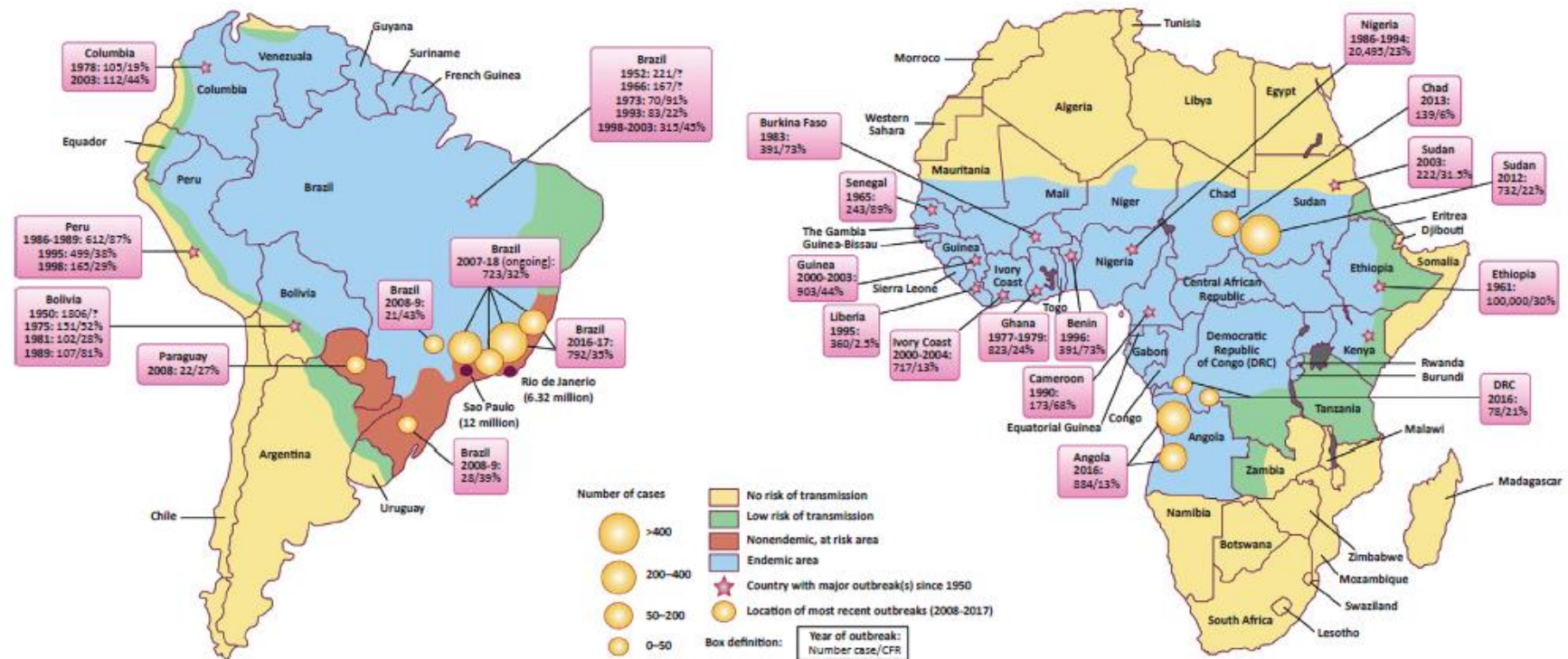
Figura 3: Organização do genoma do YFV. (A) Representação esquemática do RNA de fita simples do vírus da febre amarela (YFV) e sua tradução em uma poliproteína que quando clivada dá origem a três proteínas estruturais: C: capsídeo; E: envelope; prM: precursora de membrana (pr/M); e sete proteínas não-estruturais (NS1, NS2A-B, NS3, NS4A-B e NS5). (B) Representação esquemática da poliproteína do YFV ancorada na membrana do retículo endoplasmático (ER) após a tradução (DOUAM; PLOSS, 2018).

20

Dados moleculares e filogenéticos mostram que as linhagens circulantes nas Américas (Sul Americana I e II) são derivadas das linhagens africanas do Oeste. No Brasil, o genótipo mais frequentemente descrito é o Sul Americano I (linhagens: 1A-1E), embora já tenha sido descrito caso de isolamento do genótipo Sul Americano II no estado de Roraima
5 (VASCONCELOS *et al.*, 2004; BRYANT; HOLMES; BARRETT, 2007; BONALDO, *et al.*, 2017; DOUAM; PLOSS, 2018).

No Brasil, as linhagens 1D e 1E são encontradas desde os anos 2000, embora a partir de 2008 apenas a linhagem 1E tenha sido descrita (NUNES *et al.*, 2011; BONALDO, *et al.*, 2017). Bonaldo e colaboradores (2017) descreveram oito mutações genéticas na linhagem Sul
10 Americana 1E do YFV. Estas mutações foram identificadas em amostras de sangue de PNH do gênero *Alouatta*, no Espírito Santo, durante o surto de FA entre os anos de 2016 e 2018. Sete destas mutações estão presentes em regiões que codificam proteínas importantes para a replicação viral (complexo NS3 e NS5), podendo estar associados a vantagens seletivas para o YFV, como por exemplo, sua infectividade. Acredita-se que o YFV pode ter sido trazido ao
15 Novo Mundo através de navios de escravos vindos da África, assim como seu principal vetor em ciclos urbanos, o mosquito *A. aegypti* (MONATH, 2001; GUBLER, 2002; VASCONCELOS *et al.*, 2004).

A FA é considerada endêmica em aproximadamente 40 países da África e da América do Sul (Figura 4), incluindo o Brasil. Cerca de 80 a 90% dos casos de FA são reportados na
20 África, onde a doença afeta entre 80.000 a 200.000 pessoas anualmente em regiões consideradas endêmicas, apresentando um risco principalmente para viajantes não vacinados (VASCONCELOS; MONATH, 2016; GOLDANI, 2017).



Trends in Microbiology

Figura 4: Áreas endêmicas e com ocorrência de FA, na América do Sul e África. Em azul, regiões consideradas endêmicas para febre amarela. Em verde, regiões onde há baixo risco de transmissão. Em vermelho, regiões consideradas não endêmicas, porém com risco de transmissão. Em amarelo, áreas sem risco de transmissão do YFV. Marcados com o símbolo “estrela”, países com grandes surtos de FA desde 1950. Marcados com o símbolo “círculo” locais com surtos recentes de FA (2008-2017). Os tamanhos dos círculos hachurados em amarelo, representam os números de casos (DOUAM; PLOSS, 2018).

No Brasil, a FA foi primeiramente descrita durante o período colonial. A primeira epidemia, descrita no estado do Rio de Janeiro, foi relacionada à chegada de um navio negreiro em 1849 causando a morte de aproximadamente 50.000 pessoas entre 1850-1909 (MONATH, 2001; FIGUEIREDO, 2007). Após campanhas de combate ao vetor e da criação de uma vacina preventiva em 1936, a FA urbana foi considerada erradicada do Brasil, com o último caso descrito em 1942 em Sena Madureira, no Acre (SOPER, 1942). Contudo, casos de FA silvestre em humanos e PNH voltaram a ser relatados no país nos anos seguintes, e de 1932 a 1967, mais de 1600 casos de FA foram reportados no país. Desde os anos de 1980, casos de FA silvestre vêm sendo frequentemente relatados no Brasil, principalmente na região da bacia Amazônica onde a doença é considerada endêmica. Entre 1999 e 2004, ocorreram os maiores números de casos de FA em humanos reportados até então no país. E entre 2008 e 2009, foram confirmados casos de FA nos estados do Pará, Tocantins, Goiás e Mato Grosso do Sul, assim como um alto número de casos reportados nos estados do Rio Grande do Sul e São Paulo (FRANCO, 1969; MONATH; VASCONCELOS, 2015; SILVA, *et al.*, 2020; VASCONCELOS, 2003).

Entre 2016 e 2019 o Brasil enfrentou um dos maiores surtos de FA silvestre das últimas décadas, com milhares casos de infecção e mortes em humanos e epizootias em PNH, principalmente na região sudeste do país (MSBr, 2017a; SES-SP, 2017; SES-RJ, 2017; SES-MG, 2017; SESA-ES, 2017). De dezembro de 2016 a junho de 2019, foram reportados no país cerca de 15.000 casos de epizootias em PNH, com confirmação de pelo menos 1.500 casos de epizootias ligadas ao YFV. Além disso, foram reportados cerca de 2.200 casos de infecção por YFV em humanos com ao menos 770 mortes confirmadas (Figura 5) (MSBr, 2017a, 2018, 2019a). Embora tenha ocorrido uma diminuição, desde 2019 casos de epizootias em PNH ainda vêm sendo reportados no estado de São Paulo e na região sul do país. No período de monitoramento de 2019/2020 foram reportados 3.321 eventos suspeitos de epizootias por FA, sendo 390 casos confirmados. A maioria das epizootias foi reportada no Paraná (298), além de casos nos estados de Santa Catarina (88) e São Paulo (4) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, MSBR, 2020c). Além dos casos de epizootias, durante este mesmo período foram confirmados 19 casos de infecção por YFV em humanos no Pará (1), Acre (1) e de Santa Catarina (17).

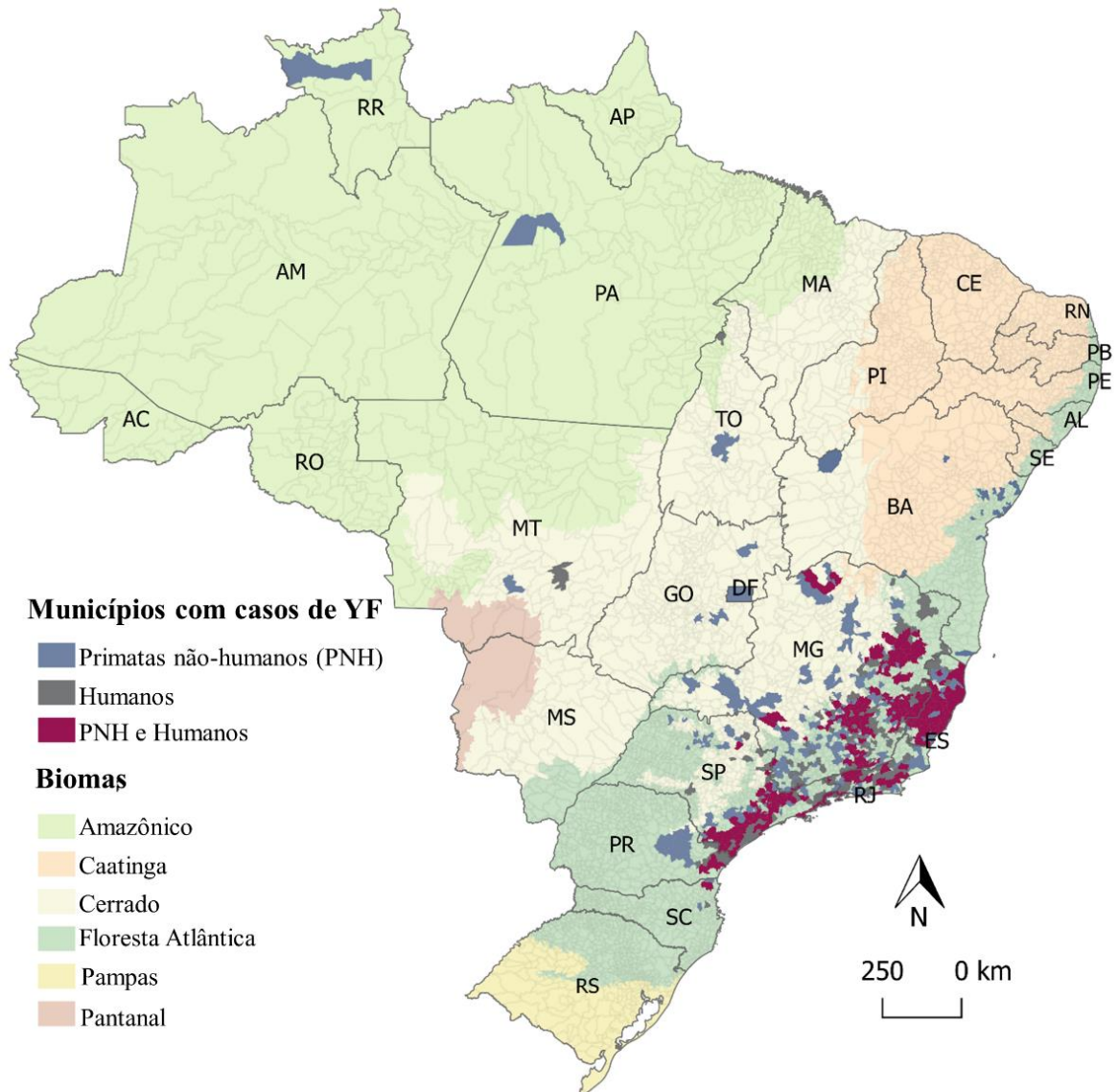
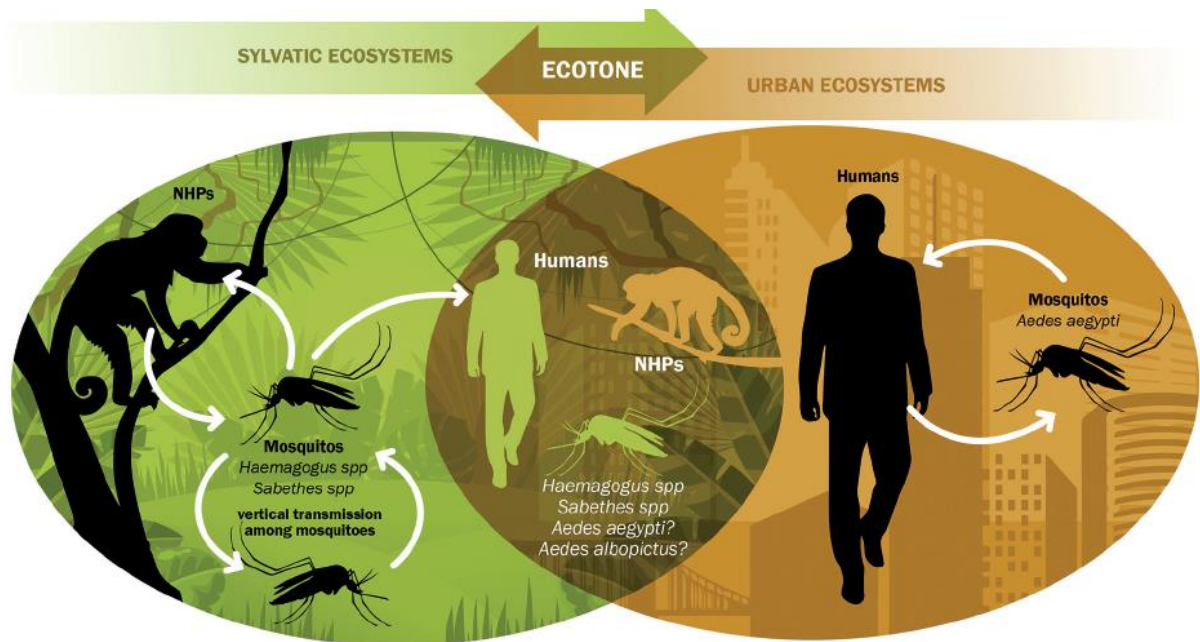


Figura 5: Casos de febre amarela (FA) em humanos e primatas não-humanos PNH no Brasil, 2016-2019. Mapa com a distribuição de casos de febre amarela silvestre no Brasil (2016 a 2019), obtidos através do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), de boletins epidemiológicos oficiais do Ministério da Saúde e das Secretarias Estaduais de Saúde (SES). Em azul, casos FA em PNH; em cinza, casos de FA em humanos; em vermelho, regiões com casos de FA em PNH e humanos (SILVA, *et al.*, 2020).

Durante o período de monitoramento de 2020/2021 (fevereiro de 2021), foram confirmados 37 casos de epizootias em PNH nos estados de Goiás (16), Paraná (11), Santa Catarina (8), São Paulo (1), e no Distrito Federal (1). Até fevereiro de 2021 nenhum caso de infecção em humano foi confirmado no país (MINISTÉRIO DA SAÚDE, MSBR, 2021b).

2.2.2. Ciclos de transmissão do YFV e epizootias de febre amarela em PNH no Brasil

O YFV é mantido na natureza através de dois ciclos de transmissão: um ciclo silvestre e um ciclo epizoótico urbano (Figura 6). O ciclo silvestre envolve principalmente PNH e mosquitos silvestres de hábitos diurnos pertencentes aos gêneros *Haemagogus* e *Sabethes*. O ciclo epizoótico urbano envolve a transmissão do vírus entre o mosquito *A. aegypti* e humanos, que são infectados ao serem picados pelos mosquitos infectados com o vírus (MONATH, 2001; MONATH; VASCONCELOS, 2015; POSSAS, *et al.*, 2018; SILVA, *et al.*, 2020). Embora o principal hospedeiro no ciclo silvestre de transmissão do YFV sejam os PNH, evidências sugerem que outros animais como roedores e algumas espécies de marsupiais arborícolas possam participar na manutenção viral em áreas onde os PNH estejam ausentes ou até mesmo imunes ao vírus (DE THOISY; DUSSART; KAZANJI, 2004).



15

Figura 6: Ciclos de transmissão do YFV. À esquerda: ciclo de transmissão silvestre do YFV envolvendo hospedeiros PNH (NHP) e mosquitos dos gêneros *Haemagogus* e *Sabethes*, humanos são hospedeiros acidentais deste ciclo. À direita: o ciclo urbano de transmissão do YFV envolvendo humanos e mosquitos *Aedes aegypti* (POSSAS, *et al.*, 2018).

20

No continente africano, os primatas do Velho Mundo (parvordem Catarrhini) são sensíveis à infecção pelo YFV e desenvolvem viremia por tempo suficiente para transmitir o vírus para mosquitos, porém raramente apresentam os sinais clínicos da doença ou morrem, sendo considerados mais resistentes à infecção pelo vírus (BRÈS, 1986; GROVES†, 2018;

HANLEY *et al.*, 2013; MORENO *et al.*, 2013; SILVA, *et al.*, 2020). Na África, os principais hospedeiros amplificadores do YFV são os PNH dos gêneros *Cercopithecus* (que apresentam viremia com duração de 3 a 4 dias) (RODHAIN, 1991; WHO, 2014) e *Colobus* (viremia alta e prolongada pode ser observada por até 9 dias) (WOODALL; DYKES; WILLIAMS, 1968).

5 Estudos sorológicos de anticorpos neutralizantes contra o YFV indicam um papel de *Cercocebus* spp. e *Papio* spp. (babuíños) (RODHAIN, 1991; TAUFFLIEB; ROBIN; CORNET, 1971; TAYLOR; HASEEB; WORK, 1955) e possivelmente *Galago senegalensis* na circulação do YFV na África (HADDOW, 1952; BRÈS, 1986; HANLEY *et al.*, 2013).

Os PNH neotropicais ou do Novo Mundo (parvordem Platyrrhini) são divididos em

10 cinco famílias: Aotidae, Atelidae, Callitrichidae, Cebidae e Pitheciidae. No Brasil, pode ser observada uma das maiores diversidades em relação a espécies de PNH, com um total de 130 espécies descritas distribuídas nos seis diferentes biomas brasileiros (Amazônico, Floresta Atlântica, Caatinga, Cerrado, Pantanal e Pampas) (GROVES†, 2018; PAGLIA *et al.*, 2012).

A família Aotidae representada apenas pelo gênero *Aotus* (Figura 7A), possui oito espécies

15 distribuídas pela Amazônia brasileira. Popularmente conhecidos como macacos-da-noite por possuírem hábitos noturnos, são macacos de porte pequeno (0,8 – 1,2 kg). Esses animais vivem em pequenos grupos entre 4 e 6 indivíduos com comportamento monogâmico, e se alimentam quase exclusivamente de frutas, folhas, e de pequenos invertebrados e flores. A

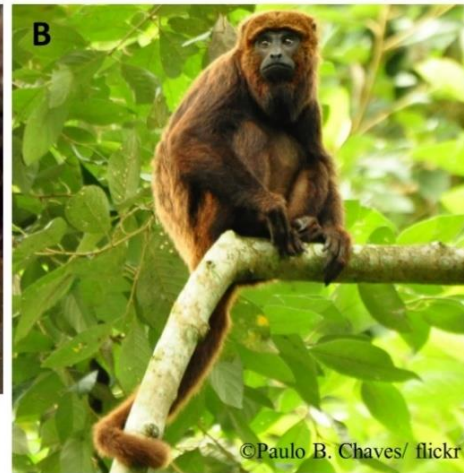
família Atelidae (Figura 7B) é representada por quatro gêneros (*Ateles*, *Lagothrix*,

20 *Brachyteles* e *Alouatta*) de PNH de médio a grande porte (5 – 15 kg), característicos por possuírem cauda preênsil, se alimentam principalmente de frutos e folhagens. Os PNH dos gêneros *Ateles* (macaco-aranha) e *Lagothrix* (macaco-barrigudo) são majoritariamente frugívoros e possuem longos membros que são utilizados para se locomoverem por braquiação (DUNN; CRISTÓBAL-AZKARATE, 2016; MITTERMEIER; RYLANDS;

25 WILSON, 2013). Estão distribuídos principalmente no bioma amazônico enquanto os PNH do gênero *Brachyteles* (muriquis) estão distribuídos nos habitats de Floresta Atlântica. Os primatas do gênero *Alouatta* (macacos-bugios) estão distribuídos em diferentes habitats que abrangem os seis biomas brasileiros. Os bugios são reconhecidos nas matas devido a sua vocalização, característico de espécies do gênero (Figura 7B) (PAGLIA *et al.*, 2012).



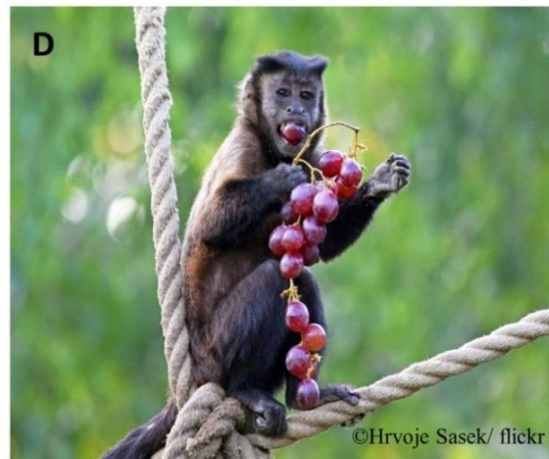
A
Aotus trivirgatus – Gênero *Aotus*
Família Aotidae



B
Alouatta guariba – Gênero *Alouatta*
Família Atelidae



C
Callithrix geoffroyi – Gênero *Callithrix*
Família Callitrichidae



D
Sapajus apella – Gênero *Sapajus*
Família Cebidae



E
Cacajao calvus – Gênero *Cacajao*
Família Pitheciidae



F
Callicebus nigrifrons – Gênero *Callicebus* - Família Pitheciidae

Figura 7: Famílias de primatas não-humanos do Brasil. A: Família Aotidae, representada pela espécie *Aotus trivirgatus*; B: Família Atelidae, representada pela espécie *Alouatta guariba*; C: Família Callitrichidae, representada pela espécie *Callithrix geoffroyi*; D: Família Cebidae, representada pela espécie *Sapajus apella*; E-F: Família Pitheciidae, representada pelas espécies (E) *Cacajao calvus*, e (F) *Callicebus nigrifrons*. Fonte: Hrvoje Šasek; Paulo B. Chaves; Peter Schoen; Aaron Martin (uso de imagem autorizado)/ Flickr.

A família Callitrichidae (Figura 7C) é composta por sete gêneros, e é representada pelos menores primatas do Brasil (100 - 700 g). Característicos pelo seu tamanho e por apresentarem unhas em formas de garras (exceto no dedão), se alimentam de frutas, insetos e seiva de plantas (DUNN; CRISTÓBAL-AZKARATE, 2016; MITTERMEIER; RYLANDS; WILSON, 2013). Os PNH do gênero *Callithrix* (saguis-de-tufo/mico-estrela) estão distribuídos através dos biomas de Floresta Atlântica, Cerrado e Caatinga, já os dos gêneros *Callimico* (mico-de-goeldi/mico-preto), *Callibella* (sagui-anão), *Cebuella* (sagui-pigmeu/sagui-leãozinho), *Mico* (Sauim/sagui) e *Saguinus* (saguis) estão distribuídos pela Amazônia, enquanto os do gênero *Leontopithecus* habitam os biomas Amazônico, Pantanal e de Cerrado (PAGLIA *et al.*, 2012). A família Cebidae (Figura 7D) é composta de primatas de médio porte, descritos como arbóreos e que vivem em grandes grupos sociais. Os PNH desta família são em sua maioria insetívoros e frugívoros, porém algumas espécies se alimentam de animais e plantas. Os gêneros *Cebus* (macacos-prego-sem-topete) e *Saimiri* (macaco-de-cheiro/macaco-esquilo) são distribuídos através do bioma Amazônico enquanto os PNH do gênero *Sapajus* (macacos-prego-de-topete) são amplamente encontrados em todos os biomas brasileiros, exceto os Pampas (DUNN; CRISTÓBAL-AZKARATE, 2016; PAGLIA *et al.*, 2012). A família Pitheciidae (Figura 7E-F) possui quatro gêneros e é representada por PNH com a maior diversidade morfológica dentre as diferentes famílias. Os Pitheciidae possuem locomoção quadrupede, não possuindo cauda preênsil e são majoritariamente herbívoros, com algumas espécies especializadas em se alimentar de sementes (DUNN; CRISTÓBAL-AZKARATE, 2016; MITTERMEIER; RYLANDS; WILSON, 2013). Os PNH do gênero *Cacajao* (Uacari) (Figura 7E), *Chiropotes* (Cuxiú) e *Pithecia* (Parauacú) são endêmicos da bacia Amazônica. Por outro lado, os animais do gênero *Callicebus* (Guigó/Zogue-zogue) (Figura 7F) possuem uma distribuição mais ampla, podendo ser encontrados em regiões da Amazônia, Floresta Atlântica, Caatinga e Pantanal (PAGLIA *et al.*, 2012).

Dados clínicos e sorológicos mostram que os PNH Neotropicais são susceptíveis à infecção por YFV em diferentes níveis, desenvolvendo a doença na maioria dos casos e muitas vezes indo a óbito (GROVES†, 2018; HOLZMANN *et al.*, 2010; OTT-JOSLIN, 1986). Estudos no Brasil descreveram a detecção de anticorpos específicos para YFV em PNH dos gêneros *Alouatta*, *Ateles*, *Aotus*, *Brachyteles*, *Callicebus*, *Callithrix*, *Cebus*, *Leontocebus*, *Pithecia* e *Saimiri* em diversos estados do país (Amazonas, Bahia, Espírito Santo, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Minas Gerais, Pará, Paraná, Rio Janeiro, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, e São Paulo) (KUMM; LAEMMERT JR., 1950; LAEMMERT JR; FERREIRA; TAYLOR, 1946). De acordo com a literatura, PNH pertencentes aos gêneros

Aotus, *Ateles*, *Cebus*, *Saimiri*, *Saguinus* e *Sapajus* são considerados menos suscetíveis ao YFV, embora alguns espécimes de *Saimiri*, *Saguinus* e *Sapajus* possam desenvolver a doença, podendo ser fatal (DAVIS; SHANNON, 1929; DAVIS, 1931; MORENO *et al.*, 2013; POSSAS, C. *et al.*, 2018; CUNHA, *et al.*, 2019). Embora haja poucas informações sobre a suscetibilidade de *Callicebus* spp. ao YFV, carcaças de PNH deste gênero (*Callicebus* sp. e *Callicebus personatus*) foram encontradas infectadas com YFV durante as recentes epizootias de YFV no Brasil (2017/2018) (CUNHA, *et al.*, 2019; FIGUEIREDO, *et al.*, 2018; REZENDE, *et al.*, 2018; SACCHETTO *et al.*, 2020)

O gênero *Alouatta* tem sido descrito como o mais susceptível à infecção por YFV, desenvolvendo os sinais clínicos da doença e na maioria das vezes chegando a óbito (DAVIS, 1931; LAEMMERT JR.; KUMM, 1950). A morte de *Alouatta* spp. está frequentemente associada a surtos por YFV no Brasil (SALLIS, *et al.*, 2003; DE ALMEIDA, *et al.*, 2012; MORENO *et al.*, 2013; CUNHA, *et al.*, 2019) e em outros países da América do Sul como Argentina (AGOSTINI; HOLZMANN; DI BITETTI, 2008; HOLZMANN *et al.*, 2010), Costa Rica (VARGAS-MENDEZ; ELTON, 1953), Panamá (COLLIAS; SOUTHWICK, 1952) e Venezuela (AUGUSTE *et al.*, 2015; RIFAKIS *et al.*, 2006). Durante o surto de YFV de 2016-2018, estudos detectaram RNA de YFV em espécimes de *Alouatta* spp. no Brasil (CUNHA, *et al.*, 2019; DELATORRE *et al.*, 2019; GÓMEZ *et al.*, 2018; REZENDE, *et al.*, 2018). Além de serem considerado mais sensível à infecção pelo YFV, os PNH do gênero *Alouatta* possuem hábito territorial e ocioso, permanecendo longos períodos no mesmo local nos topos de árvores para se alimentar e descansar, aumentando as chances de serem infectados pelos vetores silvestres (*Haemagogus* e *Sabethes*), que também têm como hábitat as copas de árvores (BICCA-MARQUES; FREITAS, 2010; NEVILLE *et al.*, 1988).

Nas Américas, incluindo o Brasil, a observação de PNH é uma ferramenta importante na vigilância epidemiológica da febre amarela. Os PNH são considerados animais sentinelas e a morte destes é um sinal de alerta, indicando a possível circulação do YFV, o que permite a vigilância passiva e o desenvolvimento de ações preventivas contra a dispersão do vírus (PAHO, 2005). No Brasil o Sistema de Vigilância de Epizootias foi iniciado em 1999, após muitos casos da doença em humanos e PNH serem reportados na região Centro Oeste do país. No mesmo ano no Rio Grande do Sul (RS), foi implantada a vigilância de PNH como uma estratégia passiva de alerta à transmissão de YFV. A vigilância ativa foi iniciada em 2001, com a detecção do vírus circulando na região nordeste do estado. Vários casos de infecção de PNH por YFV foram notificados nos anos que se seguiram, sendo que entre outubro de 2008 a junho de 2009 ocorreu um dos maiores eventos epizoóticos documentado até aquele

momento, com dois terços das espécies de PNH testando positivo para infecção por YFV (ALMEIDA, *et al.*, 2014; DE ALMEIDA, *et al.*, 2012).

Neste período (2008/2009) foram notificados ao Ministério da Saúde 1.971 casos de epizootias no país em PNH com suspeitas de infecção por YFV em 520 municípios de 19
5 estados. Do total de epizootias registrados neste período, em 88% dos casos foi possível identificar o gênero do primata afetado, sendo 29% do gênero *Callithrix*, 64,4% *Alouatta* e 6,6% do gênero *Cebus* (ARAÚJO *et al.*, 2011). Durante o período de monitoramento de FA de dez/2016 a jan/2019 foram notificados ao MSBR aproximadamente 16.400 casos suspeitos de epizootia por FA em PNH, principalmente na região sudeste. Do total, 2.296 casos foram
10 confirmados. No período de monitoramento de jul/2019 a jan/2021 houve uma diminuição dos casos de epizootias reportados. Neste período foram notificadas aproximadamente 3.890 epizootias em PNH com suspeita de infecção por YFV, dos quais 427 foram confirmados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, MSBR, 2020c; SVS-MS (MINISTÉRIO DA SAÚDE/SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE), 2021c)

15 Em humanos, os sintomas da FA geralmente se manifestam após um período de incubação do vírus de três a sete dias. Os casos mais brandos da doença são caracterizados por estado febril indiferenciado e os casos mais graves apresentam a doença de forma aguda, caracterizada por febre, calafrios, fraqueza muscular, mialgia, náuseas, vômitos e icterícia. Os casos mais severos podem apresentar hemorragia do sistema digestório e falência renal e
20 hepática (FONSECA; FIGUEIREDO, 1996). Não existe tratamento específico contra a FA. Nos casos mais leves da doença, descanso e hidratação são suficientes para reverter o quadro febril. Nos casos mais graves recomenda-se a internação do paciente e o uso de medicamentos para o combate aos sintomas de acordo com as manifestações clínicas observadas (VASCONCELOS, 2003).

25 A vacinação em humanos ainda é a forma mais recomendada de se prevenir contra o YFV. A vacina contra FA foi criada e registrada em 1936 nos Estados Unidos e disponibilizada no Brasil a partir de 1937. A vacinação contra o YFV é aplicada em uma dose da vacina produzida a partir do vírus vivo atenuado (17D) e confere imunidade a longo prazo após 10 dias da aplicação (GOLDANI, 2017; MONATH, 2005). As áreas com recomendação
30 para vacinação obrigatória contra a FA foram expandidas no Brasil e agora incluem todos os estados das regiões Norte, Sul, Sudeste e Centro-Oeste e alguns dentro da região Nordeste (Maranhão, Bahia e alguns municípios do Piauí, Alagoas e Sergipe) (MSBr, 2019a). A imunização de PNH contra YFV ainda não ocorre no Brasil e muito se discute em relação a viabilidade desta ação pois não existem estudos suficientes sobre o efeito da vacina em PNH

neotropicais. Embora hipoteticamente a imunização de PNH possa reduzir significativamente a circulação do YFV nas áreas de risco e, conseqüentemente, as chances de infecção em humanos, aspectos logísticos e de custo e segurança relacionados à captura dos animais devem ser levados em consideração (MASSAD; MIGUEL; COUTINHO, 2018). Além disso, a vacinação de PNH pode afetar de forma significativa a vigilância sentinela, afetando a detecção precoce da circulação do vírus.

2.3. Vírus da zika

O vírus da zika (ZIKV), pertencente ao gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae*, recentemente se tornou emergente em muitos países da Ásia, África e Américas (BUECHLER *et al.*, 2017; LI *et al.*, 2016). O ZIKV foi isolado pela primeira vez em 1947 em um macaco *Rhesus* em Uganda, durante um estudo sobre febre amarela. Posteriormente, o vírus foi isolado em mosquitos *Aedes africanus* da Floresta Zika, na África, de onde originou seu nome. Os primeiros casos de infecções em humanos foram descritos em 1952 em Uganda e Tanzânia, e outros casos isolados que se restringiam ao território africano e asiático. Os primeiros casos de infecção fora da África e Ásia ocorreram em 2007 na Ilha Yap, pertencente ao território dos Estados Federados da Micronésia, com 49 casos confirmados. No mesmo ano ocorreram surtos no Gabão. Em 2013, o vírus reemergiu na Polinésia Francesa com 396 casos confirmados, e entre 2013-2014 se espalhou para as Ilhas Cook, de Páscoa, Nova Caledônia e regiões do Pacífico (BUENO *et al.*, 2016; VOROU, 2016).

Em março de 2015, no Brasil, foram reportados à Organização Mundial da Saúde (OMS) casos de uma doença em pacientes no Nordeste com sintomas semelhantes a dengue. Posteriormente, dados moleculares confirmaram que o responsável por causar esta doença era o ZIKV. Embora os primeiros casos de ZIKV tenham sido reportados no Brasil apenas em 2015, dados moleculares e filogenéticos mostram que o vírus já circulava no nordeste do Brasil desde o fim de 2013/2014, e que a linhagem circulante no país é próxima àquela presente na Polinésia Francesa durante os surtos de 2013/2014, ambas pertencentes à linhagem Asiática (FARIA, *et al.*, 2016; VOROU, 2016). A linhagem reportada no nordeste brasileiro se dispersou por todo país e outros países da América do Sul e Central entre os períodos de 2014 e 2015. Atualmente, o vírus que é oriundo de três diferentes linhagens: duas africanas (África Oriental e África Ocidental) e uma asiática (LANCIOTTI *et al.*, 2016) se disseminou em mais de 33 países e territórios (Figura 8) (FARIA, *et al.*, 2017; FARIA, *et al.*, 2016; PATTERSON; SAMMON; GARG, 2016; VOROU, 2016).

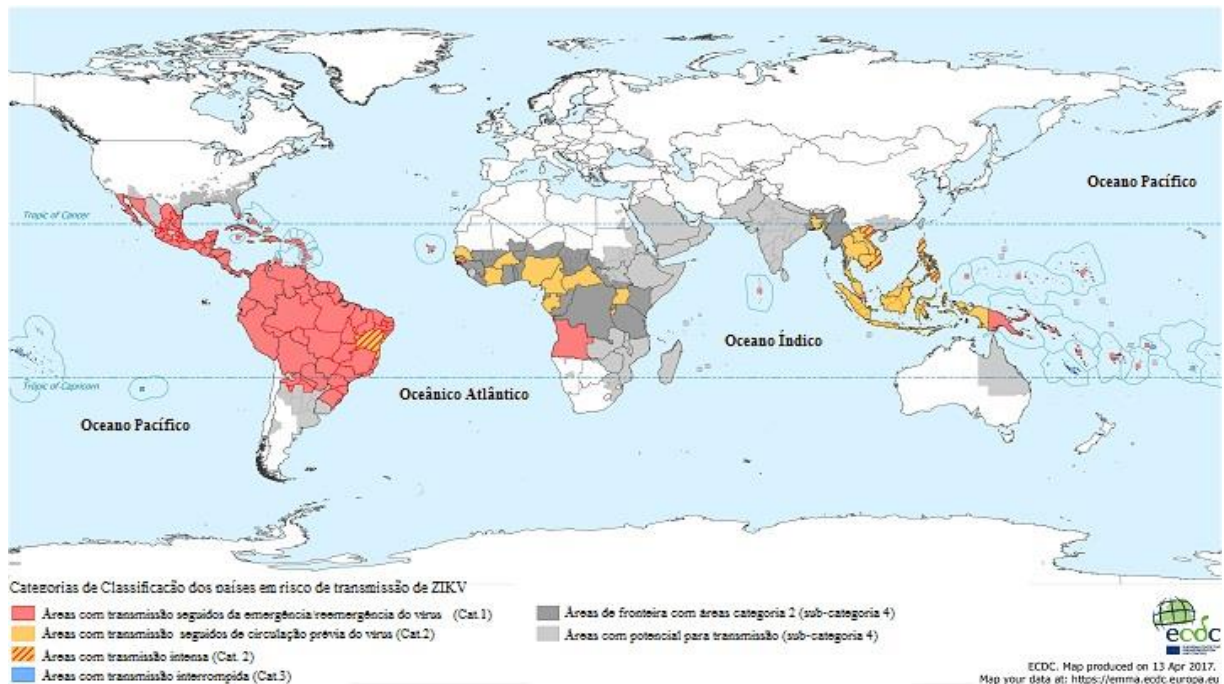


Figura 8: Regiões com risco de transmissão do vírus zika: O mapa mostra as regiões do globo categorizadas pela OMS onde há risco de transmissão do ZIKV. Rosa: áreas com transmissão seguidos da emergência/reemergência do vírus, categoria 1 (Cat.1). Laranja: áreas com transmissão seguidos da circulação prévia do vírus (Cat.2). Hachurado Vermelho: Área com transmissão intensa (Cat.2). Azul: áreas com transmissão interrompida (Cat.3). Cinza escuro: áreas de fronteira com áreas de cat. 2 (Sub-cat.4). Cinza claro: áreas com potencial para transmissão (Sub-cat.4). Fonte: Centro Europeu de Controle e Prevenção de Doenças, abril de 2017. Disponível em: http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/zika_virus_infection/zika-outbreak/Pages/Zika-countries-with-transmission.aspx. Acesso em 23 de maio de 2021.

Assim como outros arbovírus, o ZIKV é transmitido em ambientes silvestre através de vetores artrópodes hematófagos, principalmente mosquitos do gênero *Aedes*, que ao se tornarem infectados, assim se mantém até o final de sua vida. Pouco se sabe sobre quais são os hospedeiros vertebrados amplificadores do ZIKV. Estudos mostram que PNH do Velho Mundo são os principais reservatórios do vírus no meio silvestre no continente africano. Contudo embora análises sorológicas tenham identificado anticorpos (IgM) anti-ZIKV em outros mamíferos silvestres, como, patos, cabras, vacas, cavalos e morcegos no Senegal (1967-1968) e na Indonésia (1978), e em roedores, ovelhas domésticas e cabras no Paquistão (1983). Além disso, anticorpos anti-ZIKV foram detectados em orangotangos silvestres e em semi-cativeiro em Bornéu, Malásia (1996/1997) e em amostras sorológicas de macacos no oeste da África (1968 a 2002) (BUENO *et al.*, 2016; DUFFY *et al.*, 2009; VOROU, 2016).

Li e colaboradores descreveram em, 2016, infecções e a observação do estado virêmico em macacos *Rhesus* adultos após a inoculação com linhagens de ZIKV circulantes

atualmente na América do Sul, demonstrando a susceptibilidade desses animais ao vírus (LI *et al.*, 2016). A presença de animais com anticorpos específicos para ZIKV na natureza não significa necessariamente que eles atinjam viremia suficiente para transmitir o vírus a um mosquito. Mais estudos epidemiológicos são necessários para compreender a dinâmica destes animais no ciclo silvestre de transmissão do *Zika virus* (RABE *et al.*, 2016). No Brasil, os primeiros casos de detecção de ZIKV em PNH (*Callithrix jacchus* e *Sapajus libidinosus*) foram descritos no Ceará em 2016, demonstrando a possibilidade destes animais serem reservatórios para o vírus no ciclo silvestre no país (FAVORETTO *et al.*, 2016). Análises genômicas confirmaram que a linhagem de ZIKV detectada nestes PNH era a mesma circulante na América do Sul (FAVORETTO *et al.*, 2016).

Em 2016, Barr e colaboradores infectaram cultura de células de diferentes espécies de animais domésticos e silvestres e de PNH, incluindo espécies encontradas nas Américas, com ZIKV (BARR *et al.*, 2016). Efeitos citopáticos foram observados em algumas das linhagens de células, demonstrando susceptibilidade à infecção pelo vírus. Os autores descrevem que, com um nível de viremia suficientemente alto, estes animais poderiam servir de hospedeiros transmissores para o vírus. Contudo, destacam que o isolado viral usado nos experimentos do estudo não apresenta as mesmas características que o ZIKV circulante na natureza, portanto, em experimentos laboratoriais este isolado não simula uma infecção natural (BARR *et al.*, 2016). Embora os PNH estejam envolvidos na transmissão do ZIKV, não está claro se este vírus vai se tornar endêmico em PNH neotropicais e estabelecer um ciclo de transmissão silvestre nas Américas, de forma semelhante ao que ocorre com o YFV (HANLEY *et al.*, 2013). Contudo, a grande diversidade de mamíferos no Brasil, incluindo 53 espécies de PNH consideradas hospedeiras para o vírus, sugere uma possibilidade de manutenção e/ou transmissão de ZIKV no país (BUENO *et al.*, 2016).

A transmissão do ZIKV em humanos em áreas urbana e rural se dá através mosquitos fêmeas infectadas com o vírus. O principal vetor do vírus em regiões africanas é o mosquito *Aedes africanus*, embora o vírus já tenha sido isolado em mosquitos *A. henselli*, *A. apicoergenteus*, *A. opok*, *A. dalzieli*, *A. furcifer* e *A. aegypti*. Fora da África o vetor mais conhecido é o mosquito *A. aegypti*, embora o mosquito *Ae. albopictus* esteja se tornando um eficiente vetor para ZIKV (FAYE *et al.*, 2014; VOROU, 2016). Outras formas de transmissão entre humanos já foram descritas na literatura, como, através de fluidos durante relação sexual, transmissão perinatal da mãe para o feto e através de transfusão sanguínea (FOY *et al.*, 2011; VOUGA *et al.*, 2016).

A maioria dos casos de infecção por ZIKV são assintomáticos ou apresentam um quadro subclínico de febre branda. O quadro clínico mais comum de uma infecção pelo ZIKV é semelhante aquele apresentado por pacientes infectados por outras arboviroses (dengue, chikungunya e febre amarela), com sintomas como febre, artrites, conjuntivite, dores de cabeça, mialgia e nos casos mais graves, dores de estômago associados a vômitos, anorexia e diarreia. Uma das características mais específicas das infecções por ZIKV são os casos de síndrome de Guillain-Barré em alguns pacientes adultos (DICK, 1952; DUFFY *et al.*, 2009; LEONHARD *et al.*, 2020; VOROU, 2016). Além dos casos de síndrome de Guillain-Barré, a infecção de mulheres grávidas pelo ZIKV está associada a fetos e nascimento de bebês com microcefalia. Em 2015, foram registrados no Brasil 1.248 novos casos suspeitos de bebês nascidos com microcefalia associados ao vírus e em janeiro de 2016 foram descritos os primeiros casos de bebês nascidos com anormalidades oftalmológicas (VENTURA *et al.*, 2016; VOROU, 2016). Entre os anos de 2016 e 2020, foram reportados aproximadamente 458 mil casos prováveis de infecção por ZIKV no país, sendo destes aproximadamente 143 mil confirmados, incluindo em mulheres grávidas (SVS-MS (MINISTÉRIO DA SAÚDE/SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE)., 2017a, 2018, 2019b, 2020, 2021a).

2.4. Vírus chikungunya

20

O vírus chikungunya (CHIKV) é um vírus envelopado, com genoma de RNA de polaridade positiva (RNA+) membro da família *Togaviridae*, gênero *Alphavirus*. O gênero *Alphavirus* é composto por vírus classificados com base em suas propriedades antigênicas. O CHIKV pertence ao complexo antigênico *Forest Semliki*, que inclui os vírus chamados “artritogênicos” como os vírus O’nyong-nyong, Ross River e Mayaro, assim classificados devido às suas características de causar quadros clínicos relacionados a artrites (BURT *et al.*, 2012; CUNHA, *et al.*, 2020; SCHWARTZ; ALBERT, 2010; STRAUSS; STRAUSS, 1994; VU; JUNGKIND; LABEAUD, 2017). Os primeiros casos descritos de febre chikungunya ocorreram entre 1952-1953 no Planalto de Maconde na Província do Sul de Tanganyika (atual Tanzânia). Foram descritos sintomas como febre, erupções cutâneas e principalmente artralgiias, o que levou a população local a denominar esta doença “*chikungunya*”, que em Bantu significa “aquele que se dobra”, se referindo à posição contorcida que adquiriam aqueles acometidos pela artralgiias causada pela doença (MASON; HADDOW, 1957; VU; JUNGKIND; LABEAUD, 2017).

A hipótese inicial é a de que o CHIKV tenha se originado na África, onde foram identificadas duas linhagens: a Leste africana e a Leste/Central/Sul africana (ECSA), que inclui um genótipo asiático. Os casos de chikungunya nestas regiões vêm sendo reportados desde 1958, com surtos esporádicos a cada 2/20 anos (POWERS; LOGUE, 2007). Os primeiros casos relatados da doença fora da África e Ásia ocorreram entre 2005/2006 em ilhas no oceano Índico, (Comores, Mayotte, Seicheles, Madagascar, Sri Lanka, Maldivas e La Réunion) (SCHWARTZ; ALBERT, 2010). Posteriormente, o vírus se dispersou pela Índia, Europa (Itália e França), América do Norte e em 2013 foram confirmados casos no Caribe, América Central e América do Sul (Figura 9), incluindo o Brasil (FISCHER; STAPLES, 2014; VU; JUNGKIND; LABEAUD, 2017). Entre os anos de 2015 e 2021 foram reportados aproximadamente 830 mil casos prováveis de infecção por CHIKV no país, sendo aproximadamente 390 mil confirmados e 548 óbitos reportados (SVS-MS (MINISTÉRIO DA SAÚDE/SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE), 2017a, 2018, 2019b, 2020, 2021a, b).

15

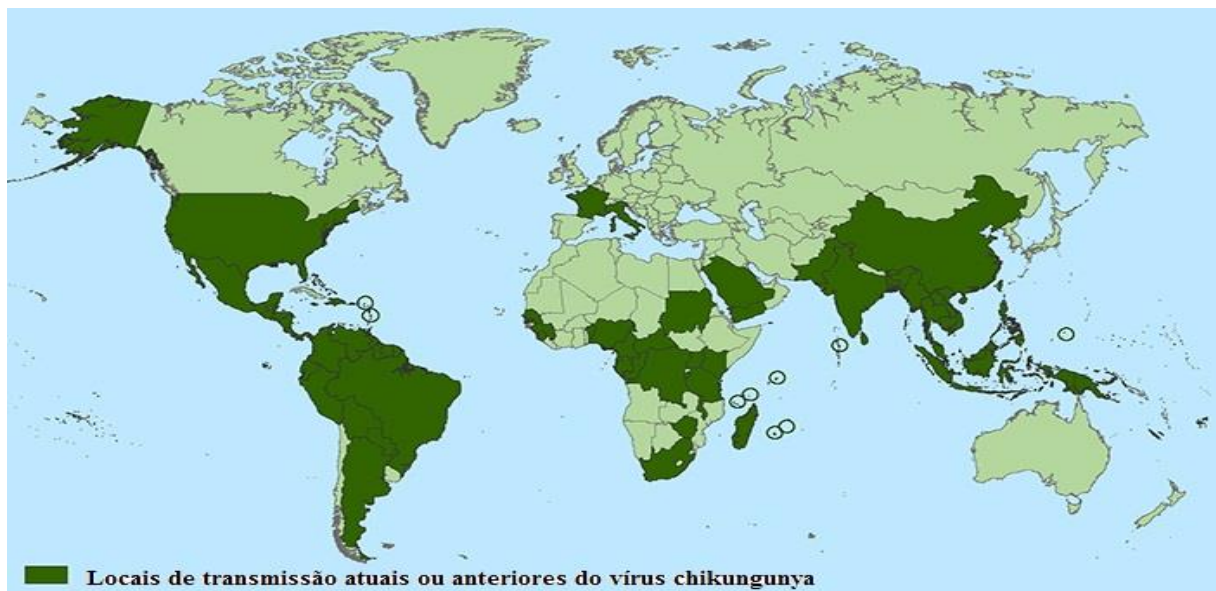


Figura 9: Regiões onde foram reportados casos de transmissão do vírus chikungunya. O mapa mostra os países e territórios com casos de transmissão reportados e atuais do CHIKV. Fonte: Centro de Controle de Prevenção de Doenças, Estados Unidos, abril de 2016. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/chikungunya/geo/>>. Acesso em 23 de maio de 2021.

20

O CHIKV é mantido na natureza através de um ciclo enzoótico silvestre entre PNH, pequenos mamíferos (como morcegos) e vetores artrópodes hematófagos do gênero *Aedes*. Contudo, o papel dos PNH no ciclo enzoótico do CHIKV ainda precisa ser bem elucidado (CUNHA, *et al.*, 2020; FIGUEIREDO, 2007).

25

Estudos de soroprevalência de anticorpos contra o CHIKV sugerem que na África o macaco-verde africano (*Cercopithecus sabaues*) e os babuínos chacma (*Papio ursinus*) sejam importantes hospedeiros do vírus na região do Zimbabué (MCINTOSH *et al.*, 1964). Além disso, o CHIKV foi isolado de macacos-verde africanos e patas (*Erythrocebus patas*) e de babuínos da Guiné (*Papio papio*) no Senegal e em chimpanzés no Congo (DIALLO *et al.*, 1999; MCINTOSH *et al.*, 1964; MONLUN *et al.*, 1993; TSETSARKIN; CHEN; WEAVER, 2016). Após um surto de CHIKV em humanos na Malásia (2008/2009), amostras de PNH da espécie *Macaca fascicularis* foram testadas, principalmente devido à aproximação destes com humanos. Embora apenas um macaco (0,7%) tenha demonstrado anticorpos neutralizantes para CHIKV, o vírus foi posteriormente isolado de quatro (3,8%) amostras da mesma espécie de PNH in Kuala Lumpur (2017) demonstrando que esta espécie pode estar envolvida no ciclo de manutenção do vírus (APANDI *et al.*, 2009; SAM *et al.*, 2015). Até o momento não existem estudos comprovando a presença de CHIKV circulando entre PNH nas Américas, incluindo o Brasil. Embora não se possa descartar a possibilidade de infecção de PNH pelo CHIKV, mais estudos epidemiológicos de detecção molecular ou de anticorpos neutralizantes específicos devem ser realizados, principalmente devido à circulação de outros arbovírus concomitantemente em várias regiões do país (VOURC'H *et al.*, 2014).

Durante grandes epidemias, o CHIKV pode ser transmitido entre humanos em estado virêmico através de mosquitos, mantendo um ciclo homem-mosquito-homem. O principal vetor do CHIKV na África e em outras regiões tropicais e subtropicais é o mosquito *A. aegypti*, embora este vírus já tenha sido isolado em outras espécies, como, *A. africanus*, *A. luteocephalus* e *A. furcifer-taylori* (BURT *et al.*, 2012). A disseminação do CHIKV para regiões consideradas não endêmicas se deve principalmente a uma adaptação genética no CHIKV; uma substituição do aminoácido alanina pelo aminoácido valina na posição 226 do gene da poliproteína de superfície do envelope (E1) do vírus. Esta mutação adaptativa do vírus permitiu uma maior capacidade de transmissão e infectividade pelo mosquito *A. albopictus*, presente em regiões tropicais e temperadas do globo (ABDELNABI; NEYTS; DELANG, 2017; BURT *et al.*, 2012; CUNHA, *et al.*, 2020; TSETSARKIN; CHEN; WEAVER, 2016).

Os sintomas associados a uma infecção por CHIKV são muito similares àqueles observados em um paciente infectado por DENV, porém, diferente do que ocorre na dengue, a maioria dos indivíduos infectados por CHIKV é sintomática. Com um período de incubação de 1 - 12 dias, o quadro clínico mais brando é caracterizado por febre súbita e alta, artralgias, mialgia, dores de cabeça, fotofobia e erupções cutâneas. Casos fatais são estimados em 1 em

1000 sendo a maioria deles ocorrendo em recém nascidos e adultos acima de 27 anos. Os sintomas associados à doença desaparecem após 7 - 10 dias, porém, muitos dos infectados reportam dores persistentes nas regiões das articulações por semanas, meses ou até anos (BURT *et al.*, 2012; SCHWARTZ; ALBERT, 2010; VU; JUNGKIND; LABEAUD, 2017).

5

2.5. Vírus oropouche

O vírus oropouche (OROV) responsável pela febre oropouche, é um membro do gênero *Orthobunyavirus*, família *Peribunyaviridae*. O OROV pertence ao sorogrupo Simbu, que inclui 25 vírus classificados em dois subclados filogenéticos, o subclado A, do qual pertencem o OROV e o vírus Manzanilla, e o subclado B, que incluem os vírus Akabane, Sathuperi, Simbu e Shamonda e Shuni (BRIESE; CALISHER; HIGGS, 2013; TRAVASSOS DA ROSA *et al.*, 2017). O OROV possui genoma de RNA fita simples com polaridade negativa segmentado em três segmentos: L (*large*), que codifica RNA-polimerase-RNA-dependente, M (*medium*), que codifica as glicoproteínas de superfície Gn e Gc, proteína do nucleocapsídeo (N) e a proteína não estrutural NSm, e o segmento S (*small*) que codifica a proteína não estrutural NSs (BRIESE; CALISHER; HIGGS, 2013; ROMERO-ALVAREZ; ESCOBAR, 2018; SAKKAS *et al.*, 2018).

O OROV foi isolado de humanos pela primeira em 1955, no vilarejo Vega de Oropouche, em Trindade (ANDERSON *et al.*, 1961). As primeiras descrições de detecção de OROV no Brasil ocorreram em 1960, onde o vírus foi isolado de três bichos-preguiça (*Bradypus tridactylus*) e em um pool de mosquitos *A. serratus* em Belém, no Pará. Em 1961, o primeiro surto de febre do oropouche, com mais de 11.000 casos registrados, ocorreu em Belém. Posteriormente, sucessivos surtos foram descritos, principalmente na região da bacia Amazônica (PINHEIRO, *et al.*, 1976; TRAVASSOS DA ROSA *et al.*, 2017; VASCONCELOS, *et al.*, 2011). Entre os anos de 1961 e 2000, epidemias de OROV foram descritas em diversos estados do país, incluindo Acre, Amapá, Amazonas, Goiás, Maranhão, Pará, Rondônia e Tocantins (ROMERO-ALVAREZ; ESCOBAR, 2018).

O primeiro isolamento do OROV fora da região da bacia Amazônica ocorreu em 2000 a partir de amostras de um PNH do gênero *Callithrix*, demonstrando a presença do vírus em novas áreas e possivelmente novos hospedeiros, como os PNH (NUNES *et al.*, 2005). Em 2016, foram detectados anticorpos anti-OROV em dois pacientes em São Paulo, que haviam viajado para os estados de Rondônia e Bahia, demonstrando a importância de se aprimorar as avaliações clínicas de sintomatologia e os testes de diagnósticos diferenciais para os arbovírus

circulantes no Brasil (LUNA *et al.*, 2017; SAKKAS *et al.*, 2018). Mais recentemente (2021), o OROV foi detectado em um paciente em Teresina, no Piauí (GIPI, 2021).

O OROV é mantido na natureza através de um ciclo urbano e um ciclo silvestre (Figura 10). O ciclo urbano tem como vetor primário mosquitos do gênero *Culicoides*, principalmente *C. parensis*, e humanos (DIXON *et al.*, 1981; SAKKAS *et al.*, 2018). Contudo, já foi demonstrado que mosquitos *Culex quinquefasciatus* também possuem a capacidade vetorial para OROV (HOCH; ROBERTS; PINHEIRO, 1986). Além disso, durante um surto de dengue no Mato Grosso o segmento S do genoma de OROV foi detectado em pools de mosquitos *C. quinquefasciatus* (CARDOSO, *et al.*, 2015). O ciclo silvestre do OROV tem como hospedeiros naturais mamíferos e aves silvestres e domésticas. Anticorpos anti-OROV foram descritos em bichos-preguiça, em alguns gêneros de PNH como *Sapajus* sp., *Alouatta caraya*, *Callithrix penicilatta*, além de espécies de roedores (*Proechimys* spp.) e pássaros silvestres (*Fringillidae*, *Thaurapidae*, *Columbidae*) (PINHEIRO; TRAVASSOS DA ROSA; TRAVASSOS DA ROSA, 1981a; SAKKAS *et al.*, 2018; TEIXEIRA NUNES *et al.*, 2005). Além disso, o vírus foi isolado de bichos-preguiça (1960) no Pará, em PNH em Arinos (2000) em Minas Gerais e em Miranda (2013) no Mato Grosso (PINHEIRO, *et al.* 1976; NUNES *et al.*, 2005). Pouco se sabe sobre o vetor primário de transmissão do OROV no ambiente silvestre, contudo, estudos epidemiológicos e laboratoriais indicam que espécies do mosquito *Coquillettidia venezuelensis*, *C. quinquefasciatus*, *A. serratus* e *Culicoides* possam estar envolvidos no ciclo de transmissão do vírus (CARDOSO *et al.*, 2015; LUNA *et al.*, 2017; PINHEIRO *et al.*, 1976).

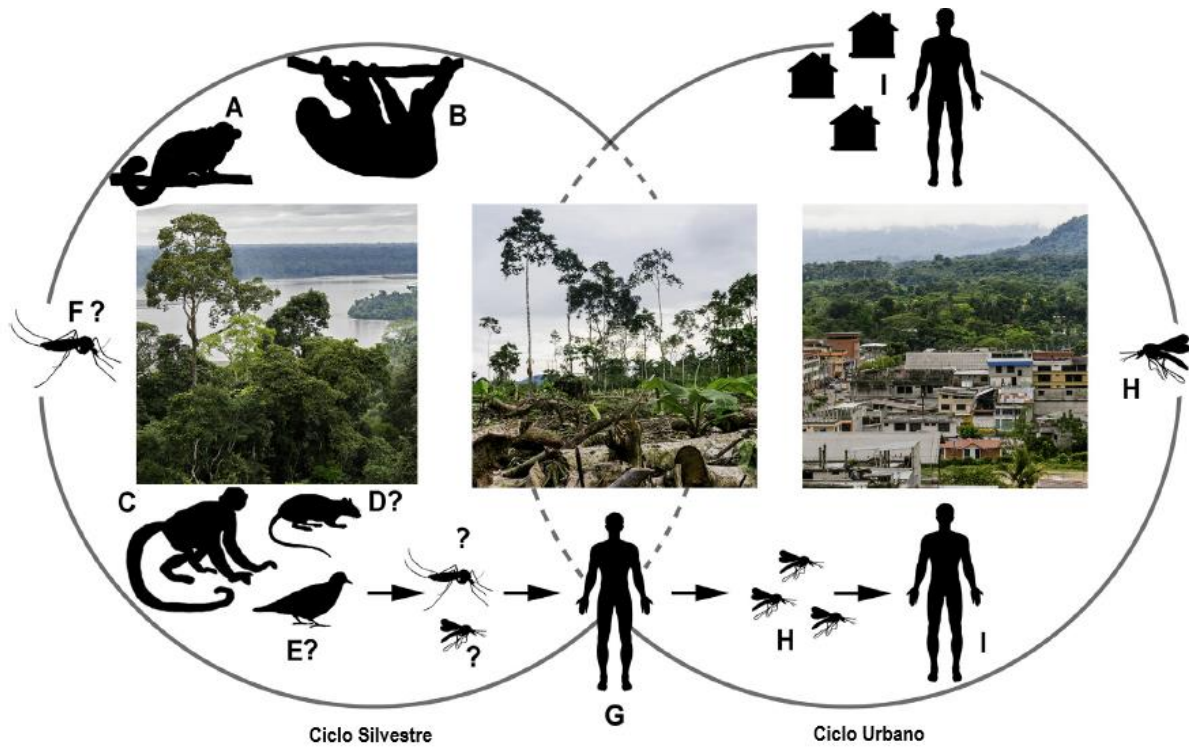


Figura 10: Ciclos de transmissão do vírus oropouche. O ciclo silvestre do OROV inclui mamíferos silvestres como *Callithrix penicillata* (A), *Bradypus tridactylus* (B), *Sapajus* spp.(C), *Allouatta caraya* e possivelmente de *Proechimys* spp. (D) O vírus oropouche também foi isolado de aves silvestres (E). Os possíveis vetores do ciclo silvestre de OROV incluem *Coquillettidia venezuelensis* e *Aedes serratus* (F). No ciclo urbano, os humanos são possíveis hospedeiros (G) podendo levar a surtos e epidemias em ambientes urbanos (I). O ciclo urbano de transmissão, acredita-se, é mantido por *Culicoides paraensis* (H). *Culex quinquefasciatus* também foi associado à dispersão do vírus oropouche (ROMERO-ALVAREZ; ESCOBAR, 2018).

10

Em humanos, a febre oropouche se manifesta de forma similar a outras arboviroses, com quadros de febre alta que podem durar de 2-7 dias, dores de cabeça, mialgia, artralgia, náuseas, tonturas e fotofobia (ROMERO-ALVAREZ; ESCOBAR, 2018; TRAVASSOS DA ROSA *et al.*, 2017). Em casos mais graves podem ser observados erupções cutâneas, dor retro-orbital, mal-estar generalizado, sangramento gengival e meningite ou encefalite (ROMERO-ALVAREZ; ESCOBAR, 2018). As manifestações neurológicas clinicamente definidas como meningite são registradas principalmente durante grandes surtos e incluem dor de cabeça intensa, tontura, letargia, diplopia e em alguns casos, ataxia e rigidez na região do pescoço. Infecções com manifestação de dor de cabeça extrema e rigidez no pescoço anteciparam casos de meningite asséptica (PINHEIRO; TRAVASSOS DA ROSA; TRAVASSOS DA ROSA, 1981).

20

2.6. Vírus mayaro

O vírus mayaro (MAYV) é um *Alphavirus* pertencente à família *Togaviridae*, e é responsável por causar a febre mayaro em humanos. O MAYV possui genoma com aproximadamente 11 kb e é constituído de RNA fita simples, polaridade positiva dividido em duas janelas de leitura (ORFs: *Open reading frames*). A ORF não estrutural codifica uma poliproteína que dá origem a quatro peptídeos não estruturais (NSP1-4), e a ORF estrutural codifica uma poliproteína que dá origem a seis peptídeos estruturais (capsídeos; envelope 3-E3, E2, 6K, transframe- TR e E1) (MACKAY; ARDEN, 2016; STRAUSS; STRAUSS, 1994). O MAYV faz parte do sorogrupo do Complexo Semliki, composto por mais oito vírus (Bebaru, CHIKV, Getah, Semliki Forest, Ross River, O'nyong-nyong e Una vírus) de importância médica e veterinária que compartilham sítios antigênicos comuns podendo gerar reatividade cruzada entre eles durante testes sorológicos (ESPOSITO; FONSECA, 2017; GRIFFIN, 2013).

O MAYV foi isolado pela primeira vez de trabalhadores rurais que apresentavam doença febril na ilha de Trindade em 1954 (ANDERSON *et al.*, 1957; CASALS; WHITMAN, 1957). No Brasil, o vírus foi isolado pela primeira vez em 1955, no Pará (CAUSEY; MAROJA, 1957). Desde então, outros surtos de febre mayaro ocorreram no país, como o de Belterra em 1978 (HOCH *et al.*, 1981), Conceição de Araguaia (1981) e Benevides (1991), no Pará (VASCONCELOS *et al.*, 1998). Em 1991, na cidade de Peixes em Tocantins, foi reportado outro surto de febre mayaro, bem como na cidade Itaruma, Goiás, em 1987 e 1991 (VASCONCELOS *et al.*, 1998). Em 2008, 36 casos de febre do mayaro foram reportados em uma comunidade rural em Belém, Pará (AZEVEDO *et al.*, 2009). E entre 2011 e 2013 no Mato Grosso, foram descritos casos de coinfeção de DENV e MAYV (ZUCHI *et al.*, 2014). Mais recentemente, em Goiás, foram detectados anticorpos IgM anti-MAYV em pacientes que viajaram para áreas rurais no estado (BRUNINI *et al.*, 2017).

Como a maioria dos arbovírus, o MAYV se mantém na natureza primariamente através de um ciclo silvestre envolvendo mosquitos silvestres de hábitos diurnos encontrados em topos de árvores e que se alimentam do sangue de PNH e possivelmente de outros vertebrados (MACKAY; ARDEN, 2016). Os vetores do MAYV incluem mosquitos do gênero *Haemagogus* (principalmente *Haemagogus janthinomys*), os mesmos envolvidos na transmissão do YFV. Contudo, já foi demonstrado por estudos de competência vetorial que mosquitos do gênero *Aedes* são capazes de transmitir o vírus (HOCH *et al.*, 1981; LONG *et al.*, 2011; MACKAY; ARDEN, 2016). Os reservatórios hospedeiros para MAYV não são

totalmente conhecidos. Contudo, já foi demonstrado que ele pode infectar uma ampla gama de hospedeiros que incluem mamíferos como carnívoros, marsupiais, roedores, primatas, artiodátilos e preguiças (DE THOISY *et al.*, 2003). Um estudo realizado em Belterra, no Pará, encontrou 27% dos PNH do gênero *Callithrix* positivos para anticorpo específico para MAYV, além disso, já foram descritos anticorpos específicos para MAYV em diferentes espécies de PNH (*Alouatta seniculus*, *Alouatta belzebul*, *Pithecia pithecia* e *Saguinus midas*) em países da América do Sul (Guiana Francesa e Panamá) (CAICEDO *et al.*, 2021; CAUSEY; MAROJA, 1957; DE THOISY, *et al.*, 2003; HOCH *et al.*, 1981).

Em humanos, os sintomas da febre mayaro são semelhantes a de outras arboviroses febris que incluem febre abrupta, que pode durar de três à cinco dias, erupções cutâneas, dor muscular, dor retro orbital, dor de cabeça, diarreia e dores nas articulações que podem persistir meses ou até mesmo anos (PINHEIRO *et al.*, 1981). Não há antiviral disponível contra o MAYV e apenas os sintomas da doença são tratados. Em 2014, uma vacina de vírus atenuado foi desenvolvida e se mostrou altamente imunogênica e protetora em camundongos. Contudo, a vacina ainda não está disponível para uso em humanos (MACKAY; ARDEN, 2016; WEISE *et al.*, 2014).

2.7. Importância dos PNH na vigilância da emergência e reemergência de arboviroses

A emergência/reemergência de arbovírus e o aumento da incidência de arboviroses em várias partes do mundo estão relacionados a vários fatores de mudanças ambientais e antropogênicas (BLAIR; ADELMAN; OLSON, 2000; VASILAKIS; GUBLER, 2016). O impacto das altas incidências de arboviroses é uma grande ameaça à saúde pública de um país ou região, além de gerar consequências diretas e indiretas em sua economia. Desta forma, o governo dos países afetados deve investir em campanhas de combate ao vetor e sistemas de vigilância que permitam identificar e prevenir possíveis emergências do vírus, como os arbovírus, na população (MAYER; TESH; VASILAKIS, 2017a). A vigilância sentinela é uma das ferramentas que permite a detecção precoce da presença de arbovírus na natureza antes destes chegarem às áreas urbanas gerando risco à população. Dentre os hospedeiros vertebrados dos arbovírus, os PNH desempenham papel de sentinelas na vigilância epidemiológica para alguns vírus, como YFV, alertando as autoridades da saúde a agirem para evitar possíveis epidemias (KOWALEWSKI *et al.*, 2011; SVOBODA, 2007; WOLFE *et al.*, 1998).

A investigação de doenças infecciosas utilizando PNH como fonte de estudo permite compreender o ciclo de transmissão do arbovírus, identificar a origem do agente patogênico, assim como os fatores que influenciam a sua manutenção na natureza (WOLFE *et al.*, 1998). Os PNH compartilham semelhanças fisiológicas e características genéticas com os humanos e consequentemente a susceptibilidade a uma variedade de patógenos, incluindo os arbovírus. Além disso, os PNH podem ocupar o mesmo ambiente que os humanos, vivendo em fragmentos de matas localizados próximos à regiões urbanas e periurbanas (WOLFE *et al.*, 1998). Os PNH têm como habitats regiões de mata, locais onde se pode encontrar altas densidades de vetores. Além disso, os PNH em sua maioria vivem em grupos e embora sejam territorialistas, são animais que necessitam se deslocar por várias regiões em busca de alimentos, o que pode facilitar a exposição dos primatas aos vírus e consequentemente sua dispersão (FREELAND, 1976; WOLFE *et al.*, 1998).

Os primeiros relatos da observação de PNH como sentinelas ocorreram na África a partir de estudos epidemiológicos sobre a febre amarela. Algumas espécies de PNH do Novo Mundo, como por exemplo, bugios (gênero *Alouatta*) são considerados altamente susceptíveis ao YFV e desenvolvem a doença de forma fatal, assim como ocorre em humanos. A morte destes animais no ambiente silvestre tem servido de alerta da presença do YFV no ambiente. Assim como ocorreu com a FA, o isolamento de vírus em PNH mortos levou à identificação de novos arbovírus, como foi o caso do vírus causador da doença Kyasanur, descoberto após uma sequência de mortes de macacos (*Macaca radiata*) na Floresta Kyasanur, na Índia (ALMEIDA *et al.*, 2014; WOLFE *et al.*, 2001).

No Brasil, a vigilância passiva de PNH se iniciou em 1999 e a partir de 2002 o Ministério da Saúde iniciou juntamente com técnicos da saúde pública de diversas regiões do país, a elaboração do Manual de Vigilância de Epizootias em PNH. Lançado em 2005, o manual teve como intuito intensificar e aprimorar as ações de vigilância e na identificação de arboviroses no país (BRASIL, 2005; SVOBODA, 2007). Entre 2000/2001, ocorreram relatos de mortes de PNH da espécie *Alouatta caraya* na região noroeste do Paraná, porém estas mortes só foram relatadas no final de 2001 à Secretaria de Saúde do estado, impossibilitando estabelecer a sua causa. No mesmo ano, ocorreram mortes de macacos da espécie *Alouatta guariba* no Rio Grande do Sul, tendo como diagnóstico a infecção por YFV (TORRES *et al.*, 2003). Entre 2007/2009 foram registradas 4.339 epizootias envolvendo 2.272 mortes de PNH, deste total, 64,8% eram bugios (*Alouatta* spp.). Do total, foram confirmadas 474 mortes por infecção por YFV, destes 92,8% envolveram bugios. Sagüis (*Callithrix* spp.), macacos-prego (*Sapajus* spp.) e outros primatas de espécies não identificadas somaram 7,2% dos casos no

período citado (LEAL *et al.*, 2016). Esse cenário reforçou ainda mais a necessidade da vigilância sentinela nesses animais.

Além disso, estudos soroepidemiológicos com PNH no Paraná e Mato Grosso do Sul mostraram que 17% (n= 121) possuíam anticorpos específicos para SLEV, sugerindo o
5 envolvimento de PNH na manutenção deste vírus na natureza. Na Guiana Francesa, foram detectados altos títulos de anticorpos para MAYV em PNH, sugerindo a presença e circulação deste vírus nos PNH deste país. Anticorpos para MAYV também foram detectados em animais na cidade de Bonito, Mato Grosso do Sul, assim como em espécies *Callithrix argentata* no estado do Pará (BATISTA *et al.*, 2012). Esses dados em conjuntos colaboraram
10 de forma significativa para a detecção de arbovírus em uma determinada região, além dos estudos do ciclo de manutenção e ou transmissão viral, podendo desta forma, contribuir para estratégias de prevenção de arboviroses.

3. JUSTIFICATIVA

O aumento expressivo do número de casos e da emergência e reemergência de doenças infecciosas tem gerado um alerta para a saúde humana e animal em todo o mundo.

5 Dentre as doenças infecciosas de maior impacto na saúde global, se destacam as zoonoses, que acometem tanto animais vertebrados quanto humanos. Diversos fatores estão relacionados à emergência e dispersão de zoonoses no mundo, incluindo fatores naturais como as mudanças climáticas e a própria evolução natural dos patógenos. Contudo, os principais fatores relacionados são os antropogênicos como a destruição de habitats naturais, aumento
10 populacional e da urbanização, aproximação dos ambientes silvestres e transporte e/ou comercialização de animais silvestres e domésticos entre diferentes regiões.

Dentre as doenças zoonóticas que vêm se destacando nos últimos anos, estão as arboviroses, doenças virais transmitidas por artrópodes hematófagos a humanos e animais. O aumento do número de casos de arboviroses nas últimas décadas e a ressurgência de
15 epidemias previamente controladas além de ser uma ameaça à saúde pública também causam consequências diretas ou indiretas à economia de um país. Este deve não só investir em leitos, infraestrutura equipamentos hospitalares, como também em serviços de vigilância e conscientização da população quanto às formas de prevenção da transmissão dos arbovírus. Uma das ferramentas de vigilância epidemiológica de arboviroses é a investigação das
20 epizootias envolvendo animais sentinelas para a manutenção da circulação desses vírus na natureza. Os primatas não humanos são considerados hospedeiros para uma variedade de arbovírus, como por exemplo, YFV, ZIKV, CHIKV, MAYV e OROV. O recente surto de febre amarela (2016 - 2018) no Brasil e a detecção do YFV em humanos e em PNH em ambientes urbanos gerou uma preocupação em relação à reurbanização do ciclo de
25 transmissão deste vírus no país. Além disso, a recente introdução do ZIKV e CHIKV no Brasil mostra que mais estudos são necessários para compreender os possíveis hospedeiros e reservatórios destes vírus em ambientes urbanos, na interface urbano-rural e em ambientes rurais/silvestres.

Neste contexto, a vigilância sentinela utilizando PNH e outros animais silvestres é
30 uma das ferramentas que permite a detecção precoce da presença de arbovírus na natureza antes destes chegarem às zonas urbanas gerando risco à população. Para isto, análises soroepidemiológicas e técnicas de biologia molecular auxiliam na detecção do vírus e estudos da sua dinâmica nos ciclos zoonóticos e epizootico. Estes resultados podem ter aplicações diretas nos programas de vigilância epidemiológicas, monitoramento e controle de endemias,

epidemias e epizootias. Além do controle de epidemias em humanos, estes resultados colaboram com pesquisas e trabalhos de conservação animal, controle de epizootias, no auxílio das gestões de políticas públicas de controles de arboviroses, educação e conscientização ambiental.

- 5 Este trabalho teve como objetivos colaborar com informações que auxiliassem na vigilância sentinela dos PNH no Brasil, auxiliar na identificação de áreas de risco para YFV nos estados de Minas Gerais e Espírito Santo durante o surto de FA silvestre de 2017/2018 e fazer o estudo epidemiológico da região nos anos de 2019/2020 após a epidemia de FA em Minas Gerais. Além disso fazer a investigações de eventos de *spillover* (MAYV, OROV) e
- 10 *spillback* (CHIKV, ZIKV) de arbovírus que possam ter como hospedeiros os PNH. E finalmente, as recentes epidemias de FA trouxeram a oportunidade de estudos mais amplos sobre a infecção de YFV em PNH, portanto, diante deste cenário este trabalho propôs uma revisão sobre os principais achados histopatológicos e da infecção de YFV em diferentes espécies de PNH sob uma perspectiva histórica e dos surtos recentes de FA no Brasil.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

- 5 Investigar a infecção de YFV e outros arbovírus (CHIKV, ZIKV, OROV e MAYV) em amostras de primatas não humanos coletados nos estados de Minas Gerais e Espírito Santo, de 2017 a 2020.

4.2. Objetivos Específicos

10

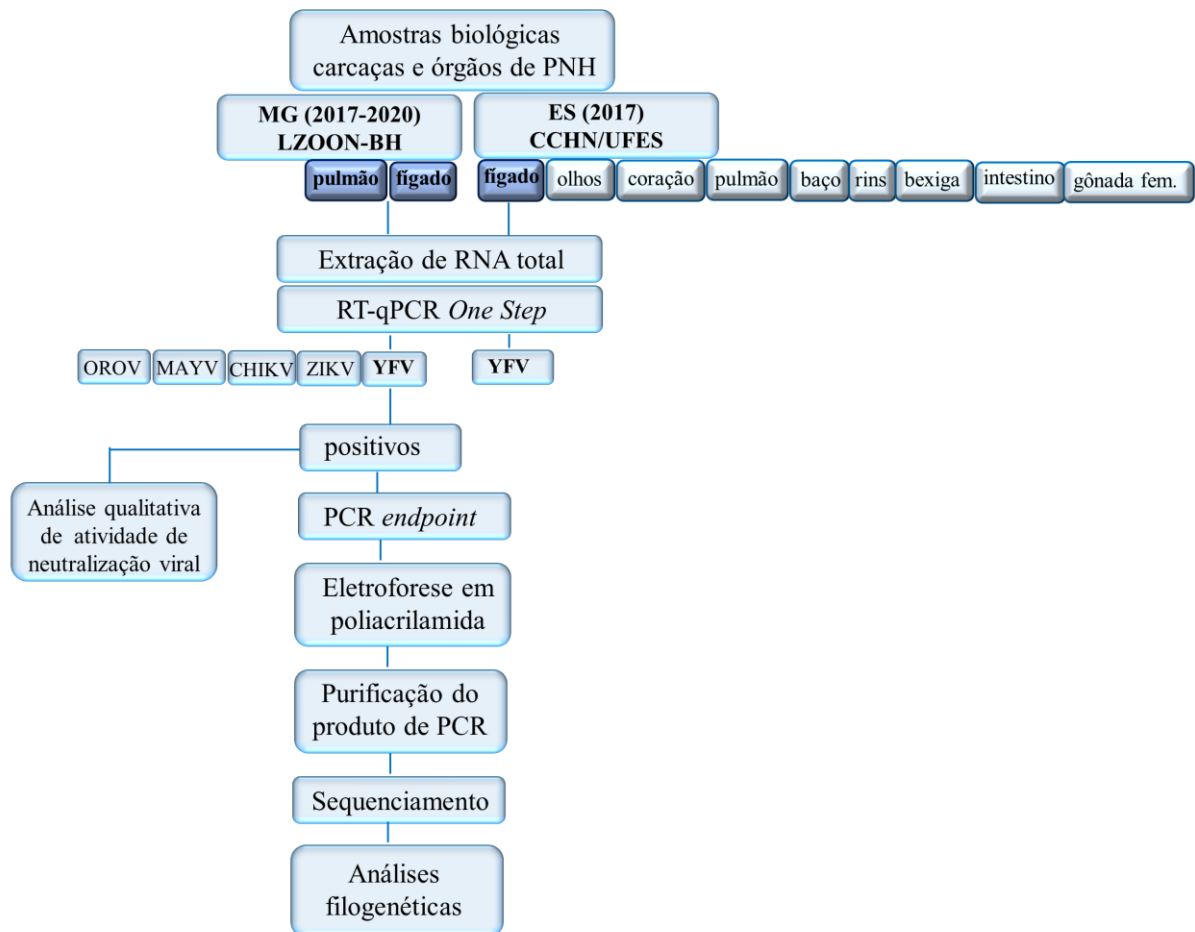
- Investigar a infecção por YFV, em primatas não humanos, no estado de Minas Gerais, entre os anos de 2018 a 2020, e no Espírito Santo em 2017;
- Analisar da dinâmica de circulação do YFV em PNH coletados em ambiente rural/silvestre, na interface rural/urbana e no ambiente urbano, no estado de Minas Gerais;
- 15 • Investigar a infecção por CHIKV, ZIKV, OROV e MAYV, em primatas não humanos, no estado de Minas Gerais;
- Revisar os principais achados histopatológicos e da infecção de YFV em diferentes espécies de PNH sob uma perspectiva histórica e dos surtos recentes no Brasil.

20

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Fluxo de Trabalho

5 A metodologia deste estudo seguiu o fluxo de trabalho apresentado no Fluxograma 1.



Fluxograma 1: Fluxograma de metodologia de trabalho. Fluxograma de trabalho para as amostras de primatas não humanos coletadas em Minas Gerais (2017-2020) e no Espírito Santo (2017).

10 5.2. Aspectos éticos

Parte do presente projeto foi submetido e aprovado (Protocolo CEUA: 98/2017) pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) para avaliação e validação do recebimento e armazenamento de amostras biológicas de primatas não humanos de acordo com a Lei 11.794/2008 e Decreto 6.899/2009 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Além disso o projeto está cadastrado no SISGEN, sob protocolo A3A89D6. A coleta e o uso de amostras de PNH

coletados em Vitória - ES pelo Prof. Dr. Sérgio Lucena Mendes do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Espírito Santo - CCHN/UFES foi autorizada (Número: 58110-1) de acordo com o artigo 28 da IN 3/2014, pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – SISBIO (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade –

5 ICMBio).

5.3. Caracterização dos locais de estudo e das amostras biológicas

5.3.1. Espírito Santo

10

O estado do Espírito Santo possui uma população total de cerca de 4.018.650 de habitantes (IBGE, 2019a), onde, aproximadamente dois terços vivem em áreas urbanas, e o restante em áreas rurais. O estado situa-se entre os paralelos 17° 53' 29'' N e 21° 18' 03'' S e os meridianos 39° 41' 18'' E - 41° 52' 45'' W e compreende uma área de 46.089,390 km²,

15 constituída por duas regiões distintas, litoral e planalto, e apresenta clima tropical úmido durante todo ano. O estado do Espírito Santo possuía 90% da sua extensão territorial coberta por Mata Atlântica, porém, devido a diversos fatores ambientais e antropogênicos, o estado apresenta atualmente menos de 15% do seu território coberto por matas divididas em fragmentos florestais (ATLÂNTICA, 2017). Na região serrana do estado, podem ser

20 encontradas sete espécies de primatas: *Brachyteles hypoxanthus* (muriqui-do-norte), *Cellicibus personatus* (sauá, guigó), *Callithrix flaviceps* (sagüi-da-serra), *Callithrix geoffroyi* (sagüi-da-cara-branca), *Sapajus nigritus* (macaco-prego), *Alouatta guariba* (bugio-marrom) e *Sapajus robustos* (macaco-prego de crista), sendo que entre estas espécies, cinco são

25 consideradas em ameaça de extinção (muriqui-do-norte, sauá/guigó, sagüi-da-serra, macaco-prego de crista e bugio-marrom) (IUCN, 2021; PASSAMANI, 2008).

5.3.2. Minas Gerais

O estado de Minas Gerais possui uma população total de cerca 21.168.791 habitantes

30 onde aproximadamente 85% vivem em áreas urbanas, e o restante em áreas rurais (IBGE, 2019b). O estado situa-se entre os paralelos 14°13'58''N e 22°54'00''S e os meridianos 39°51'32''E e 51°02'35''W e compreende uma área de 586,522 km², constituída por áreas de Mata Atlântica, Cerrado, Campos de Altitude, Campo Rupestres e Mata Seca (Governo de Minas Gerais, 2017). No estado podem ser encontradas dez espécies de primatas: *A. guariba*

(bugio-marrom), *C. penicillata* (Mico-estrela), *C. geoffroyi* (sagüi-da-cara-branca), *Callithrix flaviceps* (sagüi-da-serra), *Callithrix aurita* (sagüi-da-serra-escuro), *Sapajus robustus* (macaco-prego de crista) e *S. nigritus* (macaco-prego), *Callicebus personatus* (sauá, guigó) e *C. nigrifrons* (sauá, guigó) e *Brachyteles hypoxanthus* (muriqui-do-norte) (IUCN, 2019).

5

5.3.3. Amostras biológicas

O presente trabalho teve como local de estudo áreas urbanas, áreas de interface urbana-rural e áreas rurais/silvestres dos estados de Minas Gerais (MG) e Espírito Santo (ES).

10 As amostras biológicas deste estudo pertencem a primatas não humanos coletados nos ambientes acima citados, durante (2018) e após (2019/2020) a epidemia de febre amarela em Minas Gerais, e durante a epidemia de FA (2017) no Espírito Santo. Além disso, foram utilizadas neste estudo, uma coleção de 397 amostras de fígado de PNH coletadas pelo Laboratório de Zoonoses da Prefeitura de Belo Horizonte – MG (LZOON/MG) em 2017 em
15 MG, para a investigação de CHIKV, MAYV e OROV (SACCHETTO, 2020)

As amostras biológicas de órgãos (olhos, coração, pulmão, fígado, baço, rins, intestino, bexiga e gônadas femininas) de PNH encontrados mortos no ES (2017), foram coletadas durante trabalho de campo e evisceradas juntamente com os alunos do laboratório de Mastozoologia da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). As amostras foram
20 gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Sérgio Lucena Mendes do Departamento de Ciências Biológicas - CCHN/UFES para realização da investigação molecular pra arbovírus. As amostras de órgãos (fígado e pulmão) de carcaças de PNH de MG (2018-2020) foram coletadas pela população local e/ou pelos agentes de saúde e encaminhadas ao LZOON/MG. As carcaças de PNH recebidas foram armazenadas em freezer -20°C até o momento da coleta
25 dos órgãos pela equipe do LZOON-MG. Foram enviadas ao Laboratório de Vírus (LV-UFMG) cinco carcaças de PNH coletadas em janeiro/2018 que foram armazenadas em freezer de acesso restrito a -20°C até o momento da coleta dos órgãos pela equipe do LV-UFMG. Após janeiro/2018, apenas amostras de fígados e pulmões foram encaminhadas ao LV-UFMG. Estas amostras de órgãos encaminhadas foram armazenadas em freezer -80°C de
30 acesso restrito. Parte de cada amostra foi preservada em solução RNeasy Lysis Solution (Invitrogen – Thermo Fisher Scientific/ EUA) a -20°C ou -80°C, para análises qualitativas e quantitativas da presença do vírus através de ensaios moleculares e ensaios de avaliação de atividade neutralizante viral.

As carcaças dos animais coletados em 2017 (ES) e recebidos no início do ano de 2018 (MG) foram utilizadas para identificação das espécies, sendo posteriormente taxidermizadas e tombadas na Coleção de Mamíferos da UFES e da UFMG. O descarte dos resíduos biológicos seguiu as normas e recomendações de biossegurança previstas pela Gerência de Resíduos do Instituto de Ciências Biológicas da UFES e da UFMG.

No LZOON-BH, as carcaças de PNH foram descongeladas e inspecionadas visualmente quanto ao estágio de decomposição e/ou conservação, e diferentes aspectos foram levados em conta, como: (i) brilho do tecido (brilhante ou opaco); (ii) cor do tecido (esverdeado, acinzentado ou esbranquiçado); (iii) consistência (se o tecido estava firme ou amolecido); (iv) cheiro (se a carcaça estava com cheiro de apodrecido ou não); e (v) presença ou ausência de parasitas (larvas).

Em laboratório de acesso restrito (Laboratório de Anatomia Veterinária-UFMG), os manipuladores de carcaças de animais usaram touca, óculos de segurança, máscara N95, jalecos de mangas compridas descartáveis e luvas de látex em camada dupla para manipulação das carcaças. Todo equipamento de proteção individual usado foi acondicionado em sacos plásticos de lixo biológico e autoclavados. Pinças, tesouras e outros materiais utilizados para retirada de parte das vísceras foram autoclavados antes da lavagem. Os materiais perfurocortantes foram descartados em embalagens do tipo *descarpak*, autoclavados e então encaminhados para descarte apropriado. As macas, o chão do laboratório e outros materiais de apoio foram desinfetados com solução de hipoclorito 10% por 30 minutos, seguido de lavagem com sabão e água corrente. As macas foram ainda enxaguadas e desinfetadas com álcool 70%.

As carcaças foram colocadas em macas de aço inoxidável para descongelamento e retirada de material biológico, que foi acondicionado em microtubos de 1,5 mL e congeladas imediatamente. Este material foi armazenado em caixas em freezer -80°C em salas trancadas com acesso restrito. Após a retirada dos órgãos, o restante das vísceras foi acondicionado em sacos plásticos de resíduo biológico, com simbologia de material infectante e congelados imediatamente em freezer de acesso restrito. O descarte do material biológico foi feito de acordo com regras de biossegurança e regras da Gerência de Resíduos do Instituto de Ciências Biológicas (ICB), e em seguida, recolhidas por empresa terceirizada especializada (contratada pela UFMG). O material foi transportado em caminhões próprios e identificado. Todo o material utilizado foi autoclavado, descaracterizado e em seguida descartado em aterro sanitário.

5.4. Levantamento molecular de arbovírus em amostras de PNH

As amostras biológicas de MG foram obtidas a partir de carcaças de PNH recebidas pelo LZOON-BH. Neste laboratório todas as carcaças foram previamente testadas para a raiva, utilizando-se fragmentos de cérebro para a Reação de Imunofluorescência Direta (RIFD) e macerados de cérebro para inoculação em camundongos seguidos de RIFD. Somente amostras de animais negativos para o vírus da raiva foram encaminhadas ao LV-UFMG e usadas neste trabalho. Para a triagem molecular de YFV, CHIKV, ZIKV, MAYV e OROV foram realizadas reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR). As amostras positivas foram submetidas à PCR convencional (PCR *endpoint*) para posterior sequenciamento.

5.4.1. Extração de RNA viral total

O RNA total viral foi obtido a partir de amostras de fragmentos de fígados e pulmões, preservadas em solução RNAlater™ Stabilization Solution (Invitrogen – Thermo Fisher Scientific, EUA) a -20°C ou -80°C. O RNA total foi extraído seguindo o protocolo do kit de extração de ácidos nucleicos virais RNeasy® mini kit (Quiagen, Alemanha), como recomendado pelo fabricante. Os RNAs totais obtidos foram armazenados a -80°C até o momento da triagem por PCR.

5.4.2. Detecção de arbovírus através de RT-qPCR One Step (tempo real) e PCR Endpoint (convencional)

Após a extração de RNA total foram realizadas triagens moleculares através de RT-qPCR *One Step* (Sistema GoTaq®Probe 1-StepRT-qPCR Promega, EUA) (StepOne Software v2.3 – Thermo Fisher Scientific, EUA) para detecção de YFV, ZIKV, CHIKV, MAYV e OROV. A detecção destes arbovírus foi realizada com base em protocolos já descritos na literatura e/ou utilizados e padronizados no Laboratório de Vírus da UFMG. Todas as amostras de RNA obtidas foram testadas previamente para controle endógeno (gene codificador da β -actina) para se analisar a presença de RNA total, e a viabilidade destas amostras para uso em RT-qPCR (DE REZENDE, *et al.*, 2019; SACCHETTO *et al.*, 2020). Sobrenadantes de células Vero infectadas com os vírus estudados foram utilizadas como

controle positivos e água livre de RNase foi utilizado como controle negativo em todas as reações de RT-qPCR.

As amostras foram consideradas positivas quando apresentavam amplificação em duplicata com valor de Cq (*quantification cycle*) <37, uma vez que entre o intervalo de Cq entre 37- 40 indicam quantidades mínimas de DNA (SACCHETTO *et al.*, 2020). Contudo, Cqs entre 37-40 foram considerados resultados indeterminados e foram testados novamente com *input* maior de RNA para possível detecção do vírus nas amostras testadas. Cqs>40 foram considerados negativos. Os resultados da RT-qPCR foram inspecionados manualmente para a correção da *baseline* e *threshold*, devido à heterogeneidade no *input* de RNA entre diferentes amostras.

Para a detecção de RNA de YFV foi utilizada a metodologia de RT-qPCR *One Step* descrita por Domingo e colaboradores (2012) utilizando iniciadores e sonda TaqMan® específicos para a região não codificadora 5' (Tabela 1) do genoma do YFV, com um tamanho de 88 pb (DOMINGO *et al.*, 2012). Para detecção de ZIKV foi utilizada a metodologia de RT-qPCR *One Step* descrita por Lanciotti e colaboradores (2008) utilizando iniciadores e sonda TaqMan® específicos para a região codificadora da proteína do envelope (E) (Tabela 1) do genoma do ZIKV, com um tamanho de 76 pb (LANCIOTTI *et al.*, 2008). Para detecção de CHIKV foi utilizada a metodologia de RT-qPCR *One Step* descrita por Pastorino e colaboradores (2005) utilizando iniciadores e sonda TaqMan® específicos para a região codificadora da proteína do envelope (E) (Tabela 1) do genoma do CHIKV (PASTORINO *et al.*, 2005). Para a detecção de RNA de MAYV e OROV foi utilizada a metodologia de RT-qPCR *One Step* multiplex descrita por Naveca e colaboradores (2017) que permite a detecção simultânea dos dois vírus utilizando iniciadores e sonda TaqMan® específicos para a região codificadora da proteína não estrutural 1 (NS1) do genoma de MAYV, com um tamanho de 59 pb e iniciadores e sonda TaqMan® específicos para a região codificadora do segmento S do genoma de OROV, com um tamanho de 62 pb (Tabela 1) (NAVECA *et al.*, 2017).

Tabela 1. Sequências de iniciadores (*primers*) utilizados na detecção de arbovírus e controle endógeno

<i>Primer</i>	<i>Sequência</i>	<i>Gene Alvo</i>	<i>Tamanho do fragmento</i>	<i>Referência</i>
β actina F	5' CCA ACC GCG AGA AGA TGA 3'	β actina	97pb	(DE REZENDE, <i>et al.</i> , 2019)
β actina R	5' CCA GAG GCG TAC AGG GAT AG 3'			
YFV F	5' GCTAATTGAGGTGYATTGGTCTGC 3'	UTR 5'	88 pb	(DOMINGO <i>et al.</i> , 2012)
YFV R	5' CTGCTAATCGCTCAAMGAACG 3'			
YFV P	5' FAM ATCGAGTTGCTAGGCAATAAA CAC-TMR 3'			
ZIKV F	5' CCGCTGCCCAACACAAG 3'	E	76 pb	(LANCIOTTI <i>et al.</i> , 2008)
ZIKV R	5' CCACTAACGTTCTTTTGCAGACAT 3'			
ZIKV P	5' FAM AGCCTACCTTGACAAGCAGTCAGACACTCAA 3'			
CHIKV F	5' TCGACGCGCCCTCTTTAA 3'	E	127pb	(PASTORINO <i>et al.</i> , 2005)
CHIKV R	5' ATCGAATGCACCGCACAC 3'			
CHIKV P	5' FAM ACC AGC --- AGAC BHQa-Q 3'			
MAYV F	5' CACGGACMTTTTGCCTTCA 3'	NSP1	59 pb	(NAVECA <i>et al.</i> , 2017)
MAYV R	5' AGACTGCCACCTCTGCTKGAG 3'			
MAYV P	5'VIC ACAGATCAGACATGCAGG 3'			
OROV F	5' TCCGGAGGCAGCATATGTG 3'	Segmento S	62 pb	(NAVECA <i>et al.</i> , 2017)
OROV R	5' ACAACACCAGCATTGAGCACTT 3'			
OROV P	5'(FAM) CATTGAAGCTAGATACGG 3'			

Legenda: F: iniciador senso (*forward primer*). R: iniciador anti-senso (*reverse primer*). pb: pares de base.

Após a detecção do genoma dos vírus triados através de RT-qPCR, foi realizada a produção de DNA complementar (cDNA) e PCR convencional, utilizando diferentes conjuntos de *primers* (FARIA, *et al.*, 2018; JORGE *et al.*, 2017) para fragmentos de regiões maiores do genoma para que estes pudessem ser utilizados para sequenciamento. A síntese de cDNA foi realizada logo após a extração do RNA viral, através de reações de transcrição reversa (RT) utilizando a enzima SuperScript III® (Invitrogen – Thermo Fisher Scientific, EUA) de acordo com instruções do fabricante.

5.4.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida

A visualização dos produtos obtidos após a triagem por PCR convencional foi analisada através de eletroforese em gel de poliacrilamida (8%) em uma corrida a 100V por aproximadamente 50 minutos, dependendo do tamanho do fragmento. O padrão de tamanho molecular de DNA utilizado foi de 100pb (Bioron – Life Sciences, Alemanha). Para o processo de coloração o gel foi submetido ao corante de ácido nucleico SYBR™ Gold (Invitrogen – Thermo Fisher Scientific, EUA) e água destilada (1:10.000) sob agitação (Compact ROCKER – CR300, FINEPCR/Coréia do Sul) constante (50 rpm) por 30 minutos. A visualização do gel foi realizada em aparelho transiluminador de luz-azul (Safe Imager™ 2.0 - Invitrogen – Thermo Fisher Scientific, EUA).

5.4.4. Purificação dos Produtos de PCR

Após as análises dos resultados das reações PCR convencional, os *amplicons* com os tamanhos esperados foram purificados através de metodologia “*in house*” padronizada no LV-UFMG. A técnica consiste no corte da banda de tamanho esperado no gel de poliacrilamida utilizando lâmina de bisturi estéril (nº 22) e sua inserção em um microtubo de 0,6 mL com um orifício na base feito manualmente com o auxílio de uma agulha (40x12 mm). O microtubo foi inserido em outro microtubo de 1,5 mL e conjuntamente, ambos foram centrifugados a 20.000 g (rotor de ângulo fixo, FA-45-24-11 – Centrifuge 5415R, eppendorf, Alemanha), por 1 minuto para a maceração do gel. Posteriormente foi adicionado entre 50 e 100 µL de água ultrapura no macerado (dependendo da intensidade da banda) e este foi incubado a 4°C por 24 horas. Após incubação, o microtubo foi centrifugado a 20.000 g por 1 minuto e o sobrenadante coletado.

5.4.5. Sequenciamento e análises filogenéticas

Após a purificação, os produtos de PCR foram sequenciados por eletroforese capilar através do método Dideoxi descrito por Sanger (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977) em sequenciador automático ABI3130 (Life Technologies, EUA). Além do sequenciamento por eletroforese capilar, alguns vírus tiveram seu genoma sequenciado através da metodologia de sequenciamento por síntese no equipamento Illumina Gene Analyzer (Illumina). Esta metodologia tem como princípio a fragmentação aleatória do DNA em pequenos fragmentos que se ligam a adaptadores específicos. Durante o processo de amplificação, com a incorporação de nucleotídeos terminadores e excitação a laser, são gerados sinais que são captados e lidos pelo equipamento de forma sequencial, permitindo a montagem da sequência completa de cada cluster (KUNIN *et al.*, 2008). Os dados obtidos no sequenciamento dideoxi foram analisados posteriormente utilizando plataformas de bioinformática, como SeqTrace (STUCKY, 2012), para a montagem dos *contigs* finais, sendo consideradas as bases que apresentaram valor de qualidade igual ou superior a 30.

Com os resultados obtidos, foram realizadas análises de filogenia com o objetivo de se estabelecer relações filogenéticas entre os vírus estudados e aqueles presentes em bancos de sequências nucleotídicas (GenBank – *Genetic Sequence DataBase*) de amostras de vírus circulantes já identificadas. As sequências do GenBank foram obtidas através de plataformas BLASTN e BLASTX (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) e os alinhamentos foram realizados no software MEGAX (<https://www.megasoftware.net/>) através do programa ClustalW (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016).

Foram construídas árvores filogenéticas através da seleção de modelos evolutivos para cada conjunto de dados que foi dado através do melhor modelo de substituição de nucleotídeos no programa jModeltest. As árvores foram construídas no programa MEGAX através do método de máxima verossimilhança com busca heurística. Como teste de confiança em topologia foi realizado o método *bootstrap*, com 1000 repetições, que se baseia em uma reamostragem com reposição pseudoaleatória de dados. A partir das árvores geradas, foi criada uma única árvore de máxima credibilidade utilizando TreeAnnotator v.1.8.2, que foi visualizada no programa FigTree v.1.4.4 (DRUMMOND *et al.*, 2002; DRUMMOND, 2003).

5.5. Ensaio piloto para avaliação qualitativa da atividade neutralizante viral usando amostras de tecidos sólidos

Neste trabalho, inicialmente foram utilizadas análises moleculares para a vigilância ativa da infecção através da detecção do genoma viral nas amostras de fígado e pulmão dos PNH coletados. Porém, a análise da carga viral em amostras de carcaças é limitada devido ao período virêmico das infecções nos PNH e devido a preservação do RNA viral nas amostras coletadas. Neste caso, análises sorológicas podem auxiliar na identificação de infecções prévias e auxiliar em análises mais amplas sobre a dimensão dessas infecções nas amostras de PNH coletadas. Contudo, as carcaças de PNH enviadas ao LZOON-BH se encontravam em diferentes estágios de decomposição, não sendo possível a coleta de sangue para análises sorológicas. Uma vez que as amostras deste estudo não incluía sangue, foi proposto neste trabalho a utilização de órgãos (fígado e pulmão) para a obtenção de um homogenato para ser utilizado durante um teste piloto para análise de possível atividade neutralizante viral na amostra.

5.5.1. Células Vero

Vero CCL81 (ATCC/EUA) é uma linhagem celular contínua que tem sua origem na transformação de células epiteliais de rim de macaco verde africano *Cercopithecus aethiops* e que foram empregadas neste trabalho no ensaio piloto para avaliação da atividade neutralizante viral. Estas células foram cultivadas em Meio essencial mínimo Eagle (MEM - Cultilab, Brasil) contendo 5% de soro fetal bovino (SFB) mais antibióticos [100 U/ml de penicilina (Cellofarm Farmacêutica, Brasil), 0,1 mg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich, Alemanha) e 0,25 mg/mL de anfotericina B (Cultilab, Brasil)] e incubadas a 37°C em atmosfera 5% de CO₂.

5.5.2. Ensaio piloto para avaliação qualitativa da atividade neutralizante de YFV

Com o objetivo de se testar atividade de neutralização do em amostras de órgãos de PNH, foi realizado um experimento piloto, adaptando a metodologia de PRNT utilizando-se macerado de fígado de PNH no lugar de soro. Para isso, 50mg de fígado de PNH foram inseridos em um microtubo de 1,5mL, contendo 200 µL de tampão fosfato salina (PBS - 1x) a 4°C e 4 *beads* (2 mm) de vidro de borosilicato (Sigma-Aldrich, Alemanha) para maceração. O macerado foi centrifugado a 8.000 g (rotor de ângulo fixo, FA-45-24-11 – Centrifuge 5415R,

eppendorf, Alemanha) por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi coletado e clarificado (isto é, centrifugado sob as mesmas condições anteriores até que fosse eliminado todo os debris celulares). O último sobrenadante coletado foi utilizado no lugar de soro normalmente utilizado na metodologia de PRNT convencional. Os sobrenadantes de fígado
5 homogeneizados foram incubados a 56°C em banho seco (Thermomixer comfort – eppendorf, Alemanha) por 30 minutos para que houvesse a inativação do sistema complemento.

A técnica adaptada foi realizada em placa de células de 6 poços contendo uma monocamada com $3,0 \times 10^5$ células VERO por poço incubadas a 37°C a 5% de CO₂ com 2 mL de MEM e 5% SFB. A partir do título viral, foi realizada uma diluição seriada do YFV
10 em meio MEM sem suplementação até a concentração de vírus desejada em unidades formadoras de placas (PFU) por mL. Neste trabalho foi utilizado um título viral necessário para a obtenção de 150 PFU/mL por poço (MAEDA; MAEDA, 2013). Os exsudados de tecidos de PNH foram diluídos na concentração de 1:20 (22,5 µL de exsudado + 427,5 µL de meio = 450µL de volume final, diluição de 1:20) em MEM sem suplementação. Para o
15 controle de vírus foi utilizado uma diluição de 1:20 contendo 5% de SFB e MEM não suplementado. Para o controle de células, foi adicionado apenas MEM.

O processo de ligação do vírus com os possíveis anticorpos neutralizantes presentes no sobrenadante de fígado ocorreu através da incubação da diluição do vírus e do sobrenadante (1:40) por 1 hora a 37°C a 5% de CO₂. A adsorção foi realizada com 300 uL do vírus e do
20 sobrenadante de fígado incubados previamente, e incubados por 1 hora nas mesmas condições acima citado. Após a adsorção, foi adicionado volume suficiente de carboximetilcelulose 1% [CMC + meio 199 2X (Gibco-Life Technologies, EUA)] com 2% de SFB para cobrir as monocamadas de cada poço e a placa foi incubada a 37°C a 5% de CO₂ por cinco dias (para YFV) e observadas em intervalos de 24 horas em microscópio óptico. Após incubação as
25 células foram fixadas com solução de formalina 10% por 1 horas e coradas com solução de cristal violeta 1% em PBS (p/v) por até 30 minutos.

As amostras de sobrenadante de macerado de fígado foram testadas em duplicatas para obtenção da média da contagem do número de unidades formadoras de placas em dois poços. O título de anticorpos neutralizantes foi determinado a partir da diluição em que houve, 90%
30 de redução na infecção (soroneutralização de 90%, SN₉₀) quando comparado com o controle de vírus, e o resultado foi expresso pelo valor da diluição da SN₉₀ (DOMINGO *et al.*, 2018; MAEDA; MAEDA, 2013; PAUVOLID-CORRÊA *et al.*, 2015)

5.6. Análises Estatísticas

Todos os dados de amostras positivas foram testados para normalidade e homoscedasticidade das variâncias. As análises foram realizadas usando o software 10 Prism v7.0 (GraphPad Software Inc, EUA). Foi utilizado teste de qui-quadrado entre dois grupos ou *one-way* ANOVA para comparação entre três grupos, seguido de teste de Dunn no caso de dados não paramétricos. Foi utilizado o software R para as análises independentes de qui-quadrado para avaliação da associação entre duas categorias variáveis e produção dos gráficos de balão. Os resultados foram considerados significativos quando valor $p < 0,05$.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Distribuição dos primatas não humanos amostrados e locais de coleta em Minas Gerais, 2018 - 2020

5

De janeiro/2018 a novembro/2020 foram enviados ao LV-UFMG pelo LZOON-BH, cinco carcaças e amostras de fígado e pulmão de 609 carcaças de PNH coletadas em áreas urbanas, interfaces urbanas-rurais e rurais/silvestres de diferentes municípios de MG. Foram coletados fígados de todas as carcaças de PNH e de 21 carcaças também foram coletadas amostras de pulmão. Deste total, somente as amostras com identificação de cidade e área de coleta (n= 550, 382/2018; 127/2019; 41/2020) foram testadas. As amostras sem localidade definida foram excluídas deste estudo. Por questões de segurança biológica, todas as amostras de PNH foram submetidas a testes prévios no LZOON-BH para avaliar a infecção pelo vírus da raiva e todas testaram negativas para a presença deste vírus. As cinco carcaças recebidas no LV-UFMG foram identificadas e classificadas taxonomicamente em nível de espécie com o auxílio da equipe do Professor Fernando Perini, do Laboratório de Mastozoologia, ICB/UFMG. As carcaças que não foram enviadas ao LV-UFMG, foram identificadas em nível de gênero pela equipe do LZOON-BH.

As carcaças de PNH mortos suspeitos de FA coletadas pelo LZOON-BH eram provenientes de 200 municípios, cobrindo o total de 12 mesorregiões de MG. A maioria das amostras coletadas era proveniente de PNH coletados na região Metropolitana (n= 249/550; 45,2%, 95% IC= 41 – 49,5%), seguidos das regiões da Zona da Mata (n= 72/550; 13%, 95% IC= 10,3 – 16,2%) e do Triângulo/Alto Paranaíba (n= 78/550; 14,1%, 95% IC= 11,3 – 17,3%) (Tabela 2). De acordo com boletins oficiais da Secretaria de Estado de Saúde de MG (SES-MG), os casos de epizootias em PNH confirmados para FA em 2018 ocorreram de janeiro até junho (com um caso confirmado em outubro), a maioria deles ocorrendo na região Metropolitana, Zona da Mata, Campo das Vertentes e região Sul/ Sudeste (SES-MG, 2018b, a; SES/MG, 2018).

30

Tabela 2. Mesorregiões de Minas Gerais com coletas de carcaças de PNH suspeitos de infecção por YFV

Mesorregião	2018	2019	2020	Total	Total (%)
Campo da Vertentes	8	1	1	10	2,0
Central	14	4	2	20	3,6
Jequitinhonha	6	1	2	9	1,6
Metropolitana	163	63	23	249	45,1
Noroeste	12	-	1	13	2,3
Norte	5	7	-	12	2,1
Oeste	12	4	3	19	3,4
Sul/Sudoeste	36	9	1	46	8,3
Triângulo/Alto Paranaíba	59	15	4	78	14,1
Vale do Rio Doce	16	1	2	19	3,4
Vale do Mucuri	-	1	2	3	0,5
Zona da Mata	51	21	-	72	13
Total	382	127	41	550	100

De acordo com os critérios de inspeção quanto ao estágio de decomposição e/ou conservação, as carcaças coletadas foram classificadas quanto ao estado de conservação em: “bom” (n= 368/550, 66,9%), “razoável” (n= 142/550, 25,7%), “ruim” (n= 32/550, 5,8%), e 8 amostras não foram classificadas em nenhum dos critérios citados. O estado de conservação de um tecido pode interferir diretamente na detecção de material genômico (RNA) do YFV em uma amostra (VASCONCELOS, 2003).

Do total de amostras testadas de 2018 a 2020, 65,2% (n= 359/550, 95% IC= 61,1 – 69,2%) foram coletadas durante o período considerado epidêmico para FA (dezembro a maio) e 34,7% (n= 191/550, 95% IC= 30,7 – 38,8%) foram coletadas durante período não epidêmico (junho a novembro). A maioria das amostras foi coletada em área urbana (n= 349/550; 63,4%), seguido por amostras coletadas em área rural/silvestre (n= 180/550; 32,7%) e amostras coletadas na interface do ambiente urbano e rural/silvestre (n= 22/550; 4%).

Das 550 amostras de fígado e pulmão de carcaças de PNH coletadas, foram identificadas amostras pertencentes a PNH das famílias Atelidae, representada por espécies do gênero *Alouatta* sp. (n= 13/550; 2,3%, 95% IC= 1,2 -4%), Callitrichidae, representada por espécies do gênero *Callithrix* sp. (n= 484/550; 88%, 95% IC= 84,9 - 90,6%), Cebidae (n= 44/550; 8%, 95% IC= 5,8 - 10,5%) com dois representantes identificados à nível de gênero (*Sapajus* sp.). Oito amostras não possuíam identificação da carcaça em nenhum nível taxonômico. No Brasil, existem 118 espécies (19 gêneros, 5 famílias) de PNH identificados, sendo um dos países com a maior diversidade de primatas não humanos descritas até o momento. Essa diversidade está concentrada principalmente nos biomas Amazônico e de

Mata Atlântica, seguidos pela Caatinga, Cerrado, Pantanal e Pampas (PAGLIA *et al.*, 2012). As carcaças deste estudo pertenciam a espécies de gêneros/família de PNH (*Alouatta* spp., *Callithrix* spp., *Sapajus* spp.) nativos de Mata Atlântica e Cerrado, os dois biomas encontrados em MG. Não foi possível a identificação de algumas carcaças, com o material
5 recebido. Em 2019, uma amostra de chimpanzé (*Pan troglodytes*) que veio a óbito na Fundação de Parques Municipais e Zoobotânica de Belo Horizonte foi encaminhada ao LV-UFGM pelo LZOON.

Primeiramente as amostras foram triadas para a presença de RNA de YFV, e uma vez que estas amostras eram negativas, estas foram posteriormente triadas para outros arbovírus
10 que tinham sua circulação descrita ocorrendo no estado ou para arbovírus de importância zoonótica no Brasil (ZIKV, CHIKV, MAYV e OROV). Também foram testadas amostras para coinfeção para os arbovírus analisados neste estudo.

6.2. Investigação do vírus da febre amarela em carcaças de primatas não 15 humanos em Minas Gerais, 2018-2020

As amostras de fígados (n=550) e pulmão (n=21) de 550 carcaças de PNH foram testadas para a presença de RNA de YFV. Todas as amostras de RNA obtidas foram testadas e positivas para controle endógeno (β -actina) indicando integridade do RNA total,
20 demonstrando a viabilidade destas amostras para uso em RT-qPCR.

Do total testado, 143 amostras de fígados e uma amostra de pulmão (144/550, 26,1%, 95% IC= 22,5 - 30%) foram positivas para infecção por YFV (Tabela 3), independente do estado de conservação das carcaças. Do total de amostras positivas (n=144), 143 foram de PNH coletados durante o ano de 2018, e uma amostra positiva (pulmão) pertencia a um PNH
25 coletado no ano de 2020. Durante o ano de 2019 não foi detectada amostra positiva para RNA de YFV.

Tabela 3: Primatas não humanos positivos para presença de RNA de YFV em amostras de fígado e pulmão, provenientes de Minas Gerais em 2018 e 2020

ID PNH	Data da Coleta	Família ou Gênero	Cq	Área	Município	Mesorregião
454	jan/2018	<i>Callithrix</i> sp.	30,3	urbana	Mateus Leme	Metropolitana
460	jan/2018	<i>Callithrix</i> sp.	10,4	urbana	Nova Lima	Metropolitana
462	jan/2018	<i>Callithrix</i> sp.	31,5	urbana	Esmeraldas	Metropolitana
466	jan/2018	<i>Callithrix</i> sp.	32,6	urbana	Ubá	Zona da Mata
468	jan/2018	<i>Callithrix</i> sp.	34,1	urbana	Carmo do Rio Claro	Sul/Sudoeste
474	jan/2018	<i>Callithrix</i> sp.	26,7	urbana	Belo Horizonte	Metropolitana
477	jan/2018	<i>Callithrix</i> sp.	27,8	urbana	Betim	Metropolitana
478	jan/2018	<i>Callithrix</i> sp.	19,8	urbana	Santa Luzia	Metropolitana
496	jan/2018	<i>Callithrix</i> sp.	36	urbana	Belo Horizonte	Metropolitana
497	jan/2018	<i>Callithrix</i> sp.	34	urbana	Paracatu	Noroeste
498	jan/2018	<i>Callithrix</i> sp.	34,2	urbana	Santa Bárbara	Metropolitana
501	jan/2018	<i>Callithrix</i> sp.	35,5	urbana	Belo Horizonte	Metropolitana
502	ja/2018	<i>Callithrix</i> sp.	32,2	urbana	Paracatu	Noroeste
503	jan/2018	<i>Callithrix</i> sp.	28,4	urbana	Barão de Cocais	Metropolitana
505	jan/2018	<i>Callithrix</i> sp.	36,5	urbana	Goianá	Zona da Mata
526	jan/2018	<i>Callithrix</i> sp.	13	urbana	Lagoa Santa	Metropolitana
531	jan/2018	<i>Callithrix</i> sp.	31,8	urbana	Matozinhos	Metropolitana
534	jan/2018	<i>Callithrix</i> sp.	9,7	urbana	Barão de Cocais	Metropolitana
542	jan/2018	<i>Callithrix</i> sp.	30,4	urbana	Leopoldina	Zona da Mata
545	jan/2018	<i>Callithrix</i> sp.	32	urbana	Astolfo Dutra	Zona da Mata
546	jan/2018	<i>Callithrix</i> sp.	33,5	urbana	Cataguases	Zona da Mata
550	jan/2018	<i>Callithrix</i> sp.	24,3	urbana	Itabirito	Metropolitana
558	jan/2018	<i>Callithrix</i> sp.	36,4	urbana	Curvelo	Central
562	jan/2018	<i>Callithrix</i> sp.	36,5	urbana	Belo Horizonte	Metropolitana
563	jan/2018	<i>Callithrix</i> sp.	30	urbana	Lima Duarte	Zona da Mata
566	jan/2018	<i>Callithrix</i> sp.	13	urbana	Nova Lima	Metropolitana
572	jan/2018	<i>Callithrix</i> sp.	32,5	urbana	Belo Vale	Metropolitana
576	jan/2018	<i>Callithrix</i> sp.	32	urbana	Santa Luzia	Metropolitana
581	jan/2018	<i>Callithrix</i> sp.	15	urbana	Sarzedo	Metropolitana
584	jan/2018	<i>Callithrix</i> sp.	10,4	urbana	João Monlevade	Metropolitana
588	jan/2018	<i>Callithrix</i> sp.	35,4	urbana	Sabará	Metropolitana
591	jan/2018	<i>Callithrix</i> sp.	24,7	urbana	Belo Horizonte	Metropolitana
603	jan/2018	<i>Callithrix</i> sp.	32	urbana	Guaxupé	Sul/Sudoeste
606	jan/2018	<i>Callithrix</i> sp.	28,2	urbana	Santa Luzia	Metropolitana
607	jan/2018	<i>Callithrix</i> sp.	27,3	urbana	Vespasiano	Metropolitana
621	fev/2018	<i>Callithrix</i> sp.	36,2	urbana	Contagem	Metropolitana
622	fev/2018	<i>Callithrix</i> sp.	36	urbana	Nova Era	Metropolitana

ID PNH	Data da Coleta	Família ou Gênero	Cq	Área	Município	Mesorregião
624	fev/2018	<i>Callithrix</i> sp.	36,7	urbana	Muzambinho	Sul/Sudoeste
625	fev/2018	<i>Callithrix</i> sp.	33,8	urbana	Belo Horizonte	Metropolitana
635	fev/2018	<i>Callithrix</i> sp.	33	urbana	Lagoa Santa	Metropolitana
637	fev/2018	<i>Callithrix</i> sp.	8,9	urbana	Itabirito	Metropolitana
639	fev/2018	<i>Callithrix</i> sp.	24,5	urbana	Ipatinga	Vale do Rio Doce
640	fev/2018	<i>Callithrix</i> sp.	31	urbana	Divinópolis	Oeste
642	fev/2018	<i>Callithrix</i> sp.	36	urbana	Santa Luzia	Metropolitana
643	fev/2018	<i>Callithrix</i> sp.	33	urbana	Sete Lagoas	Metropolitana
645	fev/2018	<i>Callithrix</i> sp.	34	urbana	Divinópolis	Oeste
647	fev/2018	<i>Callithrix</i> sp.	33	urbana	Senador Firmino	Zona da Mata
649	fev/2018	<i>Callithrix</i> sp.	34,6	urbana	Visconde do Rio Branco	Zona da Mata
651	fev/2018	<i>Callithrix</i> sp.	30,2	urbana	Belo Horizonte	Metropolitana
652	fev/2018	<i>Callithrix</i> sp.	30,4	urbana	Sete Lagoas	Metropolitana
653	fev/2018	<i>Callithrix</i> sp.	30,2	urbana	Contagem	Metropolitana
656	fev/2018	<i>Callithrix</i> sp.	15,1	urbana	Nova Lima	Metropolitana
657	fev/2018	<i>Callithrix</i> sp.	14	urbana	Itabirito	Metropolitana
661	fev/2018	<i>Callithrix</i> sp.	26,6	urbana	Rio Piracicaba	Metropolitana
666	fev/2018	<i>Callithrix</i> sp.	37	urbana	Buenópolis	Central
678	fev/2018	<i>Callithrix</i> sp.	36	urbana	Uberlândia	Triângulo/Alto Paranaíba
704	mar/2018	<i>Callithrix</i> sp.	36	urbana	Belo Horizonte	Metropolitana
706	mar/2018	<i>Callithrix</i> sp.	34,5	urbana	Belo Horizonte	Metropolitana
710	mar/2018	<i>Callithrix</i> sp.	36,8	urbana	Belo Horizonte	Metropolitana
711	mar/2018	<i>Callithrix</i> sp.	35	urbana	Estrela do Sul	Triângulo/Alto Paranaíba
615	jan/2018	<i>Callithrix</i> sp.	23,6	urbana	Belo Horizonte	Metropolitana
490	jan/2018	<i>Callithrix</i> sp.	31,6	urbana	Belo Horizonte	Metropolitana
491	jan/2018	<i>Callithrix</i> sp.	28,6	urbana	Vespasiano	Metropolitana
452	jan/2018	<i>Callithrix</i> sp.	10,5	rural/silvestre	Rio Manso	Metropolitana
456	jan/2018	<i>Callithrix</i> sp.	14	rural/silvestre	Itaguara	Metropolitana
465	jan/2018	<i>Callithrix</i> sp.	11	rural/silvestre	Piranga	Zona da Mata
467	jan/2018	<i>Callithrix</i> sp.	10	rural/silvestre	Brumadinho	Metropolitana
472	jan/2018	<i>Callithrix</i> sp.	9,3	rural/silvestre	Brumadinho	Metropolitana
476	jan/2018	<i>Callithrix</i> sp.	9,5	rural/silvestre	Santa Bárbara	Metropolitana
481	jan/2018	<i>Callithrix</i> sp.	14	rural/silvestre	Brumadinho	Metropolitana
500	jan/2018	<i>Callithrix</i> sp.	33	rural/silvestre	Esmeraldas	Metropolitana
504	jan/2018	<i>Callithrix</i> sp.	14,4	rural/silvestre	Nova União	Metropolitana
508	jan/2018	<i>Callithrix</i> sp.	10,3	rural/silvestre	Porto Firme	Zona da Mata
509	jan/2018	<i>Callithrix</i> sp.	9	rural/silvestre	Brumadinho	Metropolitana
510	jan/2018	<i>Callithrix</i> sp.	10,6	rural/silvestre	Brumadinho	Metropolitana
516	jan/2018	<i>Callithrix</i> sp.	11,5	rural/silvestre	Bonfim	Metropolitana
517	jan/2018	<i>Callithrix</i> sp.	18,7	rural/silvestre	Guaraciaba	Zona da Mata

ID PNH	Data da Coleta	Família ou Gênero	Cq	Área	Município	Mesorregião
519	jan/2018	<i>Callithrix</i> sp.	30	rural/silvestre	Santana de Cataguases	Zona da Mata
521	jan/2018	<i>Callithrix</i> sp.	14,7	rural/silvestre	Moeda	Metropolitana
525	jan/2018	<i>Callithrix</i> sp.	14,2	rural/silvestre	Bonfim	Metropolitana
528	jan/2018	<i>Callithrix</i> sp.	8,9	rural/silvestre	Porto Firme	Zona da Mata
535	jan/2018	<i>Callithrix</i> sp.	11,8	rural/silvestre	Brumadinho	Metropolitana
537	jan/2018	<i>Callithrix</i> sp.	35,5	rural/silvestre	Campos Gerais	Sul/Sudoeste
538	jan/2018	<i>Callithrix</i> sp.	33,9	rural/silvestre	Chiador	Zona da Mata
541	jan/2018	<i>Callithrix</i> sp.	11,2	rural/silvestre	Santa Barbara	Metropolitana
548	jan/2018	<i>Callithrix</i> sp.	13,6	rural/silvestre	Itaguará	Metropolitana
549	jan/2018	<i>Callithrix</i> sp.	11,8	rural/silvestre	Coronel Pacheco	Zona da Mata
554	jan/2018	<i>Callithrix</i> sp.	9,2	rural/silvestre	Rio Piracicaba	Metropolitana
555	jan/2018	<i>Callithrix</i> sp.	20,3	rural/silvestre	Jeceaba	Metropolitana
564	jan/2018	<i>Callithrix</i> sp.	11,3	rural/silvestre	Olaria	Zona da Mata
571	jan/2018	<i>Callithrix</i> sp.	10,3	rural/silvestre	Itabirito	Metropolitana
593	jan/2018	<i>Callithrix</i> sp.	10,5	rural/silvestre	Nova União	Metropolitana
599	jan/2018	<i>Callithrix</i> sp.	29	rural/silvestre	São Domingos do Prata	Metropolitana
600	jan/2018	<i>Callithrix</i> sp.	10,3	rural/silvestre	Bom Jesus do Amparo	Metropolitana
601	jan/2018	<i>Callithrix</i> sp.	10,8	rural/silvestre	Rio Piracicaba	Metropolitana
604	jan/2018	<i>Callithrix</i> sp.	9	rural/silvestre	Senhora dos Remédios	Campo das Vertentes
629	fev/2018	<i>Callithrix</i> sp.	31,5	rural/silvestre	Porto Firme	Zona da Mata
634	fev/2018	<i>Callithrix</i> sp.	33,2	rural/silvestre	Sete Lagoas	Metropolitana
636	fev/2018	<i>Callithrix</i> sp.	11	rural/silvestre	Ouro Preto	Metropolitana
638	fev/2018	<i>Callithrix</i> sp.	8,4	rural/silvestre	Alto Rio Doce	Zona da Mata
641	fev/2018	<i>Callithrix</i> sp.	32,7	rural/silvestre	Toco de Moji	Sul/Sudoeste
660	fev/2018	<i>Callithrix</i> sp.	11,2	rural/silvestre	Alfredo Vasconcelos	Campo das Vertentes
662	fev/2018	<i>Callithrix</i> sp.	28,7	rural/silvestre	Desterro de Entre Rios	Metropolitana
694	fev/2018	<i>Callithrix</i> sp.	11	rural/silvestre	Ouro Preto	Metropolitana
696	fev/2018	<i>Callithrix</i> sp.	28	rural/silvestre	Uberaba	Triângulo/Alto Paranaíba
700	fev/2018	<i>Callithrix</i> sp.	34,4	rural/silvestre	Iturama	Triângulo/Alto Paranaíba
708	mar/2018	<i>Callithrix</i> sp.	11	rural/silvestre	Andrelândia	Triângulo/Alto Paranaíba
715	mar/2018	<i>Callithrix</i> sp.	36,6	rural/silvestre	Patrocínio	Triângulo/Alto Paranaíba
492	jan/2018	<i>Callithrix</i> sp.	11,2	rural/silvestre	Sabará	Metropolitana

ID PNH	Data da Coleta	Família ou Gênero	Cq	Área	Município	Mesorregião
480	jan/2018	<i>Callithrix</i> sp.	31	interf. rur/urb	Caeté	Metropolitana
544	jan/2018	<i>Callithrix</i> sp.	14	interf. rur/urb	Nova Lima	Metropolitana
561	jan/2018	<i>Callithrix</i> sp.	32,2	interf. rur/urb	Sete Lagoas	Metropolitana
747	abr/2018	<i>Callithrix</i> sp.	12	interf. rur/urb	Tiradentes	Campo das Vertentes
1041	jun/2020	<i>Callithrix</i> sp.	38,8	rural/silvestre	Curvelo	Central
463	jan/2018	<i>Alouatta</i> sp.	11	urbana	Juíz de Fora	Zona da Mata
453	jan/2018	<i>Alouatta</i> sp.	10,5	rural/silvestre	Santa Bárbara	Metropolitana
458	jan/2018	<i>Alouatta</i> sp.	10,6	rural/silvestre	Lima Duarte	Zona da Mata
471	jan/2018	<i>Alouatta</i> sp.	33	rural/silvestre	Dom Bosco	Noroeste
518	jan/2018	<i>Alouatta</i> sp.	33	rural/silvestre	União de Minas	Triângulo/Alto Paranaíba
522	jan/2018	<i>Alouatta</i> sp.	14,1	rural/silvestre	Alvinópolis	Metropolitana
586	jan/2018	<i>Alouatta</i> sp.	11	rural/silvestre	Camanducaia	Sul/Sudoeste
631	fev/2018	Cebidae	7,6	urbana	Santana do Paraíso	Vale do Rio Doce
450	jan/2018	Cebidae	8,8	rural/silvestre	Nova Lima	Metropolitana
455	jan/2018	Cebidae	7,7	rural/silvestre	Itabirito	Metropolitana
461	jan/2018	Cebidae	33,2	rural/silvestre	Rio Novo	Zona da Mata
464	jan/2018	Cebidae	9,5	rural/silvestre	Belo Vale	Metropolitana
475	jan/2018	Cebidae	11,1	rural/silvestre	Itatiaiuçu	Metropolitana
495	jan/2018	Cebidae	10,2	rural/silvestre	Piranga	Zona da Mata
515	jan/2018	Cebidae	10,8	rural/silvestre	Itabirito	Metropolitana
532	jan/2018	Cebidae	31,4	rural/silvestre	Rio Piracicaba	Metropolitana
536	jan/2018	Cebidae	9,5	rural/silvestre	Presidente Bernardes	Zona da Mata
540	jan/2018	Cebidae	10	rural/silvestre	Itatiaiuçu	Metropolitana
543	jan/2018	Cebidae	12,6	rural/silvestre	Itabirito	Metropolitana
553	jan/2018	Cebidae	9,9	rural/silvestre	Presidente Bernardes	Zona da Mata
560	jan/2018	Cebidae	11	rural/silvestre	Resende Costa	Campo das Vertentes
578	jan/2018	Cebidae	9	rural/silvestre	Ouro Preto	Metropolitana
582	jan/2018	Cebidae	8	rural/silvestre	Ouro Preto	Metropolitana
587	jan/2018	Cebidae	9,5	rural/silvestre	Congonhal	Sul/Sudoeste
592	jan/2018	Cebidae	11	rural/silvestre	Senhora de Oliveira	Zona da Mata
605	jan/2018	Cebidae	8	rural/silvestre	Paula Cândido	Zona da Mata
633	fev/2018	Cebidae	10,4	rural/silvestre	Carmo do Cajuru	Oeste
650	fev/2018	Cebidae	9,2	rural/silvestre	Nova Lima	Metropolitana
654	fev/2018	Cebidae	8,2	rural/silvestre	Ouro Branco	Metropolitana

ID PNH	Data da Coleta	Família ou Gênero	Cq	Área	Município	Mesorregião
655	fev/2018	Cebidae	9	rural/silvestre	Sapucaí Mirim	Sul/Sudoeste

ID: Identificação; Cq: *quantification cycle*; interf. rur/urb: interface rural-urbana. Em cinza: Municípios com detecção de febre amarela em PNH neste trabalho, sem relato de casos pela Secretaria do Estado de Saúde de Minas Gerais, em 2018.

5 Tendo em vista que as amostras positivas foram detectadas em sua maioria durante o ano de 2018, com apenas uma amostra detectada em 2020, foi considerada a relação entre a taxa de positividade e o total de amostras em cada grupo de classificação coletadas apenas no ano de 2018: “bom” (90/252, 35,7%; 95% IC = 29,8 – 41,9%), “razoável” (43/104, 41,3%; 95% IC = 31,7 – 51,4%) e “ruim” (10/26, 38,4%; 95% IC = 20,2 – 59,4%). Não foi observada
10 nenhuma correlação entre os estados de conservação/decomposição das carcaças e a detecção de RNA de YFV [χ^2 (n=382) = 0.45, p=.79], mostrando que independente do estado de conservação, foi possível a detecção do genoma viral na amostra de PNH.

Dos 200 municípios com amostras coletadas, o RNA de YFV foi detectado em PNH de 85 municípios de 9 mesorregiões de MG (Tabela 3). A maioria dos PNH positivos para
15 presença de RNA de YFV era proveniente das regiões Metropolitana (n= 88/144 – 61,1%; 95% IC = 52,6 – 69,1%) e da Zona da Mata (n= 26/144 – 18,0%; 95% IC = 12,1 – 25,3%). Esse mesmo perfil de positividade para YFV em PNH foi observado por Sacchetto (SACCHETTO, 2020) em 2017 no estado de MG. Ainda, os casos reportados pela Secretaria Estadual de Saúde - MG, tanto para epizootias confirmadas, como também para os casos
20 confirmados em humanos, se concentraram principalmente na região Metropolitana do estado (SES-MG, 2017, 2018b,a). Além disso, os resultados deste estudo mostram a circulação do YFV em 22 municípios de MG onde não houve confirmação de casos humanos ou de epizootias no ano de 2018 pela SES-MG (Tabela 3) (SES-MG, 2018a, 2019a). Estes resultados mostram uma circulação mais ampla do YFV, em MG em 2018, além do
25 previamente estimado pelo sistema de vigilância estadual. Além disso, foi observada uma alta taxa de positividade durante o período de epidemia em MG, gerando um alerta para que haja ampliação nos sistemas de vigilância em todo o estado.

Em relação à área de coleta, foi encontrada uma maior taxa de positividade para YFV em carcaças coletadas em área rural/silvestre (n= 74/144; 51,3%), seguido pelas áreas urbana
30 (n= 65/144; 45,1%) e ambiente de interface rural/urbana (n= 4/144; 2,7%) (χ^2 = 14,23, p< 0.0001). Foi observada a existência de uma forte associação entre a taxa de positividade de YFV em PNH e o ambiente rural (χ^2 = 19.27, p< 0.0001) (Figura 12) e um aumento da chance

de detecção de RNA do YFV (*odds ratio*: OR) das áreas urbanas (OR= 1.51, $p < 0.001$) em direção à área rural (OR= 3.60, $p < 0.0001$). Esse gradiente de maior detecção do YFV de áreas rurais comparado a áreas urbanas condiz com o padrão silvestre de circulação da FA nos surtos em MG, de 2016 a 2018, assim como observado em outros estados da região sudeste do país durante os surtos recentes de FA (ABREU *et al.*, 2019; FARIA, *et al.*, 2018; FIGUEIREDO *et al.*, 2018; GIOVANETTI *et al.*, 2019; SACCHETTO *et al.*, 2020).

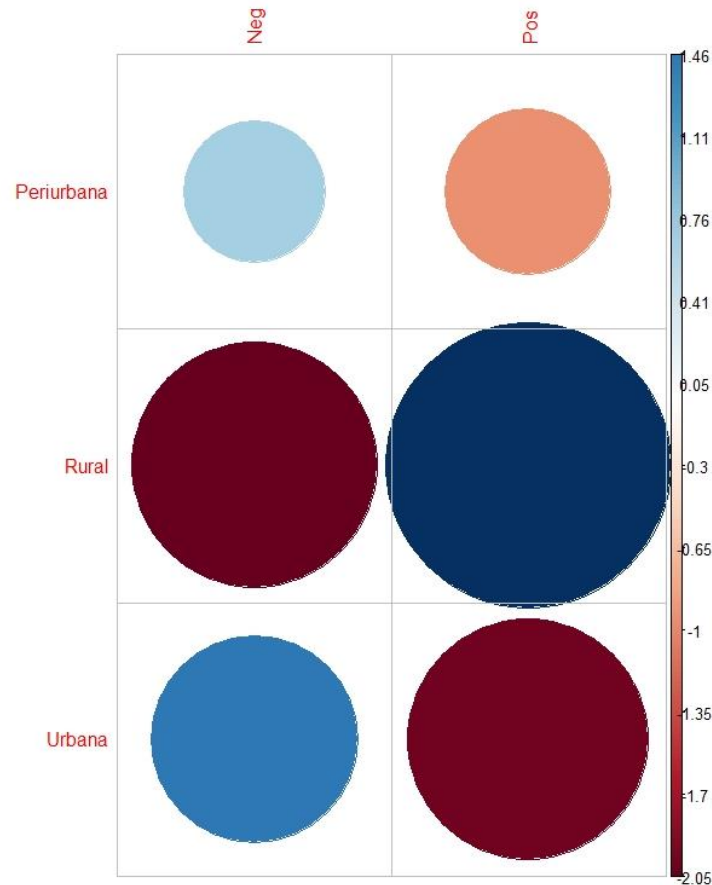


Figura 12: Associação entre a taxa de positividade de YFV em PNH e o ambiente de coleta, 2018. Foi observada uma forte associação entre taxas de positividade para YFV e o ambiente rural (balão azul escuro), assim como, uma associação negativa para a positividade para YFV em ambiente urbano (balão azul). No gráfico de balões a cor azul está associada à associação positiva e a cor vermelha está associada à associação negativa, assim como a intensidade das cores (à direita). O tamanho dos balões indica maior ou menor associação.

Muitas carcaças de área urbana, que foram positivas para RNA de YFV, foram encontradas em áreas limítrofes às cidades, contudo, algumas foram encontradas dentro do ambiente urbano, como por exemplo, carcaças coletadas em Belo Horizonte, Contagem e Betim (Figura 13A e 13B), demonstrando a presença de hospedeiros infectados com YFV dentro das matrizes urbanas.

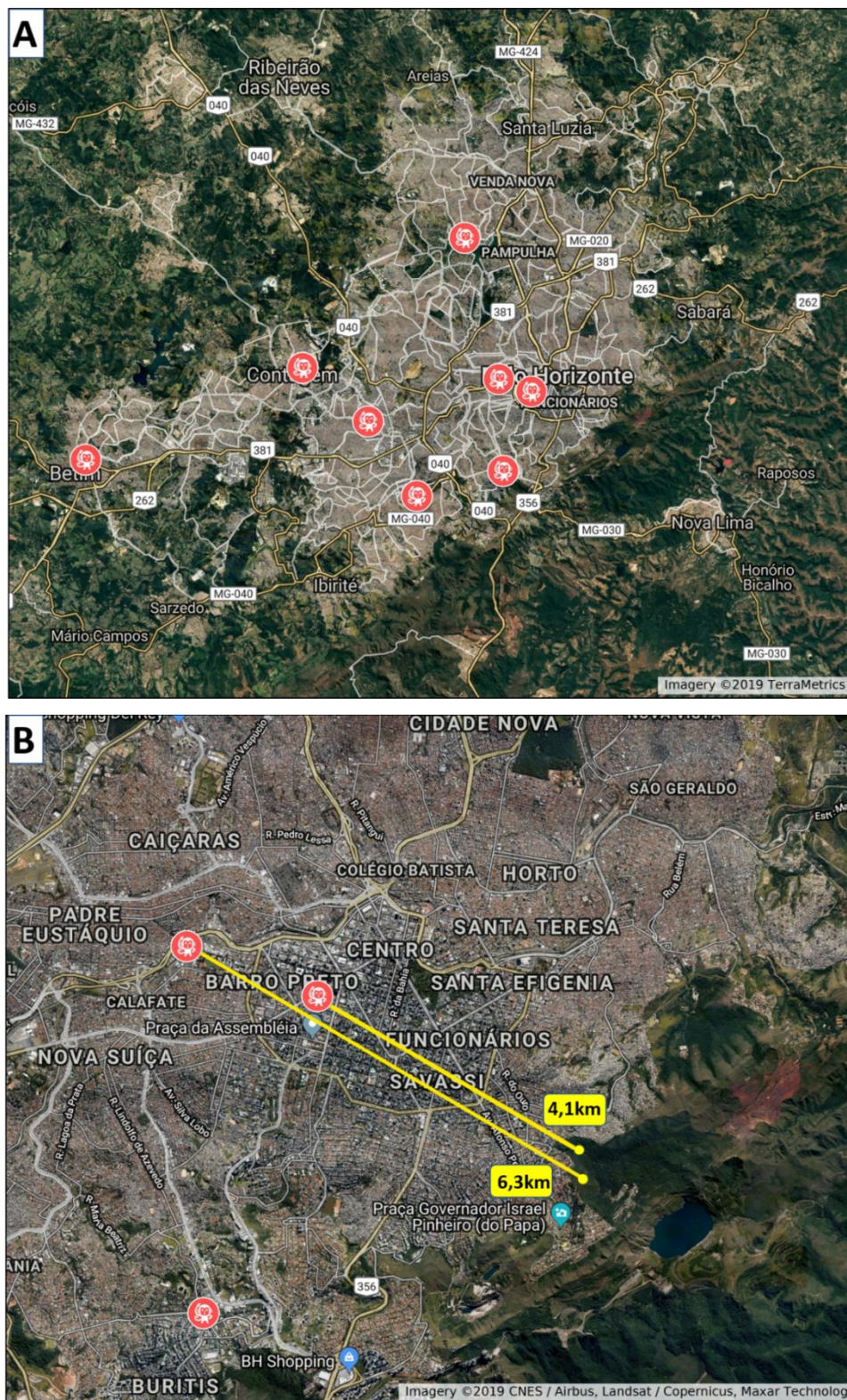


Figura 13: Regiões de coleta de PNH positivos para RNA de YFV em áreas urbanas de Minas Gerais, 2018. A: Mapa com as áreas de coleta (rosa) de PNH positivos para RNA de YFV dentro de matrizes urbanas nas cidades de Belo Horizonte, Betim e Contagem, MG. **B:** Mapa com as distâncias (amarelo) dos pontos de coleta de PNH positivos para RNA de YFV da matriz urbana de Belo Horizonte para a área de mata mais próxima da cidade. Fonte: Adaptado de Google Maps.

A maioria das amostras positivas para YFV neste estudo foram coletadas de janeiro a abril de 2018. Nenhuma amostra coletada em período não epidêmico de 2018 (jun-nov) foi positiva para RNA de YFV. Esses resultados demonstram o caráter sazonal da FA em 2018, onde se espera uma maior taxa de infecção durante os períodos mais quentes, de maior
 5 umidade e maior proliferação dos vetores (DE THOISY *et al.*, 2020; MS-BR, 2018; SVS-MS (MINISTÉRIO DA SAÚDE/SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE)., 2017b; VASCONCELOS, 2003). Além disso, diferentes fatores bióticos, abióticos e antropogênicos contribuíram para a ocorrência da epidemia de FA no estado de Minas Gerais, como a precipitação durante o mês mais seco, a riqueza de mamíferos na região, além do impacto
 10 humano, a densidade populacional e a expansão urbana na região (DE THOISY, B. *et al.*, 2020). No início da epidemia no estado, em 2017, os casos de epizootias em PNH e casos em humanos estavam ocorrendo na região norte de MG, e a riqueza de mamíferos na região, e fatores climáticos estavam associados à ocorrência da epidemia. Em 2018, os maiores números de casos se concentraram mais na região central/sul do estado, regiões densamente
 15 populadas e com uma baixa cobertura vacinal (DE THOISY, *et al.*, 2020; REZENDE, *et al.*, 2018). A observação de casos de epizootias associados à FA e o aumento do número de casos em humanos gerou uma alerta nas autoridades de saúde do estado, e logo foi iniciada uma intensa campanha de vacinação em MG, o que pode ter favorecido a diminuição dos casos reportados a partir do segundo semestre de 2018 (DE THOISY, *et al.*, 2020; MS-BR, 2017d;
 20 PNI-MS (PROGRAMA NACIONAL DE IMUNIZAÇÃO - MINISTÉRIO DA SAÚDE), 2018).

No ano de 2018, YFV foi detectado em espécimes de *Alouatta* sp. (n = 7/12), *Callithrix* sp. (n= 113/331) e animais identificados como pertencentes à família Cebidae (n= 24/34), com associação entre a positividade para YFV e o gênero/família testado ($\chi^2= 17,95$,
 25 p= 0.0001). Foi observada uma significativa associação entre a proporção de positividade em *Alouatta* (58,3%) e espécimes identificados como pertencentes à família Cebidae (70,5%) quando comparados com a positividade observada em *Callithrix* (34,2%). Contudo não foi observada diferença significativa entre a positividade para YFV e o gênero *Alouatta* e animais identificados como pertencentes à família Cebidae ($\chi^2= 0,16$, p= 0.68). Foi observada uma
 30 associação entre a taxa de carcaças do gênero *Callithrix* negativas para YFV e o ambiente urbano no ano de 2018. Contudo, um número significativo de carcaças deste gênero positivas para RNA de YFV foram encontradas em ambiente urbano, além disso, foi observada como uma forte associação de taxa de positividade de carcaças identificadas como pertencentes à família Cebidae em ambiente rural ($\chi^2= 26,51$; p< 0.0001) (Figura 14).

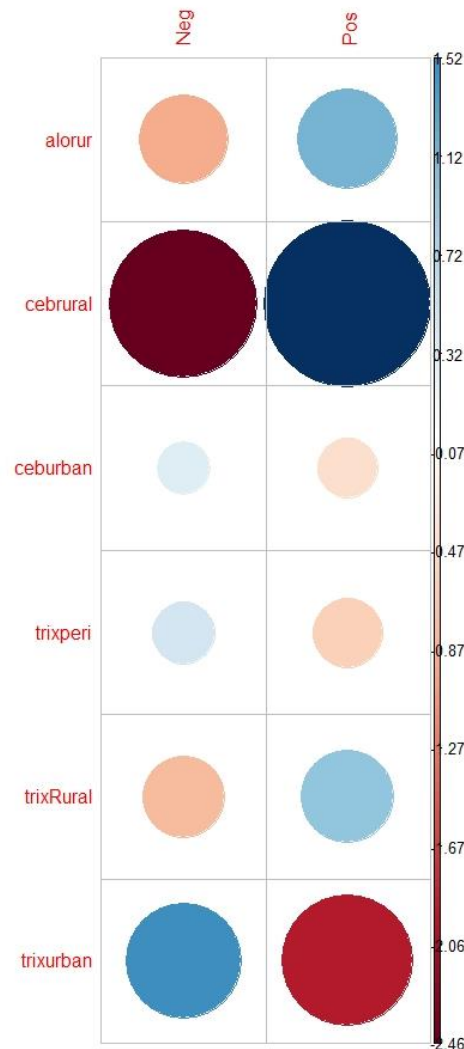


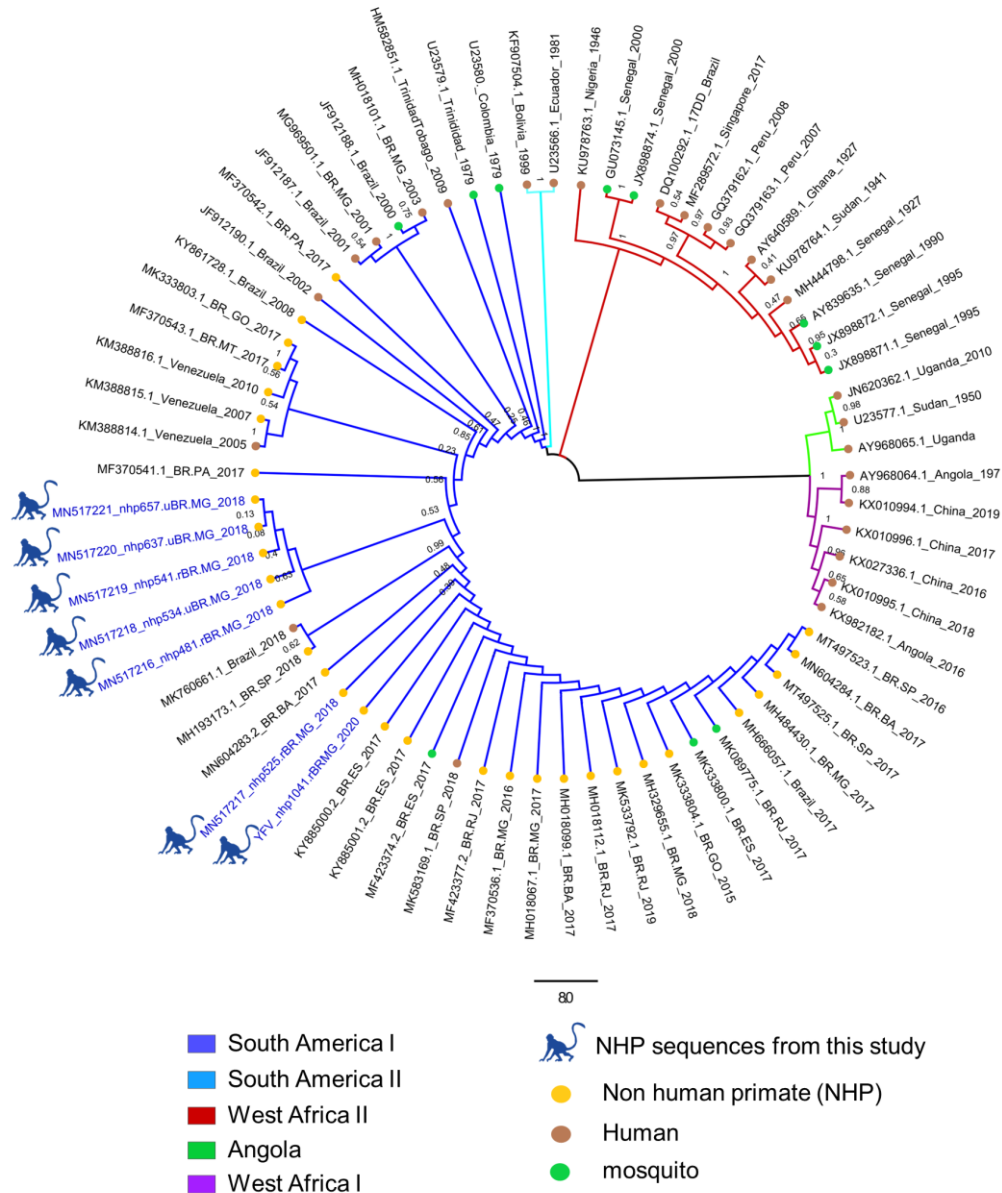
Figura 14: Associação entre gênero/família de PNH positivo para RNA de YFV e o ambiente de coleta, 2018. Foi observada uma associação entre a taxa de carcaças do gênero *Callithrix* negativas para YFV e o ambiente urbano (*trixurban* – balão vermelho à direita). Foi observada uma associação positiva de taxa de positividade de carcaças identificadas como pertencentes à família Cebidae e o ambiente rural (*cebrural* – balão azul à direita). No gráfico de balões a cor azul está associada à associação positiva e a cor vermelha está associada à associação negativa, assim como a intensidade das cores (à direita). O tamanho dos balões indica maior ou menor associação.

5

10 Algumas amostras com Cqs medianos foram selecionadas para serem sequenciadas. O produto de PCR convencional (*endpoint*) foi utilizado para sequenciamento parcial do gene do envelope de YFV (669 pb) (FARIA, *et al.*, 2018; JORGE *et al.*, 2017) para análises preliminares buscando por sequências homólogas em bancos de dados (*GenBank*), confirmando a detecção de YFV nas amostras de PNH. Foram sequenciadas três amostras de

15 PNH de área rural/silvestre e três amostras de área urbana (pertencentes à *Callithrix* sp.) de amostras coletadas em 2018 e uma amostra de área rural/silvestre (*Callithrix* sp.), coletada em 2020. A partir do sequenciamento foi gerada uma árvore filogenética de máxima

verossimilhança (Figura 15), onde, as amostras deste estudo agruparam com outras sequências de YFV de outras regiões do Brasil, todas agrupadas no Genótipo Sul Americano I.



5 **Figura 15: Árvore de Máxima Verossimilhança (ML) do gene parcial do envelope de YFV (669pb).** A árvore filogenética foi reconstruída utilizando os métodos de Máxima Verossimilhança e Tamura-Nei baseada no modelo Geral de Tempo Reversível (*General Time Reversible model*), utilizando a distribuição Gama (5 categorias) e modelo de variação da taxa evolutiva invariáveis. Um total de 1000 réplicas de bootstrap foram executadas. A análise envolveu 69 sequências nucleotídicas (nt) (669 nt) de sequências de YFV obtidas neste estudo
10 (prefixo “nhp”, em azul) e no banco de sequências GenBank (ANEXO B). A árvore é desenhada à escala, com comprimentos de ramos medidos no número de substituições de nucleotídeos por, de acordo com a escala. A análise foi realizada em MEGAX, e a árvore final foi editada e visualizada em FigTree v.1.4.4.

Embora o teste de RT-qPCR realizado não tenha sido um teste quantitativo, os valores de Cqs podem refletir a carga genômica de YFV nas amostras de fígado de PNH, contudo, a carga viral pode ser diretamente relacionada ao estado de conservação do material analisado, assim como da fase da infecção (BUSTIN *et al.*, 2009; POSTOLLEC *et al.*, 2011; SACCHETTO *et al.*, 2020). Durante a fase tardia da infecção é esperado que a carga viral diminua e em carcaças com melhor estado de conservação há mais chances de detecção do RNA viral. Foi realizada a análise da média dos Cqs detectados para cada espécime positivo na RT-qPCR. Para as carcaças em estado “ruim” (n= 10) os Cqs variaram de 11,2 a 37 (mediana= 32) e para as carcaças em estado “bom” e “razoável”, (n= 134) os Cqs variaram entre 7,6 a 36,8 (mediana=15,1), sendo que a amostra detectada em 2020 obteve um Cq acima de 37 (Cq= 38,8), contudo sua positividade foi confirmada através de sequenciamento genético. Em *Alouatta*, os Cqs detectados variaram entre 10,5 e 33 (mediana= 11). Para *Callithrix* os Cqs variaram de 8,4 a 37 e para os espécimes da família Cebidae os Cqs variaram de 7,6 a 33,2 (medianas equivalentes a 28,6 e 9,5 respectivamente). Foi observada uma diferença significativa ($p < 0.0001$) entre as medianas de Cqs de *Callithrix* e espécimes da família Cebidae.

Em relação à área de coleta das carcaças, foi observado que para amostras coletadas em área rural/silvestre, o Cq mediano foi de 11 enquanto que para amostras coletadas em áreas urbanas o Cq mediano foi de 31,8. Uma mediana menor de Cqs em ambientes rurais/silvestres demonstra uma maior carga viral nas carcaças coletadas nesses ambientes. Esse cenário mostra o caráter silvestre do YFV, onde a circulação do vírus ocorre de forma natural nos ambientes silvestres e rurais onde é encontrado seus principais hospedeiros reservatórios, os primatas não-humanos e seus principais vetores, mosquitos silvestres dos gêneros *Haemagogus* e *Sabethes*.

Devido ao número amostral para as amostras positivas do gênero *Alouatta* não foi possível comparar a taxa de positividade deste gênero com os outros grupos em estudo. Contudo, dados da literatura descrevem o gênero *Alouatta* como um dos mais susceptíveis ao YFV com maior taxa de infecção e mortalidade pelo vírus sendo reportados (FERNANDES, *et al.*, 2021). Trabalhos da literatura descrevem características histopatológicas em animais do gênero *Alouatta* infectados com YFV, semelhantes aquelas observadas em humanos infectados e em proporções maiores do que as observadas em outros gêneros de PNH no Brasil (CUNHA, M. S. *et al.*, 2019; FERNANDES *et al.*, 2021; MORENO *et al.*, 2013; SILVA, *et al.*, 2020). Além disso, foi descrita alta taxa de positividade em animais do gênero *Alouatta* tanto nos surtos mais recentes de 2016 a 2019 como em surtos de FA ocorridos em

anos anteriores (CUNHA, *et al.*, 2019; GONÇALVES *et al.*, 2012; MORENO *et al.*, 2013; REZENDE, *et al.*, 2018; SACCHETTO *et al.*, 2020; SALLIS, *et al.*, 2003; SILVA, *et al.*, 2020).

Neste estudo foram recebidas amostras de carcaças de PNH dos gêneros *Callithrix* sp. e *Alouatta* sp. e de animais identificados como pertencentes à família Cebidae. Foi observada uma predominância de carcaças pertencentes ao gênero *Callithrix* sp. que poderia ser justificada pelo fato deste trabalho não ter sido realizado a partir de um desenho experimental de área de coleta, com estas sendo realizadas sob demanda de onde estava ocorrendo mortes de PNH, em todo o território de MG. Contudo, além do viés recebimento de amostra de conveniência, deve ser considerado que animais deste gênero (*Callithrix*) são adaptáveis e capazes de sobreviverem em habitats degradados, em fragmentos de mata dentro de áreas urbanas, parques e muitas vezes em ambientes densamente populados, o que facilita seu contato com seres humanos, portanto a probabilidade de encontrar esses animais seria maior do que os animais dos outros dois gêneros (BICCA-MARQUES; FREITAS, 2010; SILVA, *et al.*, 2020; TEIXEIRA *et al.*, 2015).

Diversos estudos mostram que espécies de bugio (*Alouatta* sp.) possuem alta susceptibilidade à infecção por YFV desenvolvendo a doença de forma grave e muitas vezes de forma fatal, sendo caracterizada principalmente pelo acometimento do fígado e rins, com esteatose, apoptose de hepatócitos, hemorragia e infiltrado inflamatório além de necrose renal aguda (ENGELMANN *et al.*, 2014; FIGUEIREDO *et al.*, 2018; LAEMMERT JR.; KUMM, 1950; LEAL *et al.*, 2016; MORENO *et al.*, 2013; VASCONCELOS, 2003). O primeiro relato de morte de PNH (*Alouatta* spp.) relacionados a surtos de YFV ocorreu em Trinidad (BALFOUR, 1914), e desde então, a morte de *Alouatta* sp. ligados à infecção por YFV vindo sendo descrito em vários países da América do Sul, como Argentina (AGOSTINI; HOLZMANN; DI BITETTI, 2008; HOLZMANN *et al.*, 2010), Brasil (CUNHA *et al.*, 2019; DE ALMEIDA *et al.*, 2012; MORENO *et al.*, 2013; SALLIS, *et al.*, 2003), Costa Rica (VARGAS-MENDEZ; ELTON, 1953), Panamá (COLLIAS; SOUTHWICK, 1952) e Venezuela (AUGUSTE *et al.*, 2015; RIFAKIS *et al.*, 2006). Desde o início do mais recente surto de FA no Brasil (2017-2018), o Ministério da Saúde relatou um alto número de epizootias com mortes de *Alouatta* sp. e de outros gêneros de PNH. Além disso, vários estudos reportaram a detecção de YFV circulando em PNH, incluindo *Alouatta* sp. em diferentes estados do país, principalmente da região sudeste (GÓMEZ, *et al.*, 2017; CUNHA, *et al.*, 2019; FARIA, *et al.*, 2018; HILL *et al.*, 2020; REZENDE, *et al.*, 2018; SACCHETTO *et al.*, 2020).

A susceptibilidade de PNH ao YFV está associada a interações entre os diferentes gêneros/espécies de PNH e a linhagem viral. Além disso, a taxa de infecção em uma determinada espécie está diretamente relacionada a fatores ecológicos e comportamentais do PNH, como por exemplo, distribuição geográfica, hábitos alimentares, hábitos diurnos ou noturnos, além de hábitos comportamentais como, viver em grandes grupos ou não e ser espécie territorialistas (ROIG *et al.*, 2009; RODHAIN, 1991; STRODE, 1951). Os macacos bugios vivem em pequenos grupos, são animais territoriais e de comportamento ocioso passando grandes períodos em topos de árvores descansando ou se alimentando. Além disso, os principais vetores silvestres do YFV (*Haemagogus* e *Sabethes*) se encontram principalmente em topo de árvores se alimentando durante o dia (FORATTINI, 2002). Esses fatores associados aumentam as chances de macacos bugios serem infectados por YFV. Devido ao caráter sob demanda das coletas, foram recebidas poucas amostras de fígado de bugios (n=14), contudo a taxa de positividade encontrada neste gênero foi alta se comparada às amostras de *Callithrix* sp., podendo indicar uma maior susceptibilidade de *Alouatta* sp. à infecção por YFV.

Os PNH do gênero *Callithrix* são pequenos, vivem em grandes grupos e possuem certa plasticidade comportamental conseguindo viver em ambientes degradados e até mesmo em áreas urbanizadas (MITTERMEIER; RYLANDS; WILSON, 2013; TEIXEIRA *et al.*, 2015). Este fator pode estar associado principalmente com o fato de muitos *Callithrix* sp. (n= 217/376) terem sido encontrados em áreas urbanas neste estudo (Figura 9). Contudo, a taxa de positividade nesses PNH foi menor (34,2%) se comparado com a taxa de positividade observada para os *Alouatta* sp. A taxa de positividade também foi alta entre os PNH identificados como pertencentes à família Cebidae e, embora não se tenha a identificação a nível de gênero essas amostras, de acordo com a distribuição dos PNH dessa família no estado de MG, a probabilidade é de que elas pertençam a PNH dos gêneros *Sapajus* e/ou *Callicebus*. Para auxiliar na identificação do gênero a que estas amostras pertencem, análises de *barcode* podem ser utilizadas. Os PNH do gênero *Sapajus* são considerados susceptíveis a YFV com alguns casos de infecção sendo descritos nos estados de Goiás, Espírito Santo, São Paulo e Minas Gerais (CUNHA, *et al.*, 2019; DELATORRE *et al.*, 2019^a; dados do SINAN, junho/2019).

Embora exista pouca informação em relação à susceptibilidade de PNH do gênero *Callicebus* ao YFV, carcaças de PNH deste gênero foram encontradas infectadas com o vírus durante a epizootia recente de FA no Brasil (2016-2018) (FIGUEIREDO *et al.*, 2018; REZENDE *et al.*, 2018). As altas taxas de mortalidade de PNH no final de 2016 e início de

2017 geraram um alerta para a circulação e manutenção do YFV na região Sudeste. Rezende e colaboradores (2019) detectaram em 2017, RNA de YFV em PNH dos gêneros *Alouatta*, *Callithrix* e *Callicebus* em MG. No mesmo ano, Delatorre e colaboradores (2019) detectaram YFV em PNH do gênero *Alouatta* (*A. clamitans*) no estado do Espírito Santo (DELATORRE
5 *et al.*, 2019). Em 2017, Sacchetto detectou YFV em mais de 150 amostras de PNH dos gêneros *Alouatta*, *Callithrix*, *Callicebus* e *Sapajus* em MG (SACCHETTO, 2020). Além disso, em 2017, o YFV foi detectado em PNH em municípios de MG durante o período considerado não epidêmico para FA, diferentemente do que foi observado em 2018, onde detectou-se o vírus em humanos apenas durante o período epidêmico, com apenas uma
10 epizootia confirmada em período não epidêmico (SES-MG, 2018c; SES/MG, 2017).

Em 2019, foi recebido no LZOON-BH aproximadamente 1/3 do número total de amostras em comparação com o ano anterior, demonstrando uma possível diminuição nos casos de epizootia no estado de MG. Além disso, em 2019 não foram reportados casos em humanos ou epizootias de FA mostrando um cenário de possível diminuição da circulação do
15 vírus na região. Neste estudo foram recebidas amostras de janeiro a dezembro de 2019, e independente do período (epidêmico ou não), do gênero do PNH e do local e município de coleta, não foi detectado RNA de YFV em nenhuma amostra de PNH.

Diversos fatores podem estar associados à diminuição de casos de YFV neste período de 2019, dentre eles a possível queda da população de PNH no estado após os altos números
20 de epizootias observadas nos anos anteriores e o aumento da cobertura vacinal em humanos. No fim de 2019, a cobertura vacinal geral acumulada no estado (2007 – 2019) era de 92,7%. Embora ainda abaixo do ideal (>95%), o aumento da cobertura vacinal em 2019, em relação a anos anteriores, pode ter contribuído para a diminuição da circulação do vírus no estado entre 2018 e 2019. Contudo, casos de epizootias em PNH confirmados para YFV foram reportados
25 ao sul do Brasil, nos estados de São Paulo, Santa Catarina e Paraná em 2019 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, MSBR, 2020c; SES-MG, 2019b, 2021a, b; SES-SC, 2018; SES-SP, 2019; SESA-PR, 2019). Embora não tenham sido reportados casos de YFV em humanos ou epizootias no estado de MG em 2019, os casos de FA nos estados ao sul do país demonstram a continuada circulação do YFV fora da bacia Amazônica, região endêmica para o vírus. Já
30 foi demonstrado que o YFV é capaz de manter sua circulação fora da região endêmica por longos períodos, como foi observado para a região sudeste nos surtos recentes. Além disso, o YFV manteve uma circulação silenciosa na sudeste desde sua possível introdução na região em 2015 até causar os primeiros surtos no final de 2016, mostrando uma falha na vigilância epidemiológica neste período (ABREU *et al.*, 2019; REZENDE, *et al.*, 2018).

Neste trabalho, foi detectada uma amostra positiva para RNA de YFV coletada em 2020, proveniente de área rural da cidade de Curvelo, na região Central de MG. Neste município já foi demonstrada a circulação do vírus com casos de FA em humanos reportados em 2017 (n=3) e em 2018 (n=4) (SINAN, 2017, 2018) (Figura 16). Contudo, os números exatos de epizootias ocorridas no município não foram divulgados através dos boletins oficiais do estado de MG. Neste trabalho, uma amostra de PNH de Curvelo foi positiva para RNA de YFV coletada durante o período epidêmico de 2018 (jan/2018) e três amostras provenientes do município coletadas durante o período epidêmico em 2019 foram negativas. A presença de um PNH positivo para YFV em um município de MG em 2020 pode ser um caso isolado de detecção ou a reintrodução do vírus na região. Contudo, após sequenciamento genômico foi identificado que o genoma nesta amostra pertence ao mesmo genótipo circulante no estado durante os surtos de 2017/2018, podendo demonstrar uma manutenção do YFV em MG, como já demonstrado em outros estudos prévios (DELATORRE *et al.*, 2019; GIOVANETTI *et al.*, 2019; REZENDE, *et al.*, 2018).

15

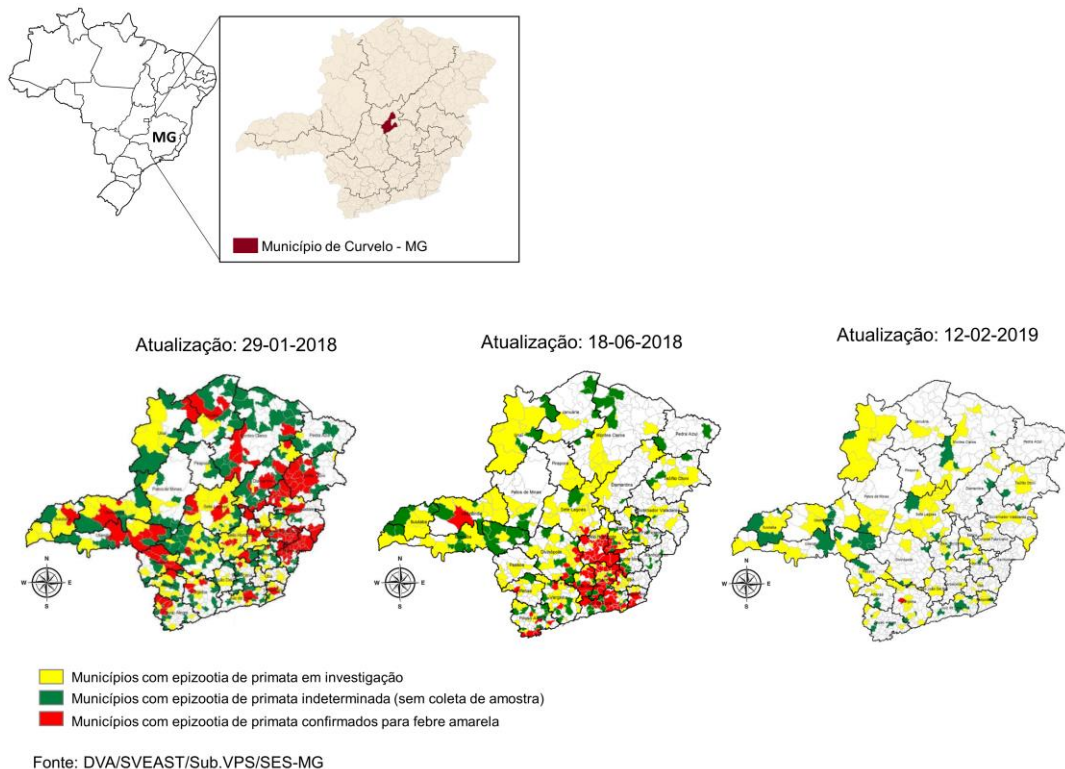


Figura 16: Municípios de Minas Gerais com casos de epizootias de YFV, 2018 – 2019. Municípios de MG com casos suspeitos e confirmados para YFV com destaque para o município de Curvelo, na região Central do estado. No ano de 2018 foram confirmados casos em humanos e epizootias de YFV no município. No ano de 2019 não foi confirmado nenhum caso de infecção de YFV em humanos ou PNH no município de Curvelo. Fonte: adaptado dos boletins epidemiológicos da SES-MG de 30/01/2018, 20/06/2018 e 19/02/2019.

20

Algumas hipóteses podem ser levantadas em relação à presença do YFV em amostra de PNH em 2020, em um município de MG, após um período sem detecção. Uma delas é a possibilidade de o vírus estar circulando em primatas nesta região de forma silenciosa, principalmente pela diminuição da notificação de epizootias e da sua ocorrência em regiões silvestres onde não está ocorrendo vigilância ativa. Somado a isso, a presença na região dos principais vetores e reservatórios do YFV no meio silvestre, mosquitos do gênero *Haemagogus*. Estes vetores quando infectados assim o permanecem por todo seu período de vida podendo transmitir o vírus para outras espécies hospedeiras ou de forma transversal para sua prole (DE ABREU *et al.*, 2019; VASCONCELOS, 2003). Além disso, a dormência observada para os ovos dos mosquitos *Haemagogus* e a resistência à dessecação, que pode ocorrer por até sete meses, levantam a hipótese desses ovos eclodirem em diferentes períodos e poderem dar origem a larvas infectadas com YFV (ALENCAR *et al.*, 2013; GALINDO; CARPENTER; TRAPIDO, 1955; TÁTILA-FERREIRA *et al.*, 2017), em diferentes momentos durante ou após surtos de FA. Essas larvas infectadas com YFV poderiam dar origem a populações de mosquitos infectadas, gerando um potencial risco de transmissão desse vírus em regiões com hospedeiros susceptíveis, mesmo que em pequena escala.

Além da possível presença de vetores infectados, a cobertura vacinal de alguns municípios do estado de MG ainda é considerada abaixo do ideal. Embora a cobertura vacinal acumulada (2007-2019) no município de Curvelo seja de 100%, existe uma heterogeneidade em relação às faixas etárias vacinadas, variando de uma cobertura de 66 a 100% deixando uma parcela da população vulnerável à infecção pelo YFV.

Esses fatores associados podem significar um potencial risco de reestabelecimento do ciclo de transmissão do YFV no estado de MG. Somado a isso, os resultados deste estudo demonstram a extensa circulação da FA pelo estado de MG em 2018, incluindo a circulação do vírus em PNH em áreas urbanas, principalmente em grandes centros urbanos da região Metropolitana. Estes fatores associados à presença de vetores competentes em áreas urbanas podem contribuir para o risco de reurbanização da FA no Brasil. Embora até o momento não exista evidências epidemiológicas do ciclo de transmissão urbana no país no recente surto de FA, mais estudos devem ser realizados para investigar a competência dos vetores urbanos para transmitir YFV e os possíveis riscos para a ocorrência de FA nos centros urbanos.

Embora a análise molecular seja uma das ferramentas mais precisas para se determinar a presença do genoma viral em uma amostra biológica, a detecção molecular do genoma viral ocorre principalmente durante o período considerado virêmico no hospedeiro, ou seja, período

em que está havendo a multiplicação do vírus. Para os PNH neotropicais, não existem dados na literatura mostrando a duração do período virêmico após a infecção pelo YFV. Contudo, uma vez que anticorpos neutralizantes já foram detectados nesses animais, sabe-se que eles podem sobreviver à infecção e desenvolver anticorpos a longo prazo contra o vírus (KUMM; LAEMMERT JR., 1950; LAEMMERT JR.; KUMM, 1950). Em humanos, a produção de anticorpos neutralizantes contra YFV persiste por longos anos após a infecção ou vacinação contra FA (MONATH, 2001).

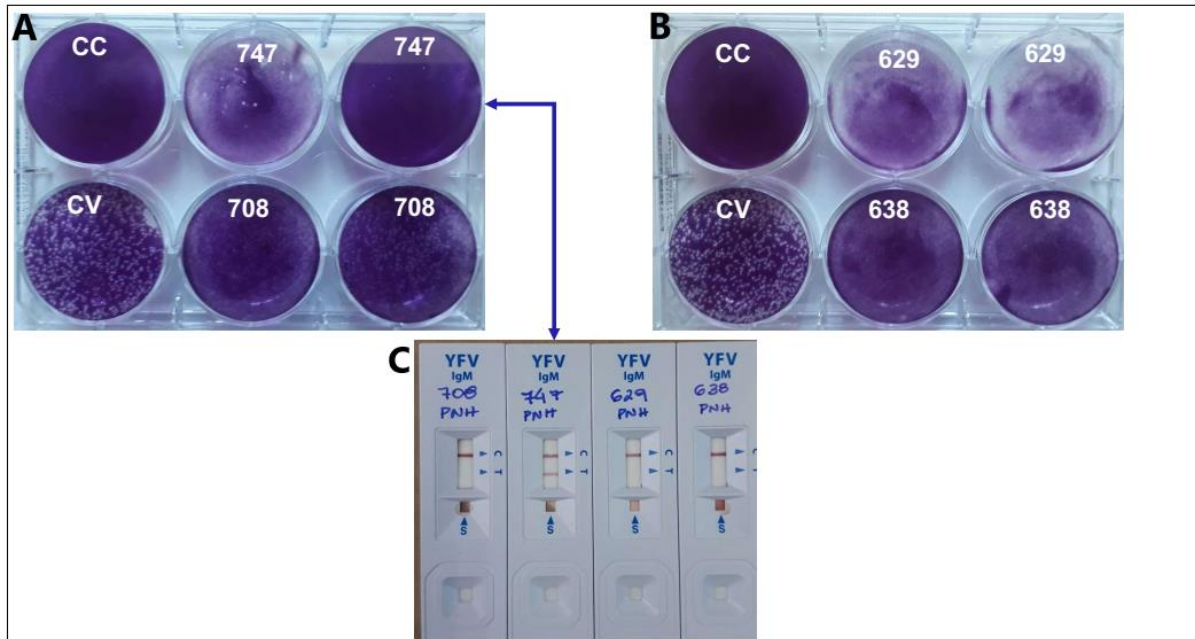
A técnica de PRNT se baseia na detecção de anticorpos neutralizantes específicos presentes no soro a partir de uma quantidade conhecida de vírus (ROEHRIG; HOMBACH; BARRETT, 2008). Neste trabalho, não foi possível a coleta de sangue para análise sorológica, uma vez que as carcaças em sua maioria já se encontravam em estado de decomposição com coagulação sanguínea.

Desta forma, para se compreender a real extensão da circulação do YFV entre os PNH através, não só da detecção molecular, mas também da presença de anticorpos neutralizantes contra o YFV, foi realizado um ensaio piloto (qualitativo), adaptado a partir da técnica de PRNT, para avaliar a atividade neutralizante do YFV em macerados de tecido hepático de carcaças de PNH. O fígado é um órgão ultra vascularizado, (LORENTE; HAUTEFEUILLE; SANCHEZ-CEDILLO, 2020) e por isso, foi utilizado para investigação piloto de anticorpos neutralizantes para YFV.

No teste realizado, foram selecionadas quatro amostras de PNH sabidamente positivas para detecção de genoma de YFV com Cq's baixo no PCR [PNH 638 (2018) *Callithrix* sp. 638, Cq=8.4], médio [PNH 708 (2018) *Callithrix* sp., Cq=11; PNH 747 (2018) *Callithrix* sp., Cq=12] e alto [PNH 629 (2018) *Callithrix* sp. 629, Cq=31.5]. Estas amostras foram testadas concomitantemente em um teste rápido de detecção de IgM (EcoDiagnóstica, Brasil). Cada macerado de fígado foi inoculado em duas replicatas, sem diluição.

Além da detecção de anticorpos neutralizantes, um dos objetivos deste teste foi a análise de possível efeito citotóxico da amostra nas células utilizadas e uma possível concordância com o resultado do teste rápido. As placas de lise não foram contadas, uma vez que o controle de vírus (YFV 17DD vacinal, Bio-Manguinhos/FIOCRUZ, Brasil) não formou as 150 PFU, como o esperado. Foi observado que para as amostras dos PNH 629 (Cq=31.5), 638 (Cq=8.4) e PNH 747 (Cq=12) houve possível efeito citotóxico. Contudo, para a amostra do PNH 747 foi possível a observação de uma possível neutralização, quando comparados com o controle de vírus (Figura 17). Esta mesma amostra testou positivo para IgM no teste

rápido. Com exceção da amostra 747, nenhuma amostra de PNH utilizada testou positivo para IgM-YFV no teste rápido (Figura 17).



5 **Figura 17: Ensaio piloto para avaliação qualitativa da atividade neutralizante e teste rápido**
para YFV em amostras de PNH, 2018. (A) Ensaio de amostras de macerado de fígado dos PNH 747
 (C_q= 12) e 708 (C_q=11) em placas de célula VERO. (B) Ensaio de amostras de macerado fígado dos
 PNH 629 (C_q= 31.5) e 638 (C_q=8.4) em placas de célula VERO. (C) Teste rápido para IgM anti-YFV
 de amostras de macerado de fígado de PNH (708, 747,629, 638). CV: controle de vírus YFV 17DD.
 10 CC: controle de células VERO.

Foi observado a partir deste ensaio a possibilidade do uso de macerado de fígado para
 análise da atividade neutralizante do YFV em uma amostra de PNH. Essa possibilidade abre
 caminho para uma análise mais extensa sobre a infecção de YFV nas amostras recebidas
 15 durante e após a epidemia de febre amarela no estado de Minas Gerais. Contudo, outros testes
 devem ser incorporados a essa análise para se entender a extensão desses resultados e a
 influência de fatores, como por exemplo, o estado de decomposição das carcaças, a diluição
 das amostras utilizadas na técnica e citotoxicidade. Para isso, poderão ser realizadas PRNT
 executadas em condições controladas utilizando macerados de fígado de camundongos
 20 infectados experimentalmente. Desta forma poderão ser analisados fatores como:
 citotoxicidade (ensaio de MTT), neutralização específica e não específica. Além disso, os
 resultados obtidos a partir desta padronização podem ser utilizados para a investigação de
 outros vírus em amostras de bancos de tecidos, uma vez que resultados moleculares negativos
 não implicam necessariamente que o animal/amostra não foi infectado por um vírus, respostas
 25 que podem ser dadas a partir das análises sorológicas.

Finalmente, durante buscas na literatura sobre patogênese e infecção de YFV em PNH, observou-se que as informações são repassadas de artigo para artigo, porém muitas vezes sem rastreabilidade. Além disso, algumas informações não possuíam referencial experimental e teórico, muitas vezes sendo obtidas a partir de experiências de atividades de campo. Com o objetivo de contribuir para melhor entendimento da infecção de YFV em PNH, foi realizada uma revisão sobre os principais aspectos relacionados à patogênese e infecção em PNH neotropicais sob uma perspectiva histórica e dos surtos recentes de FA no Brasil (ANEXO C). Este material compôs parte de um artigo de revisão intitulado “*Recent sylvatic yellow fever virus transmission in Brazil- the news from an old disease*” (ANEXO C), onde outros aspectos da febre amarela silvestre no Brasil também foram abordados, contando com a participação de outros colaboradores.

Parte dos resultados deste trabalho referentes ao período de epidemia de YFV em 2018, juntamente com os resultados obtidos em 2017 (SACCHETTO, 2020), deram origem a um artigo intitulado “*Neighbor danger Yellow fever virus epizootics in urban and urban-rural transition areas of Minas Gerais state, during 2017-2018*” (ANEXO D) que aborda, entre outros aspectos, a ampla circulação do YFV no estado de Minas Gerais durante a epidemia de febre amarela que atingiu o estado entre os anos de 2017 e 2018 e demonstra o risco da reurbanização do ciclo de transmissão do vírus. Os resultados deste trabalho, obtidos a partir de 2019 até o ano de 2020, deram origem ao manuscrito intitulado “*Investigation of yellow fever virus in non-human primates from 2019 to 2021, following two yellow fever waves in Southeast Brazil, Minas Gerais*” (em processo de escrita), e demonstram a detecção do YFV em PNH em 2020, e os fatores associados a um possível risco de reestabelecimento do ciclo silvestre de transmissão do YFV no estado de MG.

6.3. Investigação do vírus da febre amarela em carcaças de primatas não humanos no Espírito Santo, 2017

Durante o surto de YFV na região sudeste do país (2017/2018) foi reportado muitas mortes de PNH no estado do Espírito Santo, principalmente durante o primeiro semestre de 2017, período considerado epidêmico para FA (SESA-ES, 2017a; SESA-ES, 2017b). Diante deste cenário, formou-se uma parceria entre o Prof. Dr. Sérgio Mendes Lucena, do Laboratório de Mastozoologia da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) e o LV-UFMG, para a análise molecular das carcaças de PNH coletados através de busca ativa no estado do Espírito Santo. As carcaças de PNH foram recolhidas por duas instituições: através

do Serviço Estadual de Vigilância em Saúde (SEVS) e através do Laboratório de Mastozoologia da UFES. No total, foram coletadas 36 carcaças de PNH. Destas, 61,1% (n=22/36) foram recolhidas pela SEVS e entregues ao laboratório da UFES. 38,9% (n=14/36) das carcaças foram recolhidas pelo próprio laboratório da UFES. O SEVS não registrou a

5 caracterização das áreas de coleta (área urbana, periurbana, rural ou silvestre) de nenhuma das carcaças. Dentre os 14 animais recolhidos pelo laboratório da UFES, 12 foram recolhidos em áreas rurais, uma em área urbana e uma em área de interface urbana/rural.

Os animais foram identificados como *Alouatta guariba* (n= 32/36), *Callithrix geoffroyi* (n= 2/36) e *Callicebus personatus* (n= 2/36). As amostras de PNH testadas para YFV eram

10 provenientes de sete municípios do ES, sendo a maioria (n= 23/36; 63,8%) da região Sudoeste Serrana, seguido das regiões Central Serrana (n= 12/36; 33,3%) e uma amostra da região Metropolitana do estado (Tabela 4).

Tabela 4: Primatas não humanos positivos para RNA de YFV em amostras de fígado (ES),

15 2017

ID PNH	Cq	Espécie	Área	Município	Região
02ES	9.2	<i>Alouatta guariba</i>	-	Santa Teresa	Central Serrana
03ES	8.7	<i>Alouatta guariba</i>	rural	Santa Teresa	Central Serrana
04ES	23.4	<i>Alouatta guariba</i>	rural	Marechal Floriano	Sudoeste Serrana
05ES	19.8	<i>Alouatta guariba</i>	interf. urb/rur	Santa Maria de Jetibá	Central Serrana
06ES	12.9	<i>Alouatta guariba</i>	rural	Santa Maria de Jetibá	Central Serrana
07ES	12.5	<i>Alouatta guariba</i>	rural	Santa Maria de Jetibá	Central Serrana
08ES	12.9	<i>Alouatta guariba</i>	rural	Santa Maria de Jetibá	Central Serrana
09ES	12.4	<i>Alouatta guariba</i>	rural	Santa Maria de Jetibá	Central Serrana
10ES	7.9	<i>Alouatta guariba</i>	rural	Santa Maria de Jetibá	Central Serrana
11ES	12.1	<i>Alouatta guariba</i>	rural	Santa Maria de Jetibá	Central Serrana
12ES	10.8	<i>Alouatta guariba</i>	rural	Santa Teresa	Central Serrana
13ES	9.8	<i>Alouatta guariba</i>	rural	Santa Maria de Jetibá	Central Serrana
14ES	9.6	<i>Alouatta guariba</i>	rural	Santa Maria de Jetibá	Central Serrana
16ES	21.4	<i>Alouatta guariba</i>	-	Afonso Claudio	Sudoeste Serrana
17ES	17.6	<i>Alouatta guariba</i>	-	Domingos Martins	Sudoeste Serrana
18ES	20	<i>Alouatta guariba</i>	-	Domingos Martins	Sudoeste Serrana
19ES	7.6	<i>Alouatta guariba</i>	-	Domingos Martins	Sudoeste Serrana
20ES	16.1	<i>Alouatta guariba</i>	-	Domingos Martins	Sudoeste Serrana
21ES	23.4	<i>Alouatta guariba</i>	-	Domingos Martins	Sudoeste Serrana
22ES	20.6	<i>Alouatta guariba</i>	-	Domingos Martins	Sudoeste Serrana
23ES	11.7	<i>Alouatta guariba</i>	-	Domingos Martins	Sudoeste Serrana
24ES	11.7	<i>Alouatta guariba</i>	-	Domingos Martins	Sudoeste Serrana
25ES	11.3	<i>Alouatta guariba</i>	-	Domingos Martins	Sudoeste Serrana
26ES	9.6	<i>Alouatta guariba</i>	-	Domingos Martins	Sudoeste Serrana

ID PNH	Cq	Espécie	Área	Município	Região
28ES	12.4	<i>Alouatta guariba</i>	-	Domingos Martins	Sudoeste Serrana
29ES	15.3	<i>Alouatta guariba</i>	-	Domingos Martins	Sudoeste Serrana
30ES	15.6	<i>Alouatta guariba</i>	-	Domingos Martins	Sudoeste Serrana
31ES	13.3	<i>Alouatta guariba</i>	-	Marechal Floriano	Sudoeste Serrana
32ES	13.1	<i>Alouatta guariba</i>	-	Domingos Martins	Sudoeste Serrana
34ES	10	<i>Alouatta guariba</i>	-	Domingos Martins	Sudoeste Serrana
35ES	21.6	<i>Alouatta guariba</i>	rural	Marechal Floriano	Sudoeste Serrana
27ES	36.2	<i>Alouatta guariba</i>	-	Domingos Martins	Sudoeste Serrana
36ES	30.9	<i>Callithrix geoffroyi</i>	-	Domingos Martins	Sudoeste Serrana
15ES	27.1	<i>Callithrix geoffroyi</i>	urbana	Vila Velha	Metropolitana
01ES	8.2	<i>Callicebus personatus</i>	-	Venda Nova do Imigrante	Sudoeste Serrana
33ES	6.6	<i>Callicebus personatus</i>	-	Marechal Floriano	Sudoeste Serrana

ID: Identificação; Cq: *quantification cycle*; ES: Espírito Santo; inter.urb/rur: interface urbana/rural.

Do total de amostras testadas (n= 36), 100% foram positivas para presença do RNA de YFV com Cqs variando de 6.6 a 36.2 (mediana= 12.7) (Figura 18). Dentro das amostras da espécie *Alouatta guariba* (n= 32/36), os Cqs variaram entre 7.6 e 36.2 (mediana= 12.7); os Cqs das amostras de *Callithrix geoffroyi* (n= 2/36) foram de 27.1 e 30.9 e das amostras de *Callicebus personatus* (n= 2/36) foram de 6.6 e 8.2. Uma vez que os Cqs demonstram indiretamente a carga viral de uma amostra, foi possível observar que as amostras de *Callithrix geoffroyi* possuíam uma carga viral mais baixa (Cqs mais altos), quando comparados com as amostras das espécies *Alouatta guariba* e *Callicebus personatus*. Além disso, apenas uma amostra de *Callithrix geoffroyi* (Cq: 27.1) possuía identificação de local de coleta como sendo de área urbana. A maioria das amostras com identificação de área de coleta, foram as amostras da espécie *Alouatta guariba* (12 área rural e 1 ambiente de interface urbana/rural), de forma contrária 22 amostras (19 *Alouatta*, 2 *Callicebus*, 1 *Callithrix*) não possuíam local de coleta informado.

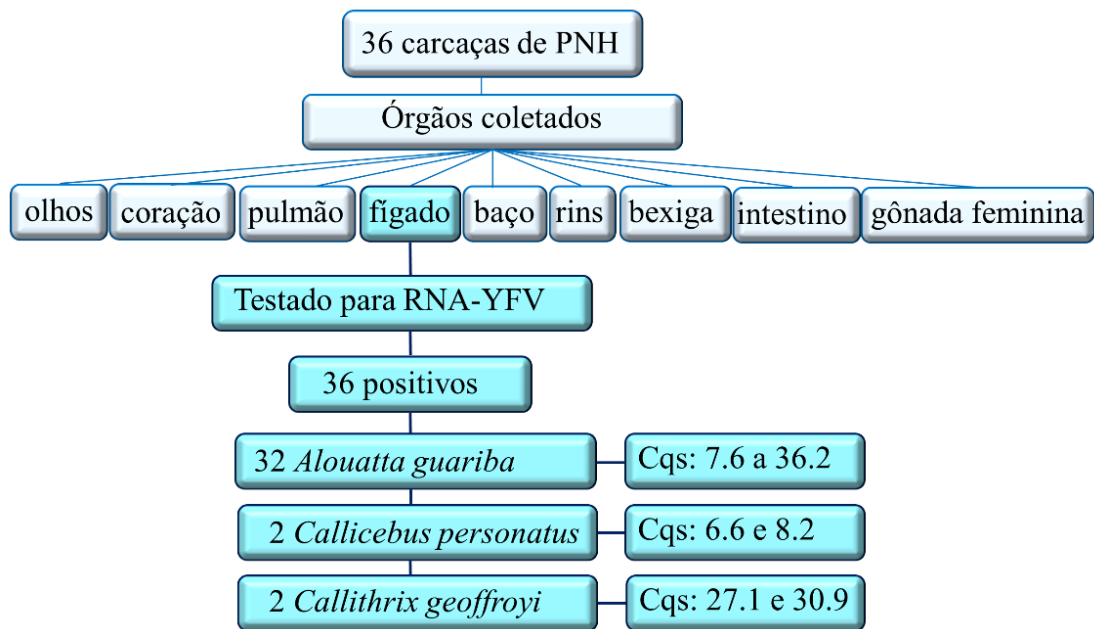


Figura 18: Detecção de RNA de YFV em amostras de PNH coletadas no estado do Espírito Santo, 2017. Das 36 carcaças de PNH recebidas do ES em 2017, foram coletados uma variedade de órgãos, incluindo, olhos, coração, pulmão, fígado, baço, rins, bexiga, intestino e gônadas femininas. Neste trabalho foram testados apenas os fígados dos PNH coletados, com uma taxa de positividade de 100% (n=36/36), de animais pertencentes as espécies: *Alouatta guariba* (com Cqs variando de 7.6 a 36.2), *Callicebus personatus* (Cqs 6.6 e 8.2) e *Callithrix geoffroyi* (Cqs 27.1 e 30.9).

As carcaças de PNH que foram recebidas no Laboratório de Mastozoologia – UFES através da Vigilância da Saúde não possuíam, em sua maioria, data de coleta, apenas 8 (n= 8/24) amostras possuíam identificação de data de coleta de janeiro, fevereiro e novembro de 2017. Dentre as amostras coletadas através de vigilância ativa (n= 11) pelo grupo do Laboratório de Mastozoologia – UFES, a data de coleta foi entre os meses de janeiro a março de 2017. Uma amostra não possuía informação de coleta, pelo grupo ou pela vigilância. De acordo com os dados obtidos, observa-se que as amostras foram recebidas e/ou coletadas durante o período considerado epidêmico para YFV (dezembro a junho), com uma amostra sendo recebida no mês de novembro de 2017.

De acordo com a Secretaria Estadual de Saúde do Espírito Santo (SESA-ES), o estado não registrava um caso de febre amarela confirmado desde meados de 1970 (SESA-ES, 2017c), contudo, desde o fim de 2016, início de 2017 a morte de PNH no estado de MG gerou um alerta em relação a dispersão do YFV para outros estados da região sudeste, incluindo o ES. A morte de PNH nas cidades do ES que fazem divisa com MG levaram o Ministério da Saúde a aumentar os municípios com vacinação contra febre amarela (SESA-ES, 2017d). De acordo com a SESA-ES, 28 municípios do estado tiveram notificação e confirmação de

mortes de PNH durante o primeiro semestre de 2017, incluindo as sete cidades deste estudo (Afonso Cláudio, Domingos Martins, Marechal Floriano, Santa Maria de Jequitibá, Santa Teresa, Venda Nova do Imigrante e Vila Velha) (SESA-ES, 2017a).

De acordo com uma pesquisa feita pela UFES, o YFV causou a morte de 85% da população de PNH do gênero *Alouatta* no estado (UFES, 2019). Muitos estudos mostram que espécies de macacos bugio (*Alouatta* sp.) possuem alta susceptibilidade à infecção por YFV. E embora o número de bugios neste estudo seja significativamente maior quando comparado com o número de amostras pertencentes a este gênero encontrados em MG, a alta taxa de positividade nas amostras de MG (58,5%) e nas amostras do ES (n= 32/32, 100%) demonstram a alta susceptibilidade de *Alouatta* sp. à infecção por YFV.

Após o surto de FA de 2017, os casos de FA no estado foram diminuindo. Em 2018 foram confirmados apenas cinco casos da doença em humanos e dois óbitos reportados, sem nenhuma epizootia de FA confirmada neste ano. Em 2019 e 2020 nenhum caso de infecção por YFV foi reportado em humanos ou em PNH (SESA-ES, 2019). De acordo com o Zoologista Sergio Lucena, a grande maioria da população de PNH susceptíveis da região morreu devido a infecção pelo vírus no surto de 2017 (CBN VITÓRIA, 2021). Contudo, a vigilância epidemiológica deve ser mantida, principalmente porque o vírus se mantém circulando fora da bacia Amazônica em estados próximos ao ES, como São Paulo, Paraná e Santa Catarina. Além disso, a cobertura vacinal no estado é baixa, não chegando a 70% da população vacinada contra a febre amarela até agosto de 2020 (ESHOJE, 2020).

6.4. Investigação da infecção pelos vírus chikungunya, zika, mayaro e oropouche em carcaças de primatas não humano em Minas Gerais, 2017-2019

As amostras de PNH coletadas nos anos de 2017-2019 e que foram negativas durante a investigação de RNA de YFV, foram submetidas à investigação de RNA de CHIKV (2017-2019) e ZIKV (2018-2019) por RT-qPCR e MAYV e OROV (2017-2019) por RT-qPCR multiplex. Além disso, foram selecionadas de forma aleatória, algumas amostras positivas para YFV para testar coinfeção entre os diferentes arbovírus.

Do total de amostras testadas entre 2017-2019 [n= 906, (2017: 397 e 2018-2019: 509)], foram utilizadas 490 amostras negativas para RNA-YFV e 22 amostras positivas para YFV-RNA, totalizando 512 amostras testadas para a presença de RNA de CHIKV e análises de coinfeção. Dentre estas carcaças estavam amostras coletadas principalmente em áreas urbanas (67,9%, 95% IC= 63,7 – 71,9%), seguido de áreas rurais (26,1%, 95% IC= 22,4 –

30,2%), e áreas de interface urbana/rural (5,8%, 95% IC= 3,9 – 8,2%). As amostras eram pertencentes à PNH dos gêneros *Callithrix* (91,8%, 95% IC= 89 – 94%), *Alouatta* (1,7%, 95% IC= 0,8 – 3,3%), *Callicebus* (0,5%, 95% IC= 0,1 – 0,17%), e animais identificados como pertencentes à família Cebidae (4,1%, 95% IC= 2,5 – 6,2%), com três representantes da
 5 família identificados como *Sapajus* sp. Oito amostras não possuíam identificação. Além disso, a amostra de *Pan troglodytes* recebida no LV-UFGM foi testada para CHIKV.

As amostras de PNH testadas para CHIKV eram provenientes de 182 municípios de 11 mesorregiões de MG, sendo a maioria (40,8%, 95% IC= 36,5 – 45,2%) da região Metropolitana, seguido das regiões do Triângulo/Alto Paranaíba (17,3%, 95% IC= 14,2 –
 10 20,9%), Zona da Mata (12,5%, 95% IC= 9,7 – 15,6%), e região Sul/Sudeste (8,4%, 95% IC= 6,1 – 11,1%) (Tabela suplementar 1, ANEXO A). Independente da região de origem das amostras, da área coletada e do gênero pertencente, todas as amostras testadas foram negativas para a presença do RNA de CHIKV.

Do total de amostras coletadas entre os anos de 2018-2019 (n=509), 349 amostras
 15 (331 amostras YFV-negativas e 18 amostras YFV-positivas) foram testadas para presença de RNA de ZIKV, e análises de coinfeção. As carcaças testadas eram provenientes de áreas urbanas (71,9%, 95% IC= 66,8 – 76,5%), em áreas rurais/silvestres (23,7%, 95% IC= 19,4 – 28,6%), áreas de interface urbana/rural (4,3%, 95% IC= 2,4 – 6,9%). As amostras eram pertencentes à PNH dos gêneros *Callithrix* (91,6%, 95% IC= 88,8 – 94,3%), *Alouatta* (1,1%,
 20 95% IC= 0,3 – 2,9%), animais identificados como pertencentes à família Cebidae (4,5%, 95% IC= 2,6 – 7,3%), com um representante da família identificado como *Sapajus* sp. e 8 amostras sem identificação. Além disso, a amostra de *Pan troglodytes* recebida foi testada para ZIKV.

As amostras de PNH testadas para ZIKV eram provenientes de 140 municípios de 11 mesorregiões de MG, e assim como as amostras testadas para CHIKV, a maioria era
 25 pertencente às regiões Metropolitana (37,2%, 95% IC= 32,1 – 42,5%), Triângulo/Alto Paranaíba (19,2%, 95% IC= 15,2 – 23,7%), Zona da Mata (12,3%, 95% IC= 9 – 16,2%), e região Sul/Sudeste (10,3%, 95% IC= 7 – 13,6%) (Tabela suplementar 1, ANEXO A). Independente da região de origem das amostras, da área coletada e do gênero pertencente, todas as amostras testadas foram negativas para a presença do RNA de ZIKV.

30 Em 2016, o RNA de ZIKV foi detectado em sete (29%) amostras de PNH das espécies *Callithrix jacchus* e *Sapajus libidinosus* no estado do Ceará (FAVORETTO *et al.*, 2016). Este foi o primeiro relato da possibilidade de PNH neotropicais estarem atuando como potenciais hospedeiros para ZIKV nas Américas. Além disso, foi demonstrada por Terzian e colaboradores em 2017, a detecção de RNA de ZIKV em 32 PNH dos gêneros *Callithrix* a

Sapajus em São Paulo e Minas Gerais (TERZIAN *et al.*, 2018). Durante um estudo realizado entre 2012 e 2017 em áreas urbanas e periurbanas do país, Moreira-Soto e colaboradores (2018) analisaram amostras de 207 PNH para CHIKV e ZIKV. Todas as amostras foram negativas para a presença de RNA dos dois vírus por RT-PCR, contudo amostras de 11 (5,3%) e seis (2,9%) PNH das famílias Atelidae, Callitrichidae e Cebidae apresentaram anticorpos específicos para CHIKV e ZIKV respectivamente (MOREIRA-SOTO *et al.*, 2018). Embora estudos mostrem a detecção de RNA de ZIKV e a presença de anticorpos específicos para CHIKV em algumas espécies de PNH neotropicais, pouco se sabe sobre o papel desses animais no ciclo de transmissão desses vírus, ou ainda, se eles podem estar atuando como hospedeiros e contribuindo para o estabelecimento e a manutenção de ambos os vírus na natureza, como ocorre com YFV.

Inicialmente, neste trabalho foram testados animais coletados principalmente em áreas urbanas, principalmente pelo ZIKV e CHIKV se manterem em uma circulação em ambientes urbanos nas Américas, envolvendo humanos como seus principais hospedeiros (FERNANDES, *et al.*, 2019; GUBLER; VASILAKIS; MUSSO, 2017; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA; FAILLOUX, 2017). Contudo, todos os PNH testados foram negativos para detecção de genoma de CHIKV e ZIKV, incluindo aqueles coletados em áreas urbanas e rurais, e aqueles que testaram positivos para RNA de YFV. Embora tenha descrição de casos de detecção do genoma do ZIKV e CHIKV em amostras de fígados, este órgão não é o principal alvo de tropismo destes vírus, o que poderia afetar nos resultados deste estudo (MATUSALI *et al.*, 2019; MINER; DIAMOND, 2017). Além disso, estes resultados não confirmam que estes animais testados não foram infectados pelo ZIKV e CHIKV podendo ter sobrevivido a esta infecção e gerado imunidade contra os vírus. Para isto, testes posteriores de detecção de anticorpos neutralizantes podem ser utilizados, como PRNT adaptada a partir de macerado de órgãos.

Do total de amostras testadas entre 2017-2019 (n= 906), 209 foram testadas para a presença de RNA de OROV/MAYV. Dentre as amostras estavam carcaças coletadas principalmente em áreas rurais/silvestre (58,3%, 95% IC= 51,3 – 65,1%), área urbana (29,6%, 95% IC= 23,5 – 36,3%), ambiente de interface urbana/rural (11,9%, 95% IC= 7,8 – 17,1%). As amostras testadas pertenciam a PNH dos gêneros *Callithrix* (84,6%, 95% IC= 79 – 89,2%), *Alouatta* (2,8%, 95% IC= 1,0 – 6,1%), *Callicebus* (1,9%, 95% IC= 0,5 – 4,8%), amostras identificadas como pertencentes à família Cebidae (8,1%, 95% IC= 4,8 – 12,7%), com quatro representante da família identificado como *Sapajus* sp., e cinco amostras sem identificação. As amostras de PNH testadas para OROV/MAYV eram provenientes de 125

municípios de 11 mesorregiões de MG, sendo a maioria (31,1%, 95% IC= 24,8 – 37,8%) da região Metropolitana, seguida das regiões do Triângulo/Alto Paranaíba (19,1%, 95% IC= 14 – 25,1%), Zona da Mata (13,4%, 95% IC= 9 – 18,7%), e da região Sul/Sudeste (10%, 95% IC= 6,3 – 14,9%) (Tabela suplementar 1, ANEXO A). Independente da região de origem das amostras, da área coletada e do gênero pertencente, todas as amostras testadas foram negativas para a presença do RNA de OROV/MAYV.

Anticorpos para OROV foram detectados em PNH do gênero *Sapajus* sp., *Alouatta* sp. e *Callithrix* sp., além disso, OROV foi isolado (2000) de um PNH do gênero *Callithrix* em Minas Gerais (BATISTA *et al.*, 2013; NUNES *et al.*, 2005). Contudo, a participação desses animais no ciclo de transmissão ainda não está clara e, dado o número de casos de infecção por OROV em humanos e a sua manutenção no ciclo de transmissão no Brasil e em outros países da América do Sul onde há uma grande variedade de espécies de PNH, há a necessidade de mais estudos e investigação para se determinar participação dos PNH neotropicais no ciclo de transmissão e possível manutenção do OROV.

O MAYV é mantido na natureza principalmente através de um ciclo enzoótico de transmissão envolvendo vetores mosquitos do gênero *Haemagogus* sp. e hospedeiros vertebrados, incluindo PNH (MACKAY; ARDEN, 2016). Uma das primeiras descrições de PNH acometidos por MAYV no Brasil ocorreu durante um surto da febre de mayaro em Belterra (Pará, 1978), onde foi reportado PNH do gênero *Callithrix* com anticorpos para MAYV (PINHEIRO *et al.*, 1981). Além disso, anticorpos especificados para MAYV foram encontrados em outros gêneros de PNH (*Alouatta seniculus*, *A. villosa*, *Pithecia pithecia*, *Saguinus midas* e *Saimiri* sp.) em países da América do Sul (Guiana Francesa, Guatemala e Panamá) (NUNES *et al.*, 2009; SEYMOUR; PERALTA; MONTGOMERY, 1983). Delatorre e colaboradores mostraram que o mais recente surto de YFV no sudeste do país tenha se originado em Goiás a partir de 2015, onde estavam ocorrendo casos de MAYV (DELATORRE *et al.*, 2019). Tanto YFV como MAYV são transmitidos primariamente pelo vetor silvestre *Haemagogus*, portanto, a presença de vetores competentes e, além disso, de hospedeiros vertebrados, como por exemplo, PNH na região sudeste e em outras regiões do país, gera o risco de emergência deste vírus em outras regiões do Brasil.

Da mesma forma que foi realizado para CHIKV e ZIKV inicialmente neste trabalho, foram testados animais coletados principalmente em áreas rurais e interface urbana/rural, principalmente pelo MAYV e OROV se manterem em uma circulação em ambientes rurais no Brasil. (MACKAY; ARDEN, 2016; SAKKAS *et al.*, 2018). Contudo, todos os PNH testados foram negativos para detecção de genoma de MAYV e OROV, incluindo aqueles coletados

em áreas rurais e urbanas, e aqueles que testaram positivos para RNA de YFV. Contudo, estes resultados não confirmam que estes animais testados não foram infectados por estes vírus podendo ter sobrevivido a esta infecção e gerado imunidade contra os vírus. Para isto, testes posteriores de detecção de anticorpos neutralizantes podem ser utilizados, como PRNT
5 adaptada a partir de macerado de órgãos.

7. CONCLUSÕES

Neste trabalho foi detectada alta taxa de positividade de YFV em PNH no estado do
10 Espírito Santo em 2017 e durante período epidêmico para FA no estado de Minas Gerais. Os resultados aqui obtidos demonstram a extensa circulação do YFV em MG em 2018, incluindo a circulação em áreas urbanas densamente populadas como a região Metropolitana do estado. Além disso, neste trabalho o YFV foi detectado em PNH em 22 municípios onde não houve confirmação pela SES-MG de casos humanos ou de epizootias nos anos de 2018,
15 demonstrando que o YFV circulou de forma ampla e muitas vezes de forma silenciosa em diversos municípios do estado.

Neste trabalho, o YFV foi detectado em amostras de fígado de PNH dos gêneros *Alouatta*, *Callithrix* e representantes da família Cebidae em MG e em PNH dos gêneros *Alouatta*, *Callithrix* e *Callicebus* no ES. Foi observada uma significativa associação entre a
20 proporção de positividade em PNH do gênero *Alouatta* e amostras identificadas como pertencentes à família Cebidae, em MG, demonstrando a alta susceptibilidade das duas espécies a infecções por YFV. Um perfil semelhante de altas taxas de positividade de YFV foi observado para os animais do gênero *Alouatta* coletados no estado do ES em 2017, mostrando a susceptibilidade dos animais deste gênero à infecção por YFV. Além disso, foi observado
25 um gradiente de circulação do YFV do ambiente rural (maior circulação e menores cargas genômicas) para o ambiente urbano (menor circulação e maiores cargas genômicas) em MG, corroborando o caráter silvestre de circulação do vírus no estado.

Em MG em 2019, nenhuma amostra testada neste trabalho foi positiva para detecção de RNA de YFV, independente do gênero, período ou local de coleta da amostra. Além disso,
30 foi detectada uma amostra positiva para RNA de YFV coletada durante período epidêmico para FA em 2020. A amostra de PNH era proveniente de área rural da cidade de Curvelo, na região Central de MG, município com histórico de casos de FA em anos anteriores. Foi identificado que o genoma de YFV nesta amostra de PNH pertence ao mesmo genótipo (Sul

Americano I) circulante no estado durante os surtos de 2017/2018, podendo demonstrar uma manutenção do YFV em MG.

Independente do gênero, do período ou área de coleta, todos os PNH testados foram negativos para detecção de genoma de ZIKV, CHIKV, MAYV e OROV. Contudo, estes resultados não confirmam que os PNH testados não foram infectados por estes vírus podendo ter sobrevivido a esta infecção e adquirido imunidade contra os vírus.

8. PERSPECTIVAS

- Este trabalho tem como perspectiva sua continuidade dentro do Grupo de Prospecção de Arbovírus (GParbo) do LV-UFMG, tendo como objetivo a continuação da prospecção de YFV e outros arbovírus em amostras de PNH coletados no ano de 2021 em Minas Gerais;
- Investigação da infecção de RNA de YFV em diferentes órgãos coletados dos PNH do Espírito Santo (2017) e análise da carga viral;
- Experimentação *in vivo* (camundongos) e padronização do protótipo de PRNT utilizando macerado de órgão;
- Análises sorológicas de anticorpos neutralizantes das amostras negativas para genoma de YFV e outros arbovírus a partir de protótipo de PRNT.

20

25

9. PRODUÇÃO CIENTÍFICA E OUTRAS ATIVIDADES

9.1. Artigos aceitos em periódicos científicos

- 5 1. **Silva***, **N.I.O.**, Sacchetto*, L., de Rezende*, I.M. et al. *Recent sylvatic Yellow fever virus transmission in Brazil: the news from an old disease*. *Virology Journal*, 17, 9 (2020). <https://doi.org/10.1186/s12985-019-1277-7> (ANEXO C);
- 10 2. Sacchetto* L., **Silva*** **N.I.O.**, Rezende I.M.d., Arruda M.S., Costa T.A., de Mello É.M., et al. (2020) *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 Tropical Diseases* 14(10): e0008658. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008658> (ANEXO D);
- 15 3. de Thoisy B., **Silva N.I.O.**, Sacchetto L., de Souza Trindade G., Drumond B.P. (2020) *Spatial epidemiology of yellow fever: Identification of determinants of the 2016-2018 epidemics and at-risk areas in Brazil*. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 14(10): e0008691. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008691> (ANEXO E);
- 20 4. Cardoso F.D., Rezende I.M., Barros E.L.T., Sacchetto L., Garcês T.C.C.S., **Silva N.I.O.**, Alves P.A., Soares J.O., Kroon E.G., Pereira A.C.T.D.C., Drumond B.P., Ferreira G.P. *Circulation of Chikungunya virus East-Central-South Africa genotype during an outbreak in 2016-17 in Piauí State, Northeast Brazil*. *Revista Instituto de Medicina Tropical Sao Paulo*. 2019 Oct 10;61:e57. doi:10.1590/S1678-9946201961057. PMID: 31618377; PMCID: PMC6792355. (ANEXO F).
- 25 5. **Silva N.I.O.**, Oliveira J.S., Kroon E.G., Trindade G.S., Drumond B.P. *Here, There, and Everywhere: The wide host range and geographic distribution of zoonotic orthopoxviruses*. *Viruses* 13 (1):43 (2020). <https://doi.org/10.3390/v13010043>. (ANEXO G).
- 30

9.2. Produção técnica

1. Elaboração e Revisão de Procedimentos Operacionais Padrão para Laboratório de Vírus (UFMG), 2021.

5

9.3. Organização de eventos e congressos

1. VII Simpósio de Microbiologia da UFMG - Conecta SIM. 2020. (evento online).

10

9.4. Orientações

1. Matheus Arruda Soares. Investigação de arbovírus em primatas não humanos no Espírito Santo, 2017. Início: 2019. Iniciação Científica (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Minas Gerais, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior. (Orientador).

15

9.5. Palestras e Entrevistas

1. **SILVA, N. I. O.** Papel dos primatas não-humanos na dinâmica e ecologia de arbovírus no Brasil. Palestra no V Workshop do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Alfenas – PPGCB-UNIFAL-MG, 2020 (evento online);
2. **SILVA, N. I. O.** O impacto de Fake News na divulgação de vacinas no Brasil. UNIBH. Trabalho Acadêmico: Ivan Resende, Belo Horizonte, 2020 (entrevista online).

25

9.6. Revisão de artigos para Periódicos Científicos

1. 2019 – Atual - Periódico: *New Microbes and New Infections*;
2. 2020 – Atual - Periódico: *Journal of Medical Virology*.

30

9.7. Projetos de extensão

1. 2017 – Atual - Assessoria científica sobre viroses emergentes;
2. 2020 – 2021 - Integrante da equipe de Diagnóstico de SARS-CoV-2 do Laboratório de Vírus (UFMG) auxiliando a Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais e Fundação Ezequiel Dias-MG no diagnóstico molecular do SARS-CoV-2 em amostras de pacientes.

9.8. Participação em eventos científicos e cursos de capacitação

1. II Encontro Científico do Laboratório de Vírus Comemoração dos 55 anos - UFMG. 2017;
- 10 2. V Simpósio de Microbiologia – UFMG, Belo Horizonte – MG, 2018;
3. XXIX Congresso de Virologia 2018/XIII Encontro de Virologia do Mercosul, Gramado – RS, 2018;
4. Mesa Redonda: Febre Amarela: Desafios presentes - UFMG, Belo Horizonte – MG, 2018;
5. 55º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical/XXVI Congresso da Sociedade Brasileira de Parasitologia ChagasLeish 2019 - UFMG, Belo Horizonte – MG, 15 2019;
6. Curso de Reciclagem de procedimentos operacionais do Laboratório de Vírus, 2018 – UFMG, Belo Horizonte – MG, 2018;
7. Curso de Reciclagem de procedimentos operacionais do Laboratório de Vírus, 2019 – 20 UFMG, Belo Horizonte – MG, 2019;
8. VI Simpósio de Microbiologia - UFMG, Belo Horizonte – MG, 2019;
9. Encontro: 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 – SP, 2019;
- 25 10. IV Curso de Verão em Bioinformática na UFMG. (Carga horária: 50h). Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Brasil, 2019;
11. XXXI Congresso Brasileiro de Virologia & XV Encontro de Virologia do Mercosul, evento online, 2020;
12. VII Simpósio de Microbiologia da UFMG - Conecta SIM – UFMG, evento online, 2020;
- 30 13. I Meeting of Systematics, Biogeography and Evolution (SBE), evento online, 2020;
14. Darwin Day 2020 – UFMG, evento online, 2020;
15. Manejo clínico da COVID-19 na Atenção Especializada. (Carga horária: 15h). UFMG/UNA-SUS, UFMG/UNA-SUS, Brasil. (curso online);

16. Workshop de Produção de Mapas e Geoprocessamento. ClickGeo - Cursos de Geotecnologias, CG, Brasil. (curso online);
17. COVID-19: TACKLING THE NOVEL CORONAVIRUS. (Carga horária: 12h). London School of Hygiene & Tropical Medicine and UK Public Health Rapid ST, LSHTM/UK-PHRST, Inglaterra (curso online);
18. Doenças ocasionadas por vírus respiratórios emergentes, incluindo o COVID-1. (Carga horária: 4h). Fundação Oswaldo Cruz - Brasília, FIOCRUZ, Brasil. (curso online);
19. PLAGUES, PESTILENCE AND PANDEMICS: ARE YOU READY? (Carga horária: 6h). Griffith University, GRIFFITH, Austrália. (curso online);
20. BSL 2-3 Training Course – UTMB, evento online, 2021.

9.9. Resumos publicados em anais de eventos científicos

1. **Silva, N. I. O.**¹; Arruda, M. S.¹; Nodari, J. Z.²; Ferreira, J. M.²; Silveira, M. T.²; Kroon, E. G.¹; Trindade, G. S.¹; Mendes, S. L.²; Drumond, B. P.¹. *Detecção molecular do vírus da febre amarela em primatas não humanos no estado do Espírito Santo*. V Simpósio de Microbiologia – UFMG, Belo Horizonte – MG, 2018.
2. Cruz, A.L.C.; **Silva, N.I.O.**; Costa, T.A.; Arruda, M.S.; Mota, R.N.; Gama, F.E.N.; Silva, S. A.; Costa, M.A.; Mello, É.M.; Kroon, E.G.; Trindade, G.S.; Drumond, B.P. *Investigação molecular do vírus da febre amarela em Brumadinho, região Metropolitana de Belo Horizonte, Minas Gerais, durante o surto de 2018*. V Simpósio de Microbiologia – UFMG, Belo Horizonte – MG, 2018.
3. Sacchetto, L.; **Silva, N. I. O.**; Rezende, I. M.; Costa, T. A.; Arruda, M. S.; Cruz, A. L. C.; Trindade, G. S.; De Thoisy, B.; Drumond, B. P. *Circulação do vírus da febre amarela em primatas não humanos no sudeste do Brasil, de 2016 a 2018*. V Simpósio de Microbiologia – UFMG, Belo Horizonte – MG, 2018.
4. Talita Bastos Machado, Ana Cláudia dos Santos Pereira Andrade, Fábio Pio Dornas, Paula Eillanny Silva Marinho, Erik Vinicius de Sousa Reis, **Natalia Ingrid Oliveira da Silva**, Isabella Luiza Martins de Aquino, Diogo Corrêa Mendonça, Betânia Paiva Drumond, P. *Prospecção de vírus gigantes em biomas brasileiros*. V Simpósio de Microbiologia – UFMG, Belo Horizonte – MG, 2018.

- 5 **5. Silva, Natalia Ingrid Oliveira da**¹; Arruda, Matheus Soares¹; Nodari, Joana Zorzal²; Ferreira, Juliana Modenesi²; Silveira, Matheus Torrezani²; Abrahão, Jônatas Santos¹; Bonjardim, Cláudio Antônio¹; Kroon, Erna Geessien¹; Trindade, Giliane de Souza¹; Mendes, Sérgio Lucena²; Drumond, Betânia Paiva¹. *Detection of Yellow fever virus in non-human primates in Espírito Santo state*. XXIX Congresso de Virologia 2018/XIII Encontro de Virologia do Mercosul, Gramado – RS, 2018.
- 10 **6. Ana Luiza Campos Cruz**^{1*}, **Natalia Ingrid Oliveira Silva**^{1*}, Thais Alkifeles Costa¹, Matheus Soares Arruda¹, Renato Nogueira Mota², Equipe LZ00N-BH³, Érica Munhoz de Mello⁴, Erna G. Kroon¹, Giliane de Souza Trindade¹, Betânia Paiva Drumond¹. *Investigation of Yellow fever virus in Brumadinho, metropolitan region of Minas Gerais, during the 2018 outbreak*. XXIX Congresso de Virologia 2018/XIII Encontro de Virologia do Mercosul, Gramado – RS, 2018.
- 15 **7. Lívia Sacchetto; Natalia Ingrid Oliveira Silva;** Izabela Maurício de Rezende; Thaís Alkifeles Costa; Matheus Soares Arruda; Ana Luiza Campos Cruz; Giliane de Souza Trindade; Benoit De Thoisy; Betânia Paiva Drumond. *Yellow fever in non-human primates from urban and peri-urban areas: Brazil, 2016/2018*. Congresso de Virologia 2018/XIII Encontro de Virologia do Mercosul, Gramado – RS, 2018.
- 20 **8. Natalia Ingrid Oliveira Silva**^{1*}, Lívia Sacchetto^{1*}, Izabela Maurício de Rezende¹, Matheus Soares Arruda¹, Thaís Alkifeles Costa¹, Érica Munhoz de Mello², Gabriela Fernanda Garcia Oliveira¹, Ana Luiza Campos Cruz¹, Fernando Perini¹, Adriano P. Págliã¹, Alaine I. A. Prado¹, Rodolfo G. A. V. Stump¹, Rodrigo L. Massara¹, Ana M. O. Pascoal¹, Erika P. Teixeira³, Cecília Barreto³, Daniel A. R. Vilela³, Laerciana S. S. Matos³, Pedro Augusto Alves⁴, Benoit de Thoisy⁵, Erna Geessien Kroon¹, Giliane de Souza Trindade¹, Betânia Paiva Drumond¹. *Detection of Yellow fever virus in non-human primates from urban and periurban areas of Minas Gerais, Brazil: a potential risk for urban transmission cycle?* 55º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical/XXVI Congresso da Sociedade Brasileira de Parasitologia ChagasLeish 2019, Belo Horizonte – MG, 2019.
- 25 **9. Matheus Soares Arruda**^{1*}, **Natalia Ingrid Oliveira Silva**^{1*}, Lívia Sacchetto¹, Izabela Maurício de Rezende¹, Thaís Alkifeles Costa¹, Érica Munhoz de Mello², Erna Geessien Kroon¹, Giliane de Souza Trindade¹, Betânia Paiva Drumond¹. *Investigação de Mayaro vírus e Oropouche vírus em primatas não humanos do estado de Minas Gerais?* 55º Congresso da

Sociedade Brasileira de Medicina Tropical/XXVI Congresso da Sociedade Brasileira de Parasitologia ChagasLeish 2019, Belo Horizonte – MG, 2019

- 5 **10. Natalia Ingrid Oliveira Silva¹**, Matheus Soares Arruda¹, Thaís Alkifeles Costa¹, Érica Munhoz de Mello², Pedro Augusto Alves³, Benoit de Thoisy⁵, Erna Geessien Kroon¹, Giliane de Souza Trindade¹, Betânia Paiva Drumond¹. Detecção do vírus da febre amarela (YFV) em primatas não humano em áreas urbanas e periurbanas, Minas Gerais – Brasil: potencial risco de ciclo urbano de transmissão? VI Simpósio de Microbiologia – UFMG, Belo Horizonte – MG, 2019.
- 10 **11. Matheus Soares Arruda^{1*}**, **Natalia Ingrid Oliveira Silva^{1*}**, Livia Sacchetto¹, Izabela Maurício de Rezende¹, Thaís Alkifeles Costa¹, Érica Munhoz de Mello², Erna Geessien Kroon¹, Giliane de Souza Trindade¹, Betânia Paiva Drumond¹. *Investigação de Mayaro vírus e Oropouche vírus em primatas não humanos do estado de Minas Gerais?* VI Simpósio de Microbiologia – UFMG, Belo Horizonte – MG, 2019.
- 15 **12. Matheus Soares Arruda^{1*}**, **Natalia Ingrid Oliveira Silva^{1*}**, Joana Zorzal Nodari², Juliana Modenesi Ferreira², Matheus Torrezani Silveira², Sergio Lucena Mendes², Erna Geessien Kroon¹, Giliane de Souza Trindade¹, Betania Paiva Drumond¹. *Dynamics of Yellow fever virus infection in non-human primates in Espírito Santo state, Brazil (2017)*. XXXI Brazilian Congress of Virology & XV MERCOSUL VIROLOGY MEETING, Online meeting, 2020.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELNABI, Rana; NEYTS, Johan; DELANG, Leen. *Chikungunya virus infections: time to act, time to treat. Current Opinion in Virology*. [S.l.: s.n.]. , 2017
- 5 ABREU, Filipe Vieira Santos De *et al.* Combination of surveillance tools reveals that Yellow Fever virus can remain in the same Atlantic Forest area at least for three transmission seasons. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 114, n. 1, p. e190076, 2019.
- AGOSTINI, I.; HOLZMANN, I.; DI BITETTI, M. S. Infant hybrids in a newly formed mixed-species group of howler monkeys (*Alouatta guariba clamitans* and *Alouatta caraya*) in
10 northeastern Argentina. *Primates*, v. 49, n. 4, p. 304–307, 2008.
- ALENCAR, Jeronimo *et al.* Immature mosquitoes (Diptera: Culicidae) in a eutrophic landfill tank from State of Rio de Janeiro, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 46, n. 6, p. 769–771, nov. 2013. Disponível em:
15 <<http://www.scielo.br/j/rsbmt/a/TtndJ7xV3zHhHHWSFFqK49H/abstract/?lang=en>>. Acesso em: 8 jul. 2021.
- ALMEIDA, Marco A.B. *et al.* Surveillance for Yellow Fever Virus in Non-Human Primates in Southern Brazil, 2001-2011: A Tool for Prioritizing Human Populations for Vaccination. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 8, n. 3, 2014.
- ANDERSON, C. R. *et al.* Mayaro virus: a new human disease agent. II. Isolation from blood
20 of patients in Trinidad, B.W.I. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 1957.
- ANDERSON, C. R. *et al.* Oropouche virus: a new human disease agent from Trinidad, West Indies. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 1961.
- APANDI, Y. *et al.* The first isolation of chikungunya virus from non-human primates in Malaysia. *Journal of General and Molecular Virology*, 2009.
- 25 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*, v. 20, n. 4, p. 527–536, 2011.
- ATLÂNTICA, FUNDAÇÃO S.O.S MATA. *Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica período 2015-2016*. Disponível em: <<http://mapas.sosma.org.br>>. Acesso em: 1 out.
30 2019.
- AUGUSTE, A. J. *et al.* Enzootic Transmission of Yellow Fever Virus, Venezuela. *Emerging Infectious Diseases*, v. 21, n. 1, p. 99–102, 2015.
- AZEVEDO, Raimunda S.S. *et al.* Mayaro fever virus, Brazilian amazon. *Emerging Infectious Diseases*, 2009.
- 35 BALFOUR, Andrew. The Wild Monkey As a Reservoir for the Virus of Yellow Fever. *The Lancet*, v. 183, n. 4730, p. 1176–1178, 1914.
- BARR, Kelli L. *et al.* Working with Zika and Usutu Viruses In Vitro. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2016.
- BATISTA, Paulo Mira *et al.* Detection of arboviruses of public health interest in free-living

New World primates (*Sapajus* spp.; *Alouatta caraya*) captured in Mato Grosso do Sul, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 46, n. 6, p. 684–690, 2013.

5 BATISTA, Paulo Mira *et al.* Seroepidemiological monitoring in sentinel animals and vectors as part of arbovirus surveillance in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 2012.

BHATT, Samir *et al.* The global distribution and burden of dengue. v. 496, n. 7446, p. 504–507, 2013.

10 BICCA-MARQUES, Júlio César; FREITAS, David Santos De. Conservation letter The role of monkeys, mosquitoes, and humans in the occurrence of a yellow fever outbreak in a fragmented landscape in south Brazil: protecting howler monkeys is a matter of public health. *Access*, v. 3, n. 1, p. 78–89, 2010.

BIRD, Brian H.; MAZET, Jonna A.K. Detection of Emerging Zoonotic Pathogens: An Integrated One Health Approach. *Annual Review of Animal Biosciences*, 2018a.

15 BIRD, Brian H.; MAZET, Jonna A.K. Detection of Emerging Zoonotic Pathogens: An Integrated One Health Approach. *Annual Review of Animal Biosciences*, v. 6, n. 1, p. annurev-animal-030117-014628, 2018b. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-animal-030117-014628>>.

20 BLAIR, C. D.; ADELMAN, Z. N.; OLSON, K. E. Molecular strategies for interrupting arthropod-borne virus transmission by mosquitoes. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 13, n. 4, p. 651–661, 2000.

BONALDO, Myrna C.; GÓMEZ, Mariela Martínez; DOS SANTOS, Alexandre A.C.; *et al.* Genome analysis of yellow fever virus of the ongoing outbreak in Brazil reveals polymorphisms. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2017.

25 BONALDO, Myrna C; GÓMEZ, Mariela Martínez; AC, Alexandre; *et al.* Genome analysis of yellow fever virus of the ongoing outbreak in Brazil reveals polymorphisms. v. 112, n. June, p. 447–451, 2017.

BRÈS, P. L. J. A century of progress in combating yellow fever. *Bulletin of the World Health Organization*, v. 64, n. 6, p. 775–786, 1986.

30 BRIESE, Thomas; CALISHER, Charles H.; HIGGS, Stephen. Viruses of the family Bunyaviridae: Are all available isolates reassortants? *Virology*, v. 446, n. 1–2, p. 207–216, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2013.07.030>>.

35 BRITO, Anderson Fernandes *et al.* Lying in wait: the resurgence of dengue virus after the Zika epidemic in Brazil. *Nature Communications*, v. 12, n. 1, p. 2619, 11 dez. 2021. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41467-021-22921-7>>. Acesso em: 12 maio 2021.

BRUNINI, Sandra *et al.* High frequency of mayaro virus IgM among febrile patients, central Brazil. *Emerging Infectious Diseases*. [S.l.: s.n.], 2017

40 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*, v. 3, n. 5, p. e75, 2007.

- BUECHLER, Connor R. *et al.* Seroprevalence of Zika Virus in Wild African Green Monkeys and Baboons. *mSphere*, v. 2, n. 2, p. 1–7, 2017.
- BUENO, M. G. *et al.* Animals in the Zika Virus Life Cycle: What to Expect from Megadiverse Latin American Countries. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 10, n. 12, p. 1–13, 2016.
- BURT, Felicity J. *et al.* Chikungunya: A re-emerging virus. *The Lancet*, v. 379, n. 9816, p. 662–671, 2012. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60281-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60281-X)>.
- BUSTIN, Stephen A. *et al.* The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, v. 55, n. 4, p. 611–622, 2009.
- 10 CAICEDO, Edgar-Yaset *et al.* The epidemiology of Mayaro virus in the Americas: A systematic review and key parameter estimates for outbreak modelling. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 15, n. 6, p. e0009418, 3 jun. 2021. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0009418>>. Acesso em: 6 jun. 2021.
- 15 CARDOSO, Belgath Fernandes *et al.* Detection of oropouche virus segment s in patients and in culex quinquefasciatus in the state of mato grosso, Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 110, n. 6, p. 745–754, 2015.
- CARDOSO, C. W. *et al.* Outbreak of Exanthematous Illness associated with Zika, Chikungunya, and Dengue viruses, Salvador, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*. [S.l.]: Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26584464/>>. Acesso em: 12 maio 2021. , 1 dez. 2015
- 20 CARMEN ROIG, Bioq *et al.* Estudio de Fiebre Amarilla en primates en áreas de brote de los departamentos de San Pedro y Central del Paraguay Study of Yellow Fever in primates in outbreaks areas of the departments of San Pedro and Central in Paraguay. *Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud*, v. 7, n. 1, p. 40–45, 2009.
- 25 CASALS, J.; WHITMAN, L. Mayaro virus: a new human disease agent. I. Relationship to other arbor viruses. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 1957.
- CAUSEY, O. R.; MAROJA, O. M. Mayaro virus: a new human disease agent. III. Investigation of an epidemic of acute febrile illness on the river Guama in Par??, Brazil, and isolation of Mayaro virus as causative agent. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 1957.
- 30 CBN VITÓRIA. Chance da febre amarela voltar ao ES é pequena, diz especialista. Vitória, 2021. Disponível em: <<https://www.cbnavitoria.com.br/reportagens/2020/01/chance-da-febre-amarela-voltar-ao-es-e-pequena-diz-especialista-1014202686.html>>.
- CHARLIER, Caroline *et al.* Arboviruses and pregnancy: maternal, fetal, and neonatal effects. *Review Lancet Child Adolesc Health*, v. 1, p. 134–180, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/>>. Acesso em: 12 maio 2021.
- 35 COIMBRA, Terezinha Lisieux Moraes *et al.* Molecular characterization of two Rocio flavivirus strains isolated during the encephalitis epidemic in São Paulo State, Brazil and the development of a one-step RT-PCR assay for diagnosis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, v. 50, n. 2, p. 89–94, 2008.
- 40 COLLIAS, N.; SOUTHWICK, C. A Field Study of Population Density and Social

- Organization in Howling Monkeys. *American Philosophical Society*, v. 96, n. 2, p. 143–156, 1952.
- CORAS, Brigitte *et al.* Cowpox and a cat. *Lancet*, v. 365, p. 446, 2005.
- 5 CUNHA, M. S. *et al.* Epizootics due to Yellow Fever Virus in São Paulo State, Brazil: viral dissemination to new areas (2016–2017). *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, p. 1–13, 2019.
- CUNHA, Marcela S. *et al.* *Chikungunya Virus: An Emergent Arbovirus to the South American Continent and a Continuous Threat to the World. Frontiers in Microbiology*. [S.l.]: Frontiers Media S.A. Disponível em: </pmc/articles/PMC7332961/>. Acesso em: 23 maio 2021. , 26 jun. 2020
- 10 CUNHA, Mariana Sequetin *et al.* Epizootics due to Yellow Fever Virus in São Paulo State, Brazil: viral dissemination to new areas (2016–2017). *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, p. 1–13, 2019.
- DA COSTA, Vivaldo Gomes *et al.* Silent emergence of Mayaro and Oropouche viruses in humans in Central Brazil. *International Journal of Infectious Diseases*, v. 62, p. 84–85, 2017.
- 15 Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2017.07.016>.
- DAVIS, N. C. The Transmission of Yellow Fever: Experiments with the “Woolly Monkeys” (*Lagothrix Lagotricha* Humboldt), the “Spider Monkey” (*Ateles Ater* F. Cuvier), and the “Squirrel Monkey” (*Saimiri Scireus* Linnaeus)*. *Journal of Experimental Medicine*, v. 51, n. 5, p. 703–721, 1931.
- 20 DAVIS, N. C.; SHANNON, R. C.b. Studies on South American Yellow Fever III. Transmission of the Virus to Brazilian Monkeys Preliminary Observations. *Journal of Experimental Medicine*, v. 4, n. 4, p. 81–85, 1929.
- DE ABREU, Filipe Vieira Santos *et al.* *Haemagogus leucocelaenus* and *Haemagogus janthinomys* are the primary vectors in the major yellow fever outbreak in Brazil, 2016–2018.
- 25 *Emerging Microbes and Infections*, 2019.
- DE ALMEIDA, M. A. B. *et al.* Yellow fever outbreak affecting *Alouatta* populations in southern Brazil (Rio Grande do Sul State), 2008-2009. *American Journal of Primatology*, v. 74, n. 1, p. 68–76, 2012.
- 30 DE ALMEIDA, Marco Antônio Barreto *et al.* Yellow fever outbreak affecting *Alouatta* populations in southern Brazil (Rio Grande do Sul State), 2008-2009. *American Journal of Primatology*, v. 74, n. 1, p. 68–76, 2012.
- DE OLIVEIRA, Jaqueline Silva *et al.* Vaccinia virus natural infections in Brazil: The good, the bad, and the ugly. *Viruses*, v. 9, n. 11, 2017.
- 35 DE REZENDE, Izabela Maurício *et al.* Yellow fever virus genotyping tool and investigation of suspected adverse events following yellow fever vaccination. *Vaccines*, v. 7, n. 4, p. 206, 1 dez. 2019. Disponível em: <www.mdpi.com/journal/vaccines>. Acesso em: 24 maio 2021.
- DE THOISY, B. *et al.* Spatial epidemiology of yellow fever: Identification of determinants of the 2016-2018 epidemics and at-risk areas in Brazil. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 14, n. 10, p. 1–22, 1 out. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008691>.
- 40 Acesso em: 12 maio 2021.

- DE THOISY, B.; DUSSART, P.; KAZANJI, M. Wild terrestrial rainforest mammals as potential reservoirs for flaviviruses (yellow fever, dengue 2 and St Louis encephalitis viruses in French Guiana. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 98, n. 7, p. 409–412, 2004.
- 5 DE THOISY, Benoît *et al.* Mayaro virus in wild mammals, French Guiana. *Emerging Infectious Diseases*, v. 9, n. 10, p. 1326–1329, 2003.
- DELATORRE, Edson *et al.* Distinct YFV Lineages Co-circulated in the Central-Western and Southeastern Brazilian Regions From 2015 to 2018. *Frontiers in Microbiology*, v. 10, n. May, p. 1–12, 2019.
- 10 DIALLO, Mawlouth *et al.* Vectors of Chikungunya virus in Senegal: Current data and transmission cycles. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1999.
- DICK, G. W.A. Zika Virus (I). Isolations and serological specificity. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 1952.
- DIXON, K. E. *et al.* Oropouche virus. II. Epidemiological observations during an epidemic in
15 Santarem, Para, Brazil in 1975. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1981.
- DOMINGO, Cristina *et al.* Advanced yellow fever virus genome detection in point-of-care facilities and reference laboratories. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 50, n. 12, p. 4054–4060, 2012.
- DOMINGO, Cristina *et al.* *Yellow fever in the diagnostics laboratory review-article*.
20 *Emerging Microbes and Infections*. [S.l.]: Nature Publishing Group. Disponível em: </pmc/articles/PMC6043483/>. Acesso em: 26 maio 2021. , 1 dez. 2018
- DONALISIO, Maria Rita; FREITAS, André Ricardo Ribas; ZUBEN, Andrea Paula Bruno Von. Arboviruses emerging in Brazil: challenges for clinic and implications for public health. *Revista de saude publica*, v. 51, p. 30, 2017.
- 25 DOUAM, Florian; PLOSS, Alexander. Yellow Fever Virus: Knowledge Gaps Impeding the Fight Against an Old Foe. *Trends in Microbiology*, p. 1–16, 2018.
- DRUMMOND, Alexei J. *et al.* Estimating mutation parameters, population history and genealogy simultaneously from temporally spaced sequence data. *Genetics*, 2002.
- DRUMMOND, Alexei; PYBUS, Oliver G.; RAMBAUT, Andrew. *Inference of Viral*
30 *Evolutionary Rates from Molecular Sequences*. *Advances in Parasitology*. [S.l.: s.n.]. , 2003
- DUFFY, Mark R. *et al.* Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *New England Journal of Medicine*, v. 360, n. 24, p. 2536–2543, 2009.
- DUNN, Jacob; CRISTÓBAL-AZKARATE, Jurgi. *New World Monkeys*.
- ENGELMANN, Flora *et al.* Pathophysiologic and Transcriptomic Analyses of Viscerotropic
35 Yellow Fever in a Rhesus Macaque Model. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 8, n. 11, 2014.
- ESHOJE, Espírito Santo Hoje. Metas de cobertura vacinal não são atingidas no Espírito Santo desde 2019. Espírito Santo, 2020. Disponível em: <<https://eshoje.com.br/metas-de-cobertura-vacinal-nao-sao-atingidas-no-espírito-santo-desde-2019/>>.

- ESPOSITO, Danilo Lucas Alves; FONSECA, Benedito Antonio Lopes Da. Will Mayaro virus be responsible for the next outbreak of an arthropod-borne virus in Brazil? *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 21, n. 5, p. 540–544, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bjid.2017.06.002>>.
- 5 ESSBAUER, Sandra; PFEFFER, Martin; MEYER, Hermann. Zoonotic poxviruses. *Veterinary Microbiology*, v. 140, n. 3–4, p. 229–236, 2010.
- FAILLOUX, Anna Bella *et al.* Surveillance of Arthropod-Borne Viruses and Their Vectors in the Mediterranean and Black Sea Regions Within the MediLabSecure Network. *Current Tropical Medicine Reports*, v. 4, n. 1, p. 27–39, 2017.
- 10 FARIA, N. R. *et al.* Establishment and cryptic transmission of Zika virus in Brazil and the Americas. *Nature*, 2017.
- FARIA, N. R.; KRAEMER, M. U.G.; HILL, S. C.; DE JESUS, J. Goes; *et al.* Genomic and epidemiological monitoring of yellow fever virus transmission potential. *Science*, v. 361, n. 6405, p. 894–899, 2018.
- 15 FARIA, N. R.; KRAEMER, M. U. G.; HILL, S. C.; GOES DE JESUS, J.; *et al.* Genomic and epidemiological monitoring of yellow fever virus transmission potential. *Science*, v. 361, n. 6405, p. 894–899, ago. 2018.
- FARIA, Nuno Rodrigues *et al.* Zika virus in the Americas : Early epidemiological and genetic findings. *Science*, v. 352, n. 6283, p. 345–349, 2016.
- 20 FAVORETTO, Silvana *et al.* First detection of Zika virus in neotropical primates in Brazil: a possible new reservoir. *bioRxiv*. [S.l: s.n.], 2016.
- FAYE, Oumar *et al.* Molecular Evolution of Zika Virus during Its Emergence in the 20th Century. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2014.
- FENNER, Frank. Adventures with poxviruses of vertebrates. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 25, n. 2, p. 123–133, 2000.
- FENNER, Frank. The Poxviruses. In: GIBBS, A. (Org.). *Portraits of Viruses. A History of Virology*. [S.l.]: Basil, Karger, 1988. p. 1–23.
- FERNANDES, Natália C.C. de Azevedo *et al.* Differential Yellow Fever Susceptibility in New World Nonhuman Primates, Comparison with Humans, and Implications for Surveillance - Volume 27, Number 1—January 2021 - Emerging Infectious Diseases journal - CDC. *Emerging Infectious Diseases*, v. 27, n. 1, p. 47–56, 1 jan. 2021. Disponível em: <https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/27/1/19-1220_article>. Acesso em: 7 jul. 2021.
- 30 FERNANDES, Rosilainy S. *et al.* Low vector competence in sylvatic mosquitoes limits Zika virus to initiate an enzootic cycle in South America. *Scientific Reports 2019 9:1*, v. 9, n. 1, p. 1–7, 27 dez. 2019. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41598-019-56669-4>>. Acesso em: 10 jul. 2021.
- FIGUEIREDO, L. T. M. Viroses emergentes no Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 40, n. 2, p. 224–229, 2007.
- FIGUEIREDO, P. O. *et al.* Detection and Molecular Characterization of Yellow Fever Virus, 40 2017, Brazil. *EcoHealth*, v. 15, n. 4, p. 864–870, 2018.

- FISCHER, Marc; STAPLES, J Erin. Morbidity and Mortality Weekly Report Chikungunya Virus Spreads in the Americas-Caribbean and South America, 2013-2014. v. 63, n. 22, p. 2013–2014, 2014. Disponível em: <<http://wwwnc.cdc.gov/>>.
- 5 FONSECA, B. A. L.; FIGUEIREDO, L. T. M. Febre Amarela. In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R (Org.). . *Tratado de Infectologia*. São Paulo: Atheneu, 1996. p. 251–257.
- FORATTINI, O P. *Culicidologia Médica - Identificação, biologia e epidemiologia*. [S.l.: s.n.], 2002.
- FOY, Brian D. *et al.* Probable Non-Vector-borne Transmission of Zika Virus, Colorado, USA. *Emerging Infectious Diseases*, 2011.
- 10 FRANCO, Odair. *História da Febre Amarela do Brasil*.
- FREELAND, W. J. Pathogens and the Evolution of Primate Sociality. *Biotropica*, 1976.
- G1PI. Teresina registra 1ª infecção pelo vírus Oropouche, transmitido por mosquitos. Teresina, 2021. Disponível em: <<https://g1.globo.com/pi/piaui/noticia/2021/04/28/teresina-registra-1a-infeccao-pelo-virus-oropouche-transmitido-por-mosquitos.ghtml>>.
- 15 GALINDO, Pedro; CARPENTER, Stanley J.; TRAPIDO, Harold. A Contribution to the Ecology and Biology of Tree Hole Breeding Mosquitoes of Panama1. *Annals of the Entomological Society of America*, v. 48, n. 3, p. 158–164, 1 maio 1955.
- GIBB, Rory *et al.* Zoonotic host diversity increases in human-dominated ecosystems. *Nature*, v. 584, n. 7821, p. 398–402, 2020a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41586-020-2562-8>>.
- 20 GIBB, Rory *et al.* Zoonotic host diversity increases in human-dominated ecosystems. *Nature*, v. 584, n. 7821, p. 398–402, 20 ago. 2020b. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41586-020-2562-8>>. Acesso em: 12 maio 2021.
- GIOVANETTI, Marta *et al.* Yellow Fever Virus Reemergence and Spread in Southeast Brazil, 2016–2019. *Journal of Virology*, v. 94, n. 1, 9 out. 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31597773/>>. Acesso em: 27 maio 2021.
- 25 GIRARD, Marc *et al.* Arboviruses: A global public health threat. 19 maio 2020, [S.l.]: Elsevier Ltd, 19 maio 2020. p. 3989–3994. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31597773/>>. Acesso em: 12 maio 2021.
- 30 GOLDANI, Luciano Z. Yellow fever outbreak in Brazil, 2017. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 21, n. 2, p. 123–124, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bjid.2017.02.004>>.
- GÓMEZ, Mariela Martínez *et al.* Genomic and structural features of the yellow fever virus from the 2016–2017 Brazilian outbreak. *Journal of General Virology*, v. 99, n. 4, p. 536–548, abr. 2018.
- 35 GONÇALVES, Denise *et al.* Immunocompetent mice model for dengue virus infection. *TheScientificWorldJournal*, v. 2012, p. 525947, 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3362018&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

- GRIFFIN, E. D. Alphaviruses. In: KNIPE DM, HOWLEY PM, GRIFFIN DE, EDITORS (Org.). . *Field's virology - vol 2*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2013. .
- GROVES†, Colin. Primate taxonomy. *The International Encyclopedia of Biological Anthropology*. [S.l.]: John Wiley & Sons, Inc., 2018. p. 1–6. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/9781118584538.ieba0405>>. Acesso em: 13 maio 2021.
- GUBLER, Duane J. Arboviral Diseases. *Archives of Medical Research*, v. 33, p. 330–342, 2002.
- GUBLER, Duane J. The Global Threat of Emergent/Re-emergent Vector-Borne Diseases. *Vector Biology, Ecology and Control*. [S.l.]: Springer, 2010a. p. 39–62.
- GUBLER, Duane J. The Global Threat of Emergent/Re-emergent Vector-Borne Diseases BT - Vector Biology, Ecology and Control. In: ATKINSON, PETER W (Org.). . Dordrecht: Springer Netherlands, 2010b. p. 39–62. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-90-481-2458-9_4>.
- GUBLER, Duane J; VASILAKIS, Nikos; MUSSO, Didier. History and Emergence of Zika Virus. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 216, n. suppl_10, p. S860–S867, 16 dez. 2017. Disponível em: <https://academic.oup.com/jid/article/216/suppl_10/S860/4753677>. Acesso em: 10 jul. 2021.
- GUTH, Sarah *et al.* Ecological processes underlying the emergence of novel enzootic cycles: Arboviruses in the neotropics as a case study. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 14, n. 8, p. 1–22, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0008338>>.
- HADDADEEN, C. *et al.* A case of cowpox virus infection in the UK occurring in a domestic cat and transmitted to the adult male owner. *British Journal of Dermatology*, v. 19319, p. 19319, 2020.
- HADDOW, A. J. A review of the results of yellow fever protection-tests on the sera of primates from kenya. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, v. 46, n. 2, p. 135–143, 1952.
- HANLEY, Kathryn A. *et al.* Fever versus fever: The role of host and vector susceptibility and interspecific competition in shaping the current and future distributions of the sylvatic cycles of dengue virus and yellow fever virus. *Infection, Genetics and Evolution*, 2013.
- HERVÉ, J.-P.; TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A. Ecologia da febre amarela no Brasil. *Revista da Fund. S. E. S. P. , Rio de Janeiro*, v. 28 (1), p. 11–19, 1983.
- HILL, Sarah C. *et al.* Genomic surveillance of yellow fever virus epizootic in São Paulo, Brazil, 2016 – 2018. *PLoS Pathogens*, v. 16, n. 8, p. 1008699, 7 ago. 2020. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1008699>>. Acesso em: 19 maio 2021.
- HOCH, A. L. *et al.* An outbreak of Mayaro virus disease in Belterra, Brazil. III. Entomological and ecological studies. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1981.
- HOCH, A. L.; ROBERTS, D. R.; PINHEIRO, F. D. Breeding sites of *Culicoides paraensis* and options for control by environmental management. *Bulletin of the Pan American Health*

Organization, 1986.

HOLLAND, John; DOMINGO, Esteban. Origin and Evolution of Viruses - Springer. *Virus Genes*, v. 16, n. 1, p. 13–21, 1998. Disponível em:

<<http://link.springer.com/10.1023/A:1007989407305%5Cnpapers3://publication/doi/10.1023/A:1007989407305>>.

HOLZMANN, Ingrid *et al.* Impact of yellow fever outbreaks on two howler monkey species (*Alouatta guariba clamitans* and *A. caraya*) in Misiones, Argentina. *American Journal of Primatology*, v. 72, n. 6, p. 475–480, 2010.

HUBÁLEK, Zdenek; RUDOLF, Ivo; NOWOTNY, Norbert. *Arboviruses pathogenic for domestic and wild animals*. [S.l.: s.n.], 2014. v. 89.

IBGE. *Panomara Populacional Espírito Santo*. Disponível em:

<<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/es/panorama>>. Acesso em: 1 out. 2019a.

IBGE. *Panorama Populacional Minas Gerais*. Disponível em:

<<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/mg/panorama>>. Acesso em: 1 out. 2019b.

ICTV, International Committee on Taxonomy of Viruses. *Positive-sense RNA Viruses - Flaviviridae*. Disponível em: <https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/flaviviridae/360/genus-flavivirus>. Acesso em: 13 maio 2021.

IUCN. *THE IUCN RED LIST OF THREATENED SPECIES*. Disponível em:

<www.iucnredlist.org>. Acesso em: 1 out. 2019.

IUCN, International Union for Conservation of Nature Natural Resources. *THE IUCN RED LIST OF THREATENED SPECIES*. Disponível em: <www.iucnredlist.org>. Acesso em: 16 maio 2021.

JOAS, Simone *et al.* Species-specific host factors rather than virus-intrinsic virulence determine primate lentiviral pathogenicity. *Nature Communications*, v. 9, n. 1, p. 1371, 2018. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41467-018-03762-3>>.

JORGE, Taissa Ricciardi *et al.* Isolation and characterization of a Brazilian strain of yellow fever virus from an epizootic outbreak in 2009. *Acta Tropica*, v. 166, p. 114–120, 1 fev. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27818122/>>. Acesso em: 5 jul. 2021.

KADING, Rebekah C.; BRAULT, Aaron C.; BECKHAM, J. David. *Global perspectives on arbovirus outbreaks: a 2020 snapshot*. *Tropical Medicine and Infectious Disease*. [S.l.]: MDPI AG. Disponível em: <www.mdpi.com/journal/tropicalmed>. Acesso em: 12 maio 2021. , 7 set. 2020

KARABATSOS, N. International catalogue of arboviruses including certain other viruses of vertebrates. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene J. Trop. Med. Hyg*, v. 3th ed, 1985.

KOWALEWSKI, Martin M. *et al.* Black and gold howler monkeys (*Alouatta caraya*) as sentinels of ecosystem health: Patterns of zoonotic protozoa infection relative to degree of human-primate contact. *American Journal of Primatology*, v. 73, n. 1, p. 75–83, 2011.

KUMAR, Sudhir; STECHER, Glen; TAMURA, Koichiro. MEGA7: Molecular Evolutionary

Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular biology and evolution*, 2016.

KUMM, H. W.; LAEMMERT JR., H. W. The Geographical Distribution of Immunity to Yellow Fever among the Primates of Brazil¹. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. s1-30, n. 5, p. 733–748, 1950.

- 5 KUNIN, V. *et al.* A Bioinformatician's Guide to Metagenomics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 72, n. 4, p. 557–578, 2008.

LAEMMERT JR., H. W.; KUMM, H. W. The Susceptibility of Howler Monkeys to Yellow Fever Virus¹. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. s1-30, n. 5, p. 723–731, 1950.

- 10 LAEMMERT JR, H. W.; FERREIRA, L. C.; TAYLOR, R. M. An epidemiological Study of jungle yellow fever in a endemic area in Brazil. Part II – Investigations of vertebrate hosts and arthropod vectors. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. s1-26, n. 6_Suppl2, p. 23–69, 1946.

- 15 LANCIOTTI, Robert S. *et al.* Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerging Infectious Diseases*, v. 14, n. 8, p. 1232–1239, 2008.

- LANCIOTTI, Robert S. *et al.* *Phylogeny of zika virus in western Hemisphere, 2015. Emerging Infectious Diseases*. [S.l.]: Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0003852>>. Acesso em: 23 maio 2021.
20 , 1 maio 2016

LEAL, Silvana Gomes *et al.* Frequency of histopathological changes in howler monkeys (*Alouatta* sp.) naturally infected with yellow fever virus in Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 49, n. 1, p. 29–33, 2016.

- 25 LEONHARD, Sonja E. *et al.* Guillain-barré syndrome related to zika virus infection: A systematic review and meta-analysis of the clinical and electrophysiological phenotype. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 14, n. 4, p. 1–24, 1 abr. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008264>>. Acesso em: 23 maio 2021.

- 30 LI, Xiao Feng *et al.* Characterization of a 2016 Clinical Isolate of Zika Virus in Non-human Primates. *EBioMedicine*, v. 12, p. 170–177, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.09.022>>.

LINDENBACH, B.D. *et al.* Flaviviridae. In D. M. Knipe & P. M. Howley (Eds.). *Fields virology*, 2013.

LONG, Kanya C. *et al.* Experimental transmission of Mayaro virus by *Aedes aegypti*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 2011.

- 35 LOPES, Nayara; NOZAWA, Carlos; LINHARES, Rosa Elisa Carvalho. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, v. 5, n. 3, p. 55–64, 2014.

LORENTE, Sylvie; HAUTEFEUILLE, Mathieu; SANCHEZ-CEDILLO, Aczel. The liver, a functionalized vascular structure. *Scientific Reports*, v. 10, n. 1, p. 16194, 1 dez. 2020.

- 40 Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-020-73208-8>>. Acesso em: 3 jun. 2021.

- LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, Ricardo; FAILLOUX, Anna-Bella. High risk for chikungunya virus to initiate an enzootic sylvatic cycle in the tropical Americas. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 11, n. 6, p. e0005698, 29 jun. 2017. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0005698>>. Acesso em: 10 jul. 2021.
- 5
- LOWE, Rachel *et al.* Emerging arboviruses in the urbanized Amazon rainforest. *The BMJ*, v. 371, 13 nov. 2020. Disponível em: <<https://www.bmj.com/content/371/bmj.m4385>>. Acesso em: 12 maio 2021.
- LUNA, Luciano Kleber de Souza *et al.* Oropouche virus is detected in peripheral blood leukocytes from patients. *Journal of Medical Virology*, v. 89, n. 6, p. 1108–1111, 2017.
- 10
- MACKAY, Ian M.; ARDEN, Katherine E. Mayaro virus: a forest virus primed for a trip to the city? *Microbes and Infection*, v. 18, n. 12, p. 724–734, 2016.
- MAEDA, Akihiko; MAEDA, Junko. Review of diagnostic plaque reduction neutralization tests for flavivirus infection. *Veterinary Journal*. [S.l.]: Vet J. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23036176/>>. Acesso em: 26 maio 2021. , jan. 2013
- 15
- MARCONDES, C. B. *et al.* Emergent and reemergent arboviruses in South America and the Caribbean: Why so many and why now? *Journal of Medical Entomology*, v. 54, n. 3, p. 509–532, 2017.
- MASON, P J; HADDOW, A J. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952-53; an additional note on Chikungunya virus isolations and serum antibodies. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1957.
- 20
- MASSAD, Eduardo; MIGUEL, Mônica Manir; COUTINHO, Francisco Antonio Bezerra. Is vaccinating monkeys against yellow fever the ultimate solution for the Brazilian recurrent epizootics? *Epidemiology and Infection*, v. 146, n. 13, p. 1622–1624, 2018.
- 25
- MATOS, Ana Carolina Diniz *et al.* Bovine vaccinia: Insights into the disease in cattle. *Viruses*, v. 10, n. 3, 2018.
- MATUSALI, Giulia *et al.* Tropism of the Chikungunya Virus. *Viruses 2019, Vol. 11, Page 175*, v. 11, n. 2, p. 175, 20 fev. 2019. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1999-4915/11/2/175/htm>>. Acesso em: 10 jul. 2021.
- 30
- MAYER, Sandra V.; TESH, Robert B.; VASILAKIS, Nikos. The emergence of arthropod-borne viral diseases: A global prospective on dengue, chikungunya and zika fevers. *Acta Tropica*, v. 166, p. 155–163, 2017.
- MCINTOSH, B. M. *et al.* Further studies on the chikungunya outbreak in southern rhodesia in 1962. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, v. 58, n. 1, p. 45–51, 1964.
- 35
- MINER, Jonathan J.; DIAMOND, Michael S. Zika Virus Pathogenesis and Tissue Tropism. *Cell Host & Microbe*, v. 21, n. 2, p. 134–142, 8 fev. 2017.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE, Secretaria De; SAÚDE, Vigilância em. *Manual de vigilância de epizootias em primatas não-humanos*. [S.l.: s.n.], 2005.
- 40
- MINISTÉRIO DA SAÚDE, MSBr. *Emergência epidemiológica de febre amarela no Brasil, no período de dezembro de 2016 a julho de 2017*.

- MINISTÉRIO DA SAÚDE, MSBr. *Monitoramento de Febre Amarela Brasil 2019*. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/junho/13/Informe-de-Monitoramento-de-Febre-Amarela-Brasil--n-18.pdf>>. Acesso em: 28 ago. 2019.
- 5 MINISTÉRIO DA SAÚDE, MSBr. *Monitoramento do Período Sazonal da Febre Amarela Brasil – 2017/2018*. Disponível em: <<https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/outubro/08/Informe-FA.pdf>>. Acesso em: 28 ago. 2019.
- 10 MINISTÉRIO DA SAÚDE, MSBr. *Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas causados por vírus transmitidos por Aedes (dengue, chikungunya e zika), semanas epidemiológicas 1 a 53, 2020*. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/media/pdf/2021/fevereiro/01/boletim_epidemiologico_svs_3.pdf>. Acesso em: 12 maio 2021a.
- 15 MINISTÉRIO DA SAÚDE, MSBr. *Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo Aedes (dengue, chikungunya e Zika), Semanas Epidemiológicas 01 a 52*. Disponível em: <<https://antigo.saude.gov.br/images/pdf/2020/janeiro/20/Boletim-epidemiologico-SVS-02-1-.pdf>>. Acesso em: 12 maio 2021a.
- 20 MINISTÉRIO DA SAÚDE, MSBr. *Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo Aedes (dengue, chikungunya e Zika), Semanas Epidemiológicas 01 a 52*. Disponível em: <<https://antigo.saude.gov.br/images/pdf/2020/janeiro/20/Boletim-epidemiologico-SVS-02-1-.pdf>>. Acesso em: 13 maio 2021b.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE, MSBr. *Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 51, 2017*. Disponível em: <<https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/23/Boletim-2017-051-Dengue.pdf>>. Acesso em: 28 ago. 2019b.
- 25 MINISTÉRIO DA SAÚDE, MSBr. *Situação epidemiológica da febre amarela – Monitoramento 2020/2021*. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2021/fevereiro/11/boletim_epidemiologico_svs_4.pdf>. Acesso em: 13 maio 2021b.
- 30 MINISTÉRIO DA SAÚDE, MSBr. *Situação epidemiológica da febre amarela no Monitoramento 2019/2020*. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/media/pdf/2020/dezembro/09/boletim_epidemiologico_svs_46.pdf>. Acesso em: 13 maio 2021c.
- MITTERMEIER, R.A.; RYLANDS, A.B.; WILSON, D.E. Primates. *The Mammals of the World*. [S.l.]: Lynx Edicions: Barcelona, Spain, 2013. .
- 35 MONATH, T. P. Yellow fever: An update. *Lancet Infectious Diseases*, v. 1, n. 1, p. 11–20, 2001.
- MONATH, T. P. *The Arboviruses: Epidemiology and Ecology*. 1st ed ed. [S.l.]: CRC Press - Taylor & Francis, 2019.
- 40 MONATH, Thomas P. Yellow fever vaccine. *Expert Review of Vaccines*, v. 4, n. 4, p. 553–574, ago. 2005.
- MONATH, Thomas P.; VASCONCELOS, Pedro F.C. Yellow Fever. *Journal of Clinical Virology*, v. 64, p. 160–173, 2015.

- MONDINI, Adriano *et al.* Simultaneous infection by DENV-3 and SLEV in Brazil. *Journal of Clinical Virology*, v. 40, n. 1, p. 84–86, 2007.
- MONLUN, E. *et al.* Surveillance of the circulation of arbovirus of medical interest in the region of eastern Senegal. *Bulletin de la Société de pathologie exotique (1990)*, 1993.
- 5 MORALES, María A. *et al.* Detection of the mosquito-borne flaviviruses, West Nile, Dengue, Saint Louis Encephalitis, Ilheus, Bussuquara, and Yellow Fever in free-ranging black howlers (*Alouatta caraya*) of Northeastern Argentina. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 11, n. 2, p. 1–13, 2017.
- MOREIRA-SOTO, A. *et al.* Evidence for multiple sylvatic transmission cycles during the
10 2016-2017 yellow fever virus outbreak, Brazil. *Clinical Microbiology and Infection*, p. 2016–2019, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.01.026>>.
- MORENO, E. S. *et al.* Epizootias de febre amarela em primatas não humanos no estado de São Paulo, Brasil, 2008-2009. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, v. 55, n. 1, p. 45–50, 2013.
- 15 MS-BR. *Monitoramento do Período Sazonal da Febre Amarela Brasil – 2017/2018 - informe nº 27 | 2017/2018.*
- MS-BR. *Orientações e indicação de dose única da vacina febre amarela - Nota Informativa Nº 94.*
- MUSSO, Didier *et al.* Unexpected outbreaks of arbovirus infections: lessons learned from the
20 Pacific and tropical America. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 18, n. 11, p. e355–e361, 2018.
- NAVECA, Felipe Gomes *et al.* Multiplexed reverse transcription real-time polymerase chain reaction for simultaneous detection of Mayaro, Oropouche, and oropouche-like viruses. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 112, n. 7, p. 510–513, 2017.
- 25 NEVILLE, M. K. *et al.* The howling monkeys, genus *Alouatta*. In: MITTERMEIER, R. A., RYLANDS, A. B., COIMBRA-FILHO, A. F. AND FONSECA, G. A. B. (Org.). *Ecology and Behavior of Neotropical Primates, vol 2*. Washington, DC: World Wildlife Fundation, 1988. p. 348–453.
- NUNES, Marcio R.T. *et al.* Evaluation of two molecular methods for the detection of Yellow
30 fever virus genome. *Journal of Virological Methods*, v. 174, n. 1–2, p. 29–34, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.02.025>>.
- NUNES, Marcio Roberto Teixeira *et al.* Arbovirus eco-epidemiology in the area affected by the Cuiabá-Santarém Highway (BR-163), Pará State, Brazil]. *Cadernos de saúde pública / Ministério da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública*, v. 25, n.
35 12, p. 2583–2602, 2009.
- OLIVEIRA, Grazielle *et al.* From lesions to viral clones: Biological and molecular diversity amongst autochthonous Brazilian Vaccinia virus. *Viruses*, v. 7, n. 3, p. 1218–1237, 2015.
- OTT-JOSLIN, J. E. Viral diseases in nonhuman primates. In: M, FOWLER (Org.). *Zoo and wild animal medicine*. Philadelphia: W.B. Saunders, 1986. p. 674–697.
- 40 PAGLIA, A. P. *et al.* *Lista anotada dos mamíferos do Brasil*. [S.l.: s.n.], 2012.

- PAHO - PANAMERICAN HEALTH ORGANIZATION. *Control of Yellow Fever, Field Guide 2005*. Washington, DC: [s.n.], 2005.
- PARRISH, Colin R. *et al.* Cross-Species Virus Transmission and the Emergence of New Epidemic Diseases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2008.
- 5 PASSAMANI, Marcelo. Densidade e tamanho de grupo de primatas na Mata Atlântica serrana do sudoeste do Espírito Santo. *Revista Brasileira de Zoociências*, v. 10, n. 1, p. 29–34, 2008. Disponível em:
<<https://periodicos.ufjf.br/index.php/zoociencias/article/view/24082>>. Acesso em: 23 jun. 2021.
- 10 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*, v. 124, n. 1–2, p. 65–71, mar. 2005. Disponível em:
<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15664052/>>. Acesso em: 24 maio 2021.
- 15 PATTERSON, Jessica; SAMMON, Maura; GARG, Manish. Dengue, zika and chikungunya: Emerging arboviruses in the new world. *Western Journal of Emergency Medicine*, v. 17, n. 6, p. 671–679, 2016.
- PAUVOLID-CORRÊA, Alex *et al.* Neutralising antibodies for mayaro virus in Pantanal, Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2015.
- 20 PEDERSEN, Amy B. *et al.* Patterns of host specificity and transmission among parasites of wild primates. *International Journal for Parasitology*, 2005.
- PERES, Marina G. *et al.* *Vaccinia virus in blood samples of humans, domestic and wild mammals in Brazil. Viruses*. [S.l.: s.n.], 2018
- 25 PERRY, Brian D.; GRACE, Delia; SONES, Keith. Current drivers and future directions of global livestock disease dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 110, n. 52, p. 20871–20877, 24 dez. 2013. Disponível em:
<<https://www.pnas.org/content/110/52/20871>>. Acesso em: 9 maio 2021.
- PINHEIRO, F. P. *et al.* An outbreak of Mayaro virus disease in Belterra, Brazil. I. Clinical and virological findings. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1981.
- 30 PINHEIRO, F. P.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P.A.; TRAVASSOS DA ROSA, J. F.S. Oropouche virus. I. A review of clinical, epidemiological, and ecological findings. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1981.
- PINHEIRO, F. P.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P A; TRAVASSOS DA ROSSA AND BENSABATH, J. F G. An outbreak of Oropouche virus disease in the vicinity of Santarem, Para, Brazil. *Tropenmedizin und Parasitologie*, 1976.
- 35 PNI-MS (PROGRAMA NACIONAL DE IMUNIZAÇÃO - MINISTÉRIO DA SAÚDE). *Imunizações - Minas Gerais - Cobertura por Ano - Período: 2018*. Disponível em:
<<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?pni/CNV/CPNIMG.def>>. Acesso em: 19 maio 2020.
- 40 POSSAS, C. *et al.* Yellow fever outbreak in Brazil: the puzzle of rapid viral spread and challenges for immunisation. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 113, n. 10, p. e180278, 2018.

- POSSAS, Cristina *et al.* *Yellow fever outbreak in Brazil: the puzzle of rapid viral spread and challenges for immunisation. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* [S.l.: s.n.], 2018
- POSTOLLEC, Florence *et al.* Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology. *Food Microbiology*, v. 28, n. 5, p. 848–861, 2011. Disponível em:
5 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2011.02.008>>.
- POWERS, Ann M.; LOGUE, Christopher H. *Changing patterns of chikunya virus: Re-emergence of a zoonotic arbovirus. Journal of General Virology.* [S.l.: s.n.], 2007
- RABE, Ingrid B. *et al.* Interim guidance for interpretation of Zika virus antibody test results. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 2016.
- 10 REZENDE, Izabela Maurício De *et al.* Persistence of Yellow fever virus outside the Amazon Basin, causing epidemics in Southeast Brazil, from 2016 to 2018. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 12, n. 6, p. e0006538, jun. 2018.
- REZENDE, I.M.D. *et al.* Persistence of Yellow fever virus outside the Amazon Basin, causing epidemics in Southeast Brazil, from 2016 to 2018. *PLoS Neglected Tropical*
15 *Diseases*, v. 12, n. 6, 2018.
- RIFAKIS, P. M. *et al.* Epizootics of yellow fever in Venezuela (2004-2005): An emerging zoonotic disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1081, p. 57–60, 2006.
- RODHAIN, F. The Role of Monkeys in the Biology of Dengue and Yellow Fever. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, v. 14, n. 1, p. 9–19, 1991.
- 20 ROEHRIG, John T.; HOMBACH, Joachim; BARRETT, Alan D.T. Guidelines for plaque-reduction neutralization testing of human antibodies to dengue viruses. 1 jun. 2008, [S.l.]: *Viral Immunol*, 1 jun. 2008. p. 123–132. Disponível em:
<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18476771/>>. Acesso em: 3 jun. 2021.
- ROMERO-ALVAREZ, Daniel; ESCOBAR, Luis E. Oropouche fever, an emergent disease from the Americas. *Microbes and Infection*, v. 20, n. 3, p. 135–146, 2018. Disponível em:
25 <<https://doi.org/10.1016/j.micinf.2017.11.013>>.
- SAATKAMP, Cassiano Junior *et al.* Mayaro virus detection in the western region of Pará state, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 54, p. e0055, 2021. Disponível em: <www.scielo.br/rsbmt>. Acesso em: 13 maio 2021.
- 30 SACCHETTO, Livia. *Detecção, isolamento e caracterização do Zika virus e do Yellow fever virus em humanos e primatas não humanos durante epidemias de arboviroses no Brasil em 2016 e 2017.* 2020. 171 f. Universidade Federal de Minas Gerais, 2020.
- SACCHETTO, Livia *et al.* Neighbor danger: Yellow fever virus epizootics in urban and urban-rural transition areas of minas gerais state, during 2017-2018 yellow fever outbreaks in
35 Brazil. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 14, n. 10, p. 1–16, 1 out. 2020. Disponível em:
<<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008658>>. Acesso em: 12 maio 2021.
- SAKKAS, Hercules *et al.* Oropouche Fever: A Review. *Viruses*, v. 10, n. 4, p. 1–16, 2018.
- SALLIS, Eliza Simone Viégas *et al.* A case of yellow fever in a brown howler (*Alouatta fusca*) in Southern Brazil. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication*
40 *of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc.*, v. 15, n. 6, p. 574–

6, 2003.

SALLIS, E. S. V. *et al.* A case of yellow fever in a brown howler (*Alouatta fusca*) in Southern Brazil. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 15, n. 6, p. 574–576, 2003.

5 SAM, I. Ching *et al.* *Chikungunya virus in macaques, Malaysia. Emerging Infectious Diseases*. [S.l.: s.n.], 2015

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1977.

10 SCHLOSS, Patrick D. *et al.* Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009.

SCHWARTZ, Olivier; ALBERT, Matthew L. *Biology and pathogenesis of chikungunya virus. Nature Reviews Microbiology*. [S.l.: s.n.], 2010

15 SECRETARIA DO ESTADO DE SAÚDE DE SÃO PAULO, SES-SP. *Boletim Epidemiológico Febre Amarela – 2017*. Disponível em: <http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/doc/famarela/fa17_1boletim_epidemiologico.pdf>. Acesso em: 28 ago. 2019.

20 SECRETARIA DO ESTADO DE SAÚDE, SES-RJ. *Monitoramento dos casos suspeitos de Febre Amarela Silvestre no Estado do Rio de Janeiro*. Disponível em: <<http://www.riocomsaude.rj.gov.br/Publico/MostrarArquivo.aspx?C=xjkgJZZmu4%3D>>. Acesso em: 28 ago. 2019.

25 SECRETARIA ESTADUAL DE SAÚDE/SES-MG. Atualização: Situação epidemiológica da febre amarela silvestre em Minas Gerais, 2017. Minas Gerais, 26 jun. 2017. , p. 1–25 Disponível em: <http://www.saude.mg.gov.br/images/icones/Atualizacao_FA_-_29_de_JUNHO_2017.pdf>.

30 SECRETARIA ESTADUAL DE SAÚDE, SES-MG. *Atualização sobre a investigação de casos suspeitos de febre amarela silvestre, Minas Gerais, 2017*. Disponível em: <http://www.saude.mg.gov.br/images/Atualizacao_FA_-_DVA_11jan2017.pdf>. Acesso em: 19 ago. 2019.

SECRETARIA ESTADUAL DE SAÚDE, SESA-ES. *Exame confirma febre amarela em macaco*. Disponível em: <<https://saude.es.gov.br/Noticia/saude-exame-confirma-febre-amarela-em-macaco>>. Acesso em: 28 ago. 2019.

35 SES-MG. *Atualização: Situação epidemiológica da febre amarela silvestre em Minas Gerais, 2017*.

SES-MG. *Boletim Epidemiológico - Febre Amarela Silvestre em Minas Gerais*.

SES-MG. *Boletim epidemiológico – 20/06/2018 Febre Amarela Silvestre em Minas Gerais*.

SES-MG. *Febre Amarela Silvestre em Minas Gerais - Boletim epidemiológico – 19/02/2019*.

SES-MG, Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais. *Informe epidemiológico da Febre*

- Amarela (06/12)*. Disponível em:
<<https://www.saude.mg.gov.br/component/gmg/story/10767-informe-epidemiologico-da-febre-amarela-06-12>>. Acesso em: 19 maio 2021c.
- 5 SES-MG, Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais. *ALERTA - CENÁRIO EPIDEMIOLÓGICO FEBRE AMARELA, 2021*. Disponível em:
<https://www.saude.mg.gov.br/images/noticias_e_eventos/000_2021/SEI_1320.01.0038355_2021_82_NI_SES_1877-2021_-_ALERTA_FA.pdf>. Acesso em: 18 jun. 2021a.
- SES-MG, Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais. *Febre Amarela*. Disponível em:
<<https://www.saude.mg.gov.br/febreamarela>>. Acesso em: 21 jun. 2021b.
- 10 SES-MG, Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais. *Informe Epidemiológico da Febre Amarela (19/02)*. Disponível em:
<<https://www.saude.mg.gov.br/component/gmg/story/10908-informe-epidemiologico-da-febre-amarela-19-02>>. Acesso em: 17 maio 2021b.
- 15 SES-SC, Secretaria de Saúde de Santa Catarina. *Boletim Epidemiológico Febre Amarela nº 18/2018 – 18 de dezembro de 2018*. Disponível em:
<<http://www.dive.sc.gov.br/conteudos/boletim2018/boletimFebreAmarela18/Bolet18FebreAmarela.pdf>>. Acesso em: 27 jul. 2019.
- SES-SP. *BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO DA FEBRE AMARELA – 03/06/2019*.
- SES/MG. *Boletim Epidemiológico, Febre Amarela, Minas Gerais*. . [S.l: s.n.], 2017.
- 20 SES/MG. *Boletim epidemiológico da Febre Amarela em Minas Gerais*. . [S.l: s.n.], 2018.
- SESA-ES, Secretaria de Estado da Saúde Espírito Santo. *Casos de febre amarela ES*. Disponível em: <<https://saude.es.gov.br/Notícia/febre-amarela-silvestre-500-casos-foram-descartados>>.
- 25 SESA-ES, Secretaria de Estado da Saúde Espírito Santo. *Espírito Santo passa a ser área com recomendação permanente de vacinação contra febre amarela*. Disponível em:
<<https://saude.es.gov.br/Notícia/espírito-santo-passa-a-ser-area-com-recomendacao-permanente-de-vacinacao-contrafebre-amarela>>. Acesso em: 30 ago. 2019b.
- 30 SESA-ES, Secretaria de Estado da Saúde Espírito Santo. *Febre amarela: Espírito Santo não é área de risco e continua sem recomendação para vacinação*. Disponível em:
<<https://www.es.gov.br/Noticia/febre-amarela-espírito-santo-nao-e-area-de-risco-e-continua-sem-recomendacao-para-vacinacao>>. Acesso em: 30 ago. 2019c.
- SESA-ES, Secretaria de Estado da Saúde Espírito Santo. *Plano Estadual de Saúde 2020 - 2023*. Disponível em: <[https://saude.es.gov.br/Media/sesa/Planejamento/Plano Estadual de Saúde - PES -2020-2023.pdf](https://saude.es.gov.br/Media/sesa/Planejamento/Plano%20Estadual%20de%20Saúde%20-%20PES%20-%202020-2023.pdf)>. Acesso em: 10 jul. 2021.
- 35 SESA-PR, Secretaria da Saúde do Paraná. *Boletim Epidemiológico Nº 015 – 30/05/2019*. Disponível em:
<http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/BoletimEpidemiologico_15FA.pdf>. Acesso em: 27 jul. 2019.
- 40 SEYMOUR, C.; PERALTA, P. H.; MONTGOMERY, G. G. Serologic evidence of natural togavirus infections in Panamanian sloths and other vertebrates. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1983.

- SILVA, Natalia Ingrid Oliveira; DE OLIVEIRA, Jaqueline Silva; *et al.* Here, There, and Everywhere: The Wide Host Range and Geographic Distribution of Zoonotic Orthopoxviruses. *Viruses*, v. 13, n. 1, 2020.
- 5 SILVA, Natalia Ingrid Oliveira; SACCHETTO, Livia; *et al.* Recent sylvatic yellow fever virus transmission in Brazil: The news from an old disease. *Virology Journal*. [S.l.]: BioMed Central Ltd. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12985-019-1277-7>>. Acesso em: 13 maio 2021. , 23 jan. 2020
- SIMPSON, Jared T. *et al.* ABySS: A parallel assembler for short read sequence data. *Genome Research*, 2009.
- 10 SINAN, Sistema de Informação de Agravos de Notificação. CASOS NOTIFICADOS (SUSPEITOS/CONFIRMADOS) DE FEBRE AMARELA POR LOCAL DE NOTIFICAÇÃO - MINAS GERAIS - Município Notificação: 312090 Curvelo. Disponível em: <http://tabnet.saude.mg.gov.br/tabcgi.exe?def/agravos/famarnet_n.def>. Acesso em: 7 jul. 2021.
- 15 SINAN, Sistema de Informação de Agravos de Notificação. CASOS NOTIFICADOS (SUSPEITOS/CONFIRMADOS) DE FEBRE AMARELA POR LOCAL DE NOTIFICAÇÃO - MINAS GERAIS - Município Notificação: 312090 Curvelo. Disponível em: <http://tabnet.saude.mg.gov.br/tabcgi.exe?def/agravos/famarnet_n.def>. Acesso em: 7 jul. 2021.
- 20 SMITH, Katherine F *et al.* GLOBALIZATION OF HUMAN INFECTIOUS DISEASE. *Ecology*, v. 88, n. 8, p. 1903–1910, 1 ago. 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1890/06-1052.1>>.
- SOPER, Fred L. *Yellow Fever in the Americas, 1938-1942*.
- 25 STRAUSS, J. H.; STRAUSS, E. G. *The alphaviruses: Gene expression, replication, and evolution. Microbiological Reviews*. [S.l.: s.n.]. , 1994
- STRODE, G. K. *Yellow fever*. New York: Mc-Graw-Hill, 1951.
- STUCKY, Brian J. Seqtrace: A graphical tool for rapidly processing DNA sequencing chromatograms. *Journal of Biomolecular Techniques*, 2012.
- 30 SVOBODA, W K. *Vigilância de epizootias em primatas não humanos (PNH) como instrumento de monitoramento de arboviroses e outras viroses de interesse em Saúde pública*. 2007. 136 f. Universidade Estadual de Londrina, 2007.
- 35 SVS-MS (MINISTÉRIO DA SAÚDE/SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE). *Monitoramento do Período Sazonal da Febre Amarela Brasil – 2018/2019*. Disponível em: <<https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/janeiro/28/informe-FA-n.3-21jan19.pdf>>. Acesso em: 17 maio 2021a.
- 40 SVS-MS (MINISTÉRIO DA SAÚDE/SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE). *Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas causados por vírus transmitidos pelo mosquito Aedes (dengue, chikungunya e zika), semanas epidemiológicas 1 a 18, 2021*. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2021/maio/18/boletim_epidemiologico_svs_18.pdf>. Acesso em: 23 maio 2021a.

SVS-MS (MINISTÉRIO DA SAÚDE/SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE).

Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas causados por vírus transmitidos por Aedes (dengue, chikungunya e zika), semanas epidemiológicas 1 a 53, 2020. Disponível em:

<[https://www.gov.br/saude/pt-](https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/media/pdf/2021/fevereiro/01/boletim_epidemiologico_svs_3.pdf)

5 [br/assuntos/media/pdf/2021/fevereiro/01/boletim_epidemiologico_svs_3.pdf](https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/media/pdf/2021/fevereiro/01/boletim_epidemiologico_svs_3.pdf)>. Acesso em: 23 maio 2021b.

SVS-MS (MINISTÉRIO DA SAÚDE/SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE).

Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo Aedes (dengue, chikungunya e Zika), Semanas Epidemiológicas 01 a 52. Disponível em:

10 <<https://antigo.saude.gov.br/images/pdf/2020/janeiro/20/Boletim-epidemiologico-SVS-02-1-.pdf>>. Acesso em: 23 maio 2021.

SVS-MS (MINISTÉRIO DA SAÚDE/SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE).

Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e doença aguda pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52 de 2018. Disponível em:

15 <<https://antigo.saude.gov.br/images/pdf/2019/janeiro/28/2019-002.pdf>>. Acesso em: 23 maio 2021b.

SVS-MS (MINISTÉRIO DA SAÚDE/SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE).

Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52, 2016. Disponível em:

20 <https://antigo.saude.gov.br/images/pdf/2017/fevereiro/05/2017_002-Dengue SE52_corrigido.pdf>. Acesso em: 23 maio 2021a.

SVS-MS (MINISTÉRIO DA SAÚDE/SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE).

Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52, 2017. Disponível em:

25 <<https://antigo.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/23/Boletim-2018-001-Dengue.pdf>>. Acesso em: 23 maio 2021.

SVS-MS (MINISTÉRIO DA SAÚDE/SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE).

Monitoramento dos casos e óbitos de febre amarela no Brasil - Informe – Nº 43/2017.

Disponível em: <[https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/junho/02/COES-](https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/junho/02/COES-FEBRE-AMARELA---INFORME-43---Atualiza---o-em-31maio2017.pdf)

30 [FEBRE-AMARELA---INFORME-43---Atualiza---o-em-31maio2017.pdf](https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/junho/02/COES-FEBRE-AMARELA---INFORME-43---Atualiza---o-em-31maio2017.pdf)>. Acesso em: 19 maio 2021b.

SVS-MS (MINISTÉRIO DA SAÚDE/SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE).

Situação epidemiológica da febre amarela – Monitoramento 2020/2021. Disponível em:

<[https://www.gov.br/saude/pt-](https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2021/fevereiro/11/boletim_epidemiologico_svs_4.pdf)

35 [br/media/pdf/2021/fevereiro/11/boletim_epidemiologico_svs_4.pdf](https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2021/fevereiro/11/boletim_epidemiologico_svs_4.pdf)>. Acesso em: 17 maio 2021c.

TÁTILA-FERREIRA, Aline *et al.* Oviposition behavior of *Haemagogus leucocelaenus*

(Diptera: culicidae), a vector of wild yellow fever in Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 59, 7 ago. 2017. Disponível em:

40 <<http://www.scielo.br/j/rimtsp/a/FwMsBHx6rfDg4ydsbgdRZKK/?format=html&lang=en>>.

Acesso em: 8 jul. 2021.

TAUFFLIEB, R.; ROBIN, Y.; CORNET, M. Le virus amaril et la faune sauvage en Afrique.

Cahiers ORSTOM.Série Entomologie Médicale et Parasitologie, v. 9, n. 4, p. 351–371, 1971.

TAYLOR, R. M.; HASEEB, M. A.; WORK, T. H. A regional reconnaissance on yellow fever

in the Sudan. With Special Reference to Primate Hosts*. *Bulletin of the World Health Organization*, v. 12, n. 5, p. 711–725, 1955. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2542307&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

- 5 TEIXEIRA, Bruno *et al.* Good neighbours: Distribution of black-tufted marmoset (*Callithrix penicillata*) in an urban environment. *Wildlife Research*, v. 42, n. 7, p. 579–589, 2015.
- TEIXEIRA NUNES, Márcio Roberta *et al.* Oropouche virus isolation, Southeast Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, v. 11, n. 10, p. 1610–1613, 2005.
- 10 TERZIAN, A.C.B. *et al.* Evidence of natural Zika virus infection in neotropical non-human primates in Brazil. *Scientific Reports*, v. 8, n. 1, 2018.
- THÈVES, C.; BIAGINI, P.; CRUBÉZY, E. The rediscovery of smallpox. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 20, n. 3, p. 210–218, 2014.
- 15 TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A. *et al.* Arboviroses. In: LEÃO R. N. Q. (Org.). *Doenças infecciosas e parasitárias - enfoque Amazônico*. Belém: Cejup/Universidade do Estado do Pará/Instituto Evandro Chagas, 1997. p. 207–225.
- TRAVASSOS DA ROSA, Jorge Fernando *et al.* Oropouche virus: Clinical, epidemiological, and molecular aspects of a neglected orthobunyavirus. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 96, n. 5, p. 1019–1030, 2017.
- 20 TSETSARKIN, Konstantin A.; CHEN, Rubing; WEAVER, Scott C. *Interspecies transmission and chikungunya virus emergence*. *Current Opinion in Virology*. [S.l.: s.n.]. , 2016
- UFES. Dois anos após surto de febre amarela, pesquisa estima que população de macacos caiu pela metade no ES. *TV Gazeta- G1*, Espírito Santo, 29 jun. 2019. Disponível em: <<https://g1.globo.com/es/espírito-santo/noticia/2019/06/29/dois-anos-apos-surto-de-febre-amarela-pesquisa-estima-que-populacao-de-macacos-caiu-pela-metade-no-es.ghtml>>. Acesso em: 30 ago. 2019.
- 25 VARGAS-MENDEZ, O; ELTON, N. W. Naturally Acquired Yellow Fever in Wild Monkeys of Costa Rica¹. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 2, n. 5, p. 850–863, 1953.
- 30 VASCONCELOS, Helena Baldez *et al.* Molecular epidemiology of oropouche virus, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, v. 17, n. 5, p. 800–806, 2011.
- VASCONCELOS, P. F. C. Yellow fever. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 36, n. 2, p. 275–293, 2003.
- 35 VASCONCELOS, P. F.C. *et al.* Epidemic of jungle yellow fever in Brazil, 2000: Implications of climatic alterations in disease spread. *Journal of Medical Virology*, v. 65, n. 3, p. 598–604, 1 nov. 2001. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jmv.2078>>. Acesso em: 12 maio 2021.
- VASCONCELOS, P. F C *et al.* Genetic divergence and dispersal of yellow fever virus, Brazil. *Emerging infectious diseases*, v. 10, n. 9, p. 1578–84, set. 2004.
- 40 VASCONCELOS, Pedro F.C.; MONATH, Thomas P. Yellow Fever Remains a Potential

- Threat to Public Health. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, v. 16, n. 8, p. 566–567, 2016.
- VASCONCELOS, Pedro Fernando da Costa. Febre amarela (Yellow Fever). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 2003.
- VASILAKIS, N.; GUBLER, D. J. Arboviruses: Molecular Biology, Evolution and Control. Nikos Vasilakis and Duane J. Gubler. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 95, n. 2, p. 488–489, 2016.
- VENTURA, Camila V. *et al.* Ophthalmological findings in infants with microcephaly and presumable intra-uterus Zika virus infection. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*, 2016.
- VOROU, Rengina. Zika virus, vectors, reservoirs, amplifying hosts, and their potential to spread worldwide: What we know and what we should investigate urgently. *International Journal of Infectious Diseases*, v. 48, p. 85–90, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2016.05.014>>.
- VOUGA, Manon *et al.* CDC guidelines for pregnant women during the Zika virus outbreak. *The Lancet*, v. 387, n. 10021, p. 843–844, 2016. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00383-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00383-4)>.
- VOURC’H, Gwenaël *et al.* Chikungunya antibodies detected in non-human primates and rats in three Indian Ocean islands after the 2006 ChikV outbreak. *Veterinary Research*, 2014.
- VU, David M.; JUNGKIND, Donald; LABEAUD, Angelle Desiree. *Chikungunya Virus. Clinics in Laboratory Medicine*. [S.l: s.n.], 2017
- WEAVER, S. C. Evolutionary influences in arboviral disease. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, v. 299, p. 285–314, 2006a.
- WEAVER, S. C. Evolutionary influences in arboviral disease. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, v. 299, p. 285–314, 2006b. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16568903/>>. Acesso em: 12 maio 2021.
- WEAVER, Scott C.; REISEN, William K. *Present and future arboviral threats*. [S.l: s.n.], 2010. v. 85.
- WEAVER, Scott C *et al.* Zika, Chikungunya, and Other Emerging Vector-Borne Viral Diseases. *Annual Review of Medicine*, n. August 2017, p. 1–14, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1146/annurev-med-050715->>.
- WEISE, William J. *et al.* A Novel Live-Attenuated Vaccine Candidate for Mayaro Fever. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2014.
- WHO. *Risk assessment on yellow fever virus circulation in endemic countries: working document from an informal consultation of experts: a protocol risk assessment at the field level*. WHO/HSE/PE ed. Geneva: World Health Organization, 2014. Disponível em: <[www.who.int/entity/csr/disease/yellowfev/en/ - 27k](http://www.who.int/entity/csr/disease/yellowfev/en/-27k)>.
- WOLFE, N D *et al.* Wild primate populations in emergning infectious disease research: The missing link? *Emerging Infectious Disease*, v. 4, n. 2, p. 149–158, 1998.
- WOLFE, Nathan D. *et al.* Sylvatic transmission of arboviruses among Bornean orangutans. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 64, n. 5, p. 310–316, 2001.

WOODALL, J. P.; DYKES, J. R. W.; WILLIAMS, M. C. The reaction of a species of Colobus monkey to inoculation with yellow fever virus. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, v. 62, n. 4, p. 528–535, 1968.

5 WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Geographical distribution of arthropod-borne diseases and their principal vectors*. . [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://www.who.int/iris/handle/10665/60575>>. , 1989

10 WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Arthropod-borne and rodent-borne viral diseases*. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/39922/WHO_TRS_719.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 28 ago. 2019.

YOUNG, Paul R. Arboviruses: A family on the move. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. [S.l.]: Springer New York LLC, 2018. v. 1062. p. 1–10. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29845521/>>. Acesso em: 12 maio 2021.

15 ZANLUCA, Camila *et al.* First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 110, n. 4, p. 569–572, 2015.

ZUCHI, Nayara *et al.* Molecular detection of Mayaro virus during a dengue outbreak in the state of Mato Grosso, Central-West Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 109, n. 6, p. 820–823, 2014.

ANEXO A – Tabela Suplementar 1

Tabela Suplementar 1: Primatas não humanos testados para presença de RNA de ZIKV, CHIKV, MAYV e OROV em amostras de fígado

ID/ano	ZIKV	CHIKV	MAYV	OROV	Gênero	Área	Município	Mesorregião
2/17	-	Neg	-	-	<i>Callithrix</i> sp.	urbana	Ituiutaba	Triângulo/Alto Paranaíba
11/17	-	-	Neg	Neg	<i>Callithrix</i> sp.	rural	Sacramento	Triângulo/Alto Paranaíba
14/17	-	Neg	-	-	<i>Callithrix</i> sp.	rural	Curvelo	Central
17/17	-	-	Neg	Neg	<i>Callithrix</i> sp.	urb/rur	Leopoldina	Zona da Mata
33/17	-	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix</i> sp.	rural	Martinho Campos	Central
39/17	-	Neg	-	-	<i>Callithrix</i> sp.	urbana	Barão de Cocais	Metropolitana
41/17	-	Neg	-	-	<i>Callithrix</i> sp.	urb/rur	Sarzedo	Metropolitana
42/17	-	Neg	-	-	<i>Callithrix</i> sp.	urbana	Pirapora	Norte
43/17	-	Neg	-	-	<i>Callithrix</i> sp.	urbana	Guapé	Sul/Sudoeste
45/17	-	Neg	-	-	<i>Callithrix</i> sp.	urbana	Belo Horizonte	Metropolitana
46/17	-	Neg	-	-	<i>Callithrix</i> sp.	urbana	Betim	Metropolitana
50/17	-	Neg	-	-	<i>Alouatta</i> sp.	rural	Sem Peixe	Zona da Mata
52/17	-	Neg	-	-	<i>Callithrix</i> sp.	urbana	Curvelo	Central
53/17	-	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix</i> sp.	rural	Curvelo	Central
54/17	-	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix</i> sp.	urbana	Tocantins	Zona da Mata
55/17	-	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix</i> sp.	rural	Goianá	Zona da Mata
57/17	-	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix</i> sp.	urb/rur	Brumadinho	Metropolitana
58/17	-	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix</i> sp.	urb/rur	Brumadinho	Metropolitana
59/17	-	Neg	Neg	Neg	<i>Callicebus</i> sp.	rural	Guimarânia	Triângulo/Alto Paranaíba
62/17	-	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix</i> sp.	rural	Uberlândia	Triângulo/Alto Paranaíba
63/17	-	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix</i> sp.	rural	Sete Lagoas	Metropolitana
65/17	-	Neg	-	-	<i>Callithrix</i> sp.	urbana	Belo Horizonte	Metropolitana
68/17	-	Neg	-	-	<i>Callithrix</i> sp.	urbana	Recreio	Zona da Mata
70/17	-	Neg	-	-	<i>Callithrix</i> sp.	urbana	Belo Horizonte	Metropolitana
71/17	-	Neg	-	-	<i>Callithrix</i> sp.	urbana	Lagoa da Prata	Central
72/17	-	Neg	-	-	<i>Callithrix</i> sp.	urbana	Ribeirão das Neves	Metropolitana
79/17	-	Neg	-	-	<i>Callithrix</i> sp.	urbana	Gov. Valadares	Vale do Rio Doce
86/17	-	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix</i> sp.	urb/rur	Santa Luzia	Metropolitana
100/17	-	Neg	-	-	<i>Callithrix</i> sp.	rural	Ouro Branco	Metropolitana
105/17	-	Neg	-	-	<i>Callithrix</i> sp.	urbana	Belo Horizonte	Metropolitana
106/17	-	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix</i> sp.	urbana	Ibiá	Norte
116/17	-	Neg	-	-	<i>Callithrix</i> sp.	urbana	Betim	Metropolitana

ID/ano	ZIKV	CHIKV	MAYV	OROV	Gênero	Área	Município	Mesorregião
120/17	-	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix</i> sp.	urb/rur	S. G. do Rio Abaixo	Metropolitana
128/17	-	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix</i> sp.	urb/rur	Ubá	Zona da Mata
130/17	-	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix</i> sp.	rural	Carmo do Rio Claro	Sul/Sudoeste
131/17	-	Neg	-	-	<i>Callithrix</i> sp.	urbana	Ibirité	Metropolitana
132/17	-	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix</i> sp.	rural	Ibiá	Norte
133/17	-	Neg	-	-	<i>Callithrix</i> sp.	urbana	Cataguases	Zona da Mata
140/17	-	Neg	-	-	<i>Alouatta</i> sp.	rural	Marliéria	Vale do Rio Doce
142/17	-	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix</i> sp.	urb/rur	Belo Horizonte	Metropolitana
143/17	-	Neg	-	-	<i>Callithrix</i> sp.	urb/rur	Belo Horizonte	Metropolitana
144/17	-	Neg	-	-	<i>Callithrix</i> sp.	urb/rur	Belo Horizonte	Metropolitana
148/17	-	Neg	-	-	<i>Callithrix</i> sp.	urbana	Belo Horizonte	Metropolitana
152/17	-	Neg	-	-	<i>Callithrix</i> sp.	urbana	Itabirito	Metropolitana
153/17	-	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix</i> sp.	rural	Felixlândia	Central
154/17	-	Neg	-	-	<i>Callithrix</i> sp.	rural	Contagem	Metropolitana
158/17	-	Neg	-	-	<i>Callithrix</i> sp.	urbana	Mário Campos	Metropolitana
159/17	-	Neg	-	-	<i>Callithrix</i> sp.	urbana	Sabará	Metropolitana
163/17	-	Neg	-	-	<i>Callithrix</i> sp.	urbana	Belo Horizonte	Metropolitana
164/17	-	Neg	-	-	<i>Callithrix</i> sp.	urbana	Dores de Guanhães	Vale do Rio Doce
165/17	-	-	Neg	Neg	<i>Alouatta</i> sp.	rural	Capitólio	Sul/Sudoeste
169/17	-	Neg	-	-	<i>Callithrix</i> sp.	urbana	Araguari	Triângulo/Alto Paranaíba
170/17	-	Neg	-	-	<i>Callithrix</i> sp.	urbana	Contagem	Metropolitana
171/17	-	Neg	-	-	<i>Callithrix</i> sp.	urbana	Uberlândia	Triângulo/Alto Paranaíba
172/17	-	Neg	-	-	<i>Callithrix</i> sp.	rural	M. Nova de Minas	Central
173/17	-	Neg	-	-	<i>Callithrix</i> sp.	urbana	Ibirité	Metropolitana
174/17	-	Neg	Neg	Neg	<i>Callicebus</i> sp.	rural	Sto. A. do Gama	Zona da Mata
175/17	-	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix</i> sp.	urb/rur	Santa Luzia	Metropolitana
177/17	-	Neg	-	-	<i>Callithrix</i> sp.	urb/rur	Betim	Metropolitana
178/17	-	-	Neg	Neg	<i>Callicebus</i> sp.	rural	Andradas	Sul/Sudoeste
180/17	-	Neg	-	-	<i>Callithrix</i> sp.	urbana	Uberlândia	Triângulo/Alto Paranaíba
183/17	-	-	Neg	Neg	<i>Callithrix</i> sp.	rural	Jampruca	Vale do Rio Doce
190/17	-	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix</i> sp.	urbana	Gov. Valadares	Vale do Rio Doce
202/17	-	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix</i> sp.	urbana	Divinópolis	Oeste
203/17	-	Neg	-	-	<i>Callithrix</i> sp.	urbana	Belo Horizonte	Metropolitana
205/17	-	Neg	-	-	<i>Callithrix</i> sp.	rural	Jaboticatubas	Metropolitana
207/17	-	Neg	-	-	<i>Callithrix</i> sp.	urbana	Sabará	Metropolitana
208/17	-	Neg	-	-	<i>Callithrix</i> sp.	urbana	São Francisco	Norte
209/17	-	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix</i> sp.	urbana	São Francisco	Norte
211/17	-	Neg	-	-	<i>Callithrix</i> sp.	urbana	Pará de Minas	Metropolitana

ID/ano	ZIKV	CHIKV	MAYV	OROV	Gênero	Área	Município	Mesorregião
217/17	-	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix</i> sp.	urbana	Gov. Valadares	Vale do Rio Doce
219/17	-	Neg	-	-	<i>Callithrix</i> sp.	urbana	Contagem	Metropolitana
220/17	-	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix</i> sp.	rural	Pres. Juscelino	Central
223/17	-	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix</i> sp.	urbana	Belo Horizonte	Metropolitana
224/17	-	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix</i> sp.	urbana	Belo Horizonte	Metropolitana
225/17	-	Neg	-	-	<i>Callithrix</i> sp.	urbana	Belo Horizonte	Metropolitana
228/17	-	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix</i> sp.	urbana	Belo Oriente	Vale do Rio Doce
230/17	-	Neg	-	-	<i>Callithrix</i> sp.	rural	Patrocínio De Muriaé	Zona da Mata
231/17	-	Neg	-	-	<i>Callithrix</i> sp.	urbana	Cataguases	Zona da Mata
232/17	-	Neg	-	-	<i>Callithrix</i> sp.	urbana	Cataguases	Zona da Mata
233/17	-	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix</i> sp.	rural	Nova União	Metropolitana
235/17	-	Neg	-	-	<i>Callithrix</i> sp.	urbana	S. João Del Rei	Campo das Vertentes
239/17	-	Neg	-	-	<i>Callithrix</i> sp.	urbana	Gov. Valadares	Vale do Rio Doce
241/17	-	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix</i> sp.	urb/rur	Pedro Leopoldo	Metropolitana
243/17	-	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix</i> sp.	rural	S. G. do Rio Abaixo	Metropolitana
244/17	-	Neg	-	-	<i>Callithrix</i> sp.	urbana	Sabará	Metropolitana
249/17	-	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix</i> sp.	rural	Paraopeba	Metropolitana
250/17	-	Neg	-	-	<i>Callithrix</i> sp.	urbana	Contagem	Metropolitana
251/17	-	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix</i> sp.	rural	Cajuri	Zona da Mata
252/17	-	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix</i> sp.	urbana	Belo Horizonte	Metropolitana
254/17	-	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix</i> sp.	urbana	Sete Lagoas	Metropolitana
255/17	-	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix</i> sp.	rural	Inhaúma	Metropolitana
260/17	-	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix</i> sp.	urbana	Nova Lima	Metropolitana
261/17	-	Neg	-	-	<i>Callithrix</i> sp.	urbana	Brumadinho	Metropolitana
263/17	-	Neg	-	-	<i>Callithrix</i> sp.	urb/rur	V. do Rio Branco	Zona da Mata
264/17	-	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix</i> sp.	urbana	Santa Luzia	Metropolitana
269/17	-	Neg	-	-	<i>Callithrix</i> sp.	urb/rur	Vespasiano	Metropolitana
271/17	-	Neg	Neg	Neg	<i>Alouatta</i> sp.	rural	Santa Juliana	Triângulo/Alto Paranaíba
272/17	-	Neg	Neg	Neg	<i>Callicebus</i> sp.	rural	C. Xavier Chaves	Campo das Vertentes
276/17	-	Neg	-	-	<i>Callithrix</i> sp.	urbana	Coronel Fabriciano	Vale do Rio Doce
277/17	-	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix</i> sp.	urbana	Gov. Valadares	Vale do Rio Doce
280/17	-	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix</i> sp.	urbana	Itabirito	Metropolitana
281/17	-	Neg	-	-	<i>Callithrix</i> sp.	urbana	Fronteira	Triângulo/Alto Paranaíba
282/17	-	Neg	-	-	<i>Callithrix</i> sp.	urbana	Nova Lima	Metropolitana
283/17	-	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix</i> sp.	urbana	Belo Horizonte	Metropolitana
284/17	-	Neg	-	-	<i>Callithrix</i> sp.	rural	Santa Luzia	Metropolitana
287/17	-	Neg	-	-	<i>Callithrix</i> sp.	rural	S. G. do Rio Preto	Jequitinhonha
292/17	-	Neg	-	-	<i>Callithrix</i> sp.	urbana	Iturama	Triângulo/Alto Paranaíba

ID/ano	ZIKV	CHIKV	MAYV	OROV	Gênero	Área	Município	Mesorregião
297/17	-	Neg	-	-	<i>Callithrix</i> sp.	urbana	Belo Horizonte	Metropolitana
298/17	-	Neg	-	-	<i>Callithrix</i> sp.	urbana	Matias Barbosa	Zona da Mata
301/17	-	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix</i> sp.	urbana	Uberlândia	Triângulo/Alto Paranaíba
302/17	-	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix</i> sp.	urbana	Sabará	Metropolitana
305/17	-	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix</i> sp.	urbana	Matias Barbosa	Zona da Mata
306/17	-	Neg	-	-	<i>Callithrix</i> sp.	urbana	Tupaciguara	Triângulo/Alto Paranaíba
307/17	-	Neg	-	-	<i>Callithrix</i> sp.	urbana	Uberlândia	Triângulo/Alto Paranaíba
308/17	-	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix</i> sp.	urbana	Belo Horizonte	Metropolitana
309/17	-	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix</i> sp.	urbana	Nova Lima	Metropolitana
311/17	-	Neg	-	-	<i>Callithrix</i> sp.	urbana	Itajubá	Sul/Sudoeste
312/17	-	Neg	-	-	<i>Callithrix</i> sp.	urbana	Uberlândia	Triângulo/Alto Paranaíba
315/17	-	Neg	-	-	<i>Callithrix</i> sp.	urbana	Ribeirão das Neves	Metropolitana
317/17	-	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix</i> sp.	urbana	Vespasiano	Metropolitana
318/17	-	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix</i> sp.	rural	S. Domingos do Prata	Metropolitana
319/17	-	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix</i> sp.	urbana	Ituiutaba	Triângulo/Alto Paranaíba
321/17	-	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix</i> sp.	urbana	Nova Lima	Metropolitana
322/17	-	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix</i> sp.	urbana	Montes Claros	Norte
324/17	-	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix</i> sp.	urbana	Ibirité	Metropolitana
326/17	-	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix</i> sp.	urbana	Uberlândia	Triângulo/Alto Paranaíba
329/17	-	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix</i> sp.	rural	Pedro Leopoldo	Metropolitana
331/17	-	Neg	-	-	<i>Callithrix</i> sp.	urbana	Belo Horizonte	Metropolitana
333/17	-	Neg	-	-	<i>Callithrix</i> sp.	urbana	Belo Horizonte	Metropolitana
335/17	-	Neg	-	-	<i>Callithrix</i> sp.	rural	Moeda	Metropolitana
338/17	-	Neg	-	-	<i>Callithrix</i> sp.	rural	Ouro Preto	Metropolitana
341/17	-	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix</i> sp.	rural	Frutal/Planura	Triângulo/Alto Paranaíba
342/17	-	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix</i> sp.	urbana	Santa Vitória	Triângulo/Alto Paranaíba
346/17	-	Neg	Neg	Neg	<i>Alouatta</i> sp.	rural	S. João Del Rei	Campo das Vertentes
348/17	-	Neg	-	-	<i>Callithrix</i> sp.	urbana	Sete Lagoas	Metropolitana
360/17	-	Neg	-	-	<i>Callithrix</i> sp.	urbana	Conselheiro Lafaiete	Metropolitana
361/17	-	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix</i> sp.	urbana	Sete Lagoas	Metropolitana
363/17	-	Neg	-	-	<i>Callithrix</i> sp.	urbana	Acaiaca	Zona da Mata
364/17	-	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix</i> sp.	rural	Fronteira	Triângulo/Alto Paranaíba
367/17	-	Neg	-	-	<i>Callithrix</i> sp.	urbana	Além Paraíba	Zona da Mata
368/17	-	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix</i> sp.	urbana	Belo Horizonte	Metropolitana
373/17	-	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix</i> sp.	urbana	Arceburgo	Sul/Sudoeste
374/17	-	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix</i> sp.	urbana	S. Roque de Minas	Oeste
377/17	-	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix</i> sp.	rural	Canaã	Zona da Mata
380/17	-	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix</i> sp.	urb/rur	Nova Lima	Metropolitana

ID/ano	ZIKV	CHIKV	MAYV	OROV	Gênero	Área	Município	Mesorregião
383/17	-	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Conc. da Aparecida	Sul/Sudoeste
384/17	-	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Nova Módica	Vale do Rio Doce
386/17	-	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Sete Lagoas	Metropolitana
392/17	-	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Itapagipe	Triângulo/alto Paranaíba
396/17	-	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Itajubá	Sul/Sudoeste
399/17	-	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Itajubá	Sul/Sudoeste
401/17	-	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Santa Luzia	Metropolitana
403/17	-	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	rural	Nova Lima	Metropolitana
405/17	-	Neg	Neg	Neg	Cebidae	rural	Pedro Teixeira	Zona da Mata
451/18	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Romaria	Triângulo/Alto Paranaíba
479/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Contagem	Metropolitana
496/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Belo Horizonte	Metropolitana
498/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Santa Bárbara	Metropolitana
501/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Belo Horizonte	Metropolitana
505/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Goianá	Zona da Mata
507/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Belo Horizonte	Metropolitana
511/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Belo Horizonte	Metropolitana
512/18	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	rural	Periquito	Vale do Rio Doce
514/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Buenópolis	Central
524/18	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	rural	Cataguases	Zona da Mata
527/18	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	rural	Andrelândia	Sul/Sudoeste
529/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Santos Dumont	Zona da Mata
530/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Belo Horizonte	Metropolitana
532/18	Neg	Neg	Neg	Neg	Cebidae	rural	Rio Piracicaba	Metropolitana
533/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Curvelo	Central
547/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Cataguases	Zona da Mata
551/18	Neg	Neg	-	-	Cebidae	urbana	Poços de Caldas	Sul/Sudoeste
556/18	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	urb/rur	Santana do Paraíso	Vale do Rio Doce
557/18	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	rural	Leopoldina	Zona da Mata
558/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Curvelo	Central
562/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Belo Horizonte	Metropolitana
565/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Santa Luzia	Metropolitana
567/18	Neg	Neg	Neg	Neg	Cebidae	rural	Campos Florido	Triângulo/Alto Paranaíba
568/18	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	rural	Conquista	Triângulo/Alto Paranaíba
569/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Ipatinga	Vale do Rio Doce
570/18	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	rural	Diamantina	Jequitinhonha
574/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Ponte Nova	Campo das Vertentes
576/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Santa Luzia	Metropolitana

ID/ano	ZIKV	CHIKV	MAYV	OROV	Gênero	Área	Município	Mesorregião
577/18	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	urb/rur	Esmeraldas	Metropolitana
579/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	BambuÍ	Oeste
580/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Divinópolis	Oeste
585/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Jaboticatubas	Metropolitana
619/18	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Monte Carmelo	Triângulo/Alto Paranaíba
620/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Santana dos Montes	Metropolitana
621/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Contagem	Metropolitana
622/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Nova Era	Metropolitana
624/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Muzambinho	Sul/Sudoeste
625/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Belo Horizonte	Metropolitana
626/18	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	rural	Presidente Juscelino	Central
628/18	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	urb/rur	Ribeirão das Neves	Metropolitana
630/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Papagaios	Metropolitana
632/18	Neg	Neg	Neg	Neg	Cebidae	rural	Conceição das Pedras	Sul/Sudoeste
642/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Santa Luzia	Metropolitana
659/18	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	rural	Pedrinópolis	Triângulo/Alto Paranaíba
664/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Tocantins	Zona da Mata
665/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Belo Horizonte	Metropolitana
666/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Buenópolis	Central
669/18	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	rural	S. Sebastião do Paraíso	Sul/Sudoeste
670/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Divinópolis	Oeste
671/18	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Alouatta sp.</i>	rural	Leopoldina	Zona da Mata
673/18	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Uberlândia	Triângulo/Alto Paranaíba
676/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Uberlândia	Triângulo/Alto Paranaíba
677/18	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	rural	Lontra	Norte
678/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Uberlândia	Triângulo/Alto Paranaíba
679/18	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	rural	Divinésia	Zona da Mata
681/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Uberlândia	Triângulo/Alto Paranaíba
682/18	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	rural	Leopoldina	Zona da Mata
683/18	Neg	Neg	Neg	Neg	Cebidae	rural	Itapeva	Sul/Sudoeste
684/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Belo Horizonte	Metropolitana
685/18	Neg	Neg	Neg	Neg	Cebidae	rural	Córrego Novo	Vale do Rio Doce
687/18	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	rural	Silvianópolis	Sul/Sudoeste
688/18	Neg	Neg	Neg	Neg	Cebidae	rural	Esp. Santo do Dourado	Sul/Sudoeste
692/18	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Alouatta sp.</i>	rural	Cabeceira Grande	Noroeste
699/18	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	rural	Ubá	Zona da Mata
703/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Araxá	Triângulo/Alto Paranaíba
707/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Uberlândia	Triângulo/Alto Paranaíba

ID/ano	ZIKV	CHIKV	MAYV	OROV	Gênero	Área	Município	Mesorregião
710/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Belo Horizonte	Metropolitana
711/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Estrela do Sul	Triângulo/Alto Paranaíba
713/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	S. Sebastião do Paraíso	Sul/Sudoeste
714/18	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	rural	Inhaúma	Metropolitana
715/18	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	rural	Patrocínio	Triângulo/Alto Paranaíba
717/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Divinópolis	Oeste
719/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Arapora	Triângulo/Alto Paranaíba
720/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Sete Lagoas	Metropolitana
721/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Sete Lagoas	Metropolitana
723/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Liberdade	Sul/Sudoeste
724/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Coromandel	Triângulo/Alto Paranaíba
725/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Uberlândia	Triângulo/Alto Paranaíba
726/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Araguari	Triângulo/Alto Paranaíba
727/18	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	urb/rur	Divinópolis	Oeste
728/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Monte Carmelo	Triângulo/Alto Paranaíba
732/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Uberaba	Triângulo/Alto Paranaíba
734/18	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	rural	Presidente Juscelino	Central
735/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Passos	Sul/Sudoeste
736/18	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Alouatta sp.</i>	rural	Monte Carmelo	Triângulo/Alto Paranaíba
737/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Belo Horizonte	Metropolitana
738/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Belo Horizonte	Metropolitana
739/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Aracuaí	Jequitinhonha
740/18	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	rural	Felixlândia	Central
742/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Belo Horizonte	Metropolitana
743/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Belo Horizonte	Metropolitana
744/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Belo Horizonte	Metropolitana
745/18	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	rural	Ribeirão das Neves	Metropolitana
746/18	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	rural	Monte Carmelo	Triângulo/Alto Paranaíba
749/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Belo Horizonte	Metropolitana
750/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	São Romão	Norte
751/18	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	rural	Uberaba	Triângulo/Alto Paranaíba
752/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Belo Horizonte	Metropolitana
754/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Além Paraíba	Zona da Mata
755/18	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	rural	Uberaba	Triângulo/Alto Paranaíba
757/18	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	rural	Estrela do Sul	Triângulo/Alto Paranaíba
758/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Belo Horizonte	Metropolitana
759/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Monte Santo de Minas	Sul/Sudoeste
760/18	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	rural	Uberaba	Triângulo/Alto Paranaíba

ID/ano	ZIKV	CHIKV	MAYV	OROV	Gênero	Área	Município	Mesorregião
761/18	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	rural	Leopoldina	Zona da Mata
762/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Belo Horizonte	Metropolitana
763/18	Neg	Neg	-	-	-	urbana	Cataguases	Zona da Mata
764/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Monte Santo de Minas	Sul/Sudoeste
765/18	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	rural	Prudente de Moraes	Metropolitana
766/18	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	rural	Uberaba	Triângulo/Alto Paranaíba
767/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Belo Horizonte	Metropolitana
768/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Governador Valadares	Vale do Rio Doce
769/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Belo Horizonte	Metropolitana
770/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Tiradentes	Campo das Vertentes
771/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Uberlândia	Triângulo/Alto Paranaíba
772/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Belo Horizonte	Metropolitana
773/18	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	rural	Uberaba	Triângulo/Alto Paranaíba
774/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Ribeirão das Neves	Metropolitana
775/18	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	urb/rur	Ibirité	Metropolitana
776/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Nova Rezende	Sul/Sudoeste
777/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Belo Horizonte	Metropolitana
778/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Paracatu	Noroeste
779/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Uberlândia	Triângulo/Alto Paranaíba
780/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Belo Horizonte	Metropolitana
781/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Gov. Valadares	Vale do Rio Doce
782/82	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	rural	Ipatinga	Vale do Rio Doce
783/18	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	urb/rur	Guanhães	Vale do Rio Doce
784/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Leopoldina	Zona da Mata
785/18	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	rural	Timóteo	Zona da Mata
786/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Belo Horizonte	Metropolitana
787/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Uberaba	Triângulo/Alto Paranaíba
788/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Contagem	Metropolitana
789/18	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	urb/rur	Augusto de Lima	Central
790/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Visc. do Rio Branco	Zona da Mata
791/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	São Tiago	Campo das Vertentes
792/18	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	rural	Arinos	Noroeste
793/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Muzambinho	Sul/Sudoeste
794/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Pirapora	Norte
795/18	Neg	Neg	-	-	<i>S/Id</i>	urbana	Buenópolis	Central
796/18	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	urb/rur	Itajubá	Sul/Sudoeste
797/18	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	rural	Carmo do Paranaíba	Triângulo/Alto Paranaíba
798/18	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Sapajus sp.</i>	rural	Ibituruna	Oeste

ID/ano	ZIKV	CHIKV	MAYV	OROV	Gênero	Área	Município	Mesorregião
799/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Belo Horizonte	Metropolitana
800/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Itajubá	Sul/Sudoeste
801/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Abadia dos Dourados	Triângulo/Alto Paranaíba
802/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Belo Horizonte	Metropolitana
803/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Uberlândia	Triângulo/Alto Paranaíba
804/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Cataguases	Zona da Mata
805/18	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	rural	Frutal	Triângulo/Alto Paranaíba
807/18	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	rural	Tiros	Triângulo/Alto Paranaíba
808/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Aimorés	Vale do Rio Doce
809/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Curvelo	Central
810/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Belo Horizonte	Metropolitana
811/18	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	rural	Uruana de Minas	Noroeste
812/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Uberlândia	Triângulo/Alto Paranaíba
813/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	S. Sebastião do Paraíso	Sul/Sudoeste
814/18	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	rural	Uberlândia	Triângulo/Alto Paranaíba
815/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Lagoa Formosa	Triângulo/Alto Paranaíba
816/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Belo Horizonte	Metropolitana
817/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Cataguases	Zona da Mata
818/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Guaxupé	Sul/Sudoeste
819/18	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	rural	Uruana de Minas	Noroeste
820/18	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	rural	Arceburgo	Sul/Sudoeste
821/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Araxá	Triângulo/Alto Paranaíba
822/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Planura	Triângulo/Alto Paranaíba
823/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Curvelo	Central
824/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Uberlândia	Triângulo/Alto Paranaíba
825/18	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	rural	Lassance	Norte
826/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Uberlândia	Triângulo/Alto Paranaíba
827/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Mantena	Vale do Rio Doce
828/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Belo Horizonte	Metropolitana
829/18	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	rural	Catas Altas	Metropolitana
830/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Buenópolis	Central
831/18	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	rural	Arceburgo	Sul/Sudoeste
832/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Ribeirão das Neves	Metropolitana
833/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Gouveia	Jequitinhonha
834/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Araxá	Triângulo/Alto Paranaíba
835/18	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	rural	Gouveia	Jequitinhonha
836/18	Neg	Neg	-	-	<i>Alouatta sp.</i>	urbana	Belo Horizonte	Metropolitana
837/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Araporã	Triângulo/Alto Paranaíba

ID/ano	ZIKV	CHIKV	MAYV	OROV	Gênero	Área	Município	Mesorregião
838/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Ibirité	Metropolitana
839/18	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	rural	Pedro Leopoldo	Metropolitana
840/18	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>S/Id</i>	rural	Sacramento	Triângulo/Alto Paranaíba
841/18	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	rural	Passos	Sul/Sudoeste
842/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	S. Sebastiao do Paraiso	Sul/Sudoeste
843/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Patos de Minas	Triângulo/Alto Paranaíba
844/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Gov. Valadares	Vale do Rio Doce
845/18	Neg	Neg	-	-	Cebidae	urbana	Sericita	Zona da Mata
846/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Gov. Valadares	Vale do Rio Doce
848/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Guapé	Sul/Sudoeste
849/18	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	urb/rur	Rio Paranaíba	Triângulo/Alto Paranaíba
851/18	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	rural	Bom Despacho	Central
853/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Belo Horizonte	Metropolitana
852/18	Neg	Neg	Neg	Neg	Cebidae	rural	São Domingos do Prata	Metropolitana
854/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Conc. da Aparecida	Sul/Sudoeste
855/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Paracatu	NorOeste
856/18	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	rural	Leopoldina	Zona da Mata
857/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Belo Horizonte	Metropolitana
858/18	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	rural	Cabeceira Grande	NorOeste
859/18	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	rural	São Joao Nepomuceno	Zona da Mata
860/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Belo Horizonte	Metropolitana
861/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	São Jose da Lapa	Metropolitana
862/18	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	rural	Cana Verde	Oeste
863/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Lontra	Norte
864/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Gov. Valadares	Vale do Rio Doce
865/18	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>S/Id</i>	rural	Itabira	Metropolitana
866/18	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	rural	Inhaúma	Metropolitana
867/18	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>S/Id</i>	rural	Alpinópolis	Sul/Sudoeste
868/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Barra Longa	Zona da Mata
869/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Açucena	Vale do Rio Doce
870/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Belo Horizonte	Metropolitana
871/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Itabira	Metropolitana
872/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Belo Horizonte	Metropolitana
873/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Leopoldina	Zona da Mata
874/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Leopoldina	Zona da Mata
875/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Belo Horizonte	Metropolitana
876/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Congonhas	Metropolitana
877/18	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	rural	Araguari	Triângulo/Alto Paranaíba

ID/ano	ZIKV	CHIKV	MAYV	OROV	Gênero	Área	Município	Mesorregião
878/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Patrocínio	Triângulo/Alto Paranaíba
879/18	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	rural	Itapagipe	Triângulo/Alto Paranaíba
880/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Guapé	Sul/Sudoeste
881/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Estrela do Sul	Triângulo/Alto Paranaíba
882/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Araxá	Triângulo/Alto Paranaíba
883/18	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	urb/rur	Visc. do Rio Branco	Zona da Mata
884/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Belo Horizonte	Metropolitana
885/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Belo Horizonte	Metropolitana
886/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Iturama	Triângulo/Alto Paranaíba
887/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Belo Horizonte	Metropolitana
888/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	S. G. do Rio Abaixo	Metropolitana
889/18	Neg	-	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Itabira	Metropolitana
890/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Raposos	Metropolitana
891/18	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	rural	São Joao Del Rei	Campo das Vertentes
892/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Campo Belo	Oeste
893/18	Neg	Neg	Neg	Neg	Cebidae	rural	Pimenta	Oeste
895/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Sete Lagoas	Metropolitana
896/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Bom Jardim de Minas	Sul/Sudoeste
897/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Belo Horizonte	Metropolitana
899/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	rural	Biquinhas	Central
900/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Cataguases	Zona da Mata
901/18	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	rural	Grupiara	Triângulo/Alto Paranaíba
902/18	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	rural	Virgem da Lapa	Jequitinhonha
903/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	rural	Virgem da Lapa	Jequitinhonha
904/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Itabira	Metropolitana
905/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Belo Horizonte	Metropolitana
906/18	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	rural	Uruana de Minas	Noroeste
907/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Belo Horizonte	Metropolitana
908/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Belo Horizonte	Metropolitana
909/18	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	rural	Sete Lagoas	Metropolitana
910/18	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	rural	Sete Lagoas	Metropolitana
911/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Itabira	Metropolitana
912/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Contagem	Metropolitana
913/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Belo Horizonte	Metropolitana
916/18	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Sete Lagoas	Metropolitana
917/18	Neg	Neg	-	-	<i>Alouatta sp.</i>	rural	Santa Rita de Caldas	Sul/Sudoeste
918/18	Neg	Neg	-	-	Cebidae	rural	Uruana de Minas	Noroeste
898/19	Neg	-	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	rural	Moeda	Metropolitana

ID/ano	ZIKV	CHIKV	MAYV	OROV	Gênero	Área	Município	Mesorregião
914/19	Neg	-	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Belo Horizonte	Metropolitana
915/19	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Itabirito	Metropolitana
920/19	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Belo Horizonte	Metropolitana
921/19	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Itabira	Metropolitana
922/19	Neg	Neg	Neg	Neg	Cebidae	urbana	Dionísio	Metropolitana
923/19	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	urb/rur	Porto Firme	Zona da Mata
924/19	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Arceburgo	Sul/Sudoeste
925/19	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Belo Horizonte	Metropolitana
926/19	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Sete Lagoas	Metropolitana
927/19	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	São Francisco	Norte
928/19	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Leopoldina	Zona da Mata
929/19	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Sete Lagoas	Metropolitana
931/19	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Belo Horizonte	Metropolitana
932/19	Neg	Neg	Neg	Neg	Cebidae	urb/rur	Jacutinga	Sul/Sudoeste
933/19	Neg	Neg	Neg	Neg	Cebidae	urbana	Poços de Caldas	Sul/Sudoeste
934/19	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	urb/rur	Cataguases	Zona da Mata
935/19	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	rural	Tocantins	Zona da Mata
936/19	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Belo Horizonte	Metropolitana
937/19	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	São Tiago	Campo das Vertentes
938/19	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Belo Horizonte	Metropolitana
939/19	-	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Piau	Zona da Mata
940/19	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Mateus Leme	Metropolitana
942/19	Neg	Neg	Neg	Neg	Cebidae	urbana	Monte Santo de Minas	Sul/Sudoeste
943/19	-	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Mariana	Metropolitana
944/19	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Pedras de M. da Cruz	Norte
945/19	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	rural	Arceburgo	Sul/Sudoeste
946/19	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Belo Horizonte	Metropolitana
947/19	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Belo Horizonte	Metropolitana
949/19	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Cataguases	Zona da Mata
951/19	-	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	rural	Mirabela	Norte
953/19	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Visc. Do Rio Branco	Zona da Mata
954/19	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Leopoldina	Zona da Mata
955/19	Neg	Neg	-	-	<i>Pan Troglodytes</i>	urbana	Belo Horizonte	Metropolitana
956/19	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Belo Horizonte	Metropolitana
957/19	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Uberlândia	Triângulo/Alto Paranaíba
958/19	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Uberlândia	Triângulo/Alto Paranaíba
959/19	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Uberlândia	Triângulo/Alto Paranaíba
960/19	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Uberlândia	Triângulo/Alto Paranaíba

ID/ano	ZIKV	CHIKV	MAYV	OROV	Gênero	Área	Município	Mesorregião
961/19	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>S/Id</i>	urbana	Itamogi	Sul/Sudoeste
962/19	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	rural	Itaúna	Oeste
963/19	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Curvelo	Central
964/19	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>S/Id</i>	urbana	Grupiara	Triângulo/Alto Paranaíba
965/19	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Curvelo	Central
966/19	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Nova Lima	Metropolitana
967/19	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Curvelo	Central
968/19	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Uberlândia	Triângulo/Alto Paranaíba
969/19	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Leopoldina	Zona da Mata
970/19	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Belo Horizonte	Metropolitana
971/19	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Formiga	Oeste
972/19	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Uberlândia	Triângulo/Alto Paranaíba
973/19	Neg	Neg	-	-	<i>S/Id</i>	urbana	Cataguases	Zona da Mata
974/19	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Santa Luzia	Metropolitana
975/19	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Belo Horizonte	Metropolitana
976/19	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Araguari	Triângulo/Alto Paranaíba
977/19	-	Neg	-	-	<i>Sapajus sp.</i>	urbana	Uberlândia	Triângulo/Alto Paranaíba
978/19	-	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	rural	Além Paraíba	Zona da Mata
979/19	-	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	rural	Uberlândia	Triângulo/Alto Paranaíba
980/19	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Santa Luzia	Metropolitana
981/19	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Araguari	Triângulo/Alto Paranaíba
982/19	-	Neg	Neg	Neg	<i>Sapajus sp.</i>	rural	Piracema	Oeste
983/19	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Uberlândia	Triângulo/Alto Paranaíba
984/19	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Ubaí	Norte
985/19	-	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	rural	Sete Lagoas	Metropolitana
986/19	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Leopoldina	Metropolitana
987/19	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Itabirito	Metropolitana
988/19	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Teófilo Otoni	Vale do Mucuri
989/19	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Lagoa Santa	Metropolitana
990/19	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Ubaí	Norte
991/19	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Belo Horizonte	Metropolitana
992/19	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Itabira	Metropolitana
993/19	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Timóteo	Vale do Rio Doce
994/19	-	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	rural	Virgem da Lapa	Jequitinhonha
995/19	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Ibirité	Metropolitana
996/19	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Belo Horizonte	Metropolitana
997/19	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Leopoldina	Zona da Mata
998/19	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Belo Horizonte	Metropolitana

ID/ano	ZIKV	CHIKV	MAYV	OROV	Gênero	Área	Município	Mesorregião
999/19	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Conceição dos Ouros	Triângulo/Alto Paranaíba
1000/19	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	rural	Paraopeba	Metropolitana
1001/19	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Lagoa Santa	Metropolitana
1002/19	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Lagoa Santa	Metropolitana
1003/19	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Belo Horizonte	Metropolitana
1004/19	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Belo Horizonte	Metropolitana
1005/19	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Além Paraíba	Zona da Mata
1006/19	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Nova Lima	Metropolitana
1007/19	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Belo Horizonte	Metropolitana
1008/19	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	urb/rur	Além Paraíba	Zona da Mata
1009/19	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Guanhães	Vale do Rio Doce
1010/19	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Patrocínio	Triângulo/Alto Paranaíba
1011/19	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Santa Luzia	Metropolitana
1014/19	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Leopoldina	Zona da Mata
1015/19	-	Neg	Neg	Neg	Cebidae	rural	S. Sebastião do Oeste	Metropolitana
1016/19	-	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	rural	Patrocínio	Triângulo/Alto Paranaíba
1017/19	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Divinópolis	Metropolitana
1018/19	-	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	rural	Guanhães	Vale do Rio Doce
1019/19	-	Neg	Neg	Neg	Cebidae	rural	Sabinópolis	Metropolitana
1021/19	-	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	rural	Bom Despacho	Metropolitana
1023/19	-	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Araxá	Metropolitana
1024/19	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Leopoldina	Zona da Mata
1025/19	-	Neg	Neg	Neg	<i>Sapajus sp.</i>	rural	Piracema	Oeste
1026/19	-	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Sete Lagoas	Metropolitana
1027/19	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Sete Lagoas	Metropolitana
1028/19	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Divinópolis	Metropolitana
1029/19	-	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	rural	Visc. do Rio Branco	Zona da Mata
1030/19	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Pedro Leopoldo	Metropolitana
1031/19	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Callithrix sp.</i>	urb/rur	Ibirité	Metropolitana
1032/19	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	São Francisco	Norte
1033/19	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Belo Horizonte	Metropolitana
1034/19	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Cataguases	Zona da Mata
1035/19	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Belo Horizonte	Metropolitana
1036/19	Neg	Neg	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Cataguases	Zona da Mata
1037/19	Neg	-	-	-	<i>Callithrix sp.</i>	urbana	Carangola	Metropolitana

ID: número de identificação; “-“: amostra não testada para o vírus em questão; S/Id: Sem identificação.

ANEXO B - Tabela Suplementar 2

Tabela Suplementar 2: Sequências genética de *Yellow fever virus* utilizadas na construção da árvore filogenética

GenbankID	YFV strain	Origin	Year	Organism	Genotype
Non-ID	nhp1041_rural	Brazil – Minas Gerais	2020	NHP	South America I
MN517216	nhp481_rural	Brazil – Minas Gerais	2018	NHP	South America I
MN517217	nhp525_rural	Brazil – Minas Gerais	2018	NHP	South America I
MN517218	nhp534_urban	Brazil – Minas Gerais	2018	NHP	South America I
MN517219	nhp541_rural	Brazil – Minas Gerais	2018	NHP	South America I
MN517220	nhp637_urban	Brazil – Minas Gerais	2018	NHP	South America I
MN517221	nhp657_urban	Brazil – Minas Gerais	2018	NHP	South America I
AY640589.1	ASIBI	Ghana	1927	human	West African II
AY839635.1	ArD76320	Senegal	1990	mosquito	West African II
AY968064.1	YFVstrain	Angola	1971	human	Angola
DQ100292.1	17DD	Brazil	-	-	West African II
GQ379162.1	#case1	Peru	2008	human	West African II
GQ379163.1	#case2	Peru	2007	human	West African II
GU073145.1	Ke/ArD149213	Senegal	2000	mosquito	West African II
HM582851.1	TVP11767	TrinidadTobago	2009	human	South America I
JF912187.1	BeH622205	Brazil	2001	human	South America I
JF912188.1	BeH622493	Brazil	2000	mosquito	South America I
JF912190.1	BeH655417	Brazil	2002	human	South America I
JX898871.1	ArD114896	Senegal	1995	mosquito	West African II
JX898872.1	ArD114972	Senegal	1995	mosquito	West African II
JX898874.1	ArD149194	Senegal	2000	mosquito	South America I
KF907504.1	88/1999	Bolivia	1999	human	South America II
KM388814.1	6A	Venezuela	2005	human	South America I
KM388815.1	9A	Venezuela	2007	NHP	South America I
KM388816.1	10A	Venezuela	2010	NHP	South America I
KU978763.1	Ogbomosho	Nigeria	1946	human	Weste Africa II
KU978764.1	M 185 D 160	Sudan	1941	human	Weste Africa II
KX010994.1	CIC1	China	2019	human	Angola
KX010995.1	CIC2	China	2018	human	Angola
KX010996.1	CIC3	China	2017	human	Angola
KX027336.1	CIC4	China	2016	human	Angola
KX982182.1	Cahama-C17	Angola	2016	human	Angola
KY861728.1	BeAn754036 (PR4408)_	Brazil	2008	NHP	South America I
KY885000.2	ES-504	Brazil – Espírito Santo	2017	NHP	South America I
KY885001.2	ES-505	Brazil – Espírito Santo	2017	NHP	South America I
MF289572.1	EHI	Singapore	2017	NHP	West African II
MF370536.1	PR5819-BeAn841178	Brazil – Minas Gerais	2016	NHP	South America I
MH329655.1	SA39	Brazil – Minas Gerais	2018	NHP	South America I
MF370541.1	PR5908-BeAn844641	Brazil – Pará	2017	NHP	South America I
MF370542.1	PR5926-BeAn844893	Brazil – Pará	2017	NHP	South America I
MF370543.1	PR5937-BeAn845130	Brazil – Mato Grosso	2017	NHP	South America I

GenbankID	YFV strain	Origin	Year	Organism	Genotype
MF423374.2	PA196	Brazil – Espírito Santo	2017	mosquito	South America I
MF423377.2	RJ95	Brazil – Rio de Janeiro	2017	NHP	South America I
MG969501.1	FIOCRUZ 71530/MG/01	Brazil – Minas Gerais	2001	human	South America I
MH018067.1	M11	Brazil – Minas Gerais	2017	NHP	South America I
MH018099.1	M218	Brazil – Bahia	2017	NHP	South America I
MH018101.1	M226	Brazil – Minas Gerais	2003	human	South America I
MH018112.1	4278	Brazil – Rio de Janeiro	2017	NHP	South America I
MH193173.1	SA129	Brazil – São Paulo	2018	NHP	South America I
MH329655.1	SA39	Brazil – Minas Gerais	2018	NHP	South America I
MH444798.1	FVV	Senegal	1927	human	West African II
MH484430.1	RJ163	Brazil – Minas Gerais	2017	NHP	South America I
MH666057.1	SPAn 14/2017	Brazil	2017	NHP	South America I
MK089775.1	MR1356	Brazil – Rio de Janeiro	2017	mosquito	South America I
MK333800.1	ES03	Brazil – Espírito Santo	2017	NHP	South America I
MK333803.1	GO05	Brazil – Goiás	2017	NHP	South America I
MK333804.1	GO27	Brazil – Goiás	2015	NHP	South America I
MK533792.1	155	Brazil – Rio de Janeiro	2019	NHP	South America I
MK583169.1	YFV052FIG	Brazil – São Paulo	2018	human	South America I
MK760661.1	t146a164 11Jan ur	Brazil	2018	human	South America I
MN604283.2	RJ259	Brazil – Bahia	2017	NHP	South America I
MN604284.1	RJ258	Brazil – Bahia	2017	human	South America I
MT497523.1	PNH94 CP227	Brazil – São Paulo	2016	NHP	South America I
MT497525.1	PNH580 CP179	Brazil – São Paulo	2017	NHP	South America I
U23566.1	1914-81	Ecuador	1981	human	South America II
U23577.1	M-112	Sudan	1950	human	Angola
U23579.1	T790882	Trinidad	1979	mosquito	South America I
U23580.1	V-528A	Colombia	1979	mosquito	South America I

ANEXO C – Artigo aceito em periódico internacional

Silva et al. *Virology Journal* (2020) 17:9
<https://doi.org/10.1186/s12985-019-1277-7>

Virology Journal

REVIEW

Open Access

Recent sylvatic yellow fever virus transmission in Brazil: the news from an old disease



Natalia Ingrid Oliveira Silva^{1†}, Lívia Sacchetto^{1†}, Izabela Maurício de Rezende^{1†}, Giliane de Souza Trindade¹, Angelle Desiree LaBeaud², Benoit de Thoisy³ and Betânia Paiva Drumond^{1*}

Abstract

Yellow fever (YF) is an acute viral disease, affecting humans and non-human primates (NHP), caused by the yellow fever virus (YFV). Despite the existence of a safe vaccine, YF continues to cause morbidity and mortality in thousands of people in Africa and South America. Since 2016, massive YF outbreaks have taken place in Brazil, reaching YF-free zones, causing thousands of deaths of humans and NHP. Here we reviewed the main epidemiological aspects, new clinical findings in humans, and issues regarding YFV infection in vectors and NHP in Brazil. The 2016–2019 YF epidemics have been considered the most significant outbreaks of the last 70 years in the country, and the number of human cases was 2.8 times higher than total cases in the previous 36 years. A new YFV lineage was associated with the recent outbreaks, with persistent circulation in Southeast Brazil until 2019. Due to the high number of infected patients, it was possible to evaluate severity and death predictors and new clinical features of YF. *Haemagogus janthinomys* and *Haemagogus leucocelaenus* were considered the primary vectors during the outbreaks, and no human case suggested the occurrence of the urban transmission cycle. YFV was detected in a variety of NHP specimens presenting viscerotropic disease, similar to that described experimentally. Further studies regarding NHP sensitivity to YFV, YF pathogenesis, and the duration of the immune response in NHP could contribute to YF surveillance, control, and future strategies for NHP conservation.

Keywords: Yellow fever virus, Yellow fever, Arbovirus, Flavivirus, Non-human primate, Epizootic, Outbreak, Epidemiology, Vector, Pathogenesis

Background

Yellow fever virus (YFV) causes yellow fever (YF), an acute disease affecting humans and non-human primates (NHP) in several South American and African countries [1, 2]. In humans, YF ranges from asymptomatic infection to non-specific symptomatic illness and fatal hemorrhagic fever [1, 2]. Despite the existence of a safe vaccine, massive YF outbreaks occurred recently in Angola, Democratic Republic of Congo [3], and Brazil [4–6]. Humans are considered incidental hosts for YFV. The virus is maintained by different cycles in tropical

and subtropical regions of sub-Saharan Africa and South America via transmission among different mosquitoes and NHP [2, 7–9]. Most of the experimental studies with YFV were performed with Old World NHP, but little is known about YF and the pathogenesis in Neotropical NHP. Neotropical NHP are considered highly susceptible to YFV infection [10], which may be related to the recent introduction of the virus into the Americas [7]. Given the ongoing YF outbreaks in Brazil (2016–2019), we present the main aspects of sylvatic YF, including historical and recent outbreaks in the country.

Main text

The virus and transmission cycle

YFV is the prototype member of the genus *Flavivirus* (family Flaviviridae), with a single-strand positive-sense RNA genome of approximately 11 kb [11]. The genome

* Correspondence: betaniadrmond@gmail.com; betaniadrmond@ufmg.br

[†]Natalia Ingrid Oliveira Silva, Lívia Sacchetto and Izabela Maurício de Rezende contributed equally to this work.

¹Laboratório de Vírus, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2020 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

has a 5' end cap structure, and it is translated into a polyprotein precursor. The polyprotein is then cleaved by viral and cellular proteases into three structural proteins (capsid, envelope, and membrane proteins) and seven non-structural proteins (named NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, and NS5) [11].

Until now, one YFV serotype and seven genotypes have been described in Africa and South America. In Africa, five genotypes are described, named West Africa I, West Africa II, East Africa, East/Central Africa, and Angola [12, 13]. In Africa, there are three transmission cycles: (i) the sylvatic cycle is reported in the rainforest, involving NHP and sylvatic *Aedes africanus*, (ii) the intermediate cycle in the forest-savanna ecotone has peridomestic anthropophilic *Aedes spp.* (such as *A. furcifer*, *A. taylori*, *A. luteocephalus*, and *A. simpsoni*) as vectors, and (iii) the urban cycle has *Aedes aegypti* and *Aedes bromeliae* as vectors [12, 13]. In South America, YFV is endemic in the Amazon Basin (Brazil, Peru, Bolivia, Colombia, Ecuador, Venezuela, French Guiana, Suriname, and Guyana) [1, 14] and the sylvatic cycle involves various species of NHP and mosquitoes primarily belonging to the genera *Haemagogus* and *Sabethes* [15]. YFV South American I and II genotypes are derived from the West African genotype [16, 17]. South American I is the predominant YFV genotype in Brazil, possessing five distinct lineages 1A-1E [17, 18]. Until the middle of the 1990s, the old lineages (1A, 1B, and 1C) co-circulated in South America but were then replaced by the modern ones, 1D and 1E [8, 17-19]. Lineage 1E is responsible for the recent YF outbreaks in Brazil (2016 to 2019), and it was probably originated from YF endemic areas in North Brazil [20, 21]. Genomic analyses of YFV causing the recent outbreaks revealed unique mutations leading to nine amino acid substitutions in the deduced polyprotein (eight substitutions in highly conserved positions of non-structural proteins 3 and 5, which form the replication complex of YFV). Those amino acid substitutions have not been previously described for YFV, and the impacts of those changes in viral fitness should be investigated [19, 22].

Recent clinical findings in yellow fever patients

YF has been described as a viscerotropic disease in humans, with viral replication playing a crucial role in pathogenesis [23]. The viscerotropic YF has been divided into three periods: (i) infection, characterized by viremia and occurrence of flu-like symptoms; (ii) remission, when seroconversion is observed while fever and symptoms bounce back or disappear; and (iii) intoxication, which affects 15-25% of symptomatic patients. During the intoxication period, symptoms reappear, including hemorrhagic fever, multi-organ dysfunction, jaundice, oliguria, anuria, renal failure, and cardiovascular

instability [1, 23]. Among the severe cases, global mortality varies from 5 to 10%, but 40% of lethality has already been described in Brazil [2].

During the recent epidemics in Brazil, the most common signs and symptoms observed in humans were fever, headache, vomiting, jaundice, chills, nausea, abdominal pain, myalgia, arthralgia, rash, diarrhea, bleeding or hemorrhagic signs [24-27]. Recently, in severe YF cases, a critical metabolic acidosis leading to the need for hemodialysis [25], increased levels of serum lipase [25, 28] and a high prevalence of pancreatitis were observed [25]. These studies highlighted the importance of pancreatitis in the evolution of YF and the need for further studies addressing this issue [25, 28].

Other studies have demonstrated different outcomes and patterns regarding YF infection. Although YF is mainly viscerotropic in humans, Marinho and colleagues (2019) described a case of a 3-year-old girl with severe manifestations in the central nervous system. The patient had mildly elevated amino transaminases but no classical YF signs or symptoms. After six days of hospitalization, the child died, and postmortem analysis showed wild-type YFV RNA in the cerebrospinal fluid [29]. The persistence of the wild-type YFV genome has been demonstrated in serum [28] and in urine [28, 30], until 28 and 47 days after the onset of symptoms, respectively. These findings indicate that YFV might persist in the host for more extended periods than previously thought. During the follow-up of two YF patients, increased levels of serum alanine transaminase (ALT) and serum aspartate transaminase (AST) (ALT > 1000 IU/L and AST > 301 IU/L) were observed two months after the onset of YF. The serum transaminases persisted elevated for up to six months [31], indicating the need for further studies on the convalescence phase of YF.

Studies have also been conducted to investigate the predictors of severity and death in different groups of YF patients. Age and elevated levels of AST, ALT, and creatinine have been independently associated with mortality in YF patients [26], while higher values of serum lipase and lower values of factor V were related to severe cases [28]. Kallas and colleagues (2019) analyzed data from 76 YF patients and observed that age, neutrophil count, AST, and viral load were independently related with death [27]. Clinical and laboratory indicators could support the management of patients and the establishment of prognosis. However, one should keep in mind that YF evolves rapidly, and clinical characteristics may vary according to different factors related to the host and the phase of infection.

Yellow fever surveillance and control

Since all South American NHP are highly susceptible to YFV infection, and epizootics often precede human

cases, NHP can be used as sentinels during surveillance programs [8]. In 1999, the Brazilian Ministry of Health (MOH) launched the Epizootics Surveillance Program aiming at the investigation of NHP epizootics and entomological surveillance [32]. After the detection of epizootics causing the death of NHP in a region, a survey of the vaccination history of residents near the site, an active search for suspected human cases, and biological sample collection for laboratory investigation are conducted. For YF diagnosis in NHP, organ fragments, especially the liver, but also spleen, kidney, heart, lungs, and brain are collected and forwarded to one of the Reference Laboratories linked to the MOH. These samples are used for investigation by immunohistochemistry, histopathology, viral isolation, or by molecular tests [33]. Immunohistochemistry and histopathology analyses allow the detection of YFV antigens and the identification of histological alterations observed in YF, respectively. Although there is scarce information regarding the infection of monkeys by other flaviviruses, some studies have detected Zika virus RNA in NHP, during the latest YFV outbreaks in Brazil [34, 35]. Faced with this, molecular techniques such as RT-qPCR have become the most reliable and specific tool to diagnose and confirm YFV infection.

YF laboratory diagnosis is performed through virologic or serological methods using human samples, by the Reference Laboratories linked to the MOH. For molecular detection of YFV RNA by RT-qPCR, sera collected from the first up to the 10th day after the onset of symptoms is recommended, and the positive result confirms YFV infection. Serological tests, especially MAC-ELISA to detect IgM antibodies, are recommended to be used after seroconversion, from the sixth day after the onset of symptoms. Due to the high probability of cross-reactivity with other flaviviruses, which are widespread throughout the same regions of YFV occurrence, the detection of IgM anti-YFV is only presumptive of recent infection [36, 37].

Since YF is a disease of immediate compulsory notification, the suspected human cases and NHP epizootics should be reported within 24 h of initial suspicion [32, 37]. Surveillance and precise diagnosis of YF are essential since they may support control measures such as vaccination [38]. YF vaccination recommendation was expanded in Brazil and now includes all states from North, South, Southeast, and Midwest regions and parts of the Northeast region (Maranhão, Bahia, and some municipalities in Piauí, Alagoas, and Sergipe) [6]. A single dose of the YF vaccine is recommended for lifelong protection [39, 40], however, this is still an issue of debate. Studies have demonstrated a significant decreasing or even the complete absence of neutralizing antibody titers, effector memory CD4⁺ and CD8⁺ T-cells and classical memory B-cells ten years after primary YF vaccination [41–43].

Regardless of the relative safety of the vaccine strains, some adverse events following YF vaccination have been described [38, 44]. In Brazil, from 2007 to 2012, the occurrence of adverse events was estimated as 0.42 events per 100,000 inhabitants [45]. In recent epidemics in Minas Gerais state from 2017 to 2018, more than 7.1 million YFV-17DD vaccine doses were given, and only one case of vaccination-associated disease was confirmed to date [46].

Much is debated on the vaccination of NHP against YF. The immunization of NHP could reduce virus circulation significantly in risk areas and, consequently, the chances of infection in humans. Besides, this strategy could help the preservation and protection of monkey populations. On the other hand, some points need to be taken into consideration. There are not enough studies regarding the effect of the vaccine in Neotropical NHP and, given the differences in susceptibility to YFV, the vaccine dose would have to be adjusted for each species. There are also logistics and cost aspects related to the capture of the animals to be considered [47]. Finally, epizootics surveillance programs could fail in early detection of YFV circulation, due to the loss of naïve sentinel NHP.

Sylvatic yellow fever in Brazil

During the 18th and 19th centuries, YFV caused devastating urban outbreaks in the Americas, and it was considered one of the most dangerous diseases of that period [12]. At the beginning of the twentieth century, campaigns focused on eradicating the vector *A. aegypti* started in several places in South America [48], leading to the eradication of the YF urban cycle in many countries, including Brazil. The last urban YF epidemic in Brazil was reported in 1929 in Rio de Janeiro state, and the ultimate YF urban case was documented in 1942, in Acre state [49].

The sylvatic cycle of YF in Brazil was observed in 1889, by Adolpho Lutz, and in 1899, by Emilio Ribas, when YF human cases occurred in *A. aegypti*-free areas, in São Paulo state [50]. However, only in 1932, the occurrence of the sylvatic cycle of YF was confirmed in Espírito Santo state [51]. In the following years (1933, 1934, 1935, 1936, 1938, 1939, 1944, 1950, 1957, and 1964), several sylvatic YF outbreaks were reported all over Brazil, in North (Amazonas and Pará states), Northeast (Bahia state), Midwest (Mato Grosso and Goiás states), Southeast (Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, and Espírito Santo states), and South (Paraná, Santa Catarina, and Rio Grande do Sul states) regions. From 1932 to 1967, a total of 1672 human cases linked to sylvatic YF were confirmed [50]. Later, YF outbreaks were mostly reported in the Amazon Basin (North and Midwest regions), and sporadic cases occurred in Minas Gerais state [2, 52]. After 1999, the epidemiological scenario of sylvatic YF changed, and

the majority of human cases occurred outside the Amazon Basin, in the Midwest, Southeast, and South regions of Brazil [2, 52]. From 1980 to mid-2015, 792 sylvatic YF human cases and 421 deaths took place in the country (data received from SINAN, June 2019).

In 2016, a sylvatic YF outbreak started in Minas Gerais state, and then it spread to São Paulo, Espírito Santo, Rio de Janeiro, and Bahia states in 2017 [4, 5]. The YFV lineage causing this outbreak was estimated to exist for at least two years before the outbreak and likely reached the Southeast region by passing through the Midwest region of Brazil [53, 54]. YFV-positive NHP were detected in Minas Gerais state throughout 2017 until mid-2018 [55, 56]. These findings raised the possibility of viral persistence in the Southeast region, which was later confirmed [54, 57]. YFV cases occurred until 2018 [53, 54] in Minas Gerais, Rio de Janeiro, Espírito Santo, and São Paulo states [5]. In 2019, YF outbreaks were reported in São Paulo, and the virus spread to Santa Catarina and Paraná states [6].

The 2016–2019 YF outbreaks in Brazil have been considered the most significant ones of the last 70 years. From December 2016 until June 2019, more than 15,000 NHP epizootics were reported in Brazil [4–6], in sylvatic, rural, and urban areas, as reported by local media [58]. Laboratory tests or epidemiological criteria confirmed at least 1567 epizootic events caused by YF, in 455 municipalities, in Southeast (90.9%), South, Northeast, Midwest, and North regions (Fig. 1) [55, 60–73].

In Brazil, most of human YF cases are described in males aged 14 to 35, who are more exposed to YFV by occupational or ecotourism activities in rural and sylvatic endemic regions. However, since the end of the 1990s, the numbers of YF cases among women and younger people have been increasing [2]. At least 2251 human cases and 772 deaths were confirmed in Brazil, from December 2016 to June 2019 [4–6]. These numbers demonstrate an increase of 2.82 times the total of YF human cases and 1.57 times the sum of YF human deaths, compared to the previous 36 years (from 1980 to 2015) (Fig. 2). Human cases were confirmed in 388 municipalities in the Southeast (96%), South, Midwest, and North regions [60–73] (Fig. 1). These data illustrate the magnitude of the recent YF epidemics in Brazil, reaching extensive YF-free areas.

Yellow fever virus vectors in Brazil

Unlike NHP and humans, which succumb to the disease or heal by developing long-term immunity, mosquitoes are considered reservoirs of YFV since they remain infected and can transmit the virus throughout life [2, 74]. In Brazil, species within the genera *Haemagogus* (*H. janthinomys*, *H. albomaculatus*, *H. leucocelaenus*, *H. capricornii*, and *H. spegazzinii*) and *Sabethes* (*S. chloropterus*, *S. soperi*, *S. cyaneus*, *S.*

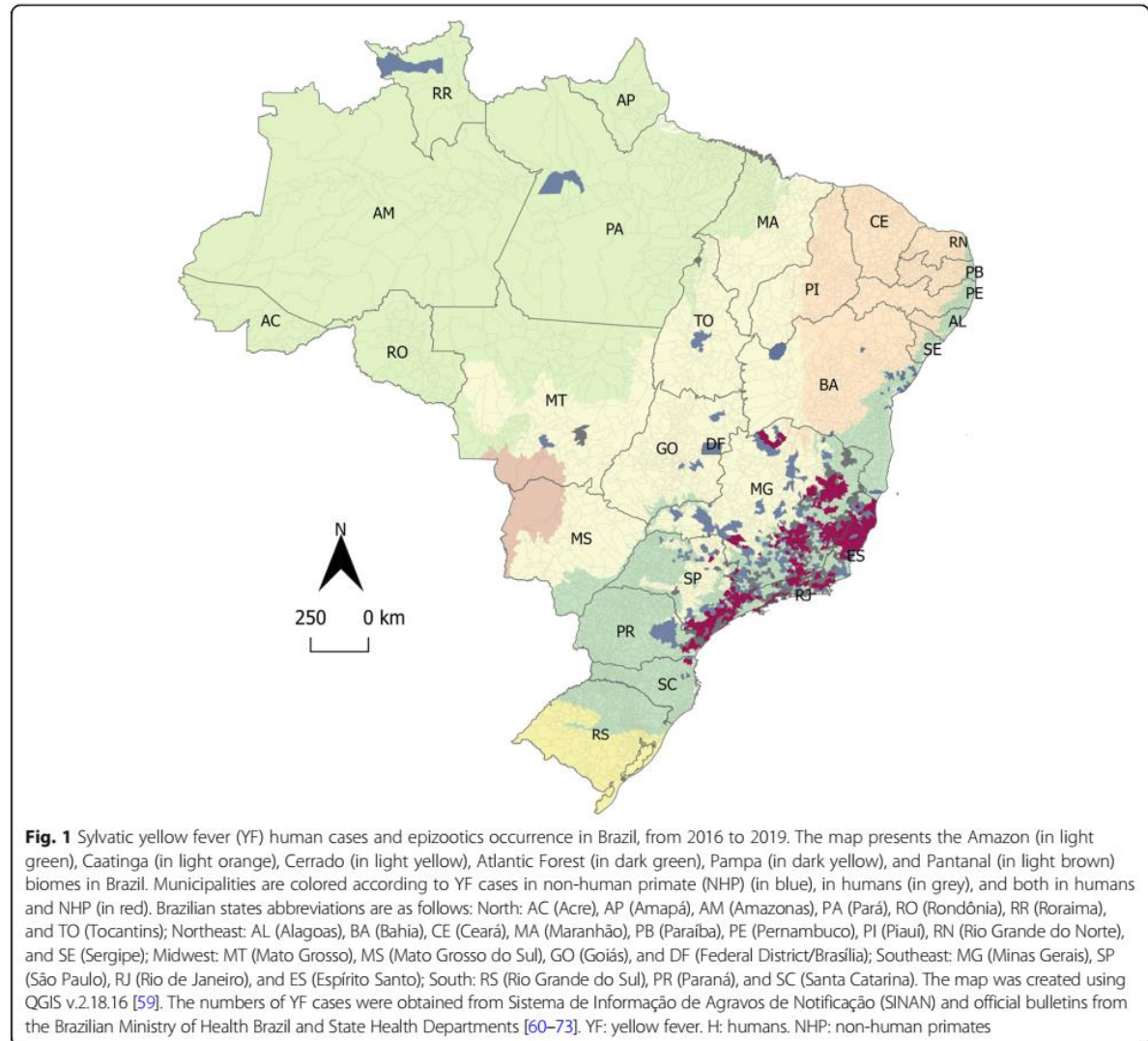
glaucodaemon, and *S. albiprivus*) are the primary sylvatic YFV vectors [2, 33, 75]. YFV-naturally infected specimens of *Aedes scapularis*, *Aedes taeniorhynchus*, *Aedes serratus*, and *Psorophora ferox* have been reported in Brazil, however, these mosquitoes are not considered primary YFV vectors [75–79].

H. janthinomys and *H. leucocelaenus* have a wide distribution in the South American continent and are considered the main YFV vectors in the Americas and South/Southeast Brazil, respectively [80, 81]. Females of *Haemagogus* spp. are hematophagous and exhibit primatophilic daily activity. They have vertically stratified spatial distribution and are mostly found in the forest canopy (acrodendrophilic behavior) [82, 83]. Female mosquitoes prefer oviposition in phytotelmata, such as tree hollows, bamboo internodes, bromeliads and leaf axis [84]. Later on, the immature stages (eggs, larvae, and pupa) develop in those phytotelmata. *Haemagogus* females seek and bite their hosts mostly in the afternoon or during the warmest hours of the day [2, 76, 80, 85].

Sabethes spp. share some ecological characteristics with *Haemagogus* spp., such as the daily activity, primatophilia, acrodendrophilia, and preferential oviposition in tree hollows. While some species are widespread in Central and South America (*Sabethes chloropterus* and *Sabethes cyaneus*), others seem to be restricted to South America (*Sabethes glaucodaemon*, *Sabethes soperi*, and *Sabethes albiprivus*) [86]. Within the genera, *S. chloropterus* is limited to forest areas and considered the primary YFV sylvatic vector. Their eggs can persist through the dry season, which is probably a key factor in YFV maintenance through unfavorable dry periods [86].

Sylvatic YFV vectors are abundant in the treetops, with daytime activity peaking in the hottest hours of the day, corresponding to the resting period of the NHP in the canopy [87], favoring the hematophagy in NHP. *H. leucocelaenus* and *H. janthinomys* are primatophilic species, but occasionally they can be found at ground level in areas surrounding [88] or distant from the forests, including indoors [89], since they can travel for long distances, as 5.7 km and 11.5 km, respectively [90]. *H. leucocelaenus* can adapt to human-modified environments, as periurban [83, 86] and urban areas [91]. YFV-infected specimens of *H. janthinomys* have already been sampled in regions near or contiguous to urban neighborhoods [75, 92]. In that way, these mosquito species could play a significant role in viral maintenance in forest settings and in viral dissemination towards peri-domestic and urban environments.

Given the ecological plasticity and the ubiquitous environmental distribution of *A. albopictus* (in urban, rural, and forest settings in tropical countries, including Brazil), this mosquito could be a bridge vector between sylvatic and urban environments [89, 93]. Experimental studies have demonstrated that *A. albopictus* can transmit YFV



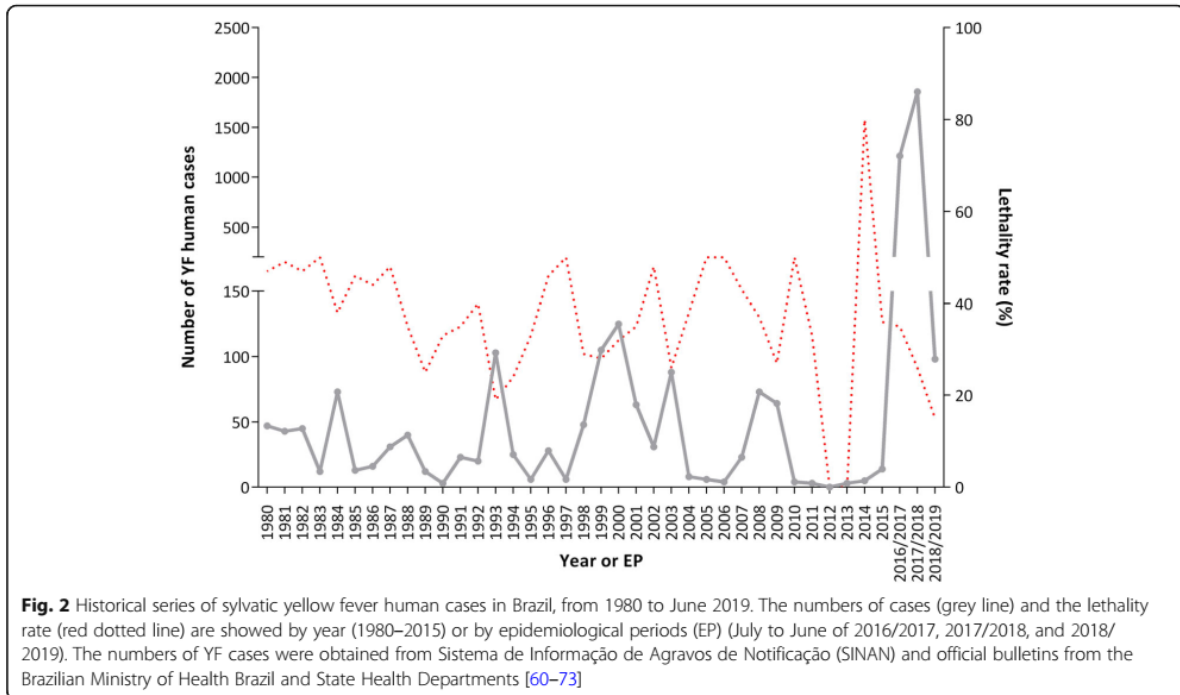
[77, 94–96], and it was found naturally infected with the virus, in a rural setting of Minas Gerais state, in 2018 [97]. *Aedes aegypti* is widespread in all the tropical and subtropical regions. This mosquito has anthropophilic and endophilic habits and is the urban vector of YFV [81]. Despite the sensitivity to YFV infection and the high infestation indices of *A. aegypti* and *A. albopictus* in urban and periurban areas in Brazil [75, 77, 98, 99], there is no evidence of YFV transmission by *A. aegypti*, since the eradication of urban YF cycle in the country [48, 75].

Non-human primates in Brazil

Neotropical NHP are divided into five families (Pitheciidae, Aotidae, Atelidae, Cebidae, and Callitrichidae) [100, 101]. The most considerable diversity of NHP is observed in Brazil, with a total of 130 species mostly

distributed in the Amazon, followed by Atlantic Forest, Caatinga, Cerrado, Pantanal, and Pampa biomes (<https://www.taxeus.com.br/lista/3035>).

The family Pitheciidae comprises NHP without prehensile tails which use quadrupedal locomotion, and most of the species are herbivorous. The species within the genera *Pithecia*, *Cacajao*, and *Chiropotes* are distributed in the Amazon region. However, *Callicebus*, the species-richest genus of Neotropical NHP, has a wide occurrence in the Brazilian territory in areas covered by the Amazon, Atlantic Forest, Caatinga, and Pantanal biomes [100, 102]. *Callicebus* specimens are much smaller than the other members of the family (0.8–1.5 kg) and differ in social organization, living in small family groups with a single monogamous adult pair. They mainly eat fruits, but also leaves, flowers, insects, bird eggs, and small vertebrates [100, 102].



The family Aotidae has one genus, *Aotus*, popularly called owl monkeys. Six out of eight *Aotus* species are distributed in the Brazilian Amazon. They are small (0.8 kg to 1.0 kg) and have nocturnal habits [102]. The owl monkeys live in small groups of 4–6 individuals and feed mainly on leaves, fruits, and invertebrates [100].

The family Atelidae comprises the largest Neotropical NHP (5 to 15 kg). They have a prehensile tail, are excellent brachiators, and feed mostly on flowers and fruits. The spider monkeys (*Ateles*) and woolly monkeys (*Lagothrix*) are distributed in the Amazon, while the muriquis (*Brachyteles*) are observed in the Atlantic Forest. The howler monkeys (*Alouatta*), recognized by their loud and characteristic vocalization, have slow locomotion and live in small tight groups. Ten species of *Alouatta* are widespread in the Amazon Basin, Atlantic Forest, Cerrado, Caatinga, Pantanal, and Pampa biomes [101, 102].

The family Cebidae comprises medium-sized animals, which live in large social groups. These NHP are mostly frugivorous and insectivorous. *Sapajus*, *Cebus*, and *Saimiri* are found in the Amazon, although *Sapajus* specimens have a broad distribution in the Atlantic Forest, Cerrado, Pantanal, and Caatinga biomes [101, 102].

The family Callitrichidae comprises small animals (120 g to 600 g) that feed on fruits, insects, and plant exudates. The genera *Callimico*, *Callibella*, *Cebuella*, and *Saguinus* are distributed in the Amazon, while *Leontopithecus* is present in the Amazon, Pantanal, and Cerrado biomes. The *Callithrix* genus, usually

called marmoset, is distributed in the Atlantic Forest, Cerrado, and Caatinga biomes [101, 102].

As seen above, a great variety of arboreal NHP is found in different geographical areas where the presence of sylvatic vectors is registered. The urbanization and the expansion of agriculture practices have led to extreme habitat degradation, causing the fragmentation of NHP populations in Brazil [103]. Although NHP mostly exist in sylvatic environments, some Neotropical NHP adapt and survive in extremely degraded habitats [104, 105]. Neotropical NHP are potential hosts for YFV due to their ecological and behavioral patterns and their susceptibility to the infection. A variety of factors could alter or lower the exposure rates of NHP to hematophagous insects. For example, the small body and group sizes of some monkeys lead to lower rates of malaria in Amazonian NHP [106]. Some NHP species exhibiting less mobility, with territorial and quite habits in the tree canopy, as *Alouatta* spp., have higher chances of being bitten and infected [103, 107]. Social and diet behavior patterns could be modified in disturbed habitats, as already shown for the red howler monkey [108]. Those behavior changes could, in turn, alter the attractiveness in favor of hematophagous mosquitoes and, consequently, the transmission of viruses.

Yellow fever in non-human primates

Old World NHP are sensitive to YFV and develop enough viremia to reinfect mosquitoes but rarely they

show clinical signs or die. In Africa, the primary YFV amplifier hosts are *Cercopithecus* spp. (with viremia lasting for three to four days) [86] and *Colobus* spp. (with viremia detected up to nine days) [109]. Serological studies indicate that *Cercocebus* spp. (mangabeys) and *Papio* spp. (baboons) [110, 111], and possibly *Galago senegalensis* could be infected and contribute to YFV transmission [7]. Serological and clinical findings related to YFV infection are described in many Neotropical NHP [112–114]. All Neotropical NHP genera are considered susceptible to YFV infection with differing degrees of sensitivity [115, 116].

Early reports in Brazil showed antibodies against YFV in specimens of *Cebus*, *Callithrix*, and *Leontopithecus*, in Mato Grosso, Bahia, and Minas Gerais states [117–119]. An extensive immunological survey detected humoral immunity against YFV in *Alouatta*, *Ateles*, *Aotus*, *Callicebus*, *Callithrix*, *Cebus*, *Brachyteles*, *Leontopithecus*, *Pithecia*, and *Saimiri* in Brazil [120]. A recent study [121], reported the decline (10 to 26%) of two miquiqui populations (*Brachyteles hypoxanthus*), from October 2016 to April 2017, in areas with YF outbreaks [55], and likely YF was the cause of deaths [121].

Alouatta is described as the most susceptible genus to YFV infection, developing clinical illness and fatal disease [114, 122, 123], even when infected with low virus inoculum [2]. However, YFV antibodies have been detected in some specimens of *Alouatta*, showing that some animals survive [2, 120, 124, 125]. In South America, it is common to hear howling monkeys (*Alouatta* spp.) in the forests, a territorial habit, and their sudden silence is considered a signal for the circulation of YFV [33, 89]. High numbers of NHP deaths, especially of *Alouatta* spp., have been associated with YF outbreaks in Argentina [115, 126], Costa Rica [127], Panama [128], Venezuela [129, 130], and Brazil [9, 20, 131, 132].

Specimens of *Callithrix* are also involved in the sylvatic cycle of YFV in Brazil. Experimental studies demonstrated the susceptibility of *Callithrix albicollis*, *Callithrix penicillata*, and hybrids marmosets to YFV [113]. Wild specimens of *C. penicillata* presenting histopathological findings suggestive of YFV infection, and marmosets showing anti-YFV antibodies have been reported in many parts of Brazil [120, 133]. In general, species within the genera *Saimiri*, *Saguinus*, *Aotus*, *Ateles*, *Cebus*, and *Sapajus* have been considered less susceptible to YFV, although *Saimiri*, *Saguinus* and *Sapajus* specimens may develop the disease, with fatal outcomes [9, 20, 89, 114, 134, 135].

Since the beginning of the most recent YF outbreak in Brazil (2016–2018), several epizootics have been reported by the MOH and other studies, affecting mostly marmosets and howler monkeys [20–22, 33, 53, 54, 136, 137]. YFV-infected specimens of *Sapajus libidinosus*,

Alouatta caraya, and *Alouatta clamitans* have been described (2015–2017) in Goiás and Espírito Santo states [53]. From 2017 on, genomic and epidemiological studies described YFV infection in NHP in the Southeast region of Brazil. YFV-infected specimens of *Alouatta* spp., *Alouatta clamitans*, *Callithrix* spp., *Callithrix jacchus*, *Callithrix penicillata*, *Callicebus* spp., and *Callicebus personatus* were observed in Minas Gerais, Espírito Santo, and Rio de Janeiro states [21, 22, 54, 57, 136–138]. During an investigation of YF epizootics in São Paulo from 2016 to 2017, Cunha and colleagues (2019) confirmed the infection in specimens of *Alouatta*, *Callithrix*, and *Sapajus*. Based on molecular and immunohistochemistry analyses, the authors suggested that some species of *Callithrix* may have different sensitivity to YFV when compared to *Alouatta* spp. and *Sapajus* spp. [20].

Although all Neotropical NHP have been considered sensitive to YFV, most of the records and studies are related to *Alouatta* and *Callithrix*. From 2221 NHP deaths, caused by YF, from 1996 until June 2016, in Brazil, the most affected NHP were *Alouatta* sp. (85.0%) followed by *Callithrix* sp. (8.3%), *Sapajus* sp. (0.8%), *Cebus* sp. (0.22%), and *Saimiri* sp. (0.05%). From July 2016 until April 2019, at least 3569 NHP deaths were caused by YF. From these total, most of the identified specimens were *Alouatta* sp. (31.7%) and *Callithrix* sp. (17.1%), followed by *Sapajus* sp. (1.1%) and *Cebus* sp. (1.0%). For the first time, SINAN registered cases of YF in *Callicebus* sp. (0.45%), *Aotus* sp. (0.03%), and *Ateles* sp. (0.03%). Also, the first case of YF was registered in *Leontopithecus rosalia* (golden lion tamarin), an endangered species native of Atlantic Forest (data received from SINAN, June 2019).

Some studies described NHP genera with different degrees of sensitivity to YFV, based on natural infection or few experimental assays. However, the susceptibility of NHP to YF is sometimes estimated using data of animals which died or survived after natural infection. It is also important to note that NHP species have a different distribution throughout Brazil, and their genetic background could influence their susceptibility to YFV. One could expect that NHP from the Amazon Basin, a YF endemic region, could be more resistant to YFV compared to NHP from YFV-free areas. Besides other ecological factors unique to each NHP genus/species, as geographic distribution and behavioral patterns could favor infection.

Pathogenesis of yellow fever in non-human primates

Most of the knowledge about the pathogenesis of YF in humans and NHP results from experimentally infected rhesus monkeys (*Macaca mulatta*), *Alouatta* spp., and *Saimiri* spp. [114, 139]. The first successful infection of a rhesus monkey with YFV was demonstrated in 1928,

by Stokes and colleagues (1928). The authors described the main pathological changes related to acidophilic necrosis of the liver parenchyma affecting predominantly the mid-zonal region of the lobule [140]. Similar findings were later reported in rhesus monkey three days post-inoculation with a high infectious dose (4565–400,000 times of the 50% lethal dose in a mice model). The progress of the disease was marked by an increase in necrotic liver cells, accompanied by an increase in animal temperature. Necropsies demonstrated infiltration of the portal tract and hepatic veins of the liver with inflammatory cells [141].

In general, NHP exhibit the viscerotropic disease, and YFV can be found in the liver, kidneys, bone marrow, spleen, and lymph nodes [142]. In rhesus monkeys, the viremia peaks from three to seven days post-infection (with estimated viral titers of 25 TCID₅₀ to 5×10^4 TCID₅₀), coinciding with the observation of severe disease [142]. The infection and lesion of hepatocytes have been described as a relatively late event. Eosinophilic degeneration of hepatocytes presenting condensed nuclear chromatin (Councilman bodies), precedes (24–48 h) death in experimentally infected monkeys [1, 143]. Clinical observations of experimentally infected rhesus monkeys showed necrosis of germinal centers of the spleen, lymph nodes, tonsils, Peyer's patches, and renal failure. Hypoxia, hypotension, and circulatory shock and multi-organ failure are also observed. A systemic inflammatory syndrome (cytokine storm) might contribute to the lethality of YF, but further studies are needed to better understand the role of immunopathological mechanisms during YF [1, 13, 143]. YFV-infected NHP may present fever, jaundice, dehydration, anorexia, oral and intestinal bleeding, liver injury with hemorrhagic and necrosis foci, and kidney failure [33, 137, 142].

There are few descriptions of YF histopathological lesions in YFV-naturally infected NHP, especially regarding Neotropical NHP. Leal and colleagues (2016) described liver necrosis in the midzone associated with apoptosis of hepatocytes as the most frequently histopathologic change in naturally infected howler monkeys (*Alouatta* spp). They also observed steatosis, liver hemorrhage, inflammatory mononuclear cell infiltration of the liver, renal acute tubular necrosis, and interstitial nephritis [139].

Recent YF outbreaks in Brazil opened an opportunity to study naturally infected NHP. Cunha and colleagues (2019) performed immunohistochemistry analyses and observed brown granular cytoplasmic hepatocytes in YFV-positive specimens of *Alouatta* spp. ($n = 22$), *Sapajus* spp. ($n = 7$), but not in five specimens of YFV-positive *Callithrix* [20]. Two carcasses of female *Callicebus personatus* displayed petechiae in the gastric mucosa, blood clots in the stomach, hemorrhagic and

friable spleen, macroscopic changes with yellow areas in the hepatic parenchyma, plus edema in lungs and eyelid, and hyperemia of the eyelid. YFV RNA was detected in the lungs, liver, kidneys, bladder, stomach, and intestine, suggesting that the pathological picture was probably caused by YFV [137]. Fernandes and colleagues (2017) performed histologic analyses of NHP carcasses (two specimens of *Alouatta* sp and 22 non-identified specimens). They observed massive liver necrosis with Councilman bodies, splenic lymphoid depletion, follicular necrosis, acute renal tubular necrosis, and multisystemic hemorrhage [138]. One animal from this study presented atypical signs, such as massive steatosis with rare midzonal to random single-cell necrosis and multifocal micro abscesses in the liver, probably associated with an acute intestinal bacterial infection or septicemia. The same animal presented endothelial necrosis and hepatic regeneration signs, as suggested by oval cell hyperplasia [138]. During the last YF outbreak in Brazil, natural infection of Neotropical NHP resembled experimental infection, but new findings were reported. The comprehensive understanding of YF pathogenesis in Neotropical NHP could bear further studies using alternative animal models, bringing light in important aspects of YF pathogenesis and treatment.

Conclusions

The changes in the epidemiological pattern of sylvatic YF since the 2000s and unprecedented magnitude of the latest YF outbreak in Brazil are an alert. A new YFV lineage was associated with the 2016–2019 outbreaks. However, whether the mutations observed in this new lineage contribute to viral fitness in vectors or hosts, and possibly to the dynamics of YF is still a matter of investigation. Genomic surveillance and evolutionary studies demonstrated the sustained circulation of YFV before December 2016 until 2019, reaching extensive YF-free areas with a significant number of naïve hosts (human and NHP) and competent vectors.

Although YF is an old disease, much is still unknown about the pathogenesis, clinical aspects of the disease, and patient management. During recent outbreaks in Brazil, the study of a high number of YF patients, who were admitted at high-quality hospitals, brought an opportunity to elucidate some clinical features of the disease, but many gaps are still open, and further studies are needed.

The recent YF outbreaks allowed the investigation of a variety of NHP outside the Amazon Basin. Following the pattern previously observed, most YFV-infected specimens belonged to *Alouatta* spp. and *Callithrix* spp., and for the first time YF was described in *Leontopithecus rosalia*. NHP are amplifier hosts for YFV but are not viral reservoirs since they die or develop cellular and

humoral immunity against the virus. However, studies to better understand the duration of protective immunity against YFV in NHP are required.

Further investigation of viremia in Neotropical NHP could contribute to the assessment of sensitivity to YFV and the potential for vector infection. This information is critical for YF surveillance, identification of YF risk-areas, and the establishment of YF control measures and future strategies for NHP conservation. Despite the imminent risk for YF re-urbanization, given YFV-infected NHP inside urban metropolitan areas of Brazil, no human case was epidemiologically linked to the YF urban transmission cycle. Further studies to understand the role of NHP in YFV circulation in different environments are needed, as well as a greater understanding of the impact of YF in NHP populations.

Abbreviations

ALT: Alanine aminotransferase; AST: Aspartate aminotransferase; ICU: Intensive care unit; LACEN: Reference Laboratories/Brazilian Ministry of Health; MAC-ELISA: Immunoglobulin M antibody capture – Enzyme-linked immunosorbent assay; MOH: Brazilian Ministry of Health; NHP: Non-human primate; NS: Non-structural protein; RT-qPCR: Reverse transcription real-time Polymerase chain reaction; SINAN: Information System on Diseases of Compulsory Declaration/Brazilian Ministry of Health; TCID₅₀: Median tissue culture infectious dose; YF: Yellow fever; YFV: Yellow fever virus

Authors' contributions

BPD, NIOS, LS, and IMR drafted the work. GST, ADL, and BdT critically revised the manuscript and contributed with intellectual content. All authors approved the final version of the manuscript.

Funding

This study was developed in the context of projects supported by different agencies. BPD acknowledges Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) (APQ-01574-17), GST acknowledges Decit/SCTIE/MoH, BPD and GST acknowledge Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais (SES-MG)/Secretaria de Estado de Planejamento de Minas Gerais (SEPLAG-MG)/Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ)/FAPEMIG (grant Yellow fever) and National Council for Scientific and Technological Development (research fellowships). BdT acknowledges the RESERVOIRS program supported by European (ERDF/FEDER) funds and assistance from Collectivité Territoriale de la Guyane and Direction Régionale pour la Recherche et la Technologie, and the Laboratoire d'Excellence CEBA "Investissement d'Avenir" and managed by the Agence Nationale de la Recherche (CEBA, Ref. ANR-10-LABEX-25-01). LS and IMR acknowledge Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)/BRAZIL (grant 0001- graduate scholarship) and NIOS acknowledge CNPq- (grant graduate scholarship). The funders had no role in study design, data collection, and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Availability of data and materials

The data that support the findings of this study are available from SINAN, but restrictions apply to the availability of these data, which were used under license for the current study, and so are not publicly available. Data are, however, available from the authors upon reasonable request and with permission of the Serviço de Informação ao Cidadão and SINAN/Brazilian Ministry of Health.

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹Laboratório de Vírus, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. ²Division of Infectious Disease, Department of Pediatrics, Stanford University School of Medicine, Stanford, California, USA. ³Laboratoire des Interactions Virus-Hôtes, Institut Pasteur de la Guyane, Cayenne, French Guiana.

Received: 29 August 2019 Accepted: 27 December 2019

Published online: 23 January 2020

References

- Monath TP. Yellow fever: an update. *Lancet Infect Dis*. 2001;1:11–20.
- Vasconcelos PFC. Yellow fever. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2003;36:275–93.
- Maguire HCF, Heymann DL. Yellow fever in Africa. *BMJ*. 2016;i3764.
- MS-BR. Centro de Operações de emergências em Saúde Pública sobre Febre Amarela – N° 43/2017 [Internet]. Ministério da Saúde do Bras. 2017:1–7. Available from: <http://portal.arquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/junho/02/COES-FEBRE-AMARELA%2D%2D-INFORME-43%2D%2D-Atualiza%2D%2D%2D-Do-em-31maio2017.pdf> [cited 2019 Aug 1]
- MS-BR. Monitoramento do Período Sazonal da Febre Amarela Brasil – 2017/2018 - informe nº 27 | 2017/2018 [Internet]. Ministério da Saúde do Bras. 2018:1–24. Available from: <http://portal.arquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/outubro/08/Informe-FA.pdf> [cited 2019 Jul 5]
- MS-BR. Monitoramento de Febre Amarela Brasil 2019 - informe nº 18 | 9 de Junho 2019 [Internet]. Ministério da Saúde do Bras. 2019:1–8. Available from: <https://portal.arquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/junho/13/Informe-de-Monitoramento-de-Febre-Amarela-Brasil%2D%2Dn-18.pdf> [cited 2019 Aug 12]
- Hanley KA, Monath TP, Weaver SC, Rossi SL, Richman RL, Vasilakis N. Fever versus fever: the role of host and vector susceptibility and interspecific competition in shaping the current and future distributions of the sylvatic cycles of dengue virus and yellow fever virus. *Infect Genet Evol*. 2013;19:292–311.
- Klitting R, Gould E, Paupy C, de Lamballerie X. What Does the Future Hold for Yellow Fever Virus? (I). *Genes (Basel)*. 2018;9:291.
- Moreno ES, Spinola R, Tengan CH, Brasil RA, Siciliano MM, Coimbra TLM, et al. Epizootias de febre amarela em primatas não humanos no estado de São Paulo, Brasil, 2008-2009. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2013;55:45–50.
- Hudson NP, Philip CB. Infective of blood during the course of experimental yellow fever. *J Exp Med*. 1929;50:583–99.
- Lindenbach BD, Murray CL, Thiel HJ, Rice CM. Flaviviridae. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*; 2013.
- Douam F, Ploss A. Yellow Fever Virus: Knowledge Gaps Impeding the Fight Against an Old Foe. *Trends Microbiol*. 2018;XX:1–16.
- Monath TP, Vasconcelos PFC. Yellow fever. *J Clin Virol*. 2015;64:160–73.
- Espinoza Villar JC, Ronchail J, Guyot JL, Cochonneau G, Naziano F, Lavado W, et al. Spatio-temporal rainfall variability in the Amazon basin countries (Brazil, Peru, Bolivia, Colombia, and Ecuador). *Int J Climatol*. 2009;29:1574–94.
- Roig C, Miret J, Rojas A, Guillén Y, Aria L, Mendoza L, et al. Estudio de Fiebre Amarilla en primates en áreas de brote de los departamentos de San Pedro y Central del Paraguay. *Memorias Del Inst Investig en Ciencias La Salud*. 2009;7:40–5.
- Bryant JE, Holmes EC, ADT Barrett. Out of Africa: A molecular perspective on the introduction of yellow fever virus into the Americas. *PLoS Pathog*. 2007;3(5):e75.
- Mir D, Delatorre E, Bonaldo M, Lourenço-De-Oliveira R, Vicente AC, Bello G. Phylodynamics of yellow fever virus in the Americas: new insights into the origin of the 2017 Brazilian outbreak. *Sci Rep*. 2017;7:1–9.
- Vasconcelos PFC, Bryant JE, Travassos APA, Tesh RB, Rodrigues SG, Barrett ADT. Genetic divergence and dispersal of yellow fever virus. *Emerg Infect Dis*. 2004;10(9):1578.
- Bonaldo MC, Gómez MM, Dos Santos AAC, De Abreu FVS, Ferreira-de-Brito A, De Miranda RM, et al. Genome analysis of yellow fever virus of the ongoing outbreak in Brazil reveals polymorphisms. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2017;112:447–51.
- Cunha MS, da Costa AC, de Azevedo Fernandes NCC, Guerra JM, dos Santos FCP, Nogueira JS, et al. Epizootics due to yellow fever virus in

- São Paulo state, Brazil: viral dissemination to new areas (2016–2017). *Sci Rep.* 2019;9:1–13.
21. Faria NR, Kraemer MUG, Hill SC, De Jesus JG, Aguiar RS, Iani FCM, et al. Genomic and epidemiological monitoring of yellow fever virus transmission potential. *Science.* 2018;361:894–9.
 22. Gómez MM, de Abreu FVS, Dos Santos AAC, de Mello IS, Santos MP, Ribeiro IP, et al. Genomic and structural features of the yellow fever virus from the 2016–2017 Brazilian outbreak. *J Gen Virol.* 2018;99:536–48.
 23. Quaresma JAS, Pagliari C, Medeiros DBA, Duarte MIS, Vasconcelos PFC. Immunity and immune response, pathology and pathologic changes: progress and challenges in the immunopathology of yellow fever. *Rev Med Virol.* 2013;23:305–18.
 24. Tuboi SH, Costa ZGA, Vasconcelos PFC, Hatch D. Clinical and epidemiological characteristics of yellow fever in Brazil: analysis of reported cases 1998–2002. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2007;101:169–75.
 25. Ho Y-L, Joelsons D, Leite GFC, Malbouisson LMS, Song ATW, Perondi B, et al. Severe yellow fever in Brazil: clinical characteristics and management. *J Travel Med.* 2019.
 26. Ribeiro AF, Cavalin RF, Suleiman JMAH, Da Costa JA, De Vasconcelos MJ, Málaque CMSA, et al. Yellow fever: Factors associated with death in a hospital of reference in infectious diseases, São Paulo, Brazil, 2018. *Am J Trop Med Hyg.* 2019;101(1):180–88.
 27. Kallas EG, D'Elia Zanella LGFAB, Moreira CHV, Buccheri R, Diniz GBF, Castiñeiras ACP, et al. Predictors of mortality in patients with yellow fever: an observational cohort study. *Lancet Infect Dis.* 2019;19(7):750–58.
 28. Casadio LVB, Salles APM, Malta FDM, Leite GF, Ho YL, Gomes-Gouvêa MS, et al. Lipase and factor V (but not viral load) are prognostic factors for the evolution of severe yellow fever cases. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2019;114:e190033.
 29. Marinho PES, Alvarenga PPM, Crispim APC, TMS C, Alvarenga AM, Bechler IM, et al. Wild-Type Yellow Fever Virus RNA in Cerebrospinal Fluid of Child. *Emerg Infect Dis.* 2019;25(8):1567.
 30. Barbosa CM, Di Paola N, Cunha MP, Rodrigues-Jesus MJ, Araujo DB, Silveira VB, et al. Yellow fever virus RNA in urine and semen of convalescent patient, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2018;24(1):176.
 31. Denis B, Chirio D, Ponscarme D, Brichler S, De Verdière NC, Simon F, et al. Hepatitis rebound after infection with yellow fever virus. *Emerg Infect Dis.* 2019;25(6):1248.
 32. MS-BR. GUIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE [Internet]. Ministério da Saúde do Bras. 2019 p. 1–706. Available from: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_saude_3ed.pdf [cited 2019 Jul 13]
 33. MS-BR. Guia de vigilância de epizootias em primatas não humanos e entomologia aplicada à vigilância da febre amarela [Internet]. 2nd ed. Ministério da Saúde do Bras. 2017. Available from: http://portal.arquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/marco/24/Guia_Epizootias_Febre_Amarela_2_a_ed_atualizada_2017.pdf [cited 2019 Jul 2]
 34. Favoretto S, Araujo D, Oliveira D, Duarte N, Mesquita F, Zanotto P, et al. First detection of Zika virus in neotropical primates in Brazil: a possible new reservoir. *bioRxiv.* 2016.
 35. Terzian ACB, Zini N, Sacchetto L, Rocha RF, Parra MCP, Del Sarto JL, et al. Evidence of natural Zika virus infection in neotropical non-human primates in Brazil. *Sci Rep.* 2018;8(1):16034.
 36. PAHO-WHO. Laboratory Diagnosis of Yellow Fever Virus infection [Internet]. Pan Am Heal Organ. World Heal Organ. 2018:1–8. Available from: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&view=download&category_slug=guidelines-5053&alias=46877-laboratory-diagnosis-of-yellow-fever-virus-infection&Itemid=270&lang=en [cited 2019 Jun 5].
 37. PAHO. Control of Yellow Fever [Internet]. Pan Am Heal Organ. 2005:1–66. Available from: <http://www.paho.org/immunization/toolkit/resources/paho-publication/field-guides/Control-of-Yellow-Fever.pdf?ua=1> [cited 2019 Jun 2].
 38. Monath TP. Yellow fever vaccine. *Expert Rev Vaccines.* 2005;4:553–74.
 39. WHO. Weekly epidemiological record Relevé épidémiologique hebdomadaire [Internet]. World Heal Organ. 2013:269–84 Available from: <https://www.who.int/wer/2013/wer8827.pdf?ua=1&ua=1%3E> [cited 2019 Jul 2].
 40. MS-BR. Orientações e indicação de dose única da vacina febre amarela - Nota Informativa Nº 94 [Internet]. Ministério da Saúde do Bras. 2017. Available from: http://www.saude.mg.gov.br/images/documentos/Nota_Informativa_dose_única_FA.pdf [cited 2019 Jul 18].
 41. Collaborative group for studies on yellow fever vaccines. Duration of post-vaccination immunity against yellow fever in adults. *Vaccine.* 2014;32(39):4977–84.
 42. Campi-Azevedo AC, Costa-Pereira C, Antonelli LR, Fonseca CT, Teixeira-Carvalho A, Villela-Rezende G, et al. Booster dose after 10 years is recommended following 17DD-YF primary vaccination. *Hum Vaccines Immunother.* 2016;12:491–502.
 43. Costa-Pereira C, Campi-Azevedo AC, Coelho-Dos-Reis JG, Peruhype-Magalhaes V, Araujo MSS, Do Vale Antonelli LR, et al. Multi-parameter approach to evaluate the timing of memory status after 17DD-YF primary vaccination. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018;12:e0006462.
 44. WHO. Detection and investigation of serious adverse events following yellow fever vaccination - Guidance from an informal consultation of experts [Internet]. World Heal Organ. 2008:1–62 Available from: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/70251/WHO_HSE_GAR_ERI_2010_2_eng.pdf?sequence=1%3E . [cited 2019 Jul 18].
 45. MS-BR. Manual de vigilância epidemiológica de eventos adversos pós-vacinação [Internet]. Ministério da Saúde do Bras. 2014:1–254. Available from: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_epidemiologica_eventos_adversos_pos_vacinacao.pdf [cited 2019 Jul 17]
 46. SES-MG. Eventos adversos pós-vacinação associados à vacina febre amarela (EAPV-VFA) Minas Gerais, 2016 a 2018 [Internet]. Secr. Estado Saúde Minas Gerais. 2018: 1–13. Available from: http://www.saude.mg.gov.br/images/noticias_e_eventos/000_2018/BoletinsEpidemiologicos/Boletim_epidemiol%F3gico_EAPV_finalv3.pdf [cited 2019 Jul 2]
 47. Selemane I. Epidemiological monitoring of the last outbreak of yellow fever in Brazil – an outlook from Portugal. *Travel Med Infect Dis.* 2019;28:46–51.
 48. Prata A. Yellow Fever (1976). 2000(95):183–7. [Internet] Available from: <https://felakuti.bandcamp.com/album/yellow-fever-1976>.
 49. Soper FL. Yellow Fever in the Americas, 1938–1942. *Febre Amarela Panam.* 1938a:1942.
 50. Franco O. História da Febre Amarela do Brasil [Internet]. Ministério da Saúde Dep. Nac. Endem. Rurais. 1969:1–212. Available from: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/0110historia_febre.pdf [cited 2019 Jul 18]
 51. Soper FL, Penna H, Cardoso E, Serafim J Jr, Frobisher M Jr, Pinheiro J. Yellow fever without *Aedes aegypti*. Study of a rural epidemic in the Valle do Chanaan, Espírito Santo, Brazil, 1932. *Am Soc Trop Med Hyg.* 1933;18:555–87.
 52. MS-BR. Guia de Vigilância em Saúde [Internet]. Ministério da Saúde do Bras. - Secr. Vigilância em Saúde. 2017:1–706. Available from: <http://portal.arquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/outubro/06/Volume-Unico-2017.pdf> [cited 2019 Jul 18]
 53. Delatorre E, de Abreu FVS, Ribeiro IP, Gómez MM, dos Santos AAC, Ferreira-de-Brito A, et al. Distinct YFV lineages co-circulated in the Central-Western and southeastern Brazilian regions from 2015 to 2018. *Front Microbiol.* 2019;10:1–12.
 54. Rezende IMD, Sacchetto L, Munhoz de Mello É, Alves PA, Iani FCM, Adelino TÊR, et al. Persistence of yellow fever virus outside the Amazon Basin, causing epidemics in Southeast Brazil, from 2016 to 2018. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018;12(6):e0006538.
 55. SES-MG. Atualização: Situação epidemiológica da febre amarela silvestre em Minas Gerais, 2017 [Internet]. Secr. Estado Saúde Minas Gerais. 2017:1–25. Available from: http://www.saude.mg.gov.br/images/icones/Atualizacao_FA_-_29_de_Junho_2017.pdf. [cited 2019 Jun 8]
 56. SES-MG. Febre Amarela em Minas Gerais - Boletim epidemiológico – 30/01/2018 [Internet]. Secr. Estado Saúde Minas Gerais. 2018:1–9. Available from: http://www.saude.mg.gov.br/images/noticias_e_eventos/000_2018/Boletim_Febre_Amarela__30.01.2018.pdf. [cited 2019 Aug 13]
 57. de Abreu FVS, Delatorre E, Dos Santos AAC, Ferreira-de-Brito A, de Castro MG, Ribeiro IP, et al. Combination of surveillance tools reveals that yellow fever virus can remain in the same Atlantic Forest area at least for three transmission seasons. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2019;114:e190076.
 58. G1BR. Macacos são vítimas da falta de informação sobre febre amarela [Internet]. Globo. 2018. Available from: <http://g1.globo.com/jornal-nacional/noticia/2018/01/macacos-sao-vitimas-da-falta-de-informacao-sobre-febre-amarela.html> [cited 2019 Jun 2]
 59. QGIS Development Team. Welcome to the QGIS project! Qgis. 2016.
 60. SESAB-BA. Boletim Epidemiológico da Febre Amarela, Nº 2 [Internet]. Secretária da Saúde da Bahia - Dir. Vigilância Epidemiológica—Divep. 2018:1–4. Available from: <http://www.saude.ba.gov.br/wp-content/uploads/2017/11/2018-Boletim-epidemiologico-da-Febre-Amarela-n-02.pdf> [cited 2019 Jun 27].
 61. SES-SP. Boletim Epidemiológico Febre Amarela 28/12/2018 [Internet]. Secr. Estado da Saúde - Gov. São Paulo. 2018:1–9. Available from: http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/doc/famarela/fa18_boletim_epid_2812.pdf [cited 2019 Jun 27]

62. SES-SP. Boletim Epidemiológico Febre Amarela – 21/01/2019 [Internet]. Secr. Estado da Saúde - Gov. São Paulo. 2019:1–5. Available from: http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/doc/famarela/2019/fa19_boletim_epid_210119.pdf [cited 2019 Jun 27]
63. SES-SP. Boletim Epidemiológico Febre Amarela – 03/06/2019 [Internet]. Secr. Estado da Saúde - Gov. São Paulo. 2019:1–6. Available from: http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/doc/famarela/2019/fa19_boletim_epid_0306.pdf
64. SESAB-BA. Boletim Epidemiológico de Febre Amarela, Bahia, 2019, Nº1 [Internet]. Secr. da Saúde do Estado da Bahia. 2019:1–3. Available from: <http://www.saude.ba.gov.br/wp-content/uploads/2017/11/2019-Boletim-epidemiologico-3gico-da-Febre-Amarela-n.01.pdf> [cited 2019 Jun 27]
65. COES-PR. Boletim Epidemiológico Nº 015–30/05/2019 Período sazonal: Julho/2018 a Junho/2019 [Internet]. Cent. OPERAÇÕES EMERGÊNCIAS EM SAÚDE PÚBLICA - Gov. do Estado do Paraná. 2019:1–6. Available from: http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/BoletimEpidemiologico_15FA.pdf [cited 2019 Jun 27]
66. COES-PR. Boletim Epidemiológico Nº 017–04/07/2019 Período sazonal: Julho/2018 a Junho/2019 [Internet]. Cent. OPERAÇÕES EMERGÊNCIAS EM SAÚDE PÚBLICA - Gov. do Estado do Paraná. 2019:1–5. Available from: http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/BoletimEpidemiologico_17FA.pdf [cited 2019 Jun 27]
67. SES-PR. Boletim Epidemiológico Febre Amarela Nº 08/2018–03 de Julho de 2018 [Internet]. Secr. Estado da Saúde do Paraná. 2018:1–9. Available from: <http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/BoletimFA07.pdf> [cited 2019 Jun 27]
68. SES-SC. Boletim Epidemiológico da Febre Amarela nº 10/2019–29 de junho de 2019 Período de monitoramento (julho/2018 a junho/2019) [Internet]. Secr. Estado da Saúde - Gov. St. Catarina. 2018 [cited 2019 Jun 27]:1–7. Available from: Boletim Epidemiológico da Febre Amarela nº 10/2019–29 de junho de 2019 Período de monitoramento (julho/2018 a junho/2019).
69. SES-SC. Boletim Epidemiológico Febre Amarela nº 18/2018–18 de dezembro de 2018 [Internet]. Secr. Estado da Saúde - Gov. St. Catarina. 2018:1–5. Available from: http://www.dive.sc.gov.br/conteudos/boletim2018/boletimFebreAmarela18/Bolet18Febre_Amarela.pdf [cited 2019 Jun 27]
70. SES-RJ. Informe Epidemiológico – Febre Amarela [Internet]. Secr. da Saúde do Rio Janeiro. 2018. Available from: <http://www.febre.amarela.rj.com.br/comum/code/MostrarArquivo.php?C=NjM9%2C> [cited 2019 Jun 27]
71. SES-SP. Boletim Epidemiológico Febre Amarela 08/01/2018 [Internet]. Secr. Estado da Saúde - Gov. São Paulo. 2018:1–8. Available from: http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/doc/famarela/fa18_boletim_epid_0801.pdf [cited 2019 Jun 27]
72. SES-MG. Febre Amarela Silvestre em Minas Gerais, Boletim epidemiológico 19/02/2019 [Internet]. Secr. Estado Saúde Minas Gerais. 2019:1–8. Available from: http://www.saude.mg.gov.br/images/noticias_e_eventos/000_2019/jane_fev_mar/Febre_Amarela/Boletim_atualiza%20E7%20FA_12-02-2019.pdf [cited 2019 Aug 13]
73. SES-MG. Boletim epidemiológico – 20/06/2018 Febre Amarela Silvestre em Minas Gerais [Internet]. Secr. Estado Saúde Minas Gerais. 2018. Available from: http://www.saude.mg.gov.br/images/documentos/Boletim_Febre_Amarela_21.06.2018_atualizada.pdf. [cited 2019 Jun 2]
74. Germain M, Mouchet J, Cordellier R, Chippaux A, Cornet M, Herve JP, et al. Epidémiologie de la fièvre jaune en Afrique. *Med Mal Infect.* 1978;69–77.
75. Abreu FVS, Ribeiro IP, Ferreira-de-Brito A, dos SAAC, de Miranda RM, de S BI, et al. *Haemagogus leucocelaenus* and *Haemagogus janthinomys* are the primary vectors in the major yellow fever outbreak in Brazil, 2016–2018. *Emerg Microbes Infect.* 2019;8:218–31.
76. Cardoso JC, de Almeida MAB, dos Santos E, da Fonseca DF, Sallum MAM, Noll CA, et al. Yellow fever virus in *Haemagogus leucocelaenus* and *Aedes serratus* mosquitoes, southern Brazil, 2008. *Emerg Infect Dis.* 2010;16:1918–24.
77. Couto-Lima D, Madec Y, Bersot MI, Campos SS, de Albuquerque MM, Dos Santos FB, et al. Potential risk of re-emergence of urban transmission of Yellow Fever virus in Brazil facilitated by competent *Aedes* populations. *Sci Rep.* 2017;7:1–12.
78. Monath TP. Yellow fever. In: Monath TP, editor. *Arboviruses Ecol Epidemiol.* Boca Raton: CRC Press; 1989. p. 139–231.
79. Whitman L, Antunes PCA. The transmission of two strains of jungle yellow fever virus by *Aedes aegypti*. *Am J Trop Med.* 1938;1(2):135–47.
80. Alencar J, Lorosa ES, Dégallier N, Serra-Freire NM, Pacheco JB, Guimarães AÉ. Feeding patterns of *Haemagogus janthinomys* (Diptera: Culicidae) in different regions of Brazil. *J Med Entomol.* 2006;42(6):981–85.
81. WHO. Geographical distribution of arthropod-borne diseases and their principal vectors [Internet]. World Heal. Organ Vector Biol. Control Div. 1989: 1–134. Available from: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/60575/WHO_VBC_89.967.pdf?sequence=1&isAllowed=y [cited 2019 Jun 20]
82. Degallier N, da Rosa APA T, Herve JP. A comparative study of yellow fever in Africa and South America. *Cienc Cult.* 1992;44:143–51.
83. Alencar J, de Mello CF, Barbosa LS, Gil-Santana HR, de A MD, Marcondes CB, et al. Diversity of yellow fever mosquito vectors in the Atlantic forest of Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2016;49:351–6.
84. Forattini OP. *Culicidologia Médica - Identificação, biologia e epidemiologia.* Culicidologia Médica. 2002.
85. Marcondes C, Alencar J. Revisão de mosquitos *Haemagogus Williston* (Diptera: Culicidae) do Brasil. *Rev Biomed.* 2010.
86. WHO. Risk assessment on yellow fever virus circulation in endemic countries - WHO [Internet]. World Heal. Organ. 2014:1–40. Available from: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/112751/WHO_HSE_PED_CED_2014_2_eng.pdf?sequence=1 [cited 2019 Jun 5]
87. Hervé J-P, Travassos da Rosa APA. Ecologia da febre amarela no Brasil. *Rev da Fund SESP, Rio Janeiro.* 1983;28(1):11–9.
88. Gomes AC, Torres MAN T, Ferri L, da Costa FR, da Silva AM. Encontro de *Haemagogus* (Conopostegus) *leucocelaenus* (Diptera: Culicidae), no Município de Porto Alegre, Estado do Rio Grande do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2007;40:487–8.
89. Possas C, Lourenço-de-Oliveira R, Tauil PL, Pinheiro FP, Pissinatti A, da Cunha RV, et al. Yellow fever outbreak in Brazil: the puzzle of rapid viral spread and challenges for immunisation. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2018;113:e180278.
90. Causey OR, Kumm HW, Laemmert HW. Dispersion of forest mosquitoes in Brazil; further studies. *Am J Trop Med Hyg.* 1950;30:301–12.
91. Mucci LF, Medeiros-Sousa AR, Ceretti-Júnior W, Fernandes A, Camargo AA, Evangelista E, et al. *Haemagogus leucocelaenus* and other mosquitoes potentially associated with sylvatic yellow fever in Cantareira State Park in the São Paulo metropolitan area, Brazil. *J Am Mosq Control Assoc.* 2016;32:329–32.
92. Pinheiro GG, Rocha MN, de Oliveira MA, Moreira LA, Filho JDA. Detection of yellow fever virus in sylvatic mosquitoes during disease outbreaks of 2017–2018 in Minas Gerais state, Brazil. *Insects.* 2019;10:E136.
93. Pereira dos Santos T, Roiz D, Santos de Abreu FV, Luz SLB, Santalucia M, Jiolle D, et al. Potential of *Aedes albopictus* as a bridge vector for enzootic pathogens at the urban-forest interface in Brazil. *Emerg Microbes Infect.* Springer US; 2018;7(1):1–8.
94. Miller BR, Ballinger ME. *Aedes albopictus* mosquitoes introduced into Brazil: vector competence for yellow fever and dengue viruses. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1988;82:476–7.
95. Massad E, FAB C, Burattini MN, Lopez LF. The risk of yellow fever in a dengue-infested area. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2001;95(4):370–74.
96. Johnson BW, Chambers TV, Crabtree MB, Filippis AMB, Vilarinhos PTR, Resende MC, et al. Vector competence of Brazilian *Aedes aegypti* and *Ae. Albopictus* for a Brazilian yellow fever virus isolate. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2002;96:611–3.
97. IEC. Instituto Evandro Chagas detecta vírus da Febre Amarela em mosquito *Aedes albopictus* no Brasil [Internet]. Inst. Evandro Chagas. 2018. Available from: <https://www.iec.gov.br/descoberta/>
98. Lourenço-de-Oliveira R, Vazeille M, De Filippis AMB, Failloux AB. Oral susceptibility to yellow fever virus of *Aedes aegypti* from Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002;97:437–9.
99. Lourenço-de-Oliveira R, Vazeille M, de Filippis AMB, Failloux AB. *Aedes aegypti* in Brazil: genetically differentiated populations with high susceptibility to dengue and yellow fever viruses. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2004;98:43–54.
100. Mittermeier, RA; Rylands, AB; Wilson, DE (Chief Eds.): *Handbook of the Mammals of the World*, vol. 3. Primates, Lynx Edicions, Barcelona. 2013:951.
101. Dunn J, Cristóbal-Azkarate J. *New World Monkeys* [Internet]. Nat. Educ. 2016. Available from: <https://www.nature.com/scitable/knowledge/library/new-world-monkeys-148121150/> [cited 2019 Jun 1].
102. Paglia AP, Fonseca GAB, Rylands AB, Herrmann G, Aguiar LMS, Chiarello AG, et al. Lista anotada dos mamíferos do Brasil Occas. *Pap. Conserv. Biol.* 2nd. Arlington, VA: Conservation International; 2012.

103. Bicca-Marques JC, de Freitas DS. The role of monkeys, mosquitoes, and humans in the occurrence of a yellow fever outbreak in a fragmented landscape in South Brazil: protecting howler monkeys is a matter of public health. *Trop Conserv Sci*. 2010;3(1):78–89.
104. Duarte MHL, Goulart VDLR, Young RJ. Designing laboratory marmoset housing: what can we learn from urban marmosets? *Appl Anim Behav Sci*. Elsevier; 2012;137:127–136.
105. Teixeira B, Hirsch A, Goulart VDLR, Passos L, Teixeira CP, James P, et al. Good neighbours: distribution of black-tufted marmoset (*Callithrix penicillata*) in an urban environment. *Wildl Res*. 2015;42:579–89.
106. Davies CR, Ayres JM, Dye C, Deane LM. Malaria infection rate of Amazonian primates increases with body weight and group size. *Funct Ecol*. 1991;6:55–62.
107. Neville MK, Glander KE, Braza F, Rylands AB. The howling monkeys, genus *Alouatta*. In: Mittermeier, R. A., Rylands, A. B., Coimbra-Filho, A. F. and Fonseca GAB, editor. *Ecol Behav Neotrop Primates*, vol 2. Washington, DC: World Wildlife Fundation; 1988:348–453.
108. de Thoisy B, Richard-Hansen C. Diet and social behaviour changes in a red howler monkey (*Alouatta seniculus*) troop in a highly degraded rain forest. *Folia Primatol*. 1997;68:357–61.
109. Woodall JP, Dykes JRW, Williams MC. The reaction of a species of *Colobus* monkey to inoculation with yellow fever virus. *Ann Trop Med Parasitol*. 1968;62:528–35.
110. Taufflieb R, Robin Y, Cornet M. Le virus amaril et la faune sauvage en Afrique. *Cahiers. ORSTOM Série Entomol Médicale Parasitol*. 1971;9:351–71.
111. Taylor RM, Haseeb MA, Work TH. A regional reconnaissance on yellow fever in the Sudan. With special reference to primate hosts. *Bull World Health Organ*. 1955;12:711–25.
112. Davis NC. Susceptibility of capuchin (*Cebus*) monkeys to yellow fever virus. *Am J Epidemiol*. 1930;11:321–34.
113. Davis NC. The susceptibility of marmosets to yellow fever virus. *J Exp Med*. 1930;52:405–16.
114. Davis NC. The transmission of yellow fever: experiments with the "woolly monkeys" (*Lagothrix Lagothricha* Humboldt), the "spider monkey" (*Ateles Ater* F. Cuvier), and the "squirrel monkey" (*Saimiri Scireus* Linnaeus). *J Exp Med*. 1931;51:703–21.
115. Holzmann I, Agostini I, Areta JI, Ferreyra H, Beldomenico P, di Bitetti MS. Impact of yellow fever outbreaks on two howler monkey species (*Alouatta Guariba clamitans* and *A. caraya*) in Misiones, Argentina. *Am J Primatol*. 2010;72:475–80.
116. Ott-Joslin JE. *Viral diseases in nonhuman primates*. In: M F, editor. *Zoo wild Anim Med*. Philadelphia: W.B. Saunders; 1986:674–697.
117. Burke AW. An Epidemic of Jungle Yellow Fever on the Planalto of Mato Grosso, Brazil. *Am Soc Trop Med Hyg*. 1937;1–17:313–334.
118. Laemmert HW, Hughes TP, Causey OR. The Invasion of Small Forests by Yellow Fever Virus as Indicated by Immunity in *Cebus Monkeys*. *Am Soc Trop Med Hyg*. 1949;9:1–29:555–565.
119. Laemmert Jr HW, Ferreira LC, Taylor RM. An epidemiological Study of jungle yellow fever in an endemic area in Brazil. Part II – Investigations of vertebrate hosts and arthropod vectors. *Am Soc Trop Med Hyg*. 1946;1–26:23–69.
120. Kumm HW, Laemmert Jr. HW. The Geographical Distribution of Immunity to Yellow Fever among the Primates of Brazil. *Am Soc Trop Med Hyg*. 1950;1–30:733–748.
121. Strier KB, Tabacow FP, de Possamai CB, Ferreira AIG, Nery MS, de Melo FR, et al. Status of the northern miquiqui (*Brachyteles hypoxanthus*) in the time of yellow fever. *Primates Springer Japan*; 2019;60:21–28.
122. Laemmert HW, Kumm HW. The susceptibility of howler monkeys to yellow fever virus. *Am J Trop Med Hyg*. 1950;30(5).
123. Galindo P. *Monkeys and yellow fever*. In: *Nonhum Primates Med Res*. 3rd ed: Academic Press, Inc. 1973.
124. De Thoisy B, Vogel I, Reynes JM, Pouliquen JF, Carne B, Kazanji M, et al. Health evaluation of translocated free-ranging primates in French Guiana. *Am J Primatol*. 2001;54:1–16.
125. Pinheiro FP, da Rosa APA T, da Rosa MAP T. An Epidemic of Yellow Fever in Central Brazil, 1972–1973. II. Ecological Studies. *Am Soc Trop Med Hyg*. 1981;30:204–11.
126. Agostini I, Holzmann I, Di Bitetti MS. Infant hybrids in a newly formed mixed-species group of howler monkeys (*Alouatta guariba clamitans* and *Alouatta caraya*) in northeastern Argentina. *Primates*. 2008;49:304–7.
127. Vargass-Mendez O, Elton NW. Naturally acquired yellow fever in wild monkeys of Costa Rica¹. *Am J Trop Med Hyg*. 1953;2:850–63.
128. Collias N, Southwick C. A field study of population density and social organization in howling monkeys. *Am Philos Soc*. 1952;96:143–56.
129. Auguste AJ, Lemey P, Bergren NA, Giambalvo D, Moncada M, Morón D, et al. Enzootic transmission of yellow fever virus. *Venezuela Emerg Infect Dis*. 2015;21:99–102.
130. Rifakis PM, Benitez JA, De-La-Paz-Pineda J, Rodriguez-Morales AJ. Epizootics of yellow fever in Venezuela (2004-2005): an emerging zoonotic disease. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1081:57–60.
131. De Almeida MAB, Dos Santos E, Da Cruz CJ, Da Fonseca DF, Noll CA, Silveira VR, et al. Yellow fever outbreak affecting *Alouatta* populations in southern Brazil (Rio Grande do Sul state), 2008-2009. *Am J Primatol*. 2012;74:68–76.
132. Sallis ESV, de Barros VLRS, Garmatz SL, Figuera RA, Graça DL. A case of yellow fever in a brown howler (*Alouatta fusca*) in southern Brazil. *J Vet Diagn Investig*. 2003;15:574–6.
133. Laemmert Jr HW, Ferreira LC. The Isolation Of Yellow Fever Virus From Wild-Caught Marmosets. *Am Soc Trop Med Hyg*. 1945;1–25:231–232.
134. Bates BC. Territorial behavior in primates: a review of recent field studies. *Primates*. 1970;11(3):271–284.
135. Davis NC, Shannon RC. Studies on South American yellow fever III. Transmission of the virus to Brazilian monkeys preliminary observations. *J Exp Med*. 1929;4:81–5.
136. de Abreu FVS, dos Santos E, Gomes MQ, Vargas WP, Oliveira Passos PH, Nunes e Silva C, et al. Capture of *Alouatta guariba clamitans* for the surveillance of sylvatic yellow fever and zoonotic malaria: Which is the best strategy in the tropical Atlantic Forest? *Am J Primatol*. 2019: e23000.
137. Figueiredo PO, Silva ATS, Oliveira JS, Marinho PE, Rocha FT, Domingos GP, et al. Detection and molecular characterization of yellow fever virus, 2017. *Brazil Ecohealth*. 2018;15:864–70.
138. Fernandes NCC, Cunha MS, Guerra JM, Réssio RA, Cirqueira CS, S. DI, et al. Outbreak of yellow fever among nonhuman primates, Espirito Santo, Brazil, 2017. *Emerg Infect Dis*. 2017;23:2038–41.
139. Leal SG, Romano APM, Monteiro RV, de Melo CB, Da C VPF, de Castro MB. Frequency of histopathological changes in howler monkeys (*Alouatta sp.*) naturally infected with yellow fever virus in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2016;49:29–33.
140. Stokes A, Bauer JH, Hudson NP. The transmission of yellow fever to *Macacus rhesus*. *J Am Med Assoc*. 1928;90:253–4.
141. Bearcroft WGC. The histopathology of the liver of yellow fever infected rhesus monkeys. *J Pathol*. 1957;1XXI:295–303.
142. Engelmann F, Jossel L, Girke T, Park B, Barron A, Dewane J, et al. Pathophysiologic and Transcriptomic analyses of Viscerotropic yellow fever in a rhesus macaque model. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(11):e3295.
143. Monath TP, Brinker KR, Chandler FW, Kemp GE, Cropp CB. Pathophysiologic Correlations in a Rhesus Monkey Model of Yellow Fever With Special Observations on the Acute Necrosis of B Cell Areas of Lymphoid Tissues. *Am Soc Trop Med Hyg*. 1981;30:431–43.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions







ANEXO D – Artigo aceito em periódico internacional

PLOS NEGLECTED TROPICAL DISEASES

RESEARCH ARTICLE

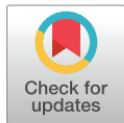
Neighbor danger: Yellow fever virus epizootics in urban and urban-rural transition areas of Minas Gerais state, during 2017-2018 yellow fever outbreaks in Brazil

Lívia Sacchetto¹ , Natalia Ingrid Oliveira Silva¹ , Izabela Maurício de Rezende¹, Matheus Soares Arruda¹, Thais Alkifeles Costa¹, Érica Munhoz de Mello², Gabriela Fernanda Garcia Oliveira¹, Pedro Augusto Alves³ , Vítor Emídio de Mendonça⁴, Rodolfo German Antonelli Vidal Stumpp⁵, Alaine Izabela Alves Prado⁵, Adriano Pereira Paglia⁵, Fernando Araújo Perini⁴, Maurício Lacerda Nogueira⁶, Erna Geessien Kroon¹, Benoit de Thoisy⁷, Giliane de Souza Trindade¹, Betânia Paiva Drumond¹ *

1 Department of Microbiology, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **2** Centro de Controle de Zoonoses, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **3** Instituto René Rachou/Fundação Oswaldo Cruz Minas, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **4** Department of Zoology, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **5** Department of Genetics, Ecology and Evolution, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **6** Department of Dermatological, Infectious and Parasitic Diseases, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil, **7** Institut Pasteur de la Guyane, Cayenne, French Guiana

 These authors contributed equally to this work.

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



OPEN ACCESS

Citation: Sacchetto L, Silva NIO, Rezende IMd, Arruda MS, Costa TA, de Mello ÉM, et al. (2020) 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 Negl Trop Dis* 14(10): e0008658. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008658>

Editor: Marília Sá Carvalho, Fundacao Oswaldo Cruz, BRAZIL

Received: January 23, 2020

Accepted: July 28, 2020

Published: October 5, 2020

Copyright: © 2020 Sacchetto 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 manuscript and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by different agencies. BPD was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), under Grant APQ-01574-17, and Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais (SES-MG)/Secretaria de Estado de Planejamento

Abstract

Background

From the end of 2016 until the beginning of 2019, Brazil faced a massive sylvatic yellow fever (YF) outbreak. The 2016–2019 YF epidemics affected densely populated areas, especially the Southeast region, causing thousands of deaths of humans and non-human primates (NHP).

Methodology/Principal findings

We conducted a molecular investigation of yellow fever virus (YFV) RNA in 781 NHP carcasses collected in the urban, urban-rural interface, and rural areas of Minas Gerais state, from January 2017 to December 2018. Samples were analyzed according to the period of sampling, NHP genera, sampling areas, and sampling areas/NHP genera to compare the proportions of YFV-positive carcasses and the estimated YFV genomic loads. YFV infection was confirmed in 38.1% of NHP carcasses (including specimens of the genera *Alouatta*, *Callicebus*, *Callithrix*, and *Sapajus*), from the urban, urban-rural interface, and rural areas. YFV RNA detection was positively associated with epidemic periods (especially from December to March) and the rural environment. Higher median viral genomic loads (one million times) were estimated in carcasses collected in rural areas compared to urban ones.

de Minas Gerais (SEPLAG-MG)/Instituto René Rachou/Fundação Oswaldo Cruz (IRR/FIOCRUZ) under Grant Yellow fever. GST was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) under grant 440593/2016-6 and Decit/SCTIE/MoH under grant 440593/2016-6. APP was supported by FAPEMIG and Coodenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). BrT was supported by the RESERVOIRS program supported by European (ERDF/FEDER) funds and assistance from Collectivité Territoriale de la Guyane and Direction Régionale pour la Recherche et la Technologie, and the MicroBIOME project granted by the Laboratoire d'Excellence CEBA "Investissement d'Avenir" under Grant ANR-10-LABX-2501. PAA was supported by FAPEMIG under grant APQ-01989-18. MLN was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP) under grant 13/21719-3. LS and IMR were supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)/Brazil under graduate scholarship grant (0001) and NIOS was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) under graduate scholarship grant, VEM was supported by Pró-Reitoria de Graduação-Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) under graduate scholarship grant. MAS, TAC, and GFGO were supported by CNPq FAPEMIG, and CAPES undergraduate scholarship grants. BPD, APP, GST, EGK, and MLN are CNPq Research Fellows. CNPq: <http://www.cnpq.br/> CAPES: <https://www.capes.gov.br/> FAPEMIG: <https://fapemig.br/pt/> FAPESP: <http://www.fapesp.br/> Pró-Reitoria de Graduação-Universidade Federal de Minas Gerais: <https://www2.ufmg.br/prograd/> The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Conclusions/Significance

The results showed the wide occurrence of YF in Minas Gerais in epidemic and non-epidemic periods. According to the sylvatic pattern of YF, a gradient of viral dissemination from rural towards urban areas was observed. A high YF positivity was observed for NHP carcasses collected in urban areas with a widespread occurrence in 67 municipalities of Minas Gerais, including large urban centers. Although there was no documented case of urban/*Aedes* YFV transmission to humans in Brazil during the 2016–2019 outbreaks, YFV-infected NHP in urban areas with high infestation by *Aedes aegypti* poses risks for YFV urban/*Aedes* transmission and urbanization.

Author summary

Brazil faced the most massive sylvatic yellow fever (YF) outbreak in 2016–2019. The outbreak affected highly densely populated areas, and Minas Gerais was the most affected state with thousands of deaths of human and non-human primates (NHP). We investigated the yellow fever virus (YFV) RNA in NHP carcasses collected throughout Minas Gerais in 2017 and 2018. We demonstrated the wide occurrence of YFV-infected NHP, including the viral persistence during the non-epidemic dry season of 2017. YFV RNA was detected in NHP carcasses in the urban, urban-rural interface and rural areas. We have also detected new YF cases in 49 municipalities where YF cases have not been previously detected during the outbreaks. Estimates of YFV genomic load in naturally infected NHP carcasses showed high and similar loads in specimens (*Alouatta*, *Callithrix*, and *Callicebus*) collected in rural areas and lower genomic loads in the urban-rural interface and urban *Callithrix* specimens. The presence of YFV inside urban areas poses an imminent risk, although no human case was epidemiologically linked to urban/*Aedes* transmission during the last outbreaks in Brazil.

Introduction

Yellow fever virus (YFV) (family *Flaviviridae*, genus *Flavivirus*) is endemic in tropical and subtropical regions of Africa, Central and South America. Yellow fever (YF) presents a broad spectrum of severity, with clinical manifestations ranging from self-limited febrile to fatal disease in humans [1,2]. There is no specific treatment for YF, and vaccination is recommended for people who live in or travel to at-risk areas [2].

Urban YF, transmitted by *Aedes aegypti* vector, was a severe threat to Brazil's human health until 1942 when the last case was registered in Acre state [1]. Nowadays, the virus is maintained in the sylvatic cycle involving Neotropical non-human primates (NHP) and sylvatic mosquitoes (*Haemagogus* spp. and *Sabethes* spp.) [2]. Although these mosquitoes mainly feed on NHP, they can incidentally transmit the virus to humans [2]. The reemergence of sylvatic YF outside the Brazilian Amazon basin has been reported, especially during the rainy season, called the epidemic period [3].

Since the eradication of urban YF, Brazil faced the largest sylvatic YF outbreak from the end of 2016 until the beginning of 2019 [4]. YFV was introduced into Southeast [4–8], from the Midwest region [8] spreading southward, causing thousands of NHP and human cases and deaths [4,9–11]. From July 2016 until June 2019, 2,240 human cases and 760 deaths were

confirmed, mostly in the Southeast region (99.2%), and over 2,590 YF epizootics were confirmed in Brazil [4,10–13]. Minas Gerais, Southeast Brazil, was one of the most affected states during the YF outbreaks. Between July 2016 and June 2018, the Secretary of Health of Minas Gerais confirmed 1,002 human cases and 340 deaths, and more than 490 epizootics in NHP [14]. Minas Gerais is in the recommended area for YF vaccination since 2008, but until the end of 2016, the state presented low average vaccination coverage (57.26%), reaching 92.71% by the end of 2018 [15].

The rapid spread and the extent of the latest recent YF outbreaks in the Southeast region, including highly densely populated urban centers in the states of Minas Gerais, São Paulo, Espírito Santo, and Rio de Janeiro [10,11], have raised concerns regarding YFV reintroduction in epidemiologically receptive areas, with millions of naïve people for YFV. NHP is the primary host of the YF sylvatic cycle, and even though NHP are mostly observed in rural/sylvatic zones, these animals are commonly found in urban-rural transition and urban areas in Brazil. Given the high numbers of epizootics during YF outbreaks, this study aimed at the molecular investigation of YFV in NHP from Minas Gerais. Our results showed the widespread occurrence of YFV in Minas Gerais and, hastily, YFV in NHP carcasses collected inside urban matrixes and urban-rural transition areas, including large urban centers.

Material and methods

Study area and samples

During YF outbreaks in Brazil (January 2017 to December 2018), we analyzed 771 liver samples from carcasses of free-living NHP from different areas of Minas Gerais state. Data regarding ten NHP carcasses previously screened for the YFV RNA [7] were included in data analysis, totaling 781 individuals analyzed here. The NHP carcasses consisted of a convenient sampling, collected in the context of the Brazilian Yellow Fever Surveillance Program [16], of epizootics that occurred in 2017 and 2018. Since biological samples were obtained from carcasses, blood sampling was not possible, and liver samples were selected for YFV investigation, due to the hepatotropic of YFV in humans and NHP [1,4, 16, 17]. Minas Gerais is in Southeast Brazil (Fig 1), with 586,521.121 km² and 21,040,662 inhabitants. The state has 853 municipalities grouped into 12 mesoregions. Three main biomes cover the state: Cerrado, Atlantic Forest, and Caatinga [18] (Fig 1).

The NHP carcasses were collected in the field by health surveillance agents (Brazilian Yellow Fever Surveillance Program [16]), frozen (-20 °C), and transported to the Laboratory of Zoonosis of Belo Horizonte/Minas Gerais (LZOON-BH). At LZOON-BH, NHP carcasses were defrosted and visually inspected regarding the stage of decomposition, taking into account different tissue aspects: (i) brightness (bright or opaque); (ii) color (regular aspect, greenish, greyish or whitish); (iii) consistency (if the tissue was firm or softened); (iv) smell (whether the carcass was smelling rotten or not); and (v) presence or absence of parasites (larvae). Based on that, liver samples were categorized according to their preservation status: good (n = 465; 59.5%), intermediate (n = 211; 27.0%), or bad (n = 59; 7.5%). After defrosting, liver fragments (0.5 cm) were collected from the carcasses and placed into microtubes containing RNA later solution (Ambion, USA) by the LZOON team. The microtubes were kept at 4 °C for 16 hours and then stored at -20 °C until used for RNA extraction at Laboratório de Vírus/Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Using the information on the address or geographic coordinates where carcasses were collected, each carcass was classified based on land use: urban (built-up) areas, urban-rural transition areas, and rural/sylvatic areas. Urban areas (built-up) corresponded to cities, towns, and villages or isolated urban areas, characterized by transformations resulting from urban

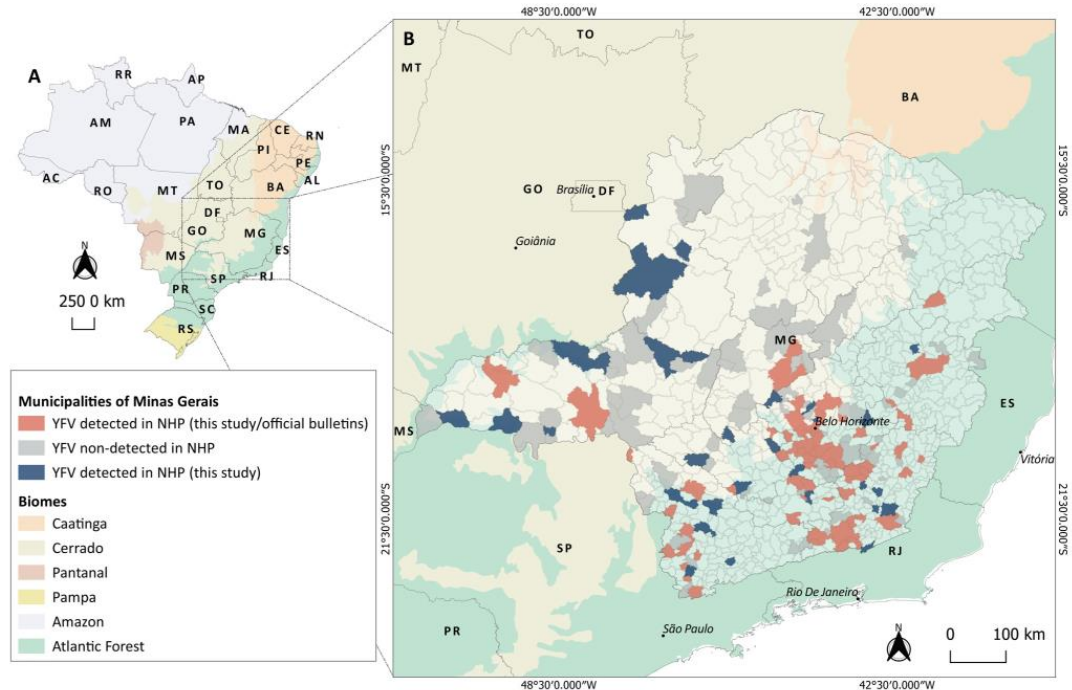


Fig 1. Yellow fever virus (YFV) investigation in non-human primate (NHP) carcasses, in Minas Gerais state, January 2017–December 2018. (A) Geopolitical map of Brazil with biomes distribution. (B) Map of Minas Gerais state indicating municipalities from where NHP carcasses were collected and investigated for YFV RNA. Municipalities are colored as follows: in grey are 120 municipalities without detection of YFV in NHP (in this study); in light red are 110 municipalities with detection of YFV in NHP (this study and official bulletins); and in blue are 49 municipalities with detection of YFV in NHP (only in this study) where YFV circulation has not been described, during 2016–2018 outbreaks. Based on official bulletins, YFV was detected (humans or NHP) in another 31 municipalities of Minas Gerais by the State Surveillance Secretary during 2016–2018 outbreaks [13,21,22]. Abbreviations referring to Federal District and states as follows: AC: Acre; AL: Alagoas; AP: Amapá; AM: Amazonas; BA: Bahia; CE: Ceará; DF: Distrito Federal; ES: Espírito Santo; GO: Goiás; MA: Maranhão; MT: Mato Grosso; MS: Mato Grosso do Sul; MG: Minas Gerais; PA: Pará; PB: Paraíba; PR: Paraná; PE: Pernambuco; PI: Piauí; RR: Roraima; RO: Rondônia; RJ: Rio de Janeiro; RN: Rio Grande do Norte; RS: Rio Grande do Sul; SC: Santa Catarina; SP: São Paulo; SE: Sergipe; and TO: Tocantins. Numbers indicate the mesoregions of Minas Gerais as follows: 1. Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba; 2. Northwest; 3. North; 4. Jequitinhonha; 5. Vale do Mucuri; 6. Vale do Rio Doce; 7. Zona da Mata; 8. South/Southwest; 9. West; 10. Central; 11. Metropolitan region; 12. Campo das Vertentes. Maps were created using the QGIS software version 3.8.2.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008658.g001>

development (e.g., paved streets, electric lighting, sewerage, buildings, and intense human occupation) [19]. A buffer zone (2.0 kilometers) was established on the outskirts of urban areas, delineating an urban-rural transition area (interface). The rural/sylvatic areas covered the entire area located outside these limits. Each localization of carcasses was checked using satellite imagery (Google Maps, available at <https://www.google.com/maps>) to determine the boundaries of the urban areas [19] urban-rural interface areas and rural/sylvatic areas as stated above. NHP carcasses analyzed here were collected in Cerrado and Atlantic Forest areas, but not in Caatinga regions.

NHP carcasses were identified at species or genus level, by the Veterinary team at LZOOON or by the Zoology/Mastozoology teams at UFMG, using morphological criteria [20–22]. Out of 781 NHP analyzed in this study, 360 carcasses (collected in 2017) were forward to UFMG laboratories, and some of them were taxidermized and deposited in the Center of Taxonomic

Collections of Universidade Federal de Minas Gerais (CCT-UFMG), Brazil [20–22]. The Committee on Ethics in the Use of Animals of UFMG approved the study (CEUA 98/2017).

YFV molecular investigation

Total RNA was extracted from approximately 30 mg of the liver preserved in RNA later solution (Ambion, USA), using RNeasy Minikit (Qiagen, USA). RNA extraction was performed in batches of 11 samples plus one negative control (nuclease-free water). RNA samples were submitted to a one-step real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR), with primers targeting the gene coding for β -actin [23], using GoTaq 1-Step RT-qPCR System (Promega, USA). All samples were positive, showing the suitability of samples for RT-qPCR. RNA samples and the negative extraction controls were screened in duplicate for YFV RNA using RT-qPCR [24]. Non-template (nuclease-free water) and YFV 17DD RNA (provided by Bio-Manguinhos/FIOCRUZ) were used as negative and positive controls, respectively. Samples were considered positive when they presented amplification in duplicate, considering the threshold for cycle quantification value (Cq) of 37. Since between the range of 37–40 Cq indicate minimal quantities of DNA, with low confidence for the results, Cqs > 37 or undetermined were considered negative. The results of RT-qPCR runs were manually inspected for the correction of baseline and threshold parameters whenever necessary due to heterogeneity in the amount of input RNA among different samples.

The Cqs are inversely proportional to the input target nucleic acid in the sample, which could indirectly reflect the YFV genomic load in the samples. In that way, we performed a quantitative RT-qPCR (Bio Gene Research Febre Amarela PCR kit—Bioclin-Quibasa, Brazil) using RNA obtained from 28 YFV-positive samples to have an estimative of YFV genomic load in the liver. We determined the number of genomic copies per gram (gc/g) of the liver, and we estimated the genomic loads in all YFV-positive carcasses using linear regression and the observed Cqs.

From 11 YFV-positive samples, a partial sequence of the envelope gene (primers 5-left and 6-right) was obtained [5], using the GoTaq Hot Start Colorless Master Mix (Promega, USA). The amplicons were purified and sequenced with the ABI3130 platform (Applied Biosystems, USA). The consensus sequences were generated (Geneious v.9.1.6—Biomatters, NZL; <https://www.geneious.com/>) and used for phylogenetic reconstruction, using the maximum likelihood method implemented in MEGA7 (<https://www.megasoftware.net/>). The final tree was edited and visualized in FigTree v.1.4.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

Statistical analyses

For statistical analyses, samples were subdivided into different groups according to the period of sampling: (i) epidemic (December–May) and non-epidemic (June–November) periods; (ii) bimester within epidemic (December/January, February/March, and April/May) and within non-epidemic periods (June/July, August/September, and October/November); (iii) NHP genera: *Callithrix*, *Callicebus*, and *Alouatta* (*Sapajus* was not included due to the low number of specimens); (iv) environment: rural, urban-rural interface, and rural areas; and (v) environment together with NHP genera: urban *Callithrix*, urban-rural *Callithrix*, rural *Callithrix*, rural *Callicebus*, and rural *Alouatta* (given the low number of specimens, *Alouatta* and *Callicebus* from urban and urban-rural interface were not included in the analyses). The comparison of proportions of YFV-positive carcasses within groups was performed using chi-square and chi-square for trend. The Kruskal-Wallis test and multiple pairwise-comparisons between groups by Wilcoxon rank-sum test were used to compare the (median) Cq values observed for the positive samples within each group. Median Cq values were compared only using data from

carcasses in good and intermediate conservation status (see [Results](#)). Statistical analyses were run in R v.3.6.0 (<https://www.r-project.org/>) and EpiTools (<http://epitools.ausvet.com.au/>). Bonferroni correction for multiple comparisons was applied, with differences considered statistically significant at $p < 0.0125$.

Results

We analyzed data from 781 NHP carcasses collected from January 2017 to December 2018 (2017: 50.8%, and 2018: 49.1%), during the epidemic (75.8%) and non-epidemic periods (24.2%), in urban (57.7%), urban-rural interface (6.9%), and rural areas (35.3%) ([S1 Fig](#)). The identified NHP carcasses belonged to different families and genera: Atelidae (*Alouatta guariba*, *Alouatta caraya*, and *Alouatta* sp.) (6.6%); Pitheciidae (*Callicebus personatus*, *Callicebus nigrifrons*, and *Callicebus* sp.) (4.1%); Cebidae (*Sapajus* sp. and *Sapajus nigritus*) (0.2%); and Callitrichidae (*Callithrix geoffroyi*, *Callithrix aurita*, *Callithrix penicillata*, *Callithrix* sp., and hybrid marmosets) (84.3%) ([Table 1](#)).

YFV infection was confirmed in 298 out of 781 carcasses (38.1%, 95% CI = 34.7–41.6%). Regardless the preservation status of the carcasses, all samples were analyzed, and YFV RNA was detected in the liver of carcasses in bad (16/59, 27.1%, 95% CI = 17.4–39.6%), intermediate (85/211, 40.2%, 95% CI = 33.9–47.0%) or good (187/465, 40.2%, 95% CI = 35.6–44.7%) preservation status. No association between the preservation status of carcasses and YFV RNA detection was observed ($\chi^2 = 3.91$, $p = 0.14$).

YFV RNA was detected in specimens of *Alouatta*, *Callicebus*, *Callithrix* ([Table 1](#)), and *Sapajus*. The investigation of the association between the positivity and NHP genera considered only data regarding *Callithrix*, *Callicebus*, and *Alouatta* ($n = 743$). An association between the YFV positivity and NHP genera ($\chi^2 = 60.51$, $p < 0.0001$) was observed, with a stronger positive association between the detection of YFV RNA and specimens of *Alouatta* (78.8%) and *Callicebus* (68.7%) compared to *Callithrix* (31.8%) ([Fig 2A](#), [Table 2](#)). No difference in positivity for YFV was observed between *Alouatta* and *Callicebus* ($\chi^2 = 0.60$, $p = 0.44$), and a higher odds

Table 1. Non-human primate carcasses tested for yellow fever virus RNA.

Genera/species	Total carcasses		YFV-positive carcasses	
	Total	Total by genus (%)	Total	Total by genus (%)
<i>Alouatta caraya</i>	2		1	
<i>Alouatta guariba</i>	17		12	
<i>Alouatta</i> sp.	33	52 (6.66%)	28	41 (13.76%)
<i>Callicebus nigrifrons</i>	19		12	
<i>Callicebus personatus</i>	7		6	
<i>Callicebus</i> sp.	6	32 (4.10%)	4	22 (7.38%)
<i>Callithrix aurita</i>	2		1	
<i>Callithrix geoffroyi</i>	21		10	
<i>Callithrix penicillata</i>	170		44	
<i>Callithrix</i> sp.	466	659 (84.38%)	155	210 (70.47%)
<i>Sapajus nigritus</i>	1		1	
<i>Sapajus</i> sp.	1	2 (0.26%)	0	1 (0.34%)
Non-ID	36	36 (4.61%)	24	24 (8.05%)
Total		781		298

YFV: yellow fever virus. Liver samples of non-human primate carcasses collected in Minas Gerais state, Brazil (Jan 2017–Dec 2018) were tested for YFV RNA using the RT-qPCR [24].

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008658.t001>

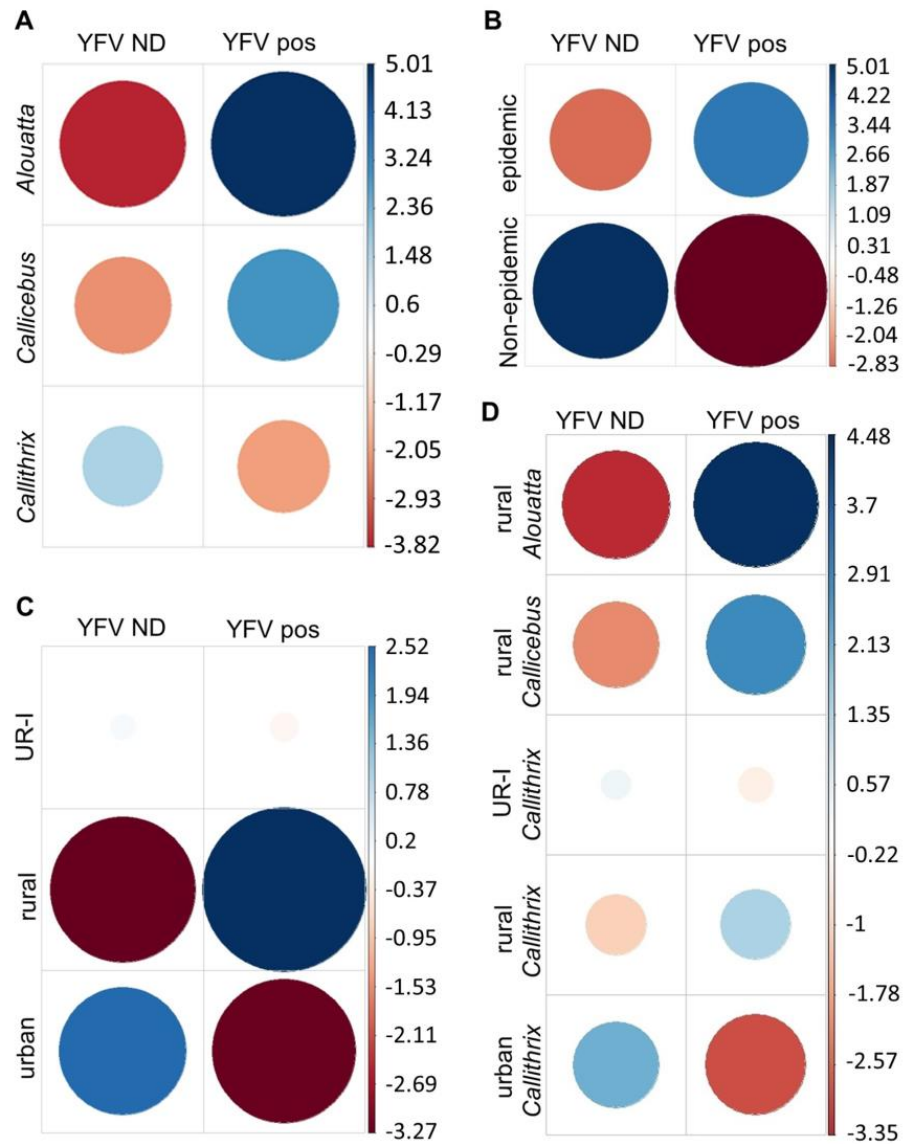


Fig 2. Association between detection of yellow fever virus (YFV) in the liver of non-human primate (NHP) carcasses with (a) NHP genera, (b) period of sampling (c) environment, and (d) environment plus NHP genera. YFV ND: yellow fever virus RNA was not detected. YFV pos: yellow fever virus RNA was detected. Pearson residuals (standardized) were extracted from the chi-square function and plotted. In each cell, the size of the circle is proportional to the amount of cell contribution, and colors indicate positive residuals (blue) or negative residuals (red). The vertical bars indicate Pearson residuals values. Analyses were run in R software v.3.6.0.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008658.g002>

Table 2. Molecular detection of yellow fever virus RNA in non-human primate carcasses.

Variable	Pos/total	Positivity % (95%CI)	OR (95%CI)	p-value*
Genera¹				
<i>Callithrix</i>	210/659	31.87 (28.42–35.52%)		
<i>Callicebus</i>	22/32	68.75 (51.43–82.05%)	4.70 (2.19–10.11)	<0.0001
<i>Alouatta</i>	41/52	78.85 (65.97–87.76%)	7.96 (4.10–15.81)	<0.0001
Period²				
Non-epidemic	18/189	9.52 (6.12–14.50%)		
Epidemic	280/592	47.30 (43.31–51.32)	8.52 (5.11–14.22)	<0.0001
Environment³				
Urban	130/452	28.76 (24.60–32.90%)		
Urban-rural interface	19/53	35.85 (22.90–48.80%)	1.40 (0.78–2.52)	<0.0001
Rural	148/276	53.62 (47.73–59.42%)	2.85 (2.08–3.90)	<0.0001
Environment /genera⁴				
Urban <i>Callithrix</i>	120/436	27.52 (23.30–31.70%)		
Urban-rural <i>Callithrix</i>	16/48	33.33 (20.00–46.70%)	1.27 (0.67–2.39)	<0.0001
Rural <i>Callithrix</i>	74/175	42.29 (35.21–49.69%)	1.92 (1.33–2.77)	<0.0001
Rural <i>Callicebus</i>	18/26	69.23 (50.01–83.50%)	5.90 (2.50–13.94)	<0.0001
Rural <i>Alouatta</i>	33/43	76.74 (62.26–86.85%)	8.66 (4.14–18.12)	<0.0001

* 95% CI: 95% confidence interval. OR: odds ratio. Pos: yellow fever virus genome detected by RT-qPCR. ¹The investigation of the association between the positivity and NHP genera considered only data regarding *Callithrix*, *Callicebus*, and *Alouatta* (n = 743, excluding non-identified specimens and one specimen of *Sapajus*). ^{2,3}The investigation of the association between the positivity and ²the period of sampling (epidemic or non-epidemic) and ³the investigation of the association between the positivity and the environment (urban, urban-rural interface, and rural/sylvatic areas) included all specimens (n = 781). ⁴The investigation of the association between the positivity and the environment together with NHP genera included part of specimens (n = 728, non-identified specimens; specimens of *Sapajus*; and specimens of *Alouatta* and *Callicebus* from urban and urban-rural interface were not included in the analyses). Liver samples of non-human primate carcasses collected in Minas Gerais state, Brazil (Jan 2017–Dec 2018), were tested for yellow fever virus RNA, using the RT-qPCR [24]. *Chi-square test with Bonferroni correction for multiple comparisons with differences considered statistically significant at p<0.0125. Analyses were run in R software v.3.6.0.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008658.t002>

ratio (OR) for YFV detection was observed for both genera (OR = 7.96 and OR = 4.70, respectively), compared to *Callithrix* (Table 2).

The detection of YFV RNA was negatively associated with the non-epidemic periods while positively associated with epidemic periods ($\chi^2 = 85.03$, $p < 0.0001$) (Fig 2B), especially the first two bimesters of the epidemic period (Dec/Jan and Feb/Mar) (S2 Fig). An extremely high OR (OR = 14.63, 95% CI = 5.80–36.91, $p < 0.0001$) was observed for YFV detection in December/January followed by February/March (OR = 14.63, 95% CI = 2.00–12.35, $p < 0.0001$). The detection of YFV RNA was negatively associated with the last bimester of the epidemic period (Apr/May) (S2 Fig). No difference was observed between the proportions of YFV-infected carcasses collected in 2017 (n = 155/397; 39.0%, 95% CI = 34.3–43.9%) and 2018 (n = 126/384; 32.8%; 95% CI = 28.3–37.6%) ($\chi^2 = 0.19$, $p = 0.65$). Throughout 2017, YFV was detected with a higher proportion of YFV-infected carcasses during the epidemic period ($\chi^2 = 17.37$, OR = 3.28, 95% CI = 1.87–5.77, $p < 0.001$). In 2018, YFV was detected only in the epidemic period (S1 Fig).

NHP carcasses were collected in 279 municipalities located in 12 mesoregions of Minas Gerais state, covered by Cerrado and Atlantic Forest. YFV was detected in 159 municipalities (11 mesoregions) (Fig 1B), within urban (n = 67), urban-rural interface (n = 20), and rural (n = 106) environments. In 2017 and 2018, the highest numbers of YFV-positive carcasses were from Metropolitan (42.6%), Zona da Mata (51.0%), and the South/Southwest (43.9%) regions (S1 Table).

Regarding the environment, differences were observed among the proportions of YFV-positive carcasses collected in urban (28.7%) urban-rural interface (35.8%), and rural areas (53.6%) ($\chi^2 = 44.65$, $p < 0.0001$) (Table 2). Analyses indicated a linear trend ($\chi^2 = 44.27$, $p < 0.0001$) and higher odds ratio for detection of YFV from urban towards urban-rural interface (OR = 1.40) and rural areas (OR = 2.85) (Table 2). The detection of YFV had a strong positive association with the rural environment and a strong negative association with the urban environment (Fig 2C).

Next, we detected an association of YFV-positive carcasses with the environment and NHP genera altogether ($\chi^2 = 60.51$, $p < 0.0001$) (Fig 2D). The proportions of YFV-positive carcasses of rural *Alouatta* (76.7%), rural *Callicebus* (69.2%), and rural *Callithrix* (42.2%) were higher than urban-rural *Callithrix* (33.3%) ($\chi^2 \geq 7.70$, $p \leq 0.005$) and urban *Callithrix* (27.5%) ($\chi^2 \geq 18.34$, $p \leq 0.0001$). A difference between the proportion of urban and rural YFV-infected *Callithrix* was observed ($\chi^2 = 11.76$, $p < 0.001$), but no difference was observed between rural and urban-rural *Callithrix* ($\chi^2 = 2.78$, $p = 0.95$) nor between urban and urban-rural *Callithrix* ($\chi^2 = 1.10$, $p = 0.29$). Lower linear trend ($\chi^2 = 60.15$, $p < 0.0001$) and odds ratio for YFV detection were observed, from rural *Alouatta* (OR = 8.66), rural *Callicebus* (OR = 5.90) and rural *Callithrix* (OR = 1.92) to urban-rural *Callithrix* (OR = 1.27) and finally urban *Callithrix* (Table 2).

Since Cqs reflect the YFV genomic load in liver samples, we analyzed the median Cq values for YFV-positive samples. There was no difference in median Cqs observed in carcasses in good versus intermediate conservation status ($\chi^2 = 9.08$, $p < 0.010$), carcasses in bad conservation status were discarded from this analysis, and only results obtained from carcasses in good and intermediate conservation status were considered. A negative linear regression was observed, and a significant equation was obtained [$10E (-0.2986 \times Cq + 13.5094)$] ($R^2 = 0.99$ and $p < 2.2E-16$) to estimate the YFV genomic load using the Cqs in liver samples under the experimental conditions used here.

The median Cqs differed regarding the environment where carcasses were collected ($\chi^2 = 57.19$, $p < 0.0001$) (Table 3). Lower median Cqs (higher estimated YFV genomic loads) were observed for carcasses collected in rural areas (median Cq = 13.0) compared to carcasses from urban-rural interface (median Cq = 31.5) (Table 3), and urban areas (median Cq = 32.6) ($p = 0.0026$ and $p < 0.0001$, respectively). Regarding the genera, analyses of median Cqs among *Alouatta* (median Cq = 13.0), *Callicebus* (median Cq = 8.5), and *Callithrix* (median Cq = 32.0) indicated a significant difference ($\chi^2 = 31.86$, $p < 0.0001$) (Table 3). Differences in median Cqs were observed for total *Callithrix* compared to *Alouatta* ($p < 0.001$) and to *Callicebus* ($p = 0.0045$). Finally, for one specimen of *Sapajus nigritus*, Cq of 30.2 (estimate of $3.10E + 04$ gc/g liver) was observed.

When we analyzed median Cqs considering both NHP genera and environments, differences were observed ($\chi^2 = 51.58$, $p < 0.0001$) (Table 3). Rural *Alouatta* (median Cq = 14.1), rural *Callicebus* (median Cq = 13.9), and rural *Callithrix* (median Cq = 15.0) presented lower median Cqs (higher estimated YFV genomic loads) compared to urban *Callithrix* (median Cq = 33.0) ($p \leq 0.0014$). No difference was observed in median Cqs when *Alouatta*, *Callicebus*, and *Callithrix* collected in rural areas were compared to each other ($p > 0.20$). No difference in median Cqs was observed between urban-rural (median Cq = 33.8) and urban *Callithrix* ($p = 0.62$).

Partial nucleotide sequences of the envelope gene of 11 samples were obtained (Genbank accession numbers: MN517211-MN517221) (S2 Table), confirming wild-type YFV in NHP carcasses from urban and rural areas of different municipalities of Minas Gerais state. Phylogenetic analysis, involving 112 nucleotide (nt) sequences (621 nt) (S3 Table), indicated that YFV isolates obtained here formed a monophyletic cluster together with other YFV isolates from 2016 to 2018, within South America genotype I (S3 Fig).

Table 3. Median quantification cycle values and estimates of yellow fever virus genomic load in liver samples of non-human primate carcasses.

Variable	Median Cq (range)	Median YFV genomic copies (range)/ gram of liver*	p-value**
Environment			p<0.0001
Urban (n = 130)	32.6 (7.6–37.0)	5.96E+03 (1.74E+11–2.89E+02)	
Urban-rural interface (n = 20)	31.5 (9.2–36.2)	1.27E+04 (5.78E+10–5.01E+02)	
Rural (n = 148)	13.0 (7.7–37)	4.24E+09 (1.62E+11–2.89E+02)	
Genera			p<0.0001
<i>Alouatta</i> (n = 41)	13.0 (8.2–36.5)	4.24E+09 (1.15E+11–4.08E+02)	
<i>Callicebus</i> (n = 22)	8.5 (7.8–36.6)	9.36E+10 (1.51E+11–3.81E+02)	
<i>Callithrix</i> (n = 210)	32.0 (8.4–37.0)	9.00E+03 (1.00E+11–2.89E+02)	
Environment/ genera			p<0.0001
Urban <i>Callithrix</i> (n = 120)	33.0 (8.9–37)	4.52E+03 (7.11E+10–2.89E+02)	
Urban-rural <i>Callithrix</i> (n = 16)	32.8 (9.2–36.2)	5.19E+03 (5.78E+10–5.01E+02)	
Rural <i>Callithrix</i> (n = 74)	15.0 (8.4–37)	1.07E+0. (1.00E+11–2.89E+02)	
Rural <i>Callicebus</i> (n = 18)	13.9 (7.8–37)	2.28E+09 (1.51E+11–2.89E+02)	
Rural <i>Alouatta</i> (n = 33)	14.1 (8.3–36.5)	1.99E+09 (1.07E+11–4.08E+02)	

n: number of carcasses. Cq: quantification cycle value. YFV: yellow fever virus. Liver samples of non-human primate carcasses collected in Minas Gerais state, Brazil (Jan 2017-Dec 2018), were tested for YFV RNA, using the RT-qPCR [24].

*Median Cqs were used to estimate YFV genomic copies per gram of liver using the equation: $[10E (-0.2986 \times Cq + 13.5094)]$.

**Median Cqs were compared using the Kruskal-Wallis test with Bonferroni correction for multiple comparisons with differences considered statistically significant at $p < 0.0125$. Analyses were run in R software v.3.6.0.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008658.t003>

Discussion

From late 2016 to 2019, Southeast Brazil faced large and extensive sylvatic YF outbreaks, with thousands of human cases and epizootics, especially in MG state [4,10–13]. Based on demand for YFV investigation, we received liver samples belonging to NHP carcasses from January/2017 to December/2018. NHP are the primary hosts of the sylvatic YF cycle, and to better understand viral circulation in Minas Gerais state during recent outbreaks, we investigated YFV RNA in NHP carcasses. YFV was detected with high overall positivity of 38% in specimens of *Alouatta*, *Callicebus*, *Sapajus*, and *Callithrix*. We observed the widespread circulation of YFV in Minas Gerais, detecting the virus in 49 municipalities where YF was not previously reported during the recent YF outbreaks [14,25,26]. In Minas Gerais state, the mesoregions with the highest numbers of YFV-positive carcasses were the same ones with the highest records of human YF cases from 2016 to 2018 [4, 14, 23, 24]. Our phylogenetic analyses confirmed the YFV in different urban areas of Minas Gerais, close to human populations. Besides, the YFV detected in urban and rural environments belonged to the same lineage, indicating the dissemination of YFV from rural/sylvatic towards the urban areas during the recent YF outbreaks.

A gradient of YFV dissemination was observed from rural towards urban-rural interface and urban areas, in conformity with the sylvatic pattern of YF [5], when one would expect a higher exposure to the virus in rural environments. According to the seasonal pattern, a higher positivity for YFV infection was observed during the epidemic periods, when a more extensive transmission of the virus and a higher number of cases would likely occur [9–11]. Our data indicate the period from December to March with the highest chances of YFV detection in NHP carcasses, what should be considered by the YF surveillance system, and strengthening the surveillance, especially at the beginning of the epidemic period. Nevertheless, the YFV circulation during the non-epidemic period of 2017 was confirmed here and by official bulletins [10,14] confirming the persistence of YFV in Minas Gerais, from 2017 to 2018 [7], followed by a decline by mid-2018 until 2019 [15].

The NHP genera and species studied here are distributed along with the Atlantic Forest and Cerrado biomes [4,27], the biomes from which NHP carcasses were sampled. *Alouatta* spp. has been described as extremely sensitive to YFV infection, developing severe and fatal disease [1,4]. However, specimens of *Alouatta* presenting antibodies against YFV shows that howler monkeys can survive from YF [4,28,29]. Indeed, high rates of howler monkeys presenting protective or neutralizing antibodies against YFV were described in studies conducted in different regions of Panama (50.7% out of 203 individuals) [29] and Brazil (25.5% out of 192 specimens) [28]. There is little information regarding the susceptibility of *Callicebus* spp. to YFV infection. However, humoral immunity against YFV was demonstrated in 28.6% of 14 specimens investigated by Kumm and Laemmert (1950) [28], in Brazil. In the present study, *Callicebus* and *Alouatta* presented similar proportions of YFV-infected carcasses with similar low median Cqs in RT-qPCR. These results might indicate the high sensitivity to YFV of *Callicebus*, as *C. nigrifrons* and *C. personatus*. The YF surveillance and animal conservation programs should consider this information since some of those species are threatened (*C. nigrifrons*) and vulnerable (*C. personatus*) with decreasing population trends [30]. Similarly, species within *Sapajus* genus present population decreasing trends with some already considered critically endangered [30]. Here, only two specimens were sampled, and one carcass was YFV-positive. Although *Sapajus* specimens may develop severe disease, they have been considered less susceptible to YFV [4]. Our results and previous studies [5,7,31] showed YF outbreaks causing thousands of deaths of NHP, which lives in one of the most threatened ecosystems of the world, the Atlantic Forest [4,18].

Despite many marmoset carcasses received (mostly from urban areas), the overall positivity for YFV in *Callithrix* was lower than *Alouatta* and *Callicebus*. Due to their ability to adapt and survive in degraded and secondary habitats [32], free-living marmosets frequently inhabit urban green areas inside Brazilian cities, close to human populations. The proximity of *Callithrix* to the anthropic environment and its wide occurrence in urban areas could increase the chances of dead marmosets to be found in a good preservation status. However, we observed a strong negative correlation for detection of YFV in urban marmosets and higher median Cqs compared to *Callicebus* and *Alouatta*, suggesting lower genomic viral loads in those urban marmosets. Previous studies showed similar data when *Callithrix* presented higher Cqs (lower viral loads) than *Alouatta* during the recent YFV epizootics in Brazil [33]. On the other hand, we did not observe a difference among rural NHP (*Callithrix*, *Alouatta*, and *Callicebus*), which presented median estimates of genomic viral loads of 10E+6 times higher than *Callithrix* from urban and urban-rural transition areas. When only marmosets were evaluated, we detected a higher positivity in rural areas and a decreasing gradient towards urban areas, consistent with the sylvatic pattern of YF. In that way, the lower overall positivity for YFV could result from

the lower exposure to YFV-infected sylvatic vectors in urban areas. *Haemagogus* spp. is highly competent and considered the primary vector of YFV in Brazil [1,4,34], including the recent outbreaks in the country [34,35]. These mosquitoes are primatophilic species, being found in the tree canopy [36]. However, some species as *Haemagogus leucocelaenus* and *Haemagogus janthynomis* can disseminate through great distances [34] and may adapt to modified environments, as urban-rural interface [34,35] and urban green areas [37].

In the present study, we observed YFV-positive carcasses collected in urban areas boundaries and different neighborhoods, including downtown areas or near to the central area of different cities. For example, 25-YFV positive marmosets were collected in urban areas of Belo Horizonte (2.5 million inhabitants), the state capital, and a total of 76 YFV-positive marmosets were sampled in the Metropolitan Region of Minas Gerais state (5.0 million inhabitants). Due to some carcasses location (for example, near the downtown area of Belo Horizonte), the land use, and marmosets territorial behavior [32], some of these NHP would have been likely infected in urban matrixes.

Although NHP have a crucial role in the epidemiology of YF and despite YFV-infected NHP in urban areas, there was no documented case of urban/*Aedes* transmission of YFV in Brazil since 1942 [1,4,9–11]. The lower viral load (represented by the estimated viral genomic load) in urban NHP could lower the chances for further viral transmission to vectors. Besides, the closure of some parks in urban centers, the vaccination of humans, and the distinct behavior patterns and habitats observed for hosts (NHP and humans) and vectors in urban areas might have played a role in preventing the urban/*Aedes* transmission of YFV to humans. However, the high infestation of Brazilian urban areas by *Aedes aegypti* poses a risk for YFV urban/*Aedes* transmission [4,34,37,38]. Concerning *Aedes*, previous studies in Brazil have confirmed the competence of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*, although the latter has shown low transmission competency to YFV [33].

Here we demonstrated the wide occurrence of YFV-infected NHP in Minas Gerais state, including several urban areas, during the epidemic and non-epidemic periods. Although the number of YFV-infected NHP and humans dramatically decreased from the mid-2018, YFV persisted in the Southeast region [5,7,8], at least during three consecutive transmission seasons [39]. These data reinforce that YFV has suitable ecological and climate conditions for its maintenance in Southeast Brazil. Further studies to investigate the sensitivity of urban NHP and the competence of YFV vectors found in urban and urban-rural transition areas should be conducted to understand better the dynamics of YF and the risks for the occurrence of YF in urban centers.

Supporting information

S1 Fig. Characteristics of non-human primate carcasses used for yellow fever virus investigation. (A) Balloon plot of observed frequencies (freq) of NHP carcasses related to the year (2017 and 2018) and the sampling period. Epi: epidemic period (December to May), non-epi: non-epidemic period (June to November). (B) Balloon plot of observed frequencies (freq) of NHP carcasses related to the genera *Alouatta*, *Callicebus*, *Callithrix*, or non-identified specimens (Non-ID), and the environment rural, urban-rural interface (UR-I), or urban areas. Balloon plots were created using Rand; each cell contains a dot whose size and color reflect the relative magnitude of the corresponding component, according to the frequencies presented. (C) Distribution of NHP carcasses according to the epidemiological weeks, in 2017 (left) and 2018 (right). YFV-positive samples are shown in red, and samples non-detectable for YFV RNA by RT-qPCR [24] are shown in blue. Epidemic periods, in 2017 and 2018, correspond to

epidemiological weeks 1 to 22 and 49 to 52 of each year.
(TIF)

S2 Fig. Association between detection of yellow fever virus (YFV) in the liver of non-human primate carcasses with each bimester within the yellow fever epidemic and non-epidemic periods. YFV ND: yellow fever virus RNA non-detectable. YFV pos: yellow fever virus RNA detectable. Pearson residuals (standardized) were extracted from the chi-square function and plotted. In each cell, the circle's size is proportional to the amount of cell contribution, and colors indicate positive residuals (blue) or negative residuals (red). The vertical bars indicate Pearson residuals values. Analyses were run in R software v.3.6.0.
(TIF)

S3 Fig. Phylogenetic tree of yellow fever virus based on partial envelope gene sequence. The phylogenetic tree was reconstructed using the Maximum Likelihood method based on the General Time Reversible model, using Gamma distribution (5 categories). A total of 1000 bootstrap replicates were run, and circles in the respective nodes represent the results. The analysis involved 112 nucleotide (nt) sequences (621 nt). Branch lengths are drawn to a scale of nucleotide substitutions per site according to the scale. Sequences are identified by Genbank accession. The analysis was conducted in MEGA7, and the final tree was edited and visualized in FigTree v.1.4.4.
(TIF)

S1 Table. Non-human primate (NHP) carcasses collected and tested for yellow fever virus (YFV) RNA, according to the mesoregions of Minas Gerais state, Brazil. YFV: yellow fever virus. RT-qPCR: one-step real-time polymerase chain reaction. NHP: non-human primate. Liver samples of NHP carcasses collected in Minas Gerais state, Brazil (January 2017–December 2018), were tested for YFV RNA using the RT-qPCR [24]. (+) detection of YFV RNA by RT-qPCR. (-) non-detection of YFV RNA by RT-qPCR.
(DOC)

S2 Table. Information regarding non-human primate (NHP) carcasses from which the yellow fever virus sequences were obtained. ^aAll municipalities are in Minas Gerais state, Southeast of Brazil. NHP: non-human primate. ID: identification. Non-ID: non-identified specimens. Feb.: February. Apr.: April. Jan.: January.
(DOC)

S3 Table. Information of yellow fever virus (YFV) sequences included in the dataset. ID: identification. YFV: yellow fever virus. NHP: non-human primate. NA: not available. This dataset included 112 YFV nucleotide (nt) sequences, spanning 621 nt (from the nucleotide 1,766 to 2,386 of MK333808.1 sequence) from South American and African genotypes.
(DOC)

Author Contributions

Conceptualization: Giliane de Souza Trindade, Betânia Paiva Drumond.

Data curation: Vítor Emídio de Mendonça, Rodolfo German Antonelli Vidal Stumpp, Alaine Izabela Alves Prado, Adriano Pereira Paglia, Fernando Araújo Perini.

Formal analysis: Lívia Sacchetto, Natalia Ingrid Oliveira Silva, Benoit de Thoisy, Betânia Paiva Drumond.

Funding acquisition: Adriano Pereira Paglia, Maurício Lacerda Nogueira, Erna Geessien Kroon, Benoit de Thoisy, Giliane de Souza Trindade, Betânia Paiva Drumond.

Investigation: Lívia Sacchetto, Natalia Ingrid Oliveira Silva, Izabela Maurício de Rezende, Matheus Soares Arruda, Thais Alkifeles Costa, Érica Munhoz de Mello, Gabriela Fernanda Garcia Oliveira, Pedro Augusto Alves, Vítor Emídio de Mendonça, Rodolfo German Antonelli Vidal Stumpp, Alaine Izabela Alves Prado, Betânia Paiva Drumond.

Methodology: Lívia Sacchetto, Natalia Ingrid Oliveira Silva, Izabela Maurício de Rezende, Giliane de Souza Trindade, Betânia Paiva Drumond.

Project administration: Adriano Pereira Paglia, Fernando Araújo Perini, Betânia Paiva Drumond.

Resources: Érica Munhoz de Mello, Pedro Augusto Alves, Erna Geessien Kroon, Benoit de Thoisy, Giliane de Souza Trindade, Betânia Paiva Drumond.

Supervision: Betânia Paiva Drumond.

Visualization: Lívia Sacchetto, Natalia Ingrid Oliveira Silva, Betânia Paiva Drumond.

Writing – original draft: Lívia Sacchetto, Natalia Ingrid Oliveira Silva, Izabela Maurício de Rezende, Betânia Paiva Drumond.

Writing – review & editing: Lívia Sacchetto, Natalia Ingrid Oliveira Silva, Izabela Maurício de Rezende, Matheus Soares Arruda, Thais Alkifeles Costa, Érica Munhoz de Mello, Gabriela Fernanda Garcia Oliveira, Pedro Augusto Alves, Vítor Emídio de Mendonça, Rodolfo German Antonelli Vidal Stumpp, Alaine Izabela Alves Prado, Adriano Pereira Paglia, Fernando Araújo Perini, Maurício Lacerda Nogueira, Erna Geessien Kroon, Benoit de Thoisy, Giliane de Souza Trindade, Betânia Paiva Drumond.

References

1. da C Vasconcelos PF. Yellow Fever. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2003; 36: 275–93. <https://doi.org/10.1590/s0037-86822003000200012> PMID: 12806465
2. Douam F, Ploss A. Yellow Fever Virus: Knowledge Gaps Impeding the Fight Against an Old Foe. *Trends Microbiol.* 2018; 26: 913–28. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.05.012> PMID: 29933925
3. da C Vasconcelos PF. Yellow fever in Brazil: thoughts and hypotheses on the emergence in previously free areas. *Rev Saude Publica.* 2010; 44: 1144–9. <https://doi.org/10.1590/s0034-89102010005000046> PMID: 21109907
4. Silva NJO, Sacchetto L, de Rezende IM, de S Trindade G, LaBeaud AD, de Thoisy Benoit and Drumond BP. Recent sylvatic yellow fever virus transmission in Brazil: the news from an old disease. *Virol J.* 2020; <https://doi.org/10.1186/s12985-019-1277-7> PMID: 31973727
5. Faria NR, Kraemer MUG, Hill SC, De Jesus JG, Aguiar RS, Iani FCM, et al. Genomic and epidemiological monitoring of yellow fever virus transmission potential. *Science (80-).* 2018; 361: 894–99. <https://doi.org/10.1126/science.aat7115> PMID: 30139911
6. Gómez MM, de Abreu FVS, Dos Santos AAC, de Mello IS, Santos MP, Ribeiro IP, et al. Genomic and structural features of the yellow fever virus from the 2016–2017 Brazilian outbreak. *J Gen Virol.* 2018; 99: 536–548. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001033> PMID: 29469689
7. de Rezende IM, Sacchetto L, Munhoz de Mello É, Alves PA, de M Iani FC, Adelino TÉR, et al. Persistence of Yellow fever virus outside the Amazon Basin, causing epidemics in Southeast Brazil, from 2016 to 2018. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018; 12: e0006538. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006538> PMID: 29864115
8. Delatorre E, Santos De Abreu FV, Ribeiro IP, Gómez MM, Cunha Dos Santos AA, Ferreira-De-Brito A, et al. Distinct YFV Lineages Co-circulated in the Central-Western and Southeastern Brazilian Regions from 2015 to 2018. *Front Microbiol.* 2019; 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01079> PMID: 31178835
9. SVS-MS. Centro de operações de emergência em saúde pública sobre febre amarela Informe No 43 2017. In: Secretaria de Vigilância em Saúde—Ministério da Saúde/Ministério da Saúde [Internet]. 2017

- [cited 7 Jul 2019] pp. 1–7. <http://portal.arquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/junho/02/COES-FEBRE-AMARELA—INFORME-43—Atualiza—o-em-31maio2017.pdf>
10. SVS-MS. Monitoramento do Período Sazonal da Febre Amarela Brasil 2017/2018 Informe N° 27. In: Secretaria de Vigilância em Saúde—Ministério da Saúde [Internet]. 2018 [cited 6 Jul 2019] pp. 1–12. <https://portal.arquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/outubro/08/Informe-FA.pdf>
 11. SVS-MS. Monitoramento de Febre Amarela Brasil 2019 Informe No 18. In: Secretaria de Vigilância em Saúde—Ministério da Saúde [Internet]. 2019 [cited 6 Jul 2019] pp. 1–8. <https://portal.arquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/junho/13/Informe-de-Monitoramento-de-Febre-Amarela-Brasil—n-18.pdf>
 12. MS-BR. Monitoramento do período sazonal da Febre Amarela Brasil 2018/2019 Informe No 3. In: Ministério da Saúde do Brasil [Internet]. 2019 [cited 5 Jul 2019] pp. 1–12. <https://portal.arquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/janeiro/28/informe-FA-n.3-21jan19.pdf>
 13. MS-BR. Monitoramento do período sazonal da Febre Amarela Brasil 2017/2018 Informe No 1 2017/2018. In: Ministério da Saúde do Brasil [Internet]. 2017 [cited 5 Jul 2019] pp. 1–12. <https://portal.arquivos2.saude.gov.br/images/PDF/2017/novembro/14/Informe-FA-14-11-17.pdf>
 14. SES-MG. Febre Amarela Silvestre em Minas Gerais 18/10/2018. In: Secretaria do Estado de Saúde de Minas Gerais [Internet]. 2018 [cited 6 Jul 2019] pp. 1–12. http://www.saude.mg.gov.br/images/noticias_e_eventos/000_2018/BoletinsEpidemiologicos/Boletim_-_Febre_Amarela_2018_-_Consolidado_V3.pdf
 15. SES-MG. Febre Amarela Silvestre em Minas Gerais—19/02/2019. In: Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais [Internet]. 2019 [cited 5 Jul 2019] pp. 1–12. http://www.saude.mg.gov.br/images/noticias_e_eventos/000_2019/jane_fev_mar/Febre_Amarela/Boletim_atualizacao_FA_12-02-2019.pdf
 16. SVS-MS. Febre Amarela Febre do Nilo Ocidental Febre Maculosa Brasileira e Outras Riquetsioses. Guia de Vigilância em Saúde. 4a edição. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde; 2019. p. 727.
 17. Monath TP, Vasconcelos PFC. Yellow fever. *J Clin Virol*. Elsevier B.V.; 2015; 64: 160–173. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2014.08.030> PMID: 25453327
 18. Stan K, Sanchez-Azofeifa A, Espírito-Santo M, Portillo-Quintero C. Simulating deforestation in Minas Gerais, Brazil, under changing government policies and socioeconomic conditions. *PLoS One*. 2015; 10: e0137911. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137911> PMID: 26371876
 19. IBGE. Sinopse Preliminar do Censo Demográfico. In: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística [Internet]. 2000 [cited 2 Jun 2020] p. 415. https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/308/cd_2000_v7.pdf
 20. Gregorin R. Taxonomia e variação geográfica das espécies do gênero *Alouatta* Lacépède (Primates, Atelidae) no Brasil. *Rev Bras Zool*. 2006; 23: 64–144. <https://doi.org/10.1590/s0101-81752006000100005>
 21. Groves C. Smithsonian series in comparative evolutionary biology. Primate taxonomy. Washington, DC: Smithsonian Institution Press; 2001. pp. 1–350.
 22. van Roosmalen MGM, van Roosmalen T, Mittermeier R. A taxonomic review of the titi monkeys, genus *Callicebus* Thomas, 1903, with the description of two new species, *Callicebus bernhardi* and *Callicebus stephennashi*, from Brazilian Amazonia. *Neotrop Primates*. 2002; 10: 1–52. <https://doi.org/10.1007/s10533-007-9087-1>
 23. de Rezende IM, Alves PA, Arruda MS, Gonçalves AP, Oliveira GFG, Pereira LS, et al. Yellow fever virus genotyping tool and investigation of suspected adverse events following yellow fever vaccination. *Vaccines*. 2019; 7. <https://doi.org/10.3390/vaccines7040206> PMID: 31817103
 24. Domingo C, Patel P, Yillah J, Weidmann M, Méndez JA, Nakouné ER, et al. Advanced yellow fever virus genome detection in point-of-care facilities and reference laboratories. *J Clin Microbiol*. 2012; 50: 4054–60. <https://doi.org/10.1128/JCM.01799-12> PMID: 23052311
 25. SES-MG. Febre Amarela Silvestre em Minas Gerais—20/06/2018. In: Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais [Internet]. 2018 [cited 5 Jul 2019] pp. 1–12. http://www.saude.mg.gov.br/images/documentos/Boletim_Febre%20Amarela_21.06.2018_atualizada.pdf
 26. SES-MG. Situação epidemiológica da febre amarela silvestre em Minas Gerais, 2017–21/08/2017. In: Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais [Internet]. 2017 [cited 5 Jul 2019] pp. 1–29. <http://www.saude.mg.gov.br/images/editais/AtualizacaoFA-22%20de%20agosto%202017.pdf>
 27. Paglia AP, Fonseca GAB, Rylands AB, Herrmann G, Aguiar LMS, Chiarello AG, et al. Lista Anotada dos Mamíferos do Brasil/Annotated Checklist of Brazilian Mammals. (2a Edição/2nd Edition). Occasional Papers in Conservation Biology. Arlington, VA: Conservation International; 2012.

28. Kumm HW, Laemmert HW. The geographical distribution of immunity to yellow fever among the primates of Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 1950; 30: 733–48. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1950.s1-30.733> PMID: [14771397](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14771397/)
29. Clark HC. Endemic yellow fever in Panama and neighboring areas. *Am J Trop Med Hyg.* 1952; 1: 78–86. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1952.1.78> PMID: [14903438](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14903438/)
30. IUCN. The IUCN Red List of Threatened Species. In: International Union for Conservation of Nature and Natural Resources [Internet]. 2019 [cited 5 Jul 2019]. <https://www.iucnredlist.org/>
31. Cunha MS, da Costa AC, de Azevedo Fernandes NCC, Guerra JM, dos Santos FCP, Nogueira JS, et al. Epizootics due to Yellow Fever Virus in São Paulo State, Brazil: viral dissemination to new areas (2016–2017). *Sci Rep.* 2019; 9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41950-3> PMID: [30940867](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30940867/)
32. Teixeira B, Hirsch A, Goulart VDLR, Passos L, Teixeira CP, James P, et al. Good neighbours: Distribution of black-tufted marmoset (*Callithrix penicillata*) in an urban environment. *Wildl Res.* 2015; 42: 579–89. <https://doi.org/10.1071/WR14148>
33. Mares-Guia MAMDM, Horta MA, Romano A, Rodrigues CDS, Mendonça MCL, Dos Santos CC, et al. Yellow fever epizootics in non-human primates, Southeast and Northeast Brazil (2017 and 2018). *Parasites and Vectors.* 2020; 13: 90. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-3966-x> PMID: [32075684](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32075684/)
34. de Abreu FVS, Ribeiro IP, Ferreira-de-Brito A, dos Santos AAC, de Miranda RM, de S Bonelly I, et al. *Haemagogus leucocelaenus* and *Haemagogus janthinomys* are the primary vectors in the major yellow fever outbreak in Brazil, 2016–2018. *Emerg Microbes Infect.* 2019; 8: 218–31. <https://doi.org/10.1080/22221751.2019.1568180> PMID: [30866775](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30866775/)
35. Pinheiro GG, Rocha MN, de Oliveira MA, Moreira LA, Filho JDA. Detection of yellow fever virus in sylvatic mosquitoes during disease outbreaks of 2017–2018 in minas gerais state, brazil. *Insects.* 2019; 10: e136. <https://doi.org/10.3390/insects10050136> PMID: [31083286](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31083286/)
36. Causey OR, Kumm HW, Laemmert HW. Dispersion of forest mosquitoes in Brazil: Further studies. *Am J Trop Med Hyg.* 1950; s1-30: 301–12. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1950.s1-30.301> PMID: [15419408](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15419408/)
37. Mucci LF, Medeiros-Sousa AR, Ceretti-Júnior W, Fernandes A, Camargo AA, Evangelista E, et al. *Haemagogus leucocelaenus* and Other Mosquitoes Potentially Associated With Sylvatic Yellow Fever In Cantareira State Park In the São Paulo Metropolitan Area, Brazil. *J Am Mosq Control Assoc.* 2016; 32: 329–32. <https://doi.org/10.2987/16-6587.1> PMID: [28206862](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28206862/)
38. Mir D, Delatorre E, Bonaldo M, Lourenço-De-Oliveira R, Vicente AC, Bello G. Phylodynamics of Yellow Fever Virus in the Americas: New insights into the origin of the 2017 Brazilian outbreak. *Sci Rep.* 2017; 7: 7385. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07873-7> PMID: [28785067](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28785067/)
39. De Abreu FVS, Delatorre E, Dos Santos AAC, Ferreira-De-Brito A, De Castro MG, Ribeiro IP, et al. Combination of surveillance tools reveals that yellow fever virus can remain in the same atlantic forest area at least for three transmission seasons. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2019; 114: e190076. <https://doi.org/10.1590/0074-02760190076> PMID: [31038550](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31038550/)

ANEXO E – Artigo aceito em periódico internacional

PLOS NEGLECTED TROPICAL DISEASES

RESEARCH ARTICLE

Spatial epidemiology of yellow fever: Identification of determinants of the 2016-2018 epidemics and at-risk areas in Brazil

Benoit de Thoisy^{1*}, Natalia Ingrid Oliveira Silva², Lívia Sacchetto², Giliane de Souza Trindade², Betânia Paiva Drumond^{2*}

¹ Laboratoire des Interactions Virus-Hôtes, Institut Pasteur de la Guyane, Cayenne, French Guiana,

² Department of Microbiology, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

* bdethoisy@pasteur-cayenne.fr (BdT); betaniadrumond@ufmg.br, betaniadrumond@gmail.com (BPD)



Abstract

Optimise control strategies of infectious diseases, identify factors that favour the circulation of pathogens, and propose risk maps are crucial challenges for global health. Ecological niche modelling, once relying on an adequate framework and environmental descriptors can be a helpful tool for such purposes. Despite the existence of a vaccine, yellow fever (YF) is still a public health issue. Brazil faced massive sylvatic YF outbreaks from the end of 2016 up to mid-2018, but cases in human and non-human primates have been recorded until the beginning of 2020. Here we used both human and monkey confirmed YF cases from two epidemic periods (2016/2017 and 2017/2018) to describe the spatial distribution of the cases and explore how biotic and abiotic factors drive their occurrence. The distribution of YF cases largely overlaps for humans and monkeys, and a contraction of the spatial extent associated with a southward displacement is observed during the second period of the epidemics. More contributive variables to the spatiotemporal heterogeneity of cases were related to biotic factors (mammal richness), abiotic factors (temperature and precipitation), and some human-related variables (population density, human footprint, and human vaccination coverage). Both projections of the most favourable conditions showed similar trends with a contraction of the more at-risk areas. Once extrapolated at a large scale, the Amazon basin remains at lower risk, although surrounding forest regions and notably the North-West region, would face a higher risk. Spatial projections of infectious diseases often relied on climatic variables only; here for both models, we instead highlighted the importance of considering local biotic conditions, hosts vulnerability, social and epidemiological factors to run the spatial risk analysis correctly: all YF cases occurring later on, in 2019 and 2020, were observed in the predicted at-risk areas.

OPEN ACCESS

Citation: de Thoisy B, Silva NIO, Sacchetto L, de Souza Trindade G, Drumond BP (2020) Spatial epidemiology of yellow fever: Identification of determinants of the 2016-2018 epidemics and at-risk areas in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis* 14(10): e0008691. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008691>

Editor: Benjamin M. Althouse, UNITED STATES

Received: August 19, 2019

Accepted: August 10, 2020

Published: October 1, 2020

Copyright: © 2020 de Thoisy 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 manuscript and/or in the cited references.

Funding: BdT was supported by the RESERVOIRS program funded by European (ERDF/FEDER) and assistance from Collectivité Territoriale de la Guyane and Direction Régionale pour la Recherche et la Technologie, and the MicroBIOME project granted by Laboratoire d'Excellence CEBA "Investissement d'Avenir" and managed by the Agence Nationale de la Recherche (CEBA,

Author summary

Yellow fever (YF) is a vector-borne disease and from December 2016 until 2020, caused infection and death in humans and monkeys in the Southeast and South of Brazil. The

Ref. ANR-10-LABEX-25-01). BPD was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) (grant number APQ-01574-17). GST was supported by Dicit/SCTIE/MoH. BPD and GST were supported by the Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais (SES-MG)/Secretaria de Estado de Planejamento de Minas Gerais (SEPLAG-MG)/ Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) (grant Yellow fever). BPD and GST were supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) (grant: Research fellowship). LS was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)/BRAZIL (grant 0001). NIOS: National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) - (grant Graduate Scholarship). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: NO authors have competing interests.

transmission cycle includes hosts and vectors whose presence and abundance are driven by environmental conditions. Ecological niche models are expected to identify biotic and abiotic conditions favourable to a species and to predict its likelihood of presence. Such models have shown their relevance to determine the environmental and anthropogenic variables favourable for host and vector species of infectious diseases, and consequently for highlighting more at-risk areas. Relying on human and monkey populations, we showed how temperature, rain, predicted mammal density, human impact, and vaccination coverage explained the occurrence of YF cases in 2017–2018 Brazilian epidemics. We predicted at-risk areas for future outbreaks, including areas outside and surrounding the Amazon basin, YF cases occurring later, in 2019 and 2020, were observed in the predicted at-risk areas using our modelling approach. This modelling approach, relying on ecology theory and methodological framework for using epidemiological data, helps to identify human threatened populations, for which vaccination efforts should be oriented, and also for monkeys whose preservation is the main biodiversity concern.

Introduction

Yellow fever (YF), caused by yellow fever virus (YFV) (genus *Flavivirus*, family *Flaviviridae*), is endemic in tropical and neotropical forest regions, with successive stages of silent circulation, epidemic events, and local expansions [1]. The most accepted hypothesis is that YFV was introduced from Africa into South America with the slave trade, and it caused several urban outbreaks along the Brazilian coast. Later, the virus established a sylvatic enzootic cycle involving non-human primates (NHP) and sylvatic mosquitoes vectors in the Amazon basin [2]. Outside the Amazon basin, YFV reemerges sporadically and with a seasonal pattern. In early 2000, the epidemiology pattern changed, and for the last 20 years, most of the human cases were recorded outside the Amazon Forest [3]. At the end of 2016, a vast epidemic of YF with sylvatic transmission patterns and the likelihood for urbanisation [4] started in Minas Gerais state (MG), Brazil, likely originating from the Midwest region to Southeast and then South regions [5–8].

Surveillance of the epidemic and inter-epidemic periods requires the identification of at-risk areas for implementation of mitigation measures such as vector control, vaccination of more exposed populations, and control of abiotic and biotic factors that may favour transmission. Hence knowledge of how environmental factors influence vector and reservoir occurrence and dynamics is needed to understand how pathogens are dispersed and maintained in and across landscapes [9]. Niche modelling, derived from ecology science and initially developed to circumvent gaps in species distribution knowledge, showed relevance in identifying more favourable areas for zoonotic diseases occurrence and can be applied to vectors [10] or reservoirs [11]. Regarding YF distribution of the considered most susceptible Neotropical NHP, the howler monkeys (*Alouatta caraya* and *Alouatta guariba clamitans*), and the primary vector (*Haemagogus leucocelaenus*), were used to predict the distribution of epidemics in South Brazil [12].

However, for many infectious disease systems including yellow fever, the range of potential and putative hosts is not definitively exhaustive, and communities, rather than species, may be part of the cycle. Furthermore, at foci of emergence and the forest edge, synanthropic species may play a role in the cycle and transmission [13], adding unweighted complexity in the delimitation of hosts and vectors taxonomic lists, and their associated ecological requirements. Concerning YF, the most recognised hosts are humans, but the cycle mainly relies on NHP, in which some species are highly vulnerable to infection [14–16]. An extensive set of

other mammals also show serological evidence of infection, suggesting their possible role in the virus circulation [17]. The main recognised vectors of YFV are *Haemagogus janthinomys* and *Hg. leucocelaenus*, however, other mosquitoes from the Culicidae family have been found infected [18]. A broad spectrum of species may have a role in the YF cycle [19]. Identifying explanatory variables and modelling only the occurrence of recognised vectors and hosts, may miss essential parts of the infectious system, that depends on an uncovered diversity of secondary hosts. This gap may lead to conflicting issues when suitable areas are expected to be considered as epidemiologic risks [20–22]. Such "polyhostal" and "polyvectored" infectious agents [23] can be modelled including all the actors in the system, but this may be unrealistic in cycles evolving such diversified ecosystems or based on disease cases only [24].

In that way, an alternative may be to focus on the occurrence of human cases [25], considering that the disease records show favourable conditions for the circulation of the pathogen, whatever the hosts and vectors, including the secondary ones [24,26]. Choice of relevant explicative variables is crucial for such purposes. Contrasting with general trends of pathogens distributions [27], the influence of anthropic pressures on the environment and biodiversity may play significant roles at local geographic scales and can modify the complex interactions between hosts, vectors, and disease agents [28–30]. The BAM framework (biotic, abiotic, movement) was proposed [31] to identify conditions suitable for disease maintenance and dispersal correctly. Biotic and abiotic conditions explained transmission pathways between host and vectors and shaped the geographic and ecological conditions of the infectious agents. The movement summarises limitations, accessibility, and barriers for spreading. Once including human-related variables, that could be associated to contact with the virus. Spatial projections of those climatic, ecological, and anthropogenic favourable conditions to pathogen occurrence may then be understood as a risk map [32].

Here we used records of YFV infection of humans and NHP to explore the environmental variables explaining the occurrence of YF during the 2016–2018 epidemics in the Southeast Brazilian region. To reach this target, we relied on a machine learning algorithm strongly related to ecological theory, a Maximal Entropy Modelling [33]. This model is a highly confident presence-pseudo-absence model based on maximum entropy, that does not require real absence data. The model predicts species occurrences by finding the environmental profiles that lead to predictions that best differentiates presence from the background while taking into account the limits of the environmental variables of known locations [34]. A key point for mapping infectious diseases is that the absence of recorded cases (due to low surveillance areas or to asymptomatic cases) does not mean a lack of virus circulation.

Here we used spatial statistics, and niche modelling to (i) investigate the drivers of YF occurrence in NHP and humans, during the 2017–2018 epidemics, and (ii) predict more at-risk areas, according to the replies of recorded cases to a set of biotic, abiotic, and human-related environmental variables. We relied on the ability of our modelling approach to make a geographic extrapolation on a larger scale than the one used for the learning of the explanatory functions for the YFV occurrence of disease cases according to explicative environmental variables. This spatial prediction of the more favourable regions, at the South American scale, showed where future and undetected cases could more likely occur, and consequently where infectious risk is elevated.

Methods

Input occurrence

All confirmed cases of YF in humans and the confirmed YF epizootics in NHP that occurred from July 2016 until June 2018 were retrieved from Brazilian official bulletins [35–40] and

data received from the Ministry of Health through the Reporting Disease Information System (SINAN), the Centre for Strategic Health Surveillance Information (CIEVS) and other technical sectors of epidemiological surveillance in Brazil [41–44]. According to the Brazilian Ministry of Health, suspected YF cases in humans should be confirmed by clinical-laboratory tests through: (i) virus isolation in tissues or blood/serum; (ii) detection of YFV genome; (iii) detection of IgM antibodies by MAC-ELISA in non-vaccinated individuals or antibodies titres four times higher by hemagglutination inhibition; (iv) histopathological and tissue lesions compatible to YF; or (v) by epidemiological link cases [41,42,44]. Epizootics in NHP are confirmed for at least one animal at the Probable Place of Infection or by an epidemiological link [41,43,44]. As spatial dynamics changed over the YF outbreaks for both datasets, two periods were considered: July 2016 to December 2017, and January 2018 to October 2018.

The human 2016–2017 dataset included 579 confirmed cases from 158 locations, in Minas Gerais (81%), Espírito Santo (10%), São Paulo (4%), Rio de Janeiro (4%), and Tocantins (one location) states. In most locations (84%), the number of cases ranged from 1 to 5, and up to 20 in 3% of the locations. The human 2018 dataset included 837 confirmed cases from 120 locations, in São Paulo (64%), Rio de Janeiro (31%), and Minas Gerais (5%) states. In 73% of the locations, the number of cases ranged from 1 to 5, and up to 20 in 6% of the locations.

The NHP 2016–2017 dataset included 1,054 confirmed epizootics (of *Callithrix* spp., *Sapajus* spp., *Callicebus* spp., and *Alouatta* spp.) from 319 locations, in São Paulo (54%), Minas Gerais (19.5%), Bahia (18%) Espírito Santo (6%), Rio de Janeiro (1.5%), Distrito Federal (Brasília), Mato Grosso, Tocantins (<1%) states. In 91% of the locations, the number of cases ranged from 1 to 5, and up to 20 in 4% of the locations. The NHP 2018 dataset includes 382 confirmed epizootics from 123 locations, in São Paulo (75%), Minas Gerais (16%), Rio de Janeiro (7%), Bahia (2%), and Tocantins (<1%) states. In 92% of the locations, the number of cases ranged from 1 to 5, and up to 20 in 2% of the locations.

Ethics statement

We report a geospatial analysis of YF data. The human data were readily obtained from existing public access databases (Reporting Disease Information System (SINAN), the Centre for Strategic Health Surveillance Information (CIEVS), [41–44]). The information that identifies the patient was anonymised in the databases, and there is no need for ethical considerations.

Resampling

We resampled occurrence points to consider the more likely place of infection better, as proposed recently for cutaneous leishmaniasis modelling and to reply on the BAM framework [25]. To increase the likelihood to sample the area of infection, we randomly distributed the occurrence points in a buffer area expected to represent the most likely area of infection. To reduce the total number of records at single points that may reflect autocorrelation rather than ecological conditions, we considered all the locations with less than five human records with a unique occurrence point. Areas with 5 to 20 records were represented with two occurrence points and areas with over 20 records with four occurrence points. For NHP, locations with 1 to 8 records were figured by one occurrence point, locations with 9 to 24 cases were figured by four occurrence points, and locations with over 24 records had 8 occurrence points. The issue of georeferencing accuracy in disease mapping is crucial [45]. Considering that infection likely could not occur in the most urbanised areas (human footprint > 65), the size of the distribution buffer was defined as a 2 km circular area surrounding the record when the associated human footprint (HFP, <http://sedac.ciesin.columbia.edu>) [46,47] was < 20.3 km for HFP from

20 to 50, and 4 km for HFP > 50. Within buffers, all areas with HFP > 65 were excluded, since they correspond to a complete urbanised habitat.

Spatial statistics

The extent of the epidemics, the likelihood of spatial autocorrelation, and the spatial distribution of confirmed cases were explored with Kernel density and the z-value of the Morans-I autocorrelation and Getis-Ord general G statistics. Anselin Local Morans I statistics allowed investigating hot and cold spots, and aberrant geographic values. All analyses were implemented with ArcGIS 10.6 (<http://www.arcgis.com/index.html>) [48].

Niche modelling

Environmental determinants. Candidate explanatory determinants included (i) 19 climatic variables (BIOCLIM data, www.worldclim.org) [49], (ii) one geomorphologic variable (elevation digital model derived from the Shuttle Radar Topography Mission, available at www.earthexplorer.usgs.org) [50], (iii) three ecological variables: above-ground biomass [51], canopy height [52] and mammal richness (<http://sedac.ciesin.columbia.edu>); and (iv) variables related to human populations (poverty, population density and urban expansion, <http://sedac.ciesin.columbia.edu>) and (v) a variable to expected impacts of anthropogenic presence on biodiversity (Human Foot Print, <http://sedac.ciesin.columbia.edu>) [46,47]. For the human model, the vaccination coverage (expressed as the proportion of the population who had ever received a vaccine) was added, under different scenarios accounting for uncertainty in how vaccine campaigns were targeted [53]. Spatial correlation between variables was investigated with correlation and covariance matrices (SDM ToolsBox, ArcGIS 10.6) [48]; variables with correlation > 0.7 were discarded.

Modelling procedures. Preliminary comparative tests were made with four algorithms: two machine learning models: Boost Regression Tree (BRT) and Maximal Entropy; and both a General Additive Model (GAM) and a Generalized Linear Model (GLM) (statistical models), using the online platform [54]. Maximal Entropy outperformed BRT, GAM and GLM for True Negative, False Positive, False Discovery, False Omission Rates, and Negative Predictive values. Consequently, Maximal Entropy Modelling 3.4.1 [55] was later used. Besides, unlike other spatial modelling, complex procedures such as Maximal Entropy are not negatively affected by a broad set of environmental variables, and may even benefit from multiple colinearities [56]. Prediction tests were performed at two geographic scales. All the learning stages were done on the geographic area where cases were recorded. The prediction of the at-risk areas, relying on learnt relations between occurrences and selected variables, was done at the geographic scale of recorded cases, and the South American scale. Preliminary runs with MaxEnt (five replicates, 10,000 iterations) allowed discarding variables with a limited contribution (<10% of both contribution and permutation importance, Jackknife tests), on the base of Area Under the Curve of the Receiver Operating Characteristic values, as this metric is commonly employed to assess the specificity and sensitivity of models and to select the variables. Once selected, the Maxent model was run (at ten replicates, 100,000 iterations, subsampling) to make response curves of variables, and prediction of more favourable areas in the areas mentioned above, where cases occurred. The monkeys and human cases that occurred between July 2018 and January 2020 (33 places with human cases, all in places where no record was noticed in the 2016–2017 period, and 56 epizootics events, including 52 new places of occurrence), therefore not considered in the modelling process, were used to assess the predictive power of the model, exploring how those new occurrences fall in predicted at-risk areas.

Results

The distribution of YF occurrence largely overlapped for NHP and humans, and a contraction of the spatial extent with a southward displacement of the human and NHP cases was observed between the two periods (Fig 1).

Within the distribution envelope, spatial distribution tests showed significant aggregations of records, for both humans and NHP in the two periods (Humans 2017, Anselin Morans I: $z = 6.1, p < 0.0001$; Monkeys 2017, Anselin Morans I: $z = 24, p < 0.0001$; Humans 2018, Getis-Ord G: $z = 2.06, p < 0.05$; Monkeys 2018, Anselin Morans I: $z = 4.3, p < 0.0001$) (Fig 2).

Those changes in the geographic extent and aggregative behaviour of the epidemics suggested different replies to environmental variables for the first and second half of the outbreak. Within the broad set of tentative explanatory variables, niche modelling allowed evidencing with high-reliability contributive ones to YF occurrence.

Based on records of human cases in 2017 (AUC = 0.97 +/- 0.006): *BIO15* (Precipitation Seasonality), *BIO4* (Temperature Seasonality), *BIO18* (Precipitation of Warmest Quarter), *BIO14* (Precipitation of Driest Month), the *human footprint index*, the *urban expansion*, the *mammal richness*, and the *vaccination coverage* (Table 1) were retained to explain YF occurrence. The responses of YF occurrence likelihood to *BIOCLIM* variables showed a rather narrow range of optimal conditions. The response to *HFP* and *mammal richness* showed a peak of more favourable conditions at intermediate values. The likelihood of YF occurrence decreased at the highest *pop density* and showed an increasing slope to moderate vaccination coverage, and then suddenly decrease (S1 Fig).

Relying on those relations between occurrence and explicative variables, spatial projections showed the geographic extent of more favourable areas of YF occurrence (Fig 3A) in Southeast Brazil and once extrapolated, that at-risk areas were surrounding the Amazon basin (Fig 3B).

Best explanatory variables to YF occurrence based on Monkey records, in 2017 (AUC = 0.95 +/- 0.014) were three climatic variables: (i) *BIO17* (Precipitation of Driest Quarter); (ii) *BIO15* (Precipitation Seasonality), and (iii) *BIO4* (Temperature Seasonality); two human-related variables: the Human Footprint Index (*HFP*) and the population density (*pop density*); and a variable related to ecological conditions: the *mammal richness* (Table 1). The responses of occurrence to the three *BIO* variables also showed a rather narrow range of optimal climatic conditions. The response to mammal richness showed a peak at a narrow range of values while the response to *HFP* showed a gradual increase of likelihood, followed by a stabilized plateau at the highest values. The response to mammal richness showed a peak at a narrow range of values (S2 Fig).

Interpolated spatial projections, based on monkey cases during epizootics in 2017, of more favourable conditions showed a slightly extended area in Southeast, but also part of Northeast of Brazil. Once extrapolated at the South American scale, more at-risk areas also surrounded the Amazon basin (Fig 4), similar to the prediction constructed with human records.

For 2018, *BIO4* (Temperature Seasonality), *BIO18* (Precipitation of Warmest Quarter), *HFP*, poverty, population density, mammal richness, and vaccination coverage were the best explanatory variables for YF occurrence in humans (AUC = 0.977 +/- 0.005) (Table 1). The responses of YF occurrence to *BIOCLIM* variables showed a rather narrow range of optimal climatic conditions. The responses to *HFP* and mammal richness also showed a peak of more favourable conditions at intermediate values. The likelihood of occurrence was high and stabilized from *poverty* and *pop density* and showed a sudden decrease in vaccination coverage (S3 Fig).

Spatial projections suggested that more favourable areas of YF occurrence (Fig 5) are more restricted in Southeast Brazil, but also areas surrounding the Amazon basin.

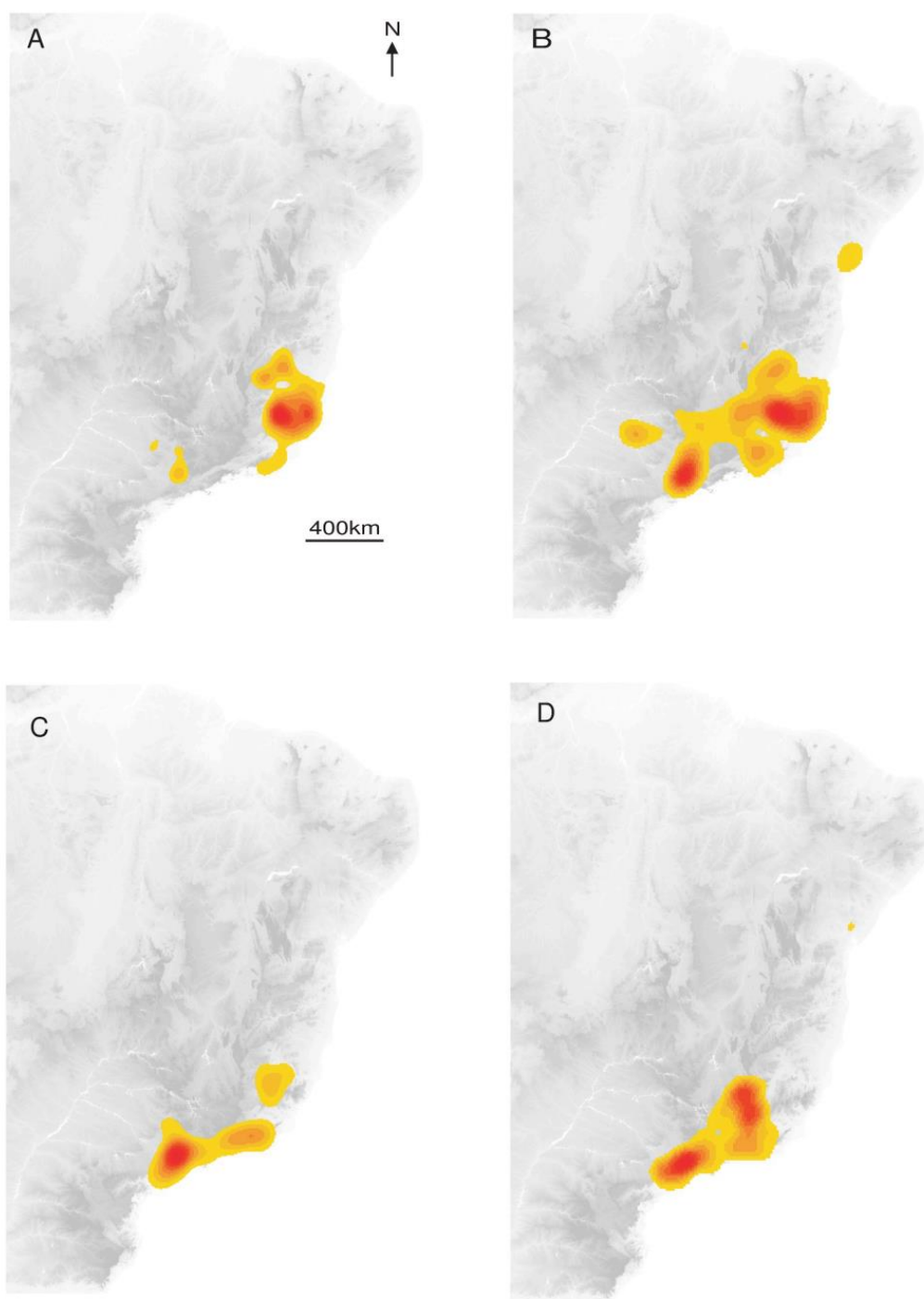


Fig 1. Interpolated Kernel density of occurrence records. (A) Humans 2017. (B) Monkeys 2017. (C) Humans 2018. (D) Monkeys 2018.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008691.g001>

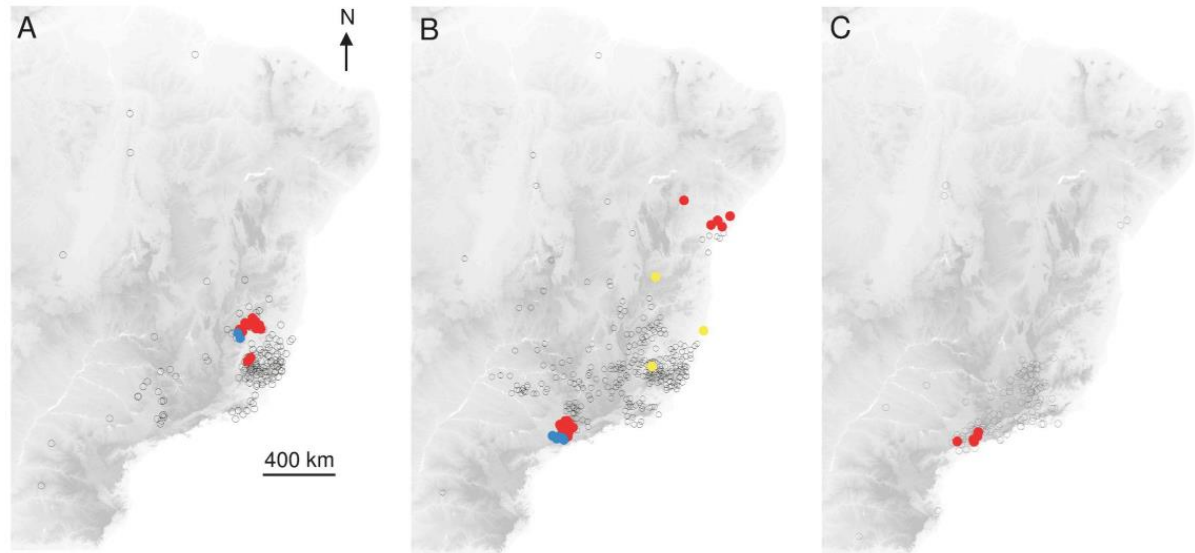


Fig 2. Spatial aggregation (significant Anselin Morans I test) of records. (A) Humans 2017, (B) Monkeys 2017, (C) Monkeys 2018. Empty circle: non-significant aggregation. Red: positive aggregation. Yellow: high aggregation in a region with low aggregation. Blue: low aggregation in a region with high aggregation.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008691.g002>

The best explanatory variables for YF occurrence in monkeys 2018 were *BIO9* (Mean Temperature of Driest Quarter), mammal richness, and four human-related variables: (i) human footprint index; (ii) population density; (iii) urban expansion; (iv) and poverty (AUC = 0.974

Table 1. Contribution of environmental variables to YF occurrence, based on human and monkey cases in 2017 and 2018, Brazil.

Variables	Humans 2017		Monkeys 2017		Humans 2018		Monkeys 2018		
	Percent contribution	Permutation importance	Percent contribution	Permutation importance	Percent contribution	Permutation importance	Percent contribution	Permutation importance	
Climatic variables	BIO4	18.3	8.9	31.8	43.5				
	BIO15	7.8	23.6	1.5	9.9				
	BIO17			0.7	10.7				
	BIO18	18	11			13.8	49.5		
	BIO14	2.4	13.4			6.2	2.9		
BIO9							17.4	34.6	
Ecological variables	Mammals	13.1	4.3	12.1	5.5	18	20.5	11.1	15.5
Human-related variables	HFP	5.9	5	11.1	14.6	5.3	4.0	4.8	28.6
	Popdensity	30.9	29.4	42.7	15.9	28.7	4.7	21.9	17.5
	Urban expansion							16.7	0.2
	Poverty					21.2	4	28.1	3.7
	Vaccine cover index	3.7	4.4			6.8	14.3		

HFP: Human Footprint index, BIO9: Mean Temperature of Driest Quarter, BIO17: Precipitation of Driest Quarter, BIO15: Precipitation Seasonality (coefficient of variation of the annual range), BIO4: Temperature Seasonality (coefficient of variation of the annual range); BIO18: Precipitation of Warmest Quarter, BIO14: Precipitation of Driest Month.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008691.t001>

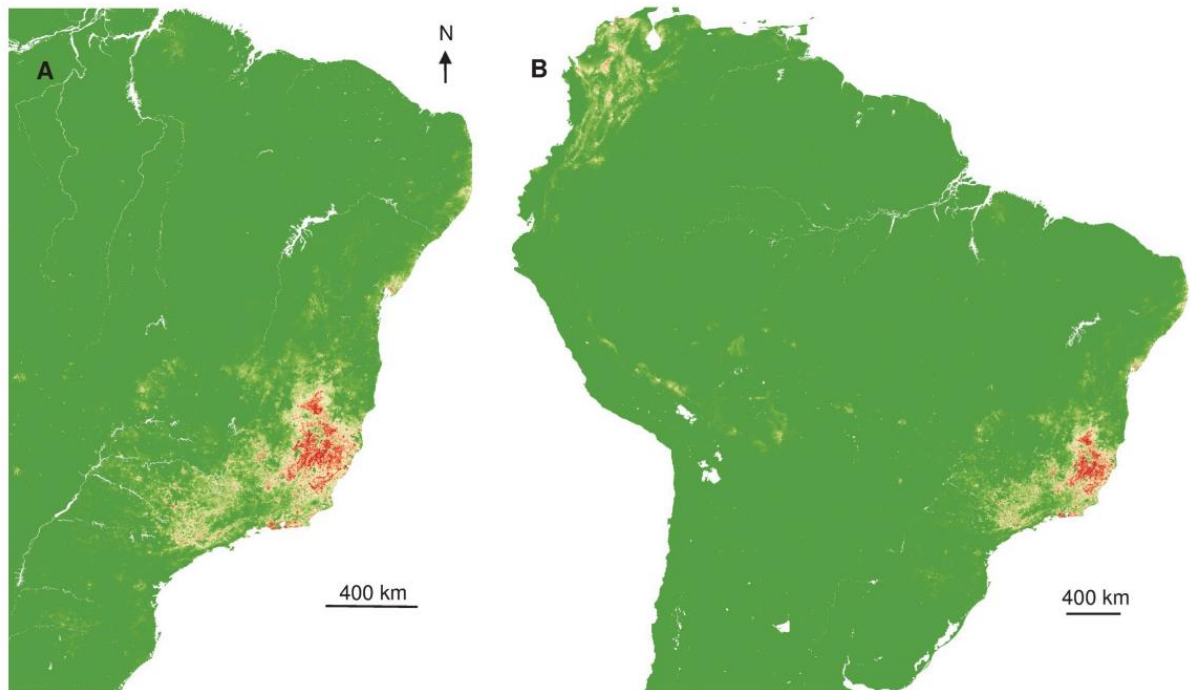


Fig 3. Interpolated and extrapolated geographic projections based on human records in 2017. Interpolated (A) and extrapolated (B) geographic projections of more suitable conditions for YF occurrence, based on 2017 human records.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008691.g003>

± 0.014) (Table 1), with profiles of replies similar to 2017. Poverty is one other explicative variable, with an expanding likelihood of occurrence when it increases (S4 Fig).

The spatial projection of the favourable conditions showed the split of the more likely area of circulation to more restricted and southern zones. Once extrapolated, the surroundings of the Amazon basin were predicted to be much more exposed than the centre (Fig 6), more at-risk areas were located on the North-West part of South America.

For both humans and monkeys, decile values (i.e., a sum of the favorability value of pixels at 10%, 20%, of the pixels) highlighted a decrease in the geographic extent of the at-risk areas from 2017 to 2018 (Fig 7A). However, the parallel decreasing favorability classes frequency (number of pixels at a given favorability value) means that the geometric distribution of the favorability values remained similar both for monkeys and humans and for both periods (Fig 7B). In sum, the epidemics in 2018 is less extended geographically, but where it occurred, the risk did not decrease. Last, we observed that 60% of records that occurred after June 2018 fell in the areas within a calculated at-risk value within the highest decile, and > 82% of cases occurred in areas within the three highest predicted deciles values, confirming the ability of the model to predict suitable conditions for YFV circulation.

Discussion

Brazil faced massive sylvatic YF outbreaks that took place in 2017 and 2018, mostly concentrated in the Southeast region, but cases have been recorded up to 2020 [57]. Over 2,250

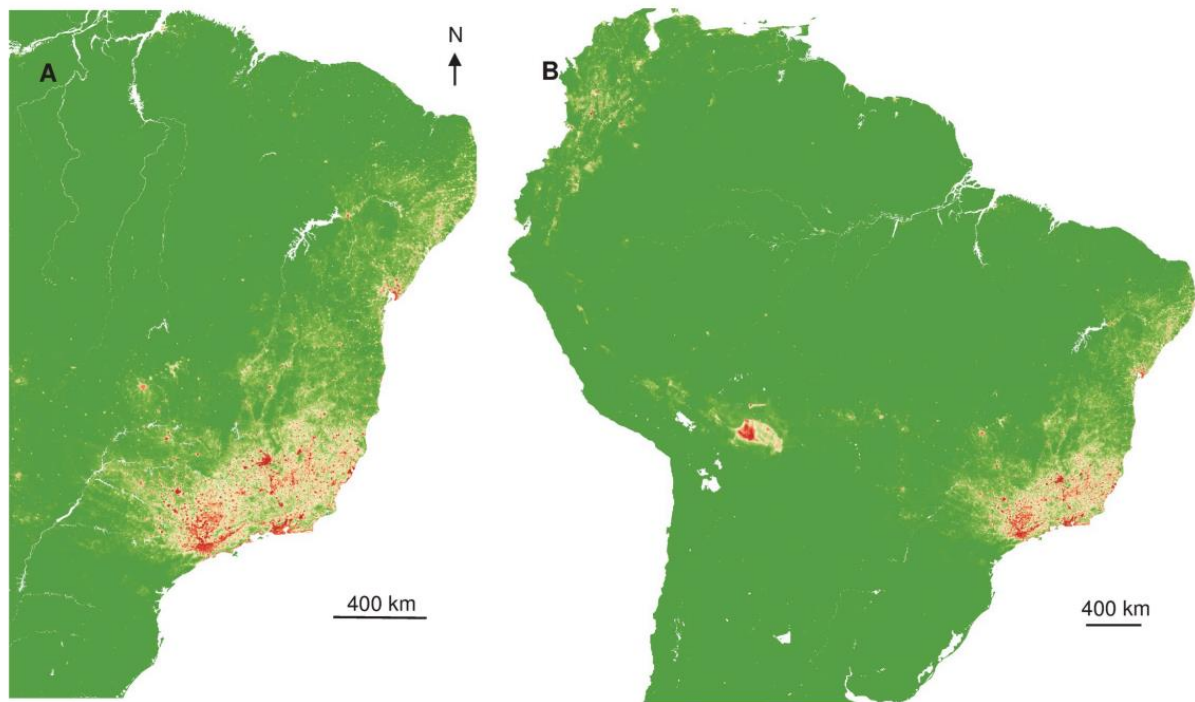


Fig 4. Interpolated and extrapolated geographic projections based on monkey records in 2017. Interpolated (A) and extrapolated (B) geographic projections of more suitable conditions for YF occurrence, based on 2017 monkey records.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008691.g004>

human cases and 2,500 YF epizootics were confirmed from July/2016 until March/2020, outside Brazilian Amazon basin [40,57]. Yellow fever virus circulated among NHP for several months before the first human cases were recorded [4], at the end of 2016/beginning of 2017. The same YFV lineage persisted from 2017 to 2018 [6] and shared the most common recent ancestor with YFV detected at the beginning of 2016 in São Paulo previously to the recent YF outbreak [6]. These findings altogether point out to a failure in YF surveillance based on sentinel NHP and consequently in the control measures such as vaccination of human populations living in areas of YF occurrence.

Mitigation measures, such as vector control, prioritisation of vaccination in more at-risk populations, require the identification of environmental drivers favouring or limiting the movements of the virus, and epidemics dispersal. For this purpose, predictive disease mapping could be a relevant and confident tool [58]. Focusing on YF systems and relying on human and NHP cases from the 2016–2018 epidemics, we explore the distribution, ecological opportunities, and spatial risks of the disease in South America.

To accurately identify the set of environmental conditions suitable for the disease maintenance and dispersal and to choose the most ecologically significant parameters for the model, the BAM ("Biotic", "Abiotic", "Movement") framework [31] was recently theoretically promoted for spatial disease transmission [32]. Biotic and abiotic variables are expected to shape the biogeographic constraints and opportunities of infectious agents distribution. Those variables are widely used in niche modelling of vectors [12,59,60], and anthropogenic variables are much less used [61]. Movement variables summarise the limitation and the accessibility,

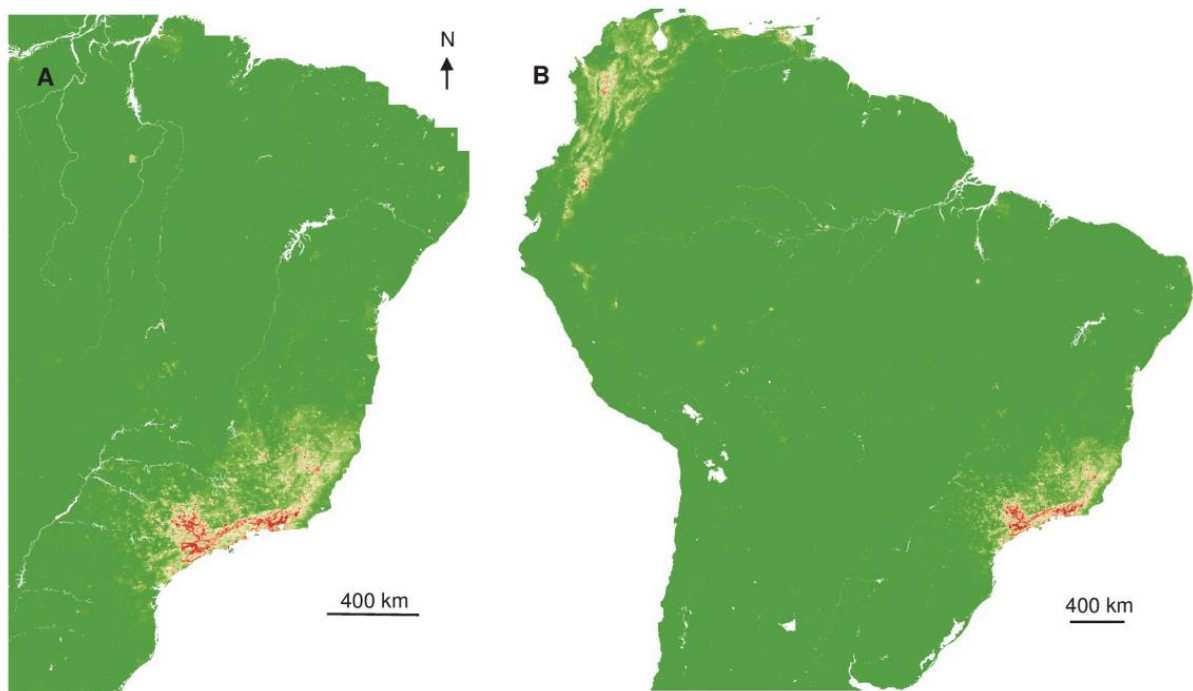


Fig 5. Interpolated and extrapolated geographic projections based on human records in 2018. Interpolated (A) and extrapolated (B) geographic projections of more suitable conditions for YF occurrence, based on 2018 human records.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008691.g005>

possible barriers, or spreading opportunities, but are far less considered in disease biogeography [32]. Considering the known ecology of Neotropical YF epidemiology, the random redistribution of cases in the most likely places of infection allows successfully integrating the movement [25]. Despite the criticism of "black box" for MaxEnt [62], relying on the BAM framework, and using a machine-learning model strongly related to ecological theory [33], algorithm sensitivity can be controlled as soon as some ecological knowledge of the system to explore are acquired.

The interpolated Kernel density of YF records indicated that cases were mostly concentrated in the Southeast of Brazil, with a contraction of spatial extent and a southward displacement, from 2017 to 2018. The overlapping of humans and NHP density records was expected given the sylvatic pattern of the YF outbreaks in 2017 and 2018 [4,18], since epizootics are usually observed before and concomitant to outbreaks affecting humans [63]. On the other hand, the interpolated distribution of NHP cases was more diffuse than for humans and geographically widespread at the beginning of the outbreak, with two main foci, in Minas Gerais and São Paulo states. These observations suggested either several foci of emergence or a rapid dispersal of the virus. Recent phylogeographic analysis showed that the YFV lineage, causing the recent outbreaks, was probably originated in Goiás state (Midwest region), and it was introduced into different areas of basins [5]. These regions of viral introduction coincide with the two primary foci detected here. In Minas Gerais, the focus included the area from the Northeast region of the state (the epicentre of the outbreak) to the Metropolitan region, where the capital of Minas Gerais state, Belo Horizonte, is located. However, given the reference laboratory of

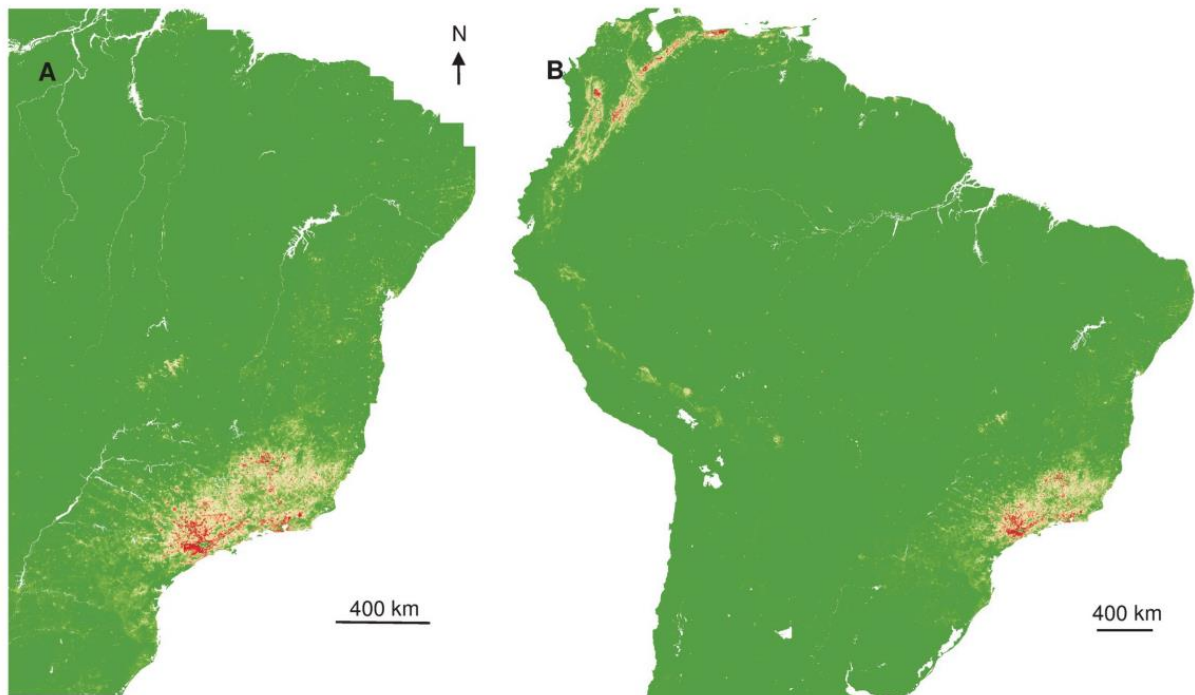


Fig 6. Interpolated and extrapolated geographic projections based on monkey records in 2018. Interpolated (A) and extrapolated (B) geographic projections of more suitable conditions for YF occurrence, based on monkey 2018 records.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008691.g006>

the state is located there, more NHP from Belo Horizonte and neighbour cities have probably been tested in better conditions. The other YF focus was located in São Paulo state. It was demonstrated a second introduction of YFV in the Southwestern region of Minas Gerais, in March 2016, followed by the dissemination towards the Metropolitan region of São Paulo state [5]. These findings are in agreement with the aggregation of monkeys in 2017 and 2018 in the coastal area of São Paulo that could result from the virus getting into an area with naïve populations that contributed to viral dissemination, and with suitable ecological condition leading to the aggregation.

The Kernel density and the location of statistical aggregation for humans 2017 coincide with the area where the outbreak started in the eastern part of Minas Gerais, by the end of 2016 [64]. In this region with low average vaccination coverage at the first stage of the outbreak [6], a high number of people were infected and may have contributed to viral dissemination throughout the Southeast region of Brazil. However, in 2018, most of the human cases were concentrated in a different region of Minas Gerais, following a southward movement reaching other parts of this state, and also Rio de Janeiro and São Paulo states [37,38,64]. On the other hand, the lack of aggregation to humans in 2018 could be related to vaccination that was strengthened in the Southeast region, and then the YF cases could reflect a more random fashion.

The evidenced changes of geographic extent and aggregative behaviour of the epidemics suggest different replies to environmental variables, during the first and second half of the outbreak. The inclusion of biotic factors definitively increase the relevance of the models [12] and

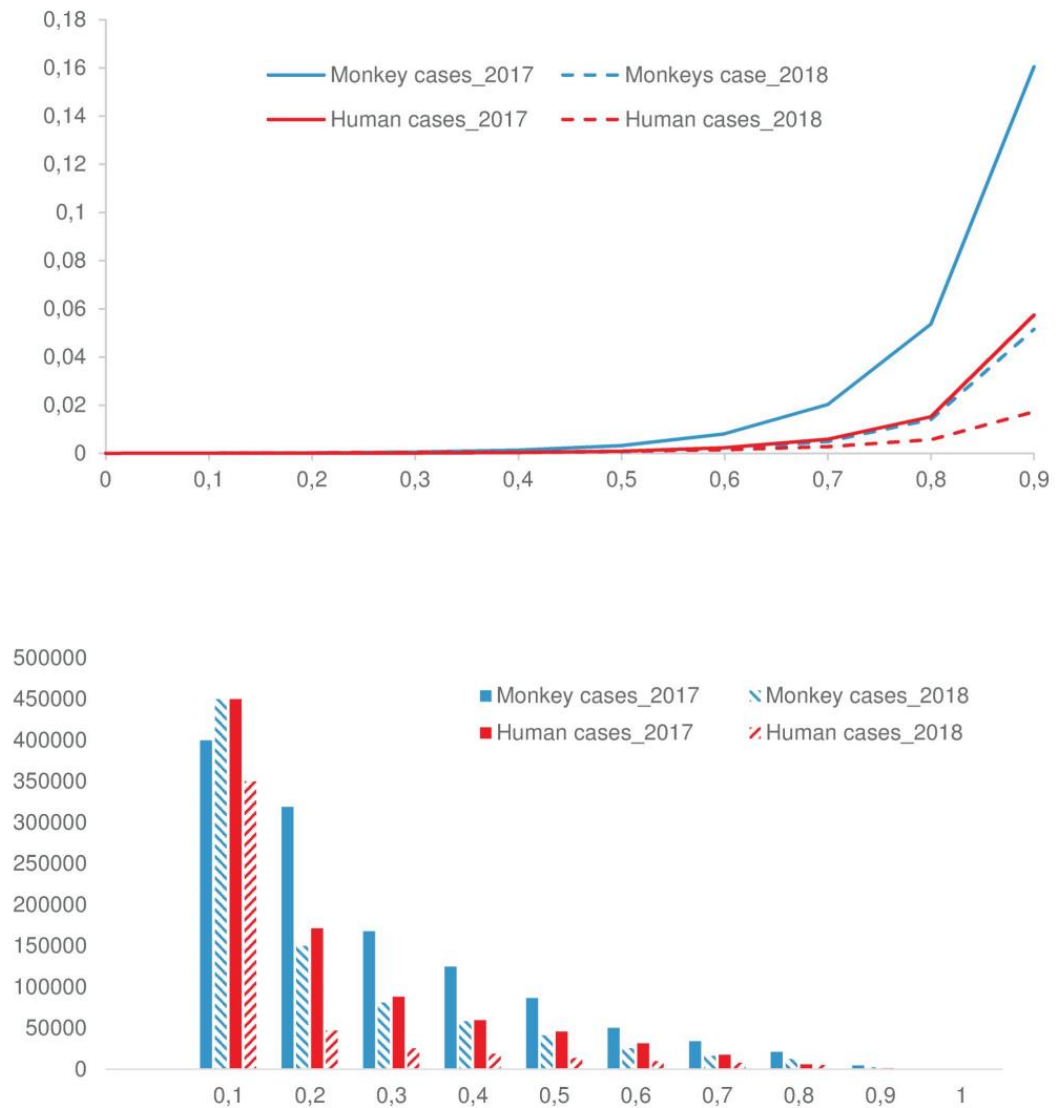


Fig 7. (A). At-risk index (favorability value) at deciles, for the 2017 and 2018 periods, humans and monkeys. (B). The number of geographic units (1 sq km) at different at-risk index, for the 2017 and 2018 periods, humans and monkeys.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008691.g007>

allows working at more local scales, both in time and space. Mammal richness was a variable influencing the likelihood of YF occurrence in humans and NHP, in both periods. The narrow range of values of mammal richness that could affect the occurrence of YF, suggests the importance of natural habitats for YF maintenance given the occurrence not only of the NHP hosts, evidenced by the richness of mammals but also competent vectors. Yellow fever virus cycle relies primarily on NHP as vertebrate hosts [65]. So far, no other mammal species was shown to act as reservoirs, despite serological evidence of infection [17] or theoretical assumptions

[66]. Reply of occurrence likelihood to mammal richness should instead be considered as a reply to a surrogate for overall biodiversity. The influence of richness on the occurrence of YF shows the importance of natural habitats for YFV maintenance.

Nevertheless, the predicted power of high but not highest richness areas as more favourable for YF risk suggests that the virus circulate primarily in forest habitats, but also highlights the importance of anthropogenic activities. Traditional agriculture, wood extraction, non-lignous products gathering and hunting that are first steps of biodiversity collapse [27,67] increase the risk, as they promote contact with vectors. Anthropogenic changes to landscapes, from the fragmentation of continuous habitats to isolated protected areas, both deplete populations in more disturbed areas and can concentrate animal populations at unnaturally high densities in some others. Environmental changes may alter the behaviour, social structure, and dynamics of all components of the pathogen transmission system [68,69]. Such changes can modify the relative importance of different host species for pathogens, elevating, or depressing levels of sensibility to infection [70,71]. Because host density is a crucial driver of transmission rates, these changes may create new foci of transmission, or new sources of zoonotic infections because reserves may also attract human visitors. Similarly, changes in food or other key resources, without changes to the habitat itself, can promote the clumping of hosts at YF-risk areas, as projected at Southeast Brazil, but also in areas surrounding the Amazon basin. On a more conceptual point of view, the pattern of reply of occurrence to a biodiversity surrogate can suggest a dilution effect [72,73], or, more trivially, this may indicate the lack of surveillance.

Here, we observed the influence of temperature and precipitation on the likelihood of YF occurrence in 2017 and 2018. The role of climatic variables is a well-known pattern in the shape of the distribution and density of mosquitoes. Higher average temperatures and precipitation rates are known to influence larval development and create more conditions for oviposition and larval habitats, leading to an increase in the density of different species, as *Haemagogus* and *Aedes* [74]. Temperature explains *Aedes* occurrence [75], influencing the survival of the adults and the gonotrophic cycle [76]. At more local scales, stable air humidity, rainfall, and temperature explained most of the variation of *Haemagogus* distribution [12]. Climate changes, possibly leading to higher temperatures and precipitation rates may have, hypothetically, favoured an increase in mosquito population density in Brazil, and this could also support YFV transmission by the vectors [74]. The epidemic period of arbovirus transmission in Southeast Brazil coincides with the rainy and hot season, usually from December to May [63], that was coincident to the periods where outbreaks emerged.

Besides, climatic factors, environmental and ecological conditions may influence the dispersal of *Haemagogus* female mosquitoes, as the search for oviposition sites and blood-feeding sources [74]. Infected mosquitos and humans can disperse YFV over great distances [65,77], and on the other hand NHP may not be responsible for the rapid spread of the virus [65,74,77]. In that way, any factor influencing mosquito density and dispersal would increase the transmission to different hosts and the spread of YFV through vast distances. Interestingly, climatic variables contributed more to YF occurrence in 2017 than human variables, and the opposite was observed for 2018, with a predominance of human variables influencing the likelihood of YF occurrence. The detection of the first human cases (end of 2016) was concurrent with a spatial expansion and with an increase in the numbers of YFV transmission to humans. These observations were probably a reflection of an increase in the abundance of sylvatic vectors [4], during the epidemic period. Therefore these findings reinforce the role of climatic factors in the likelihood of YF in the first period, 2017.

Once YFV was disseminated through great distances, including regions with naïve population and causing infection in a vast number of people, the role of human variables could have a

more significant impact on YF occurrence, as observed during the second period, and previously described [65,74]. Some of the human variables influencing the occurrence of YF were related to social-economic conditions, such as population density and poverty. The urban expansion added to higher population densities would increase the chances of viral exposure and infection. Poverty might be associated with less educational status and with more chances of YFV exposure due to the involvement of people in rural livelihood activities. Besides, the less the educational status, the less the population will adhere to vaccination programs, especially the YF one, given that refusal to be vaccinated may be associated with the potential adverse effects rather than the benefits. The different reply of occurrence to HFP (peak at medium-high values in 2017, and average values only in 2018) suggested that vaccination on the second half of the outbreak, that occurred primarily on more urbanised and developed areas, may have restricted the circulation of the virus in areas with highest HFP.

The lower risk in the Amazon basin is likely explained by a smaller extent of anthropogenic drivers and high vaccination coverage since this is a region where yellow fever vaccination is mandatory [63]. Although a decrease of the geographic extent of the YF at-risk area was observed from 2017 to 2018, the distribution of the favorability values remains similar both in monkeys and humans and for both periods, showing that there are still areas with high risk for YF occurrence.

As study limitations, the modelling process relies on successive steps, the limits of which and the ways expected to control the induced biases must be emphasized. First, heterogeneity of diagnostic methods to consider occurrence data may increase the models' omission rate, although we were restricted to data retrieved directly from the public health databases. Second, the redistribution of cases limited the over-representation of certain environmental conditions and allowed focusing on the more favourable zones of infection, a key issue when dealing with georeferenced data extracted from official reports [45]. However, the methodology for defining more likely areas of contamination, and excluding more unlikely, is based on satellite imagery and remains a visual assessment. It also excludes anthropised and highly disturbed habitats, since to date no case was linked to a YF urban transmission cycle [78]. Vectors and potential reservoirs may, nevertheless, occur in urban areas, making imminent a risk of urbanisation of the cycle. Modelling procedures may also have their intrinsic limits. Together with the great performances of Maximal Entropy among SDM [34], this algorithm may suffer for overfitting, resulting in more spatially restricted extrapolated favourable areas. Consequently, those favourable areas have to be seen as more at-risk and considered as prioritized zones: however, the risk may also occur in less favourable areas. One other key point is that, although most recent available environmental variables were used, some are not updated over the period when the cases occurred, so some data (e.g., human footprint, canopy height, above-ground biomass) are not necessarily concomitant with the case occurrence period, and may bias the prediction. Last, extrapolation of the predicted conditions outside the environmental domain, as did with the projection to the entire Amazon biome may fail [79–81], and model performance and addition of algorithmic complexity, moving away from ecological theory and justification, may bias the understanding of ecological responses and predictions. One fundamental prerequisite for extrapolation is that environmental ranges of explicative variables in the training area (here, Southeast-Brazil) and the extrapolated area (here, Amazonia) are within the same ranges [82]. As a good overlap is observed (S5 Fig), extrapolation may be possible [82], although it still needs to be interpreted cautiously.

Ecological Niche Modelling is, decidedly, of significant interest in modelling the geography of diseases [32]. Infectious disease distribution is, at a coarse scale, mainly explained by climatic drivers [83], biotic variables, and interactions affecting occurrence at a much lower extent ("Eltonian noise hypothesis") [84]. Such models have been recently widely used to

explore how climatic determinants and global changes may predict diseases expansion [85–89]. Although they have not to be understood as risk maps, instead, they evidenced the potential for niche expansion of diseases and consequently the exposure (i.e., the "epidemiological hazard") for populations. However, biotic determinants may be significant drivers of abundance at smaller spatial resolutions and may allow highlighting local interactions, strongly influencing the cycle and consequently, the epidemiological risk. With the advent of real-time acquired and more highly resolute environmental data (e.g., Earth Observing System Data and Information System, Earth Data), the dilemma is likely not more "coarse-scale / low-resolution information" or "local-scale / high-resolution information", but slightly better adequacy of explanatory variables to the hypothesis to test. For this purpose, the BAM (Biotic, Abiotic, Movement/Migration) framework may be helpful to guide the choice of candidates [32]. We also highlight, as for Cutaneous Leishmaniasis [25], the importance of anthropogenic variables to assess and locate the risk, but keep in mind that the models are highly dependent on the spatial scaling: risk maps are first context- and space-dependent. Anthropogenic variables may interact with all the three components of BAM. Those variables do not include only human-induced disturbance of ecosystems, whatever their extent, but also social, economic, behavioural descriptors, that may influence at outstanding temporal and geographic scale the vulnerability and resilience of populations.

Despite the existence of a vaccine, YF is still a public health issue, as demonstrated by the recent outbreaks in Brazil. Regardless of the impact on the human population, YF has also a high impact on NHP population, especially in areas with endangered and/or endemic species. Surveillance and human vaccination are not only essential to avoid dissemination of YFV among humans but also NHP since human beings are responsible for viral dissemination. The surveillance should be reinforced as well as the vaccination of target populations preventing future outbreaks.

Conclusions

A global health strategy requires understanding factors that favour pathogens' circulation, and it expects to map and predict at-risk areas. During the 2017 and 2018 Yellow Fever outbreaks in Brazil, distribution of cases largely overlapped for humans and monkeys, and a progressive contraction of the spatial extent and a southward displacement was observed. Relying on Ecological Niche Modelling approach with a Maximal Entropy algorithm, we showed that the most significant variables explaining the spatiotemporal heterogeneity of YF cases were related to biotic factors, abiotic factors that drive vector population size, and some human-related variables. As a test of the relevance of the spatial extrapolation model, we showed that the YF cases that occurred after mid-2018, not included in the analysis, were distributed in areas with the predicted more suitable conditions for the circulation of the virus. With the methodological framework used, we suggest that the spatial predictions of the likelihood of occurrence of cases can be interpreted, although cautiously, as future at-risk areas for YF. This ability of the model to identify the role of environmental variables to the occurrence of cases, and to spatially predict the risk, may help to support more effective YF surveillance and control measures.

Supporting information

S1 Fig. Analyses of environmental variables contributing to the likelihood of YF occurrence in humans, 2017.

(TIF)

S2 Fig. Analyses of environmental variables contributing to the likelihood of YF occurrence in monkeys, 2017.

(TIF)

S3 Fig. Analyses of environmental variables contributing to the likelihood of YF occurrence in humans, 2018.

(TIF)

S4 Fig. Analyses of environmental variables contributing to the likelihood of YF occurrence in monkeys, 2018.

(TIF)

S5 Fig. Overlaps between the ranges of environmental variables in the environmental domain (blue line) and extrapolated region (orange line).

(TIF)

Acknowledgments

We thank the colleagues from Laboratório de Vírus/Universidade Federal de Minas Gerais and collaborators from Laboratório de Zoonoses/Prefeitura de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

Author Contributions

Conceptualization: Benoit de Thoisy, Betânia Paiva Drumond.

Data curation: Natalia Ingrid Oliveira Silva, Giliane de Souza Trindade.

Formal analysis: Benoit de Thoisy.

Funding acquisition: Benoit de Thoisy, Giliane de Souza Trindade, Betânia Paiva Drumond.

Investigation: Benoit de Thoisy, Natalia Ingrid Oliveira Silva, Lívia Sacchetto, Giliane de Souza Trindade, Betânia Paiva Drumond.

Methodology: Benoit de Thoisy.

Project administration: Benoit de Thoisy, Betânia Paiva Drumond.

Resources: Benoit de Thoisy, Natalia Ingrid Oliveira Silva, Lívia Sacchetto, Betânia Paiva Drumond.

Supervision: Benoit de Thoisy, Betânia Paiva Drumond.

Validation: Benoit de Thoisy.

Visualization: Benoit de Thoisy.

Writing – original draft: Benoit de Thoisy, Betânia Paiva Drumond.

Writing – review & editing: Natalia Ingrid Oliveira Silva, Lívia Sacchetto, Giliane de Souza Trindade.

References

1. Jentes ES, Pomeroy G, Gershman MD, Hill DR, Lemarchand J, Lewis RF, et al. The revised global yellow fever risk map and recommendations for vaccination, 2010: consensus of the Informal WHO Working Group on Geographic Risk for Yellow Fever. *Lancet Infect Dis.* 2011; 11:622–32. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(11\)70147-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(11)70147-5) PMID: 21798462

2. Bryant JE, Holmes EC, Barrett ADT. Out of Africa: A Molecular Perspective on the Introduction of Yellow Fever Virus into the Americas. *PLoS Pathog.* 2007; 3:e75. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030075> PMID: 17511518
3. Vasconcelos PF da C. Febre amarela (Yellow Fever). *Rev Soc Bras Med Trop.* 2003; 36:275–93. <https://doi.org/10.1590/s0037-86822003000200012> PMID: 12806465
4. Faria NR, Kraemer MUG, Hill SC, De Jesus JG, Aguiar RS, Iani FCM, et al. Genomic and epidemiological monitoring of yellow fever virus transmission potential. *Science (80-)*. 2018; 361:894–99. <https://doi.org/10.1126/science.aat7115> PMID: 30139911
5. Delatorre E, Santos De Abreu FV, Ribeiro IP, Gómez MM, Cunha Dos Santos AA, Ferreira-De-Brito A, et al. Distinct YFV Lineages Co-circulated in the Central-Western and Southeastern Brazilian Regions from 2015 to 2018. *Front Microbiol.* 2019;10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00010> PMID: 30728810
6. de Rezende IM, Sacchetto L, Munhoz de Mello É, Alves PA, Iani FC de M, Adelino TÉR, et al. Persistence of Yellow fever virus outside the Amazon Basin, causing epidemics in Southeast Brazil, from 2016 to 2018. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018; 12:e0006538. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006538> PMID: 29864115
7. SES-SC. Boletim Epidemiológico da Febre Amarela n° 05/2019–28 de março 2019 Período de monitoramento (julho/2018 a junho/2019). In: Secretaria de Estado da Saúde de Santa Catarina [Internet]. 2019 [cited 11 Jul 2019]. Available: <http://www.dive.sc.gov.br/conteudos/boletim2019/boletimFa5D2019/Boletim05FebreAmarela.pdf>
8. COES-PR. Boletim Epidemiológico No 016–13/06/2019. In: CENTRO DE OPERAÇÕES DE EMERGÊNCIAS EM SAÚDE PÚBLICA—Secretaria da Saúde Governo do Paraná [Internet]. 2019 [cited 13 Jun 2019]. Available: http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/BoletimEpidemiologico_16FA.pdf
9. Estrada-Peña A, Ostfeld RS, Peterson AT, Poulin R, de la Fuente J. Effects of environmental change on zoonotic disease risk: an ecological primer. *Trends Parasitol.* 2014; 30:205–14. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2014.02.003> PMID: 24636356
10. Carvalho BM, Rangel EF, Ready PD, Vale MM. Ecological niche modelling predicts southward expansion of *Lutzomyia (Nyssomyia) flaviscutellata* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), vector of Leishmania (*Leishmania*) amazonensis in South America, under climate change. *PLoS One.* 2015; 10:e0143282. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143282> PMID: 26619186
11. De Thoisy B, Matheus S, Catzeffis F, Clément L, Barrioz S, Guidez A, et al. Maripa hantavirus in French Guiana: phylogenetic position and predicted spatial distribution of rodent hosts. *Am J Trop Med Hyg.* 2014; 90:988–92. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.13-0257> PMID: 24752689
12. de Almeida MAB, dos Santos E, Cardoso J da C, da Silva LG, Rabelo RM, Bicca-Marques JC. Predicting Yellow Fever Through Species Distribution Modeling of Virus, Vector, and Monkeys. *Ecohealth.* 2019; 16:95–108. <https://doi.org/10.1007/s10393-018-1388-4>
13. Bermúdez SE, Gottdenker N, Krishnavajhala A, Fox A, Wilder HK, González K, et al. Synanthropic Mammals as Potential Hosts of Tick-Borne Pathogens in Panama. *PLoS One.* 2017; 12:e0169047. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169047> PMID: 28060928
14. Davis NC. Susceptibility of capuchin (*Cebus*) monkeys to yellow fever virus. *Am J Epidemiol.* 1930; 11:321–34. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a113835>
15. Galindo P. Monkeys and Yellow Fever. In: Bourne GJ, editor. *Nonhuman Primates and Medical Research*. New York: Academic Press; 1973. pp. 1–15. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-119150-4.50006-4>
16. Monath TP, Vasconcelos PFC. Yellow fever. *J Clin Virol. Elsevier B.V.*; 2015; 64:160–173. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2014.08.030> PMID: 25453327
17. De Thoisy B, Dussart P, Kazanji M. Wild terrestrial rainforest mammals as potential reservoirs for flaviviruses (yellow fever, dengue 2 and St Louis encephalitis viruses) in French Guiana. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2004; 98:409–12. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2003.12.003> PMID: 15138077
18. de Abreu FVS, Ribeiro IP, Ferreira-de-Brito A, dos Santos AAC, de Miranda RM, Bonelly I de S, et al. *Haemagogus leucocelaenus* and *Haemagogus janthinomys* are the primary vectors in the major yellow fever outbreak in Brazil, 2016–2018. *Emerg Microbes Infect.* 2019; 8:218–31. <https://doi.org/10.1080/22221751.2019.1568180> PMID: 30866775
19. Hanley KA, Monath TP, Weaver SC, Rossi SL, Richman RL, Vasilakis N. Fever versus fever: The role of host and vector susceptibility and interspecific competition in shaping the current and future distributions of the sylvatic cycles of dengue virus and yellow fever virus. *Infect Genet Evol.* 2013; 19:292–311. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.03.008> PMID: 23523817
20. Medone P, Ceccarelli S, Parham PE, Figuera A, Rabinovich JE. The impact of climate change on the geographical distribution of two vectors of chagas disease: Implications for the force of infection. *Philos Trans R Soc B Biol Sci.* 2015; 370:20130560. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0560> PMID: 25688019

21. Gutiérrez EE. Ecological niche modelling requires real presence data and appropriate study regions: a comment on Medone et al. (2015). *Philos Trans R Soc B Biol Sci.* 2016; 371:20160027. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0027> PMID: 27325839
22. Rabinovich J. Ecological niche modelling in triatomines—abusus non tollit usum: a reply to Gutiérrez (2016). *Philos Trans R Soc B Biol Sci.* 2016; 371:20160188. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0188> PMID: 27325841
23. Pavlovsky E. Natural nidity of transmissible diseases in relation to landscape. *Epidemiology of zoono-throponoses. The Challenge of Epidemiology: Issues and Selected Readings.* Urbana: University of Illi-nois Press; 1965.
24. Peterson AT. Ecological niche modelling and understanding the geography of disease transmission. *Vet Ital.* 2007; 43:393–400. PMID: 20422515
25. Chavy A, Nava AFD, Luz SLB, Ramírez JD, Herrera G, Dos Santos TV, et al. Ecological niche model-ling for predicting the risk of cutaneous leishmaniasis in the Neotropical moist forest biome. *PLoS Negl Trop Dis.* 2019; 13:e0007629. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007629> PMID: 31412022
26. Murray KA, Olivero J, Roche B, Tiedt S, Guégan JF. Pathogeography: leveraging the biogeography of human infectious diseases for global health management. *Ecography (Cop).* 2018; 41:1411–27. <https://doi.org/10.1111/ecog.03625> PMID: 32313369
27. Guégan J-F, De Thoisy B, Ayoub A, Cappelle J. Forêts tropicales, changements d'usage des sols et risques infectieux émergents. *Rev For Française.* 2019; <https://doi.org/10.4267/2042/69998>
28. Olivero J, Fa JE, Real R, Márquez AL, Farfán MA, Vargas JM, et al. Recent loss of closed forests is associated with Ebola virus disease outbreaks. *Sci Rep.* 2017;7. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00035-9> PMID: 28127057
29. Leach M, Bett B, Said M, Bukachi S, Sang R, Anderson N, et al. Local disease–ecosystem–livelihood dynamics: Reflections from comparative case studies in Africa. *Philos Trans R Soc B Biol Sci.* 2017; <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0163> PMID: 28584171
30. Kilpatrick AM, Salkeld DJ, Titcomb G, Hahn MB. Conservation of biodiversity as a strategy for improving human health and well-being. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences.* 2017. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0473> PMID: 27994116
31. Soberon J, Peterson AT. Interpretation of Models of Fundamental Ecological Niches and Species' Distributional Areas. *Biodivers Informatics.* 2005; <https://doi.org/10.17161/bi.v2i0.4>
32. Johnson EE, Escobar LE, Zambrana-Torrel C. An Ecological Framework for Modeling the Geography of Disease Transmission. *Trends in Ecology and Evolution.* 2019. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2019.03.004> PMID: 31078330
33. Low-Choy S, Huijbers C. Experimenting with modelling via a virtual laboratory: Evaluating pseudo-absence strategies to refine a species distribution model. *Proceedings - 22nd International Congress on Modelling and Simulation, MODSIM 2017.* 2017. <https://doi.org/10.36334/modsim.2017.g8.lowchoy>
34. Elith J, H. Graham C, P. Anderson R, Dudík M, Ferrier S, Guisan A, et al. Novel methods improve prediction of species' distributions from occurrence data. *Ecography (Cop).* 2006; <https://doi.org/10.1111/j.2006.0906-7590.04596.x>
35. SES-MG. Boletim epidemiológico–06/02/2018 Febre Amarela Silvestre em Minas Gerais. In: Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais [Internet]. 2018 [cited 2 Jun 2019]. Available: [http://www.saude.mg.gov.br/images/documentos/Boletim-FebreAmarela06defevreirede2018final\(1\)\(2\).pdf](http://www.saude.mg.gov.br/images/documentos/Boletim-FebreAmarela06defevreirede2018final(1)(2).pdf)
36. SES-MG. Boletim epidemiológico–20/06/2018 Febre Amarela Silvestre em Minas Gerais. In: Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais [Internet]. 2018 [cited 2 Jun 2019]. Available: http://www.saude.mg.gov.br/images/documentos/Boletim_Febre_Amarela_21.06.2018_atualizada.pdf
37. SES-SP. BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO FEBRE AMARELA. In: Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo [Internet]. 2018 [cited 8 Jul 2019]. Available: http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/doc/famarela/fa18_boletim_epid_1707.pdf
38. SES-RJ. MONITORAMENTO DA FEBRE AMARELA SILVESTRE NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO. In: SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE DO RIO DE JANEIRO [Internet]. 2018 [cited 11 Jul 2019]. Available: <http://www.riocomsaude.rj.gov.br/Publico/MostrarArquivo.aspx?=%2Bp77vqe5mOs%3DC>
39. SES-BA. BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO DA FEBRE AMARELA. In: Secretaria da Saúde do Estado da Bahia [Internet]. 2017 [cited 2 Jul 2019]. Available: <http://www.saude.ba.gov.br/wp-content/uploads/2017/11/2017-Boletim-epidemiologico-da-Febre-Amarela-n.-03.pdf>
40. MS-BR. Febre amarela: Ministério da Saúde atualiza casos no país. In: Ministério da Saúde do Brasil [Internet]. 2018 [cited 13 Jun 2019]. Available: <http://www.saude.gov.br/noticias/agencia-saude/43042-febre-amarela-ministerio-da-saude-atualiza-casos-no-pais-7>

41. SES-MS. Emergência epidemiológica de febre amarela no Brasil, no período de dezembro de 2016 a julho de 2017 (vol 48, nº 28). In: Boletim Epidemiológico [Internet]. 2017 pp. 1–22. Available: https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/setembro/06/2017_027.pdf
42. MS-BR. Guia de Vigilância em Saúde [Internet]. 2016 [cited 18 Feb 2020] pp. 7–775. Available: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/agosto/25/GVS-online.pdf>
43. MS-BR. Guia de vigilância de epizootias em primatas não humanos e entomologia aplicada à vigilância da febre amarela [Internet]. 2014 [cited 18 Feb 2020] pp. 1–102. Available: http://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_epizootias_primatas_entomologia.pdf
44. SES-MS. Monitoramento dos casos e óbitos de febre amarela no Brasil. In: Informe Especial Febre Amarela no Brasil Nº 01/2017 [Internet]. 2017 [cited 18 Feb 2020] pp. 1–24. Available: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/marco/18/Informe-especial-COES-FA.pdf>
45. Auchincloss AH, Gebreab SY, Mair C, Diez Roux A V. A Review of Spatial Methods in Epidemiology, 2000–2010. SSRN. 2012. <https://doi.org/10.1146/annurev-publhealth-031811-124655> PMID: 22429160
46. Venter O, Sanderson EW, Magrath A, Allan JR, Behr J, Jones KR, et al. Global terrestrial Human Footprint maps for 1993 and 2009. *Sci Data*. 2016; <https://doi.org/10.1038/sdata.2016.67> PMID: 27552448
47. Venter O, Sanderson EW, Magrath A, Allan JR, Behr J, Jones KR, et al. Last of the Wild Project, Version 3 (LWP-3): 2009 Human Footprint, 2018 Release. Palisades, NY: NASA Socioeconomic Data and Applications Center (SEDAC); 2018.
48. ESRI. An introduction to sampling/monitoring networks—Help | ArcGIS Desktop. In: ArcMap 10.6. 2019.
49. Hijmans RJ, Cameron SE, Parra JL, Jones PG, Jarvis A. WorldClim. In: *International Journal of Climatology*. 2005.
50. USGS. EarthExplorer | USGS. In: United States Geological Survey. 2017.
51. Avitabile V, Herold M, Heuvelink GBM, Lewis SL, Phillips OL, Asner GP, et al. An integrated pan-tropical biomass map using multiple reference datasets. *Glob Chang Biol*. 2016; <https://doi.org/10.1111/gcb.13139> PMID: 26499288
52. Simard M, Pinto N, Fisher JB, Baccini A. Mapping forest canopy height globally with spaceborne lidar. *J Geophys Res Biogeosciences*. 2011; <https://doi.org/10.1029/2011JG001708>
53. Shearer FM, Longbottom J, Browne AJ, Pigott DM, Brady OJ, Kraemer MUG, et al. Existing and potential infection risk zones of yellow fever worldwide: a modelling analysis. *Lancet Glob Heal*. 2018; 270–278. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(18\)30024-X](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(18)30024-X) PMID: 29398634
54. Hallgren W, Beaumont L, Bowness A, Chambers L, Graham E, Holewa H, et al. The Biodiversity and Climate Change Virtual Laboratory: Where ecology meets big data. *Environ Model Softw*. 2016; 76:182–86. <https://doi.org/10.1016/j.envsoft.2015.10.025>
55. Phillips SJ, Anderson RP, Schapire RE. Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecol Modell*. 2006; <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2005.07.011> PMID: 16501661
56. De Marco P, Nóbrega CC. Evaluating collinearity effects on species distribution models: An approach based on virtual species simulation. *PLoS One*. 2018; 13:e0202403. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202403> PMID: 30204749
57. SVS-MS. Vigilância epidemiológica do sarampo no Brasil 2020: Semana Epidemiológica 01 (29/12/2019) a 06 (08/02/2020). In: Boletim Epidemiológico [Internet]. 2020 [cited 6 Mar 2020] pp. 1–41. Available: <https://www.saude.gov.br/images/pdf/2020/marco/05/Boletim-epidemiologico-SVS-09---.pdf>
58. Escobar LE, Craft ME. Advances and limitations of disease biogeography using ecological niche modeling. *Frontiers in Microbiology*. 2016. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01174> PMID: 27547199
59. Escobar LE, Romero-Alvarez D, Leon R, Lepe-Lopez MA, Craft ME, Borbor-Cordova MJ, et al. Declining Prevalence of Disease Vectors Under Climate Change. *Sci Rep*. 2016; <https://doi.org/10.1038/srep39150> PMID: 27982119
60. Baak-Baak CM, Moo-Llanes DA, Cigarroa-Toledo N, Puerto FI, Machain-Williams C, Reyes-Solis G, et al. Ecological niche model for predicting distribution of disease-vector mosquitoes in Yucatán State, México. *J Med Entomol*. 2017; <https://doi.org/10.1093/jme/tjw243> PMID: 28399263
61. Obenauer JF, Andrew Joyner T, Harris JB. The importance of human population characteristics in modeling *Aedes aegypti* distributions and assessing risk of mosquito-borne infectious diseases. *Trop Med Health*. 2017; <https://doi.org/10.1186/s41182-017-0078-1> PMID: 29167627
62. Phillips SJ, Anderson RP, Dudík M, Schapire RE, Blair ME. Opening the black box: an open-source release of Maxent. *Ecography (Cop)*. 2017; 40:887–93. <https://doi.org/10.1111/ecog.03049>

63. MS-BR. Febre Amarela—Guia para Profissionais de Saúde. In: Ministério da Saúde de Brasil [Internet]. 2017 [cited 13 Jun 2019]. Available: http://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/febre_amarela_guia_profissionais_saude.pdf
64. SES-MG. Boletim Epidemiológico—06/12/2018 Febre Amarela Silvestre em Minas Gerais. In: Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais [Internet]. 2018 [cited 2 Jun 2019]. Available: http://www.sau.gov.br/images/noticias_e_eventos/000_2018/BoletinsEpidemiologicos/Boletim_-_Febre_Amarela_06_12_Finalizado.pdf
65. Vasconcelos PF da C. Yellow fever in Brazil: thoughts and hypotheses on the emergence in previously free areas. *Rev Saude Publica*. 2010; 44:1144–9. <https://doi.org/10.1590/s0034-89102010005000046> PMID: [21109907](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21109907/)
66. Reluga T, Meza R, Walton DB, Galvani AP. Reservoir interactions and disease emergence. *Theor Popul Biol*. 2007; <https://doi.org/10.1016/j.tpb.2007.07.001> PMID: [17719617](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17719617/)
67. Lewis SL, Edwards DP, Galbraith D. Increasing human dominance of tropical forests. *Science*. 2015. <https://doi.org/10.1126/science.aaa9932> PMID: [26293955](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26293955/)
68. Ostfeld R, Keesing F. The function of biodiversity in the ecology of vector-borne zoonotic diseases. *Can J Zool*. 2000;
69. Huang ZYX, de Boer WF, van Langevelde F, Olson V, Blackburn TM, Prins HHT. Species' Life-History Traits Explain Interspecific Variation in Reservoir Competence: A Possible Mechanism Underlying the Dilution Effect. *PLoS One*. 2013; <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054341> PMID: [23365661](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23365661/)
70. Hussain S, Ram MS, Kumar A, Shivaji S, Umapathy G. Human Presence Increases Parasitic Load in Endangered Lion-Tailed Macaques (*Macaca silenus*) in Its Fragmented Rainforest Habitats in Southern India. *PLoS One*. 2013; <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063685> PMID: [23717465](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23717465/)
71. Hanya G, Chapman CA. Linking feeding ecology and population abundance: A review of food resource limitation on primates. *Ecol Res*. 2013; <https://doi.org/10.1007/s11284-012-1012-y>
72. Keesing F, Belden LK, Daszak P, Dobson A, Harvell CD, Holt RD, et al. Impacts of biodiversity on the emergence and transmission of infectious diseases. *Nature*. 2010. <https://doi.org/10.1038/nature09575> PMID: [21124449](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21124449/)
73. Civitello DJ, Cohen J, Fatima H, Halstead NT, Liriano J, McMahon TA, et al. Biodiversity inhibits parasites: Broad evidence for the dilution effect. *Proc Natl Acad Sci*. 2015; <https://doi.org/10.1073/pnas.1506279112> PMID: [26069208](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26069208/)
74. Possas C, Lourenço-de-Oliveira R, Tauil PL, Pinheiro F de P, Pissinatti A, da Cunha RV, et al. Yellow fever outbreak in Brazil: the puzzle of rapid viral spread and challenges for immunisation. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2018; 113:e180278. <https://doi.org/10.1590/0074-02760180278> PMID: [30427974](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30427974/)
75. Kraemer MU, Sinka ME, Duda KA, Mylne AQ, Shearer FM, Barker CM, et al. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. *Elife*. 2015; <https://doi.org/10.7554/elife.08347> PMID: [26126267](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26126267/)
76. Brady OJ, Johansson MA, Guerra CA, Bhatt S, Golding N, Pigott DM, et al. Modelling adult *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* survival at different temperatures in laboratory and field settings. *Parasites and Vectors*. 2013; <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-351> PMID: [24330720](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24330720/)
77. Causey OR, Kumm HW, Laemmert HW. Dispersion of forest mosquitoes in Brazil: Further studies. *Am J Trop Med Hyg*. 1950; s1-30:301–12. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1950.s1-30.301> PMID: [15419408](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15419408/)
78. Silva NIO, Sacchetto L, de Rezende IM, Trindade G de S, LaBeaud AD, de Thoisy Benoit and Drumond BP. Recent sylvatic yellow fever virus transmission in Brazil: the news from an old disease. *Virology*. 2020; <https://doi.org/10.1186/s12985-019-1277-7>
79. Duque-Lazo J, van Gils H, Groen TA, Navarro-Cerrillo RM. Transferability of species distribution models: The case of *Phytophthora cinnamomi* in Southwest Spain and Southwest Australia. *Ecol Modell*. 2016; 320:62–70. <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2015.09.019>
80. Bell DM, Schlaepfer DR. On the dangers of model complexity without ecological justification in species distribution modeling. *Ecol Modell*. 2016; 330:50–59. <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2016.03.012>
81. Carneiro LRDA, Lima AP, Machado RB, Magnusson WE. Limitations to the use of species-distribution models for environmental-impact assessments in the Amazon. *PLoS One*. 2016; 11:e0146543. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146543> PMID: [26784891](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26784891/)
82. Braunisch V, Suchant R. Predicting species distributions based on incomplete survey data: The trade-off between precision and scale. *Ecography (Cop)*. 2010; 33:826–40. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0587.2009.05891.x>
83. Guernier V, Hochberg ME, Guégan JF. Ecology drives the worldwide distribution of human diseases. *PLoS Biol*. 2004; 2:e141. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020141> PMID: [15208708](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15208708/)

84. Soberón J, Nakamura M. Niches and distributional areas: Concepts, methods, and assumptions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106:19644–19650. <https://doi.org/10.1073/pnas.0901637106> PMID: [19805041](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19805041/)
85. Chalhaf B, Chemkhi J, Mayala B, Harrabi M, Benie GB, Michael E, et al. Ecological niche modeling predicting the potential distribution of *Leishmania* vectors in the Mediterranean basin: Impact of climate change. *Parasites and Vectors*. 2018;11. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2597-3> PMID: [29301570](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29301570/)
86. Tapia-Garay V, Figueroa DP, Maldonado A, Frías-Laserre D, Gonzalez CR, Parra A, et al. Assessing the risk zones of chagas' disease in chile, in a world marked by global climatic change. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2018; 113:24–29. <https://doi.org/10.1590/0074-02760170172> PMID: [29211105](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29211105/)
87. Tjaden NB, Caminade C, Beierkuhnlein C, Thomas SM. Mosquito-Borne Diseases: Advances in Modeling Climate-Change Impacts. *Trends Parasitol*. 2018; 34:227–245. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2017.11.006> PMID: [29229233](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29229233/)
88. Nichols MD, Butler CJ, Lord WD, Haynie ML. Projected expansion in climatic suitability for *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas Disease, and five widespread *Triatoma* species by 2070. *bioRxiv*. 2018; <https://doi.org/10.1101/490508>
89. Pigott DM, Bhatt S, Golding N, Duda KA, Battle KE, Brady OJ, et al. Global distribution maps of the leishmaniases. *Elife*. 2014; 3:e02851. <https://doi.org/10.7554/elife.02851> PMID: [24972829](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24972829/)

ANEXO F – Artigo aceito em periódico nacional

REVISTA
DO
INSTITUTO
DE
MEDICINA
TROPICAL
DE
SÃO PAULO
JOURNAL OF THE SÃO PAULO
INSTITUTE OF TROPICAL MEDICINE

ORIGINAL ARTICLE

<http://doi.org/10.1590/S1678-9946201961057>

Circulation of Chikungunya virus East-Central-South Africa genotype during an outbreak in 2016-17 in Piauí State, Northeast Brazil

Felipe Daniel Cardoso¹, Izabela Mauricio de Rezende², Emanuela Lima Teixeira Barros¹, Lívia Sacchetto², Tereza Cristina de Carvalho Souza Garcês¹, Natalia Ingrid Oliveira Silva², Pedro Augusto Alves³, Jefferson Oliveira Soares¹, Erna Geessien Kroon², Anna Carolina Toledo da Cunha Pereira¹, Betânia Paiva Drumond², Gustavo Portela Ferreira¹

ABSTRACT

Chikungunya virus (CHIKV) is an arbovirus that emerged in the Americas in 2013. Infection with CHIKV is symptomatic in most of the cases and patients can develop chronic arthralgia that lasts from months to years in over 40% of the cases. The East-Central-South Africa (ECSA) genotype was introduced in Brazil in 2014, in Bahia State. Here we report the circulation of the CHIKV ECSA genotype in Piauí State, Northeast Brazil, during the years 2016-2017. The phylogenetic analysis revealed a single introduction of this lineage probably in 2015 and its maintenance at least until 2017. This analysis has also demonstrated the proximity of this genotype with isolates from neighboring States, and its partial nucleotide sequence of the viral E1 gene revealed a synapomorphy synonyms. This finding highlights the spread of the ECSA genotype in Brazil and supports its circulation in the Brazilian Northeast.

KEYWORDS: Chikungunya virus. Brazil. ECSA genotype. Arbovirus. Togavirus. Alphavirus. Molecular surveillance. Epidemiology. E1 gene.

INTRODUCTION

Chikungunya virus (CHIKV) is an arthropod-borne, enveloped, positive single-stranded RNA virus of the family *Togaviridae*, genus *Alphavirus*. Its genome contains two open reading frames encoding four nonstructural (nsP1-4) and five structural proteins (C, E3, E2, 6K, E1)^{1,2}. Studies performed in Thailand, Malaysia, Mayotte and La Reunion islands have shown that 52 to 98% of the infected patients develop symptoms that range from fever, headache, myalgia, articular edema and rash to intense polyarthralgia and severe joint pain³⁻⁶. Furthermore, a variety of studies have reported a high prevalence of chronic arthralgia, which can last from months to years in approximately 40% of the infected people^{7,8}.

CHIKV was isolated for the first time in 1952-53 in Tanzania⁹. So far, four distinct lineages have been recognized: East-Central-South Africa (ECSA), Indian Ocean (IOL), Asian and West African lineages¹⁰. Until 2004, CHIKV had caused small and sporadic outbreaks at the African and Asian continents, however that year, the ECSA genotype caused massive outbreaks in the East Africa coast^{11,12}. This was followed by unprecedented epidemics in Indian Ocean islands and Asia as well as the first outbreak in a temperate region in Italy¹³. In 2013, the first cases of

¹Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Reis Velloso, Parnaíba, Piauí, Brazil

²Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

³Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas René Rachou, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

Correspondence to: Gustavo Portela Ferreira
Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Reis Velloso, Av. São Sebastião, 2819, CEP 64202-020, Parnaíba, PI, Brazil
Tel: +55 86 999203470, +55 86 33235846

E-mail: gtvpf@ufpi.edu.br

Received: 29 March 2019

Accepted: 9 September 2019



autochthonous transmission in the Americas were reported in the Caribbean island of Saint Martin, caused by the Asian genotype¹⁴. In late 2014, the Asian genotype was detected in the Amapa State, Northern Brazil¹⁵, whereas the ECSA genotype was later detected in Bahia State, Northeast Brazil¹⁶. According to the Brazilian Ministry of Health, between 2016 and 2018, 547,797 suggestive cases of CHIKV were reported in the country, with 361,640 laboratory confirmed cases and 387 CHIKV-associated deaths¹⁷⁻¹⁹. The Northeast region of the country accounted for 86.4% and 76.8% of the suggestive cases during 2016 and 2017, respectively^{17,19}.

Piauí State (PI) is located in the Northeast region of Brazil, and borders the States of Bahia, Ceará, Pernambuco and Maranhão and Tocantins (Figure 1). Until 2016, no cases of CHIKV (imported or autochthonous) were reported in Piauí State. However, in 2016, the incidence rate of suggestive CHIKV infections increased to 86.4 per 100.000 inhabitants, the lowest in the Northeast region¹⁹, and peaked in 2017 reaching 194.5 per 100.000 inhabitants¹⁷. In 2018, the incidence rate dropped to 17.4 per 100.000 inhabitants. In addition, deaths caused by CHIKV infection have been confirmed in Piauí State in 2016 and 2017^{17,18}. Considering that there has been an increase in the incidence rate of CHIKV in Piauí State, the aim of the present study was to investigate and to identify the circulating genotype in the State.

MATERIALS AND METHODS

Clinical samples and ethical statement

From April 2016 to November 2017, clinical samples were collected at the Urgency Medical Service Unity and State Hospital Dirceu Arcoverde in the city of Parnaíba, Piauí State, Brazil. Serum were obtained from whole blood samples collected from patients presenting two or more of the following symptoms: fever ($>38.5\text{ }^{\circ}\text{C}$), headache, arthralgia, myalgia, rash and/or hemorrhagic manifestations. Informed consent was obtained from all the patients or their legal guardians, and a form with questions about age, days of symptoms, travel history and previous diagnostics was filled out. The collected samples were stored at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, transported to the research laboratory at the Federal University of Piauí within 5 h after collection and stored at $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. When available, results of the serological tests for DENV and CHIKV performed by public health services were retrieved. The research was approved by the Human and Ethics Committee of the Federal University of Piauí, under the protocol N^o CAAE 46111615.0.0000.5214.

Molecular investigation of Chikungunya infection

Viral RNA extractions were performed from serum of patients presenting three or more symptoms, less than

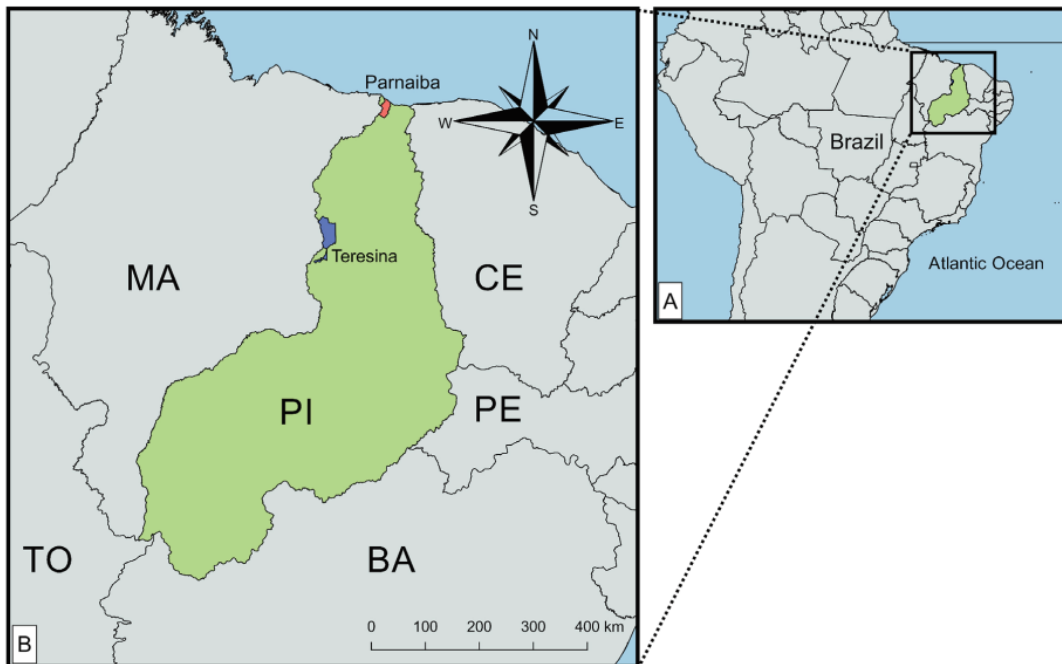


Figure 1 - The geographic location of Piauí State in Brazil. Teresina and Parnaíba municipalities are highlighted in blue and orange, respectively. BA: Bahia; CE: Ceará; MA: Maranhão; PE: Pernambuco; PI: Piauí TO: Tocantins.

5 days of the onset of symptoms and the presence of IgM antibodies against CHIKV, when available. The viral RNA extraction was performed using QIAamp viral RNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) or NucleoSpin® RNA Virus (Macherey-Nagel, Düren, Germany), following the manufacturer's instructions.

The cDNA synthesis was carried with random hexamers (20 µM, Qiagen, Hilden, Germany) and Moloney Murine Leukemia virus reverse transcriptase (Promega, Madison, Wisconsin, USA), following the manufacturer's instructions. Using specific primers previously described for CHIKV *E1* (DVRChk-F 5' ACCGGCGTCTACCCATT CATGT 3'; DVRChk-R 5' GGGCGGGTAGTCCATGTTGTAGA 3')²⁰ and CHIKV *E2* (JM1 5' GCAGACGCAGAGAGGGCCAG 3'; JM2 5' CGTGCTGCAAGGTAGTTCTC 3'; JM3 5' GCTATTTGTAAGAACGTCAG 3'; JM4 5' TACCGTGCTGCGGTTCGGGA A 3')²¹ genes, partial genome sequences were amplified. The expected products of 330 bp (*E1*) and 240 bp (*E2*) were separated by electrophoresis in 1.5% agarose gels stained with the intercalant agent GelRed™ (Biotium Inc., Fremont, California, USA) and visualized under U.V. lights. The expected bands were excised from the gel and purified using the QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Germany) for nucleotide sequencing.

Nucleotide sequencing and phylogenetic analysis

PCR amplicons of the *E1* and *E2* genes were sequenced using 0.5 µM of each specific primer (forward and reverse) and approximately 10 ng of each DNA sample. The sequencing was performed in a ABI 3130 DNA Analyzer (Applied Biosystems) using BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems), using the Sanger sequencing platform of Rene Rachou Institute (Fiocruz, Minas Gerais, Brazil). Raw data were analyzed and final contigs were assembled using the Geneious R9 version 9.1.8²². The partial sequences of *E2* and *E1* genes were concatenated in frame and aligned to 74 concatenated sequences of CHIKV genotypes retrieved from GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) using CLUSTALW, implemented on MEGA6²³. The nucleotide substitution model of Kimura 2-parameters with Gamma distribution (4 categories) (K2+G) was selected using jModelTest v 2.1.4²⁴. The maximum likelihood tree was reconstructed using MEGA 6²³ with a total of 88 sequences, the nucleotide substitution model K2+G with 1000 bootstrap replicates.

Bayesian inferences were performed using BEAST package 1.8.4²⁵ with Markov Chain Monte Carlo algorithms (MCMC). Input files for BEAST v.1.8.4 were created with BEAUTi v.1.8.4²⁶, using 88 concatenated *E2E1* sequences.

The best model was selected comparing the marginal likelihood estimations (MLE)²⁷. The estimates were performed using the nucleotide substitution model GTR, with gamma distribution (four categories), under the relaxed molecular clock and the Bayesian skyline demographic Model. Three hundred million chains were run, the first 30 million steps were discarded, and convergence of parameters was verified with Tracer v.1.5.0²⁸. The trees were sampled at every 10,000 steps and then summarized in a maximum clade credibility tree using TreeAnnotator v.1.8.2²⁹. The final tree was visualized in FigTree v.1.4.3³⁰.

RESULTS

Clinical samples and serological results

During April/2016 and November/2017, 580 patient samples were collected. 40.2% (233/580) of samples were collected during 2016, whereas 59.8% (347/580) were collected during 2017. The majority of the patients were woman (66.4%). The main clinical signs were fever (84.65%), arthralgia (82.06%), headache (77.75%) and myalgia (71.38%) (Table 1). However, 0.86% (5/580) of patients have also presented neurological complications, such as encephalitis. Of the 580 samples collected, serological tests for CHIKV IgM were performed on 52.59% (305/580) samples, CHIKV IgG on 19.31% (112/580), DENV IgM on 75.69% (439/580) and DENV IgG on 61.72% (358/580). Of these, 70.16% (214/305) were positive for CHIKV IgM, 14.12% (62/439) for DENV IgM and 36 (6.21%) were positive for both CHIKV and DENV IgM tests (Figure 2).

RT-PCR for CHIKV

From the total of collected samples, RNA extraction was performed on 19.31% (112/580) samples. Of these, 56.25% (63/112) were from 2016 and 43.75% (49/112) from 2017. Of the analyzed samples, 29.46% (33/112) were positive for CHIKV by PCR, with 57.58% (19/33) from 2016 and 42.42% (14/33) from 2017. Of the positive samples, CHIKV specific IgM tests were available for 36.36% (12/33) patients, of which 50% (6/12) were CHIKV IgM positive (Figure 2). 87.88% (29/33) of the PCR-positive CHIKV samples had DENV IgM tests performed, and 10.34% (3/29) of samples were positive. Only one of the CHIKV-positive samples with serological tests results presented both DENV and CHIKV IgM antibodies. Of the 33 CHIKV-positive samples, one (3.03%) patient of 11 years old presented clinical signs of encephalitis as well as fever, vomiting, headache, myalgia and eye

Table 1 - Demographic and clinical characteristics of suspected cases of CHIKV infection during April/2016 to November/2017 in Piauí, Brazil, according to CHIKV laboratory test results (RT-PCR).

	All Samples (n=580)	Suspected cases (n=112)	Positive (n=33)	Negative (n=79)	Sequenced (CHIKV ECSA) (n=14)
Sex					
Female	66.4%	62.5%	54.55%	65.82%	57.14%
Age (years)					
Median(range)	33(1-89)	29(3-85)	35(6-85)	27(3-76)	37(7-73)
Clinical Symptoms					
Fever	84.65%	85.71%	93.94%	81.01%	100%
Arthralgia	82.06%	82.14%	90.91%	78.48%	92.86%
Headache	77.75%	74.11%	81.82%	69.62%	92.86%
Myalgia	71.38%	66.96%	75.76%	63.29%	100%
Exanthema	63.79%	66.07%	57.57%	69.62%	71.43%
Prostration	54.14%	56.25%	48.48%	59.49%	57.14%
Eye problems	52.07%	52.68%	45.45%	55.70%	42.86%
Nauseas	48.02%	42.86%	54.54%	37.98%	57.14%
Vomits	25.52%	26.78%	21.21%	27.89%	28.57%
Articular Edema	23.45%	25.89%	39.39%	20.25%	57.14%
Diarrhea	18.79%	16.94%	12.12%	18.99%	14.29%
Neurological Complications	0.86%	4.46%	3.03%	5.06%	7.14%

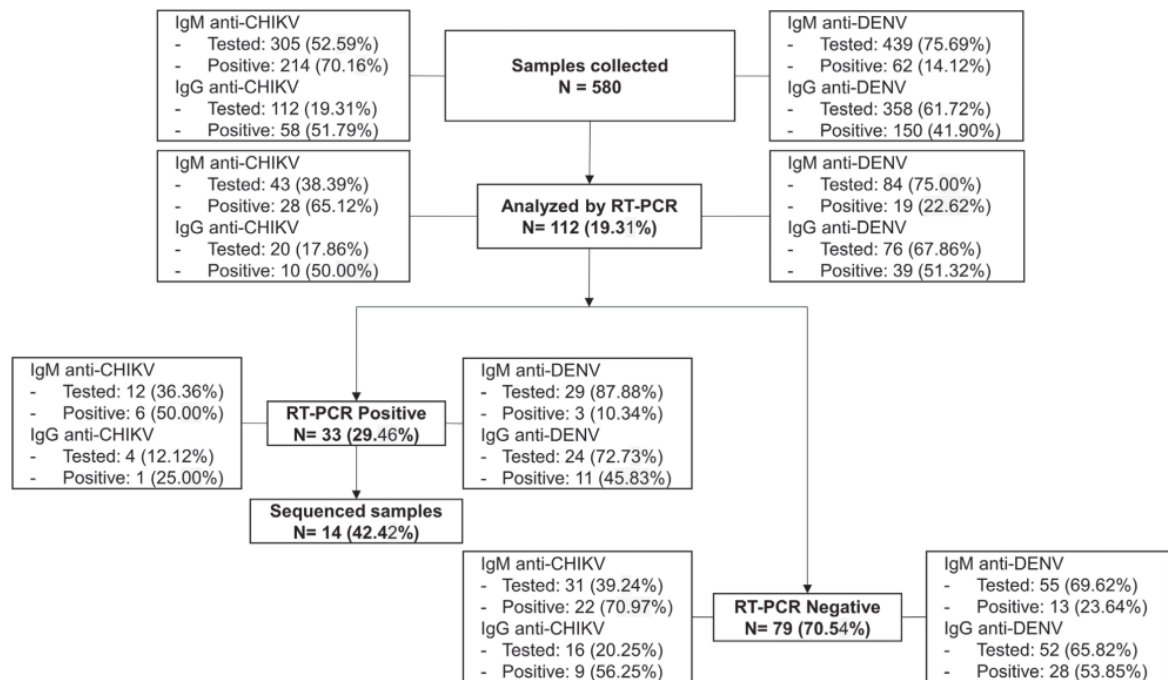


Figure 2 - Flowchart showing the total number of patient samples collected and laboratory tested (RT-PCR) to CHIKV during April/2016 to November/2017.

complications. The presence of CHIKV IgM antibodies was detected in this sample, but DENV IgM and IgG were not detected. Among the PCR negative samples (79/112),

CHIKV IgM tests were performed on 39.34% (31/79) of the patients. Of these, 70.97% (22/31) of the samples presented CHIKV IgM antibodies (Figure 2).

Nucleotide sequencing and phylogenetic analysis

The partial sequence of *E2* and *E1* genes of 14 samples from 2016 and 2017 were determined (GenBank accession N° MK510154-MK510181). The partial sequences of *E2* (208 nt) and *E1* (120 nt) genes were concatenated in frame (328 nt; corresponding to positions 8,804 to 8,923 and 10,253 to 10,460 compared to the nucleotide sequence of CHIKV strain BHI3745/H804709, isolated in Feira de Santana, Bahia (GenBank accession N° KP164570). The phylogenetic analysis based on the Maximum likelihood (Supplemental Figure 1) and Bayesian methods revealed that all sequenced isolates belonged to the ECSA genotype and clustered together, forming a monophyletic group, called CHIKV/PI/2016-2017 (supported by a posterior probability (PP) equal to 0.96). This group clustered with

other CHIKV isolates, circulating from 2014 to 2016, in Bahia¹⁶, Rio de Janeiro³¹, Sergipe³², Alagoas³³, Paraíba and Pernambuco (PP=1) (Figure 3).

The isolates from CHIKV/PI/2016-2017 had the most recent common ancestor (MRCA) estimated in 2015 (95% Bayesian credible interval = 2014 to 2016). The nucleotide sequences within CHIKV/PI/2016-2017 were identical to each other. When sequences within CHIKV/PI/2016-2017 were compared to sequences from other Brazilian isolates (collected during 2014-2016), a nucleotide similarity of 99.3% was observed. Analysis of nucleotide and predicted amino acid sequences of CHIKV/PI/2016-2017 compared to sequences belonging to others Brazilian CHIKV/ ECSA genotypes, indicated a synonymous nt substitution characterized as synapomorphy (position 87 of the *E1* gene of CHIKV/PI/2016-2017 sequences).

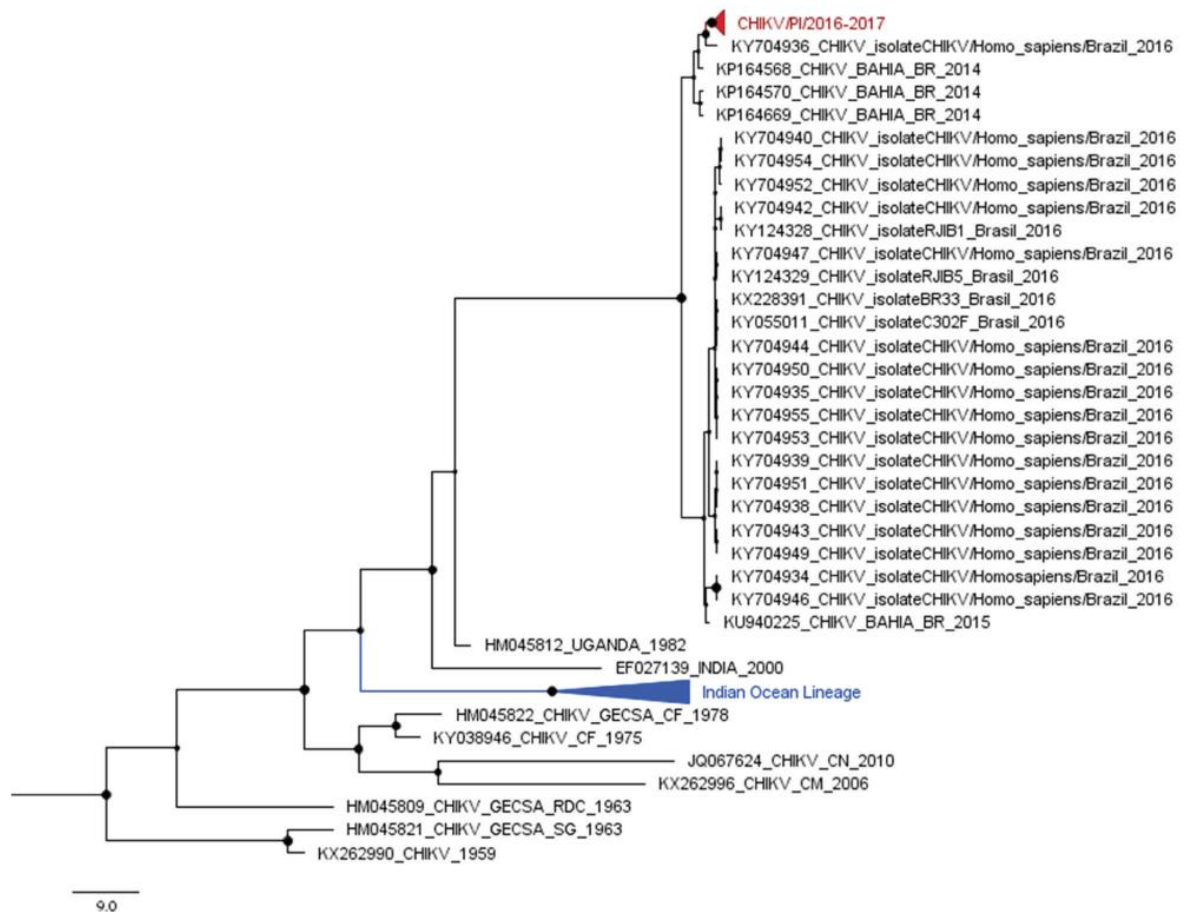


Figure 3 - Bayesian phylogenetic analysis of Chikungunya virus. A subtree of the ECSA genotype, from the maximum clade credibility tree inferred using 88 Chikungunya virus sequences (328 nt) is shown. The posterior probability values are represented by circles drawn in scale in the nodes. Clades containing strains from Piauí (2016/2017) and the Indian Ocean Lineage are shown in red and blue, respectively. Branch lengths are drawn to scale of years. The tree was reconstructed using the nucleotide substitution model GTR with gamma distribution (four categories), under the relaxed molecular clock and the Bayesian skyline demographic model. PI: Piauí. BR: Brazil. GECSA: Genotype East-Central South African. CHIKV: Chikungunya virus.

DISCUSSION

In this study, we performed a molecular investigation of CHIKV infection in symptomatic patients in Piauí State, Northeast Brazil, during 2016 and 2017. By using molecular tests, CHIKV infections were confirmed in 33 patients out of 112 tested samples. As the presence of acute symptoms such as fever, arthralgia, myalgia and headache lasting less than 5 days after the onset of the symptoms was a criterion of inclusion, our symptoms data should be carefully considered. However, it is noteworthy to add that one of the CHIKV-positive patients developed encephalitis, the most common neurological complication reported during outbreaks in La Reunion³⁴, Guadeloupe and Martinique³⁵ islands.

It is difficult to estimate the incidence of neurological symptoms among infected patients, however, encephalopathies are the most common neurological disorders associated with CHIKV infection³⁶. On the other hand, symptoms such as fever, arthralgia, headache and myalgia are better described in CHIKV infected patients. These symptoms were the most prevalent in our positive samples, and were also observed in patients from Alagoas³³ and Sergipe³⁷ States, Northeast Brazil.

After the partial nucleotide sequencing of *E1* and *E2* genes, phylogenetic analysis indicated that the Piauí CHIKV isolates presented in this study were clustered within the ECSA genotype and formed a monophyletic clade with other Brazilian samples from 2014 to 2016. Based on the evolutionary analysis, our extracted viral RNAs share the most common recent ancestor dating from 2015, suggesting the introduction of CHIKV ECSA genotype into Piauí probably in that year. Studies performed in Pernambuco³⁸ and Alagoas³³ States, also located in the Brazilian Northeast region, have suggested that CHIKV was also introduced in these States in 2015.

Moreover, the interval between the introduction of CHIKV in Piauí in 2015, and the report of its detection made only in 2016 by the surveillance system, demonstrated a silent circulation and maintenance of the virus in the region^{18,39}. These data corroborate the finding from Costa *et al.*³³, who estimated the introduction of CHIKV in Alagoas in mid-April 2015, but the virus was detected by the surveillance system a few months later³³. Furthermore, a recent study on isolates from Rio de Janeiro, Southeast Brazil, has shown that the introduction of CHIKV ECSA genotype in the State may have taken place almost a year after its detection by the surveillance system⁴⁰. Altogether, these data corroborate our finding that CHIKV may have been circulating in Piauí up to a year before its detection.

CONCLUSION

In conclusion, we provided the first genotype surveillance of CHIKV cases during 2016/2017 in Piauí State, Northeast Brazil. Our study corroborates the circulation of the ECSA genotype in other Brazilian Northeastern States during this period, such as Bahia⁴¹, Sergipe³² and Alagoas^{33,42}. Our data also indicate the introduction of CHIKV in Piauí in 2015, and its maintenance up to 2017. Since previous studies have shown a high incidence of chronic symptoms^{7,8}, which could have social and economic impacts, more research is needed to evaluate the prevalence and impact of acute and chronic CHIKV infections in the region.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank colleagues from Laboratório de Biologia de Microrganismos e Plantas - UFPI, and from Laboratório de Virus – UFMG for their support. We also thank the administrative and laboratory staff from the public health facilities for their support with the samples collection.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

FDC and GPF conceived and designed the study. IMR, LS, NIOS and BPD carried out experiments and performed phylogenetic analyses. PAA sequenced the PCR fragments. FDC, ELTB and TCCSG collected the patient samples and performed the experiments. JOS, ACTCP and EGK contributed with reagents and materials. FDC, IMR, BPD and GPF analyzed the data and wrote the paper.

FINANCIAL SUPPORT

This study was supported by grants from Piauí Research Foundation - FAPEPI, Prefeitura Municipal de Parnaíba and from Brazilian National Research Council (CNPq) 456707/2014-0. ELTB, TCCSG, IMR and LS. were supported by graduate fellowships from the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel - CAPES. NIOS was supported by a graduate fellowship from CNPq. EGK and BPD are fellows of CNPq. The funding agencies had no role in data collection, data analysis, data interpretation, and writing of this manuscript.

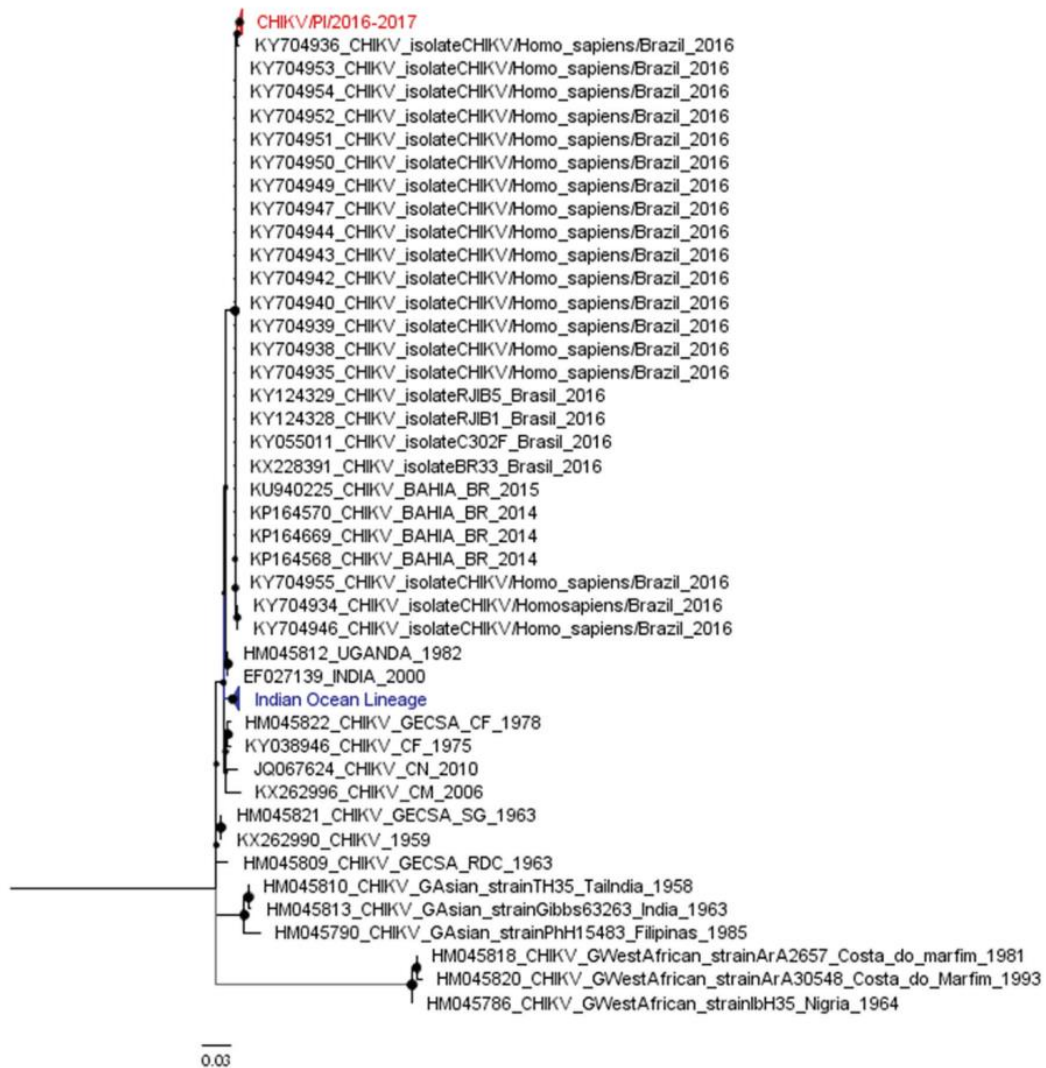
REFERENCES

1. Tang BL. The cell biology of Chikungunya virus infection. *Cell Microbiol.* 2012;14:1354-63.
2. Weaver SC, Lecuit M. Chikungunya virus and the global spread of a mosquito-borne disease. *N Engl J Med.* 2015;372:1231-9.

3. Nakkhara P, Chongsuvivatwong V, Thammapalo S. Risk factors for symptomatic and asymptomatic chikungunya infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2013;107:789-96.
4. Queyriaux B, Simon F, Grandadam M, Michel R, Tolou H, Boutin JP. Clinical burden of chikungunya virus infection. *Lancet Infect Dis.* 2008;8:2-3.
5. Ayu SM, Lai LR, Chan YF, Hatim A, Hairi NN, Ayob A, et al. Seroprevalence survey of Chikungunya virus in Bagan Panchor, Malaysia. *Am J Trop Med Hyg.* 2010;83:1245-8.
6. Sissoko D, Moendandze A, Malvy D, Giry C, Ezzedine K, Solet JL, et al. Seroprevalence and risk factors of Chikungunya virus infection in Mayotte, Indian Ocean, 2005-2006: a population-based survey. *PLoS One.* 2008;3:e3066.
7. Paixão ES, Rodrigues LC, Costa MC, Itaparica M, Barreto F, Gérardin P, et al. Chikungunya chronic disease: a systematic review and meta-analysis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2018;112:301-16.
8. Feldstein LR, Rowhani-Rahbar A, Staples JE, Weaver MR, Halloran ME, Ellis EM. Persistent arthralgia associated with Chikungunya virus outbreak, US Virgin Islands, December 2014-February 2016. *Emerg Infect Dis.* 2017;23:673-6.
9. Robinson MC. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952-53. I. Clinical features. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1955;49:28-32.
10. Volk SM, Chen R, Tsatsarkin KA, Adams AP, Garcia TI, Sall AA, et al. Genome-scale phylogenetic analyses of Chikungunya virus reveal independent emergences of recent epidemics and various evolutionary rates. *J Virol.* 2010;84:6497-504.
11. Serگون K, Njuguna C, Kalani R, Ofula V, Onyango C, Konongoi LS, et al. Seroprevalence of Chikungunya virus (CHIKV) infection on Lamu Island, Kenya, October 2004. *Am J Trop Med Hyg.* 2008;78:333-7.
12. Renault P, Solet J, Sissoko D, Balleydier E, Larrieu S, Filleul L, et al. A major epidemic of Chikungunya virus infection on Réunion Island, France, 2005-2006. *Am J Trop Med Hyg.* 2007;77:727-31.
13. Rezza G, Nicoletti L, Angelini R, Romi R, Finarelli AC, Panning M, et al. Infection with Chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. *Lancet.* 2007;370:1840-6.
14. Leparç-Goffart I, Nougairède A, Cassadou S, Prat C, de Lamballerie X. Chikungunya in the Americas. *Lancet.* 2014;383:514.
15. Nunes MR, Faria NR, Vasconcelos JM, Golding N, Kraemer MU, Oliveira LF, et al. Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. *BMC Med.* 2015;13:102.
16. Teixeira MG, Andrade AM, Costa MC, Castro JS, Oliveira FL, Goes CS, et al. East/Central/South African genotype Chikungunya virus, Brazil, 2014. *Emerg Infect Dis.* 2015;21:906-8.
17. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de dengue, febre de Chikungunya e doença aguda pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 49 de 2018. *Bol Epidemiol.* 2018;49:1-14. [cited 2019 May 27]. Available from: <http://portal.arquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/janeiro/02/2018-067.pdf>
18. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de dengue, febre de Chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 49, 2016. *Bol Epidemiol.* 2017;47:1-10. [cited 2019 May 27]. Available from: <http://portal.arquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2016/dezembro/20/2016-033---Dengue-SE49-publicacao.pdf>
19. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de dengue, febre de Chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 50, 2017. *Bol Epidemiol.* 2017;48:1-13. [cited 2019 May 27]. Available from: <http://portal.arquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/10/2017-046-Publicacao.pdf>
20. Kumar CV, Johnson AM, Gopal DV. Molecular characterization of Chikungunya virus from Andhra Pradesh, India & phylogenetic relationship with Central African isolates. *Indian J Med Res.* 2007;126:534-40.
21. Porter KR, Tan R, Istary Y, Suharyono W, Sutaryo, Widjaja S, et al. A serological study of Chikungunya virus transmission in Yogyakarta, Indonesia: evidence for the first outbreak since 1982. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2004;35:408-15.
22. Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, et al. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics.* 2012;28:1647-9.
23. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol Biol Evol.* 2013;30:2725-9.
24. Posada D. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol Biol Evol.* 2008;25:1253-6.
25. Drummond AJ, Suchard MA, Xie D, Rambaut A. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Mol Biol Evol.* 2012;29:1969-73.
26. Drummond AJ, Rambaut A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol Biol.* 2007;7:214.
27. Baele G, Lemey P, Bedford T, Rambaut A, Suchard MA, Alekseyenko AV. Improving the accuracy of demographic and molecular clock model comparison while accommodating phylogenetic uncertainty. *Mol Biol Evol.* 2012;29:2157-67.
28. BEAST Developers. Tracer. [cited 2019 Sep 12]. Available from: <http://beast.community/tracer>
29. BEAST Developers. TreeAnnotator. [cited 2019 Sep 12]. Available from: <https://beast.community/treeannotator>
30. Rambaut A. FigTree. [cited 2019 Sep 9]. Available from: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>
31. Cunha MS, Cruz NV, Schnellrath LC, Medaglia ML, Casotto ME, Albano RM, et al. Autochthonous transmission of East/

- Central/South African genotype Chikungunya virus, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2017;23:1737-9.
32. Costa-da-Silva AL, Ioshino RS, Petersen V, Lima AF, Cunha MP, Wiley MR, et al. First report of naturally infected *Aedes aegypti* with Chikungunya virus genotype ECSA in the Americas. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017;11:e0005630.
 33. Costa AC, Thézé J, Komninakis SC, Sanz-Duro RL, Felinto MR, Moura LC, et al. Spread of Chikungunya virus East/Central/South African genotype in Northeast Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2017;23:1742-4.
 34. Lemant J, Boisson V, Winer A, Thibault L, André H, Tixier F, et al. Serious acute Chikungunya virus infection requiring intensive care during the Reunion Island outbreak in 2005-2006. *Crit Care Med.* 2008;36:2536-41.
 35. Crosby L, Perreau C, Madeux B, Cossic J, Armand C, Herrmann-Storke C, et al. Severe manifestations of Chikungunya virus in critically ill patients during the 2013-2014 Caribbean outbreak. *Int J Infect Dis.* 2016;48:78-80.
 36. Mehta R, Gerardin P, Brito CA, Soares CN, Ferreira ML, Solomon T. The neurological complications of Chikungunya virus: a systematic review. *Rev Med Virol.* 2018;28:e1978.
 37. Cunha MP, Santos CA, Lima Neto DF, Schanoski AS, Pour SZ, Passos SD, et al. Outbreak of Chikungunya virus in a vulnerable population of Sergipe, Brazil: a molecular and serological survey. *J Clin Virol.* 2017;97:44-9.
 38. Machado LC, Morais-Sobral MC, Campos TL, Pereira MR, Albuquerque MF, Gilbert C, et al. Genome sequencing reveals coinfection by multiple Chikungunya virus genotypes in a recent outbreak in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis.* 2019;13:e0007332.
 39. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de dengue, febre de Chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52, 2015. *Bol Epidemiol.* 2016;47:1-10. [cited 2019 May 27]. Available from: <http://portal.arquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2016/janeiro/15/svs2016-be003-dengue-se52.pdf>
 40. Souza TM, Vieira YR, Delatorre E, Barbosa-Lima G, Luiz RL, Vizzoni A, et al. Emergence of the East-Central-South-African genotype of Chikungunya virus in Brazil and the city of Rio de Janeiro may have occurred years before surveillance detection. *Sci Rep.* 2019;9:2760.
 41. Sardi SI, Somasekar S, Naccache SN, Bandeira AC, Tauro LB, Campos GS, et al. Coinfections of Zika and Chikungunya viruses in Bahia, Brazil, identified by metagenomic next-generation sequencing. *J Clin Microbiol.* 2016;54:2348-53.
 42. Tanabe EL, Tanabe IS, Santos EC, Marques JP, Borges AA, Lima MC, et al. Report of East-Central South African Chikungunya virus genotype during the 2016 outbreak in the Alagoas State, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2018;60:e19.

Circulation of Chikungunya virus East-Central-South Africa genotype during an outbreak in 2016-17 in Piauí State, Northeast Brazil



Supplemental Figure 1 - Maximum likelihood analysis of Chikungunya virus. The maximum likelihood tree was inferred using 88 Chikungunya virus sequences (328 nt). The bootstrap values are represented by circles drawn in scale in the nodes. Clades containing strains from Piauí (2016/2017), and Indian Ocean Lineage are shown in red and blue, respectively. Branch lengths are drawn to scale or the number of substitutions per site. The tree was reconstructed using the nucleotide substitution model Kimura-2-parametrs with gamma distribution (four categories) (K2+G). PI: Piauí State. GECSA: Genotype East-Central South African. Gwest African: Genotype West African. GAsian: Genotype Asian. CHIKV: Chikungunya virus.

ANEXO G – Artigo aceito em periódico internacional

Contexto Geral - Inicialmente este trabalho tinha também como meta a investigação de ortopoxvírus dos órgãos de PNH da coleção biológica aqui estudadas. No Brasil, desde a descrição dos primeiros casos de infecção pelo vírus vaccínia em áreas rurais na região sudeste, diversos isolados de VACV vêm sendo descritos no país. As epidemias de VACV são descritas principalmente em gados de leite e nos trabalhadores rurais que cuidam destes animais, e são frequentemente reportados no estado de Minas Gerais. Contudo, já foram descritas detecção de anticorpos neutralizantes contra ortopoxvírus em diferentes espécies de animais silvestres no Brasil, incluindo em primatas não humanos e em animais domésticos, cachorros, porcos, entre outros. Embora a transmissão direta desses animais para humanos ainda não tenha sido documentada, esse risco deve ser considerado uma vez que estes vírus se mantêm num ciclo enzoótico no país.

O objetivo deste trabalho era fazer a prospecção genômica e de anticorpos neutralizantes das amostras de órgãos de PNH disponíveis na coleção de órgãos presentes no LV-UFGM. Contudo, devido à pandemia de COVID-19 e consequentes restrições de mobilidade e isolamento e utilização do laboratório, esta parte do trabalho experimental não pode ser realizada. Não obstante, dada a importância dos poxvírus zoonóticos, alternativamente, foi realizado um trabalho de revisão bibliográfica sobre a gama de hospedeiros, incluindo PNH, e a distribuição geográfica dos principais ortopoxvírus zoonóticos de importância à saúde pública e veterinária.

Seja para alimentação, transporte ou como companhia, o ser humano vem domesticando, criando e interagindo com animais e, consequentemente, com seus patógenos há séculos. Atualmente, com o aumento da densidade populacional e da urbanização, com o uso desenfreado da terra para agricultura, desmatamento e aproximação do homem aos ambientes silvestres, tem se observado o aumento da emergência e da reemergência de doenças zoonóticas, com destaque para aquelas causadas por vírus (BIRD; MAZET, 2018b; GIBB *et al.*, 2020b; GUBLER, 2010a). A maioria dos patógenos zoonóticos emergentes se origina de hospedeiros mamíferos, principalmente na natureza, embora animais domésticos e de criação também possam ser considerados fontes importantes de doenças infecciosas. Diferenças na biologia do patógeno determinam a gama de espécies hospedeiras suscetíveis à infecção, além disso, os patógenos podem expandir sua gama de hospedeiros infectando diferentes espécies animais. A capacidade de atravessar a barreira entre as diferentes espécies como hospedeiros é observada em algumas espécies de vírus, principalmente devido às suas


altas taxas de mutações, o que fornece um potencial de adaptação para superar barreiras à infecção em diferentes espécies de hospedeiros (JOAS *et al.*, 2018; PARRISH *et al.*, 2008; PEDERSEN *et al.*, 2005).

Durante as últimas décadas, diferentes vírus zoonóticos surgiram ou ressurgiram na natureza, incluindo os vírus da febre amarela, chikungunya, zika, além dos vírus da síndrome respiratória do Oriente Médio, síndrome respiratória aguda grave coronavírus 2 (SARS-CoV-2), Ebola, Marburg, Nipah e Hendra. Além destes, uma das famílias de vírus emergentes de grande importância pra saúde humana e animal em todo o mundo são os poxvírus. Os poxvírus estão entre os mais antigos e conhecidos vírus da humanidade, principalmente por causa de seu representante mais letal, o vírus da varíola responsável por causar entre 300-500 milhões de mortes durante o século 20. A família *Poxviridae* é dividida em duas subfamílias, *Entomopoxvirinae* e *Chordopoxvirinae*, sendo esta última mais conhecida por abrigar um dos gêneros mais estudados e conhecidos entre os poxvírus, os *Orthopoxvirus*.

Atualmente as espécies de ortopoxvírus de maior atenção são os vírus monkeypox (*Monkeypox virus* - MPXV), cowpox (*Cowpox virus* – CPXV), vaccínia e vírus relacionados (*Vaccinia virus/vaccinia-like viruses* – VACV), sendo estes os principais responsáveis pelos casos de infecção reportados em humanos e animais no mundo todo. Nas últimas décadas, casos de surtos de ortopoxvírus em diferentes espécies animais e sua expansão geográfica vêm sendo cada vez mais relatados, gerando preocupação quanto ao potencial epidêmico desses vírus. Esses fatos geram um alerta em relação os potenciais mudanças evolutivas dos ortopoxvírus, sua capacidade de cruzar a barreira entre diferentes espécies e desta forma aumentando sua gama de hospedeiros. Além disso, casos de infecção por ortopoxvírus têm sido descritos em diversos países de diferentes continentes demonstrando a ampla distribuição geográfica destes vírus. Desta forma, a revisão literária apresentada neste capítulo teve como objetivo apresentar um compilado dos principais aspectos relacionados à gama de hospedeiros de alguns ortopoxvírus de importância animal e zoonótica e sua distribuição geográfica no contexto epidemiológico atual.

Review

Here, There, and Everywhere: The Wide Host Range and Geographic Distribution of Zoonotic Orthopoxviruses

Natalia Ingrid Oliveira Silva, Jaqueline Silva de Oliveira, Erna Geessien Kroon , Giliane de Souza Trindade and Betânia Paiva Drumond *

Laboratório de Vírus, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais: Belo Horizonte, Minas Gerais 31270-901, Brazil; nios2402@ufmg.br (N.I.O.S.); jaquelinebmedica@hotmail.com (J.S.d.O.); ernagkroon@gmail.com (E.G.K.); giliane@icb.ufmg.br (G.d.S.T.)

* Correspondence: betaniadrumond@ufmg.br

Abstract: The global emergence of zoonotic viruses, including poxviruses, poses one of the greatest threats to human and animal health. Forty years after the eradication of smallpox, emerging zoonotic orthopoxviruses, such as monkeypox, cowpox, and vaccinia viruses continue to infect humans as well as wild and domestic animals. Currently, the geographical distribution of poxviruses in a broad range of hosts worldwide raises concerns regarding the possibility of outbreaks or viral dissemination to new geographical regions. Here, we review the global host ranges and current epidemiological understanding of zoonotic orthopoxviruses while focusing on orthopoxviruses with epidemic potential, including monkeypox, cowpox, and vaccinia viruses.

Keywords: *Orthopoxvirus*; *Poxviridae*; zoonosis; *Monkeypox virus*; *Cowpox virus*; *Vaccinia virus*; host range; wild and domestic animals; emergent viruses; outbreak



Citation: Silva, N.I.O.; de Oliveira, J.S.; Kroon, E.G.; Trindade, G.d.S.; Drumond, B.P. Here, There, and Everywhere: The Wide Host Range and Geographic Distribution of Zoonotic Orthopoxviruses. *Viruses* **2021**, *13*, 43. <https://doi.org/10.3390/v13010043>

Academic Editors: Jónatas Abrahão and Hermann Meyer

Received: 14 November 2020

Accepted: 24 December 2020

Published: 30 December 2020

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



Copyright: © 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Poxvirus and Emerging Diseases

Zoonotic diseases, defined as diseases or infections that are naturally transmissible from vertebrate animals to humans, represent a significant threat to global health [1]. Among the species recognized as pathogenic to humans, more than half originated in animals, and some have been characterized as emerging or re-emerging pathogens [2,3]. Most zoonotic pathogens originated in wild and domesticated mammalian hosts such as bats, rodents, and primates [4]. The analysis of global trends indicates that new zoonotic threats will continue to emerge at an accelerating rate, and are mainly associated with a growing population, changes in land use, climate changes, increased intercontinental travel, and expanded trade networks [4,5].

Poxviruses are of great veterinary and human importance and infect numerous vertebrate and invertebrate animals, including humans. The *Poxviridae* family is divided into two subfamilies, namely: *Chordopoxvirinae*, which infect vertebrates, and *Entomopoxvirinae* (A–C), which infect invertebrates. The *Chordopoxvirinae* subfamily is further divided into 18 genera (*Avipoxvirus*, *Capripoxvirus*, *Centapoxvirus*, *Cervidpoxvirus*, *Crocodylidpoxvirus*, *Leporipoxvirus*, *Macropopoxvirus*, *Molluscipoxvirus*, *Mustelpoxvirus*, *Orthopoxvirus*, *Oryzopoxvirus*, *Parapoxvirus*, *Pteropopoxvirus*, *Salmonpoxvirus*, *Sciuripoxvirus*, *Suipoxvirus*, *Vespertilionpoxvirus*, and *Yatapoxvirus*), distinguishable by their serological reactions [6,7].

The family *Poxviridae* comprises large, brick-shaped or ovoid enveloped viruses containing a linear, double-stranded DNA genome approximately 200 kilobase pairs in length [7,8]. Poxviruses are among mankind's longest and best-known viruses mainly because of their most feared and lethal representative, *Variola virus* (VARV), the causative agent of smallpox. Before its remarkable eradication in 1980, VARV represented a centuries-old threat to humans worldwide and killed approximately 300–500 million people during the 20th century [9]. The global eradication of smallpox marked the culmination of an

intensive vaccination program and quarantine measures promoted by the World Health Organization (WHO) [8,10,11]. Although VARV was eradicated 40 years ago, many challenges regarding poxvirus infections persist, including the worrisome possibility of VARV reintroduction by accidental release, its use as a biological weapon, or the emergence and re-emergence of zoonotic orthopoxviruses worldwide [12,13].

Orthopoxviruses are remarkable for their wide host spectrum, ranging from humans to domestic and wild animals (Figure 1). *Orthopoxvirus* is the most important and well-characterized poxvirus genus, mainly due to its impact on human and animal health [7,8]. Here, we review the major aspects related to the dynamics and emergence of zoonotic orthopoxvirus infections worldwide, focusing on the host range and current epidemiological situation relating to monkeypox (MPXV), cowpox (CPXV), vaccinia (VACV), and VACV-like viruses.

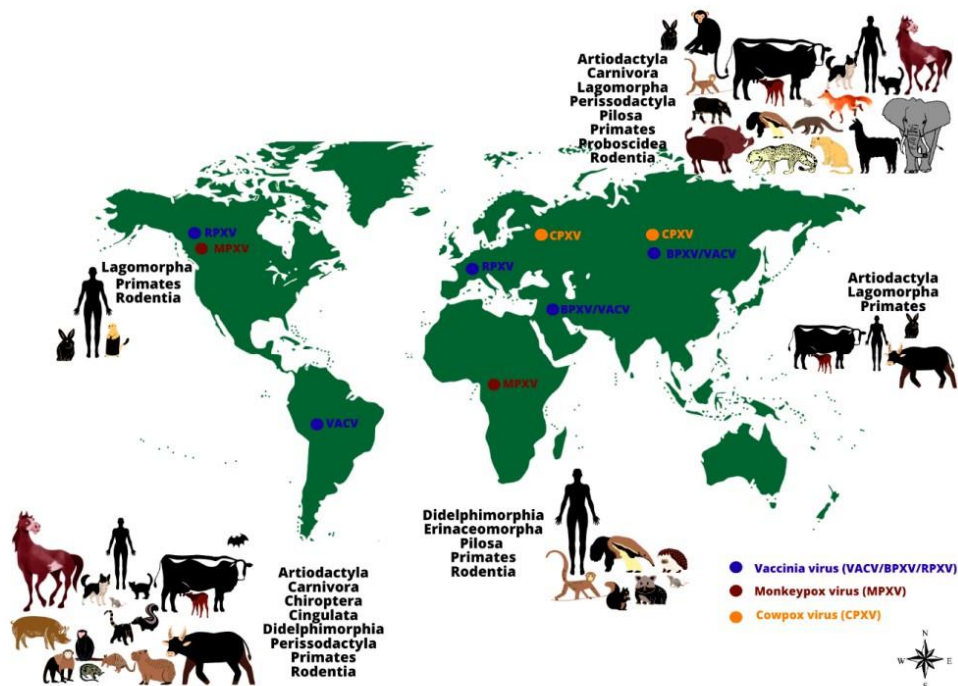


Figure 1. The worldwide distribution and host range of monkeypox, cowpox and vaccinia viruses.

The image shows the range of animal hosts (represented by orders) that have been demonstrated to be naturally infected by some *Orthopoxvirus* species, according to different regions of the world (except by Monkeypox virus in the United States of America, represented by imported cases). Orthopoxvirus infections have been demonstrated in animals belonging to different orders, using different methods (virus isolation, molecular detection of viral genomes or serological screening for antibodies against orthopoxviruses). The occurrence of some zoonotic orthopoxviruses has already been confirmed (by virus isolation or molecular detection of the viral genome) in some geographical regions (indicated by colored dots: blue: vaccinia virus (including buffalopox and rabbitpox viruses) in South America, Europe, Asia, and the Middle East; brown: monkeypox virus in Africa and North America; orange: cowpox virus in Europe and Asia).

2. Orthopoxvirus

The *Orthopoxvirus* genus comprises VARV, VACV, CPXV, MPXV, *camelpox virus*, *Akhmeta virus*, and other species with zoonotic potential. All orthopoxviruses share significant DNA sequence similarity and are immunologically cross-reactive and cross-protective. Infection with any orthopoxvirus is considered to generate protection against exposure or re-exposure to any other member of the genus [14,15]. Orthopoxvirus species are named primarily according to the hosts from which they were first isolated and identified; however, the name does not necessarily represent its natural reservoir or complete host range [8,16–19]. Despite the large number of studies, little is known about the primary hosts and reservoirs of zoonotic orthopoxviruses in nature, or their transmission and maintenance cycles [20]. Regarding the host range, orthopoxviruses can be both highly specialized and host restricted or generalists with a broad host range. For instance, VARV is a highly specialized virus that infects only humans, whereas MPXV, CPXV, and VACV are examples of generalist zoonotic orthopoxviruses that can infect several mammalian host species and also spillover into humans [20].

The evolution of generalist pathogens requires the successful crossing of host transmission barriers [21]. These include geographical, ecological, and behavioral constraints that separate a virus from its possible recipient hosts; virus-host cell incompatibility, such as tissue tropism, differences in receptor binding, genome replication, production, and shedding of infectious particles; and host immunity evasion, which includes cellular barriers or responses that restrict the infection and/or evasion of a virus from the innate immune system of its host [22]. To overcome these barriers, orthopoxviruses have different biological features that can synergistically contribute to the transmission to, and exploitation of, a broad range of new host species as observed for CPXV, MPXV, and VACV. Orthopoxviruses can cause both local lesions on the skin and systemic infections, resulting in direct and indirect transmission routes. When accompanied by viral particle stability in the environment, this can increase the likelihood of potential hosts being exposed to the virus independently of direct contact with infected hosts. In addition, orthopoxviruses can infect a variety of mammalian cells in a manner that is mostly independent of species-specific receptors and have large genomes that carry the information essential for viral replication, thereby increasing the possibility of successful infection in a new cell/host. Although the double stranded DNA genomes of orthopoxviruses have low mutation rates when compared with other viruses, such as RNA viruses, orthopoxviruses possess a genetic arsenal comprising several immune-regulatory, virulence, and host range genes [20]. The variety of host-genes among poxviruses enables them to express different viral proteins with important roles in cell tropism, as well as in the modulation of host signaling pathways and immunomodulatory responses, thereby establishing optimal cellular conditions for viral replication [23]. Finally, many of the strategies employed by orthopoxviruses to evade host immune defenses target conserved elements of the immune system in different potential hosts [20]. Combined, these features altogether are crucial for virus-cell and virus-host interactions and can contribute to the success of viral replication and transmission.

Despite the eradication of smallpox, the possibility of its re-emergence or the emergence of other orthopoxviruses in human and animal populations is a relevant global health issue. As smallpox vaccination is no longer mandatory, most of the world's population that is under 40 years of age lacks immunity against orthopoxviruses [24,25]. This scenario is highlighted by numerous reports in recent years of human diseases caused by zoonotic orthopoxviruses such as MPXV [26–33], CPXV [34–41], VACV-like [42–49], and Akhmeta virus [18]. To date, the circulation of orthopoxviruses among wild and domestic animals has been recorded in different regions of the world, including South America, Africa, Europe, the Middle East, and Asia [27,40,42,43,50–57]. These facts raise concerns regarding the host ranges and distribution of orthopoxviruses, as well as their potential to cause outbreaks in animals and human populations, thereby further impacting animal and public health.

2.1. Monkeypox Virus

Monkeypox virus isolates are subdivided into two clades, namely, the West African and the Congo Basin clades, based on genetic and phenotypic (virulence) differences [58]. Notably, several studies have indicated that the clinical signs are similar between infections caused by viruses from either clades [59]. The first observation of MPXV infection was reported in 1958 during an outbreak of pustular rash illness in cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*) arriving in Copenhagen, Denmark, from Singapore [60]. Despite being named after the first described host, non-human primates are accidental hosts for MPXV [61].

Further insights into the range of taxa susceptible to MPXV infection were obtained by laboratory studies and field surveys. MPXV infections have been reported in a broad range of rodents, such as mice (*Mus musculus*), rabbits (*Oryctolagus cuniculus*), hamsters, woodchucks (*Marmota monax*), jerboas (*Jaculus* sp.), and porcupines (*Atherurus africanus*) (Table 1). Similarly, based on methods such as viral isolation, molecular assay, or experimental infection, susceptibility to MPXV infection was reported in ant-eaters (*Myrmecophaga tridactyla*), black-tailed prairie dogs (*Cynomys ludovicianus*), southern opossums (*Didelphis marsupialis*), short-tailed opossums (*Monodelphis domestica*), African hedgehogs (*Atelerix* sp.), and several non-human primate species. Additionally, serological surveys have implicated several African rodents, including giant pouched rats (*Cricetomys* spp.), African dormice (*Graphiurus* spp.), rope squirrels (*Funisciurus* spp.), and sun squirrels (*Heliosciurus* spp.) as primary orthopoxvirus hosts in Africa [61–63].

Among Old World non-human primates, cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*), sooty mangabeys (*Cercocebus atys*), orangutans (*Pongo pygmaeus*), and chimpanzees (*Pan troglodytes*) can be infected with MPXV. Among New World non-human primates [60,64–75], the common marmosets (*Callithrix jacchus*) was shown to be susceptible to MPXV infection through intravenous inoculation [76] (Table 1).

In 2003, a MPXV outbreak occurred in the United States of America (USA). Human infection was associated with direct contact with ill pet prairie dogs that were kept near to infected exotic animals imported from Ghana, West Africa [77]. This episode, as well as the infection of rodents, heightened concerns regarding the introduction of MPXV into the Americas. Meanwhile, the susceptibility of several African rodents to MPXV raised worries about the transmission of the virus to humans, as these animals are sometimes kept as pets [78,79].

Although humans are also accidental hosts [61], MPXV became the most significant pathogenic zoonotic orthopoxvirus for humans since the eradication of smallpox, given its associated morbidity (systemic infection) and lethality. The first human MPXV infection was described in 1970 for a 9-month old child in the Democratic Republic of Congo who had presented smallpox-like skin eruptions [70,80]. Several other human cases were reported in the following years. From 1970 to 1999, the WHO reported at least 404 confirmed and approximately 500 suspected human cases of monkeypox in different African countries (Central African Republic, Cameroon, Nigeria, Côte d'Ivoire, Liberia, Sierra Leone, and Gabon), but mainly in the Democratic Republic of Congo [52,81,82]. From the 2000s, alongside outbreaks in the Democratic Republic of Congo, the Republic of Congo, and South Sudan, the first human cases outside the Africa continent were also described. During May and June of 2003, cases of people with febrile illness and skin eruptions were notified to the Wisconsin Division of Public Health, but no deaths were reported and no person-to-person transmission was proven [78]. The source of this outbreak was traced back to imported infected exotic animals from Ghana [52,62,78]. Fortunately, the multi-state episode of captive rodent infection in the USA was short-lived, and the transmission cycle in the country was broken [83].

Table 1. Hosts and susceptible animals to monkeypox virus infection.

Order/Family	Species	Method of Investigation *	Association to Human Infection **
Primates/ Hominidae	Humans (<i>Homo sapiens</i>)	viral isolation	yes
	Orangutans (<i>Pongo pygmaeus</i>)	viral isolation	yes
	Chimpanzees (<i>Pan troglodytes</i>)	viral isolation	no
Primates/ Cercopitheciidae	Sooty mangabeys (<i>Cercocebus atys</i>)	PCR/ viral isolation	no
	Cynomolgus monkeys (<i>Macaca fascicularis</i>)	viral isolation	yes
Primates/ Callithricidae	White-tufted marmosets (<i>Callithrix jacchus</i>)	Lab. Infec.	no
Rodentia/ Chinchillidae	Rabbits (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	Lab. Infec.	no
Rodentia/ Muridae	Inbred mice (<i>Mus musculus</i>)	Lab. Infec.	no
Rodentia/ Cricetidae	hamsters	Lab. Infec.	no
Rodentia/ Nesomyidae	Giant-pouched rats (<i>Cricetomys</i> sp.)	PCR/ viral isolation	no
Rodentia/ Gliridae	African dormice (<i>Graphiurus</i> sp.)	PCR/ viral isolation	no
Rodentia/ Sciuridae	Rope squirrels (<i>Funisciurus</i> sp.)	PCR/ viral isolation	yes
	Black-tailed prairie dogs (<i>Cynomys ludovicianus</i>)	PCR	yes
	Woodchucks (<i>Marmota monax</i>)	PCR/ viral isolation	no
Rodentia/ Dipodidae	Jerboas (<i>Jaculus</i> sp.)	PCR/ viral isolation	no
Rodentia/ Hystricidae	Porcupines (<i>Atherurus africanus</i>)	PCR/ viral isolation	no
Pilosa/ Macroscelididae	Ant-eaters (<i>Myrmecophaga tridactyla</i>)	viral Isolation	no
Didelphimorphia/ Didelphidae	Southern opossums (<i>Didelphis marsupialis</i>)	PCR/ viral isolation	no
	Shot-tailed opossums (<i>Monodelphis domestica</i>)	PCR/ viral isolation	no
Erinaceomorpha/ Erinaceidae	African hedgehogs (<i>Atelerix</i> sp.)	PCR/ viral isolation	no

* Method of investigation: viral infection demonstrated by molecular assay (PCR) or viral isolation using samples obtained from naturally infected animals; Lab. Infec.: MPXV infection susceptibility was observed during experimental studies in laboratory. ** Transmission to humans already reported in the literature.

Alarming, several outbreaks of monkeypox in humans have been reported in African regions in the last decade. In 2010, two confirmed and eight suspected cases were described in the Republic of Congo related to the migration of refugees, regional inter-ethnic conflicts, or autochthonous cases. No deaths were reported among the confirmed cases, although one individual with suspected infection died [84]. In the same year, two cases of MPXV infection associated with hunting and the consumption of wild rodent meat were reported in the Central African Republic, with no deaths [85]. Numerous suspected and confirmed cases were reported in the Democratic Republic of Congo, from 2010 to 2016 [86,87], and in Serra Leone in 2014 [88]. Several suspected and 12 confirmed cases, as well as three deaths were reported in different provinces in the Central African Republic (Mbomou, Basse-Kotto, and Haute-Kotto) [52,89,90]. In 2017, the Republic of Congo reported its largest MPXV outbreak (88 suspected and seven confirmed cases, with six deaths), which affected 18 villages in five districts. This outbreak presented risks of MPXV spreading to neighboring countries given the extent of population mobility and refugee presence in the region [30].

Some African regions have continuously reported human cases of MPXV infection in recent years (2017 to 2020), including the Central African Republic (27 confirmed cases and two deaths) [91,92], Nigeria (181 confirmed cases and seven deaths) [31,93], Sierra Leone (one confirmed case) [94], Liberia (two confirmed cases and two deaths) [95], Cameroon (one confirmed case) [96], and the Democratic Republic of Congo (numerous confirmed cases and 321 deaths) [33,97]. Recently (2018), three cases of monkeypox were reported in the United Kingdom. Two were of people who had traveled to Nigeria, while the third concerned a health care worker who had had contact with one infected patient. One of the patients who had traveled to Nigeria reported having contact with a person with a rash and the possible consumption of bushmeat, raising the possibility that this may have been a case of secondary or even tertiary human-to-human transmission. Meanwhile, the infection contracted by the British care worker confirms human-to-human MPXV transmission [96]. Other cases of MPXV infections outside of Africa were reported in Israel (2018) and Singapore (2019), for travelers who imported the disease from Nigeria [98,99].

The natural source of MPXV and its maintenance cycle in nature remains unknown as the virus has only been isolated twice in nature (wild animals): once from the rope squirrel (*Funisciurus anerythrus*), Zaire, in 1985 [62], and once from the sooty mangabey (*Cercocebus atys*), Côte d'Ivoire, in 2012 [100]. To date, naturally occurring MPXV infections remain confined to the forest regions of West and Central Africa [101,102]. Consequently, a higher proportion of human MPXV cases are reported in regions (mainly African villages) where humans and non-human primates live in close proximity. The consumption, hunting, and handling of meat derived from non-human primates, rodents, and other small mammals have also been associated with human cases of MPXV infection [71,85,86,103–105]. Close contact with rodents has also been implicated as a source of human infection [67,106].

Human cases of monkeypox have been increasing even though they may have been underreported. Notably, diagnostic capabilities in the affected countries are most often limited, while health care workers worldwide are generally not aware of monkeypox disease. A lack of understanding about monkeypox disease associated with factors such as the increasing encroachment of humans into wild habitats, the inter-continental travel of people from endemic areas to MPXV-free regions, and the importation of animals both as pets and for laboratory studies raises concern regarding MPXV emergence, surveillance, prevention, and control [15]. Additionally, vaccination against smallpox was ceased decades ago, resulting in an increasingly larger number of people that are vulnerable to infection by MPXV or other orthopoxviruses. Although some animal species have been described as being susceptible to MPXV infection, most of what is known about its pathogenesis and clinical characteristics is derived from descriptions of animals in captivity or laboratory facilities. As monkeypox is an emerging zoonotic disease with epidemic potential and much of its host range and maintenance cycle in nature remains obscure, advances are urgently needed to better understand natural cycle of MPXV.

2.2. Cowpox Virus

Edward Jenner was the first to document CPXV infection after observing local lesions on the teats of cows, which he called “cow-pox”. Then, in 1798, Jenner demonstrated the efficacy of “true cow-pox” scarification in inducing immunity against smallpox [8,107]. There were frequent reports of bovine cowpox cases until the early 1970s in Europe, with sporadic transmission to humans, mainly milkers, occurring via contact with infected cows [108]. However, the number of bovine cowpox cases decreased, while reports of “cowpox-like” infections in several animal species, such as cats and elephants, [109] increased. “Cowpox-like” infections were described in a broad range of captive and domestic animals like non-human primates [110–112], felines [108,111,113–117], dogs [118], rodents [39,50,111,119–125], foxes [126,127], rhinoceroses [15,114,128], tapirs [129], okapis [130], horses [131], anteaters [114], mongooses [129], stone martens [132], bearcats [133], and farmed llamas [134,135] (Table 2). The viruses responsible for these infections induced clinical signs similar to those of CPXV infection such as hemorrhagic pox on the chorioal-

lantoic membrane and A-type inclusions bodies, and were thus considered to be “true cowpox” [136,137]. Most of these animals are thought to be accidental hosts for CPXV, and not reservoirs. Rodents, particularly voles (*Microtus* spp. and *Myodes* spp.), are known to be the primary CPXV reservoirs in nature [136,138].

Table 2. Hosts and susceptible animals to cowpox virus infection.

Order/Family	Species	Method of Investigation *	Association to Human Infection **
Primates/ <i>Hominidae</i>	Humans (<i>Homo sapiens</i>)	virus isolation	no
Primates/ <i>Callithrichidae</i>	White-tufted marmosets (<i>Callithrix jacchus</i>)	virus isolation	no
Primates/ <i>Cercopithecidae</i>	Barbary macaques (<i>Macaca sylvanus</i>)	virus isolation	no
	Cynomolgus macaques (<i>Macaca fascicularis</i>)	Lab. Infec.	no
	Rhesus macaques (<i>Macaca mulata</i>)	Lab. Infec.	no
Carnivora/ <i>Felidae</i>	Domestic cats (<i>Felis catus</i>)	virus isolation	yes
	Cheetahs (<i>Acinonyx jubatus</i>)	virus isolation	yes
	Lions (<i>Panthera leo</i>)	virus isolation	no
	Pumas (<i>Felis concolor</i>)	virus isolation	no
	Black panthers (<i>Panthera pardus</i>)	virus isolation	no
	Jaguarundis (<i>Herpailurus yagouaroundi</i>)	virus isolation	no
	Jaguars (<i>Felis onca</i>)	virus isolation	no
Carnivora/ <i>Canidae</i>	Dogs (<i>Canis lupus familiaris</i>)	virus isolation	no
	Foxes (<i>Vulpes vulpes</i>)	Lab. Infec.	no
Carnivora/ <i>Herpestidae</i>	Banded mongooses (<i>Mungos mungo</i>)	virus isolation	no
Carnivora/ <i>Ailuridae</i>	Bearcats (<i>Ailurus fulgens</i>)	virus isolation	no
Perissodactyla/ <i>Rhinocerotidae</i>	Black rhinoceros (<i>Diceros bicornis</i>)	virus isolation	no
	White rhinoceros (<i>Ceratotherium s. simum</i>)	virus isolation	no
Perissodactyla/ <i>Equidae</i>	Horses (<i>Equus caballus</i>)	virus isolation	no
Artiodactyla/ <i>Bovidae</i>	Cows (<i>Bos taurus</i>)	virus isolation	yes
Artiodactyla/ <i>Giraffidae</i>	Okapis (<i>Okapia johnstoni</i>)	virus isolation	no
Artiodactyla/ <i>Camelidae</i>	Lamas (<i>Lama glama</i> sp.)	virus isolation	no
Rodentia/ <i>Arvicolidae</i>	Field voles (<i>Microtus agrestis</i> .)	virus isolation	no
Rodentia/ <i>Muridae</i>	Brown rats (<i>Rattus norvegicus</i>)	virus isolation	yes
	Giant gerbils (<i>Rhombomys opimus</i>)	virus isolation	no
Rodentia/ <i>Cricetidae</i>	Root voles (<i>Microtus oeconomus</i>)	virus isolation	no
Rodentia/ <i>Caviidae</i>	Patagonian cavy (<i>Dolichotis patagonum</i>)	PCR	no
Rodentia/ <i>Castoridae</i>	Beavers (<i>Castor fiber canadensis</i>)	virus isolation	no
Rodentia/ <i>Sciuridae</i>	Ground squirrels (<i>Citellus fulvus</i>)	virus isolation	no
Proboscidea/ <i>Elephantidae</i>	Asian elephants (<i>Elephas maximus</i>)	virus isolation	yes
	African elephants (<i>Loxodonta africana</i>)	virus isolation	no

* Method of investigation: virus infection demonstrated by molecular assay (PCR) or viral isolation using samples obtained from naturally infected animals; Lab. Infec.: CPXV infection susceptibility was observed during experimental studies in laboratory. ** Transmission to humans already reported in the literature.

CPXV is currently mostly found in Europe and northern and central Asia where cases of infections in rodents, cats, and humans continue to be reported. In Great Britain, CPXV is endemic in rodents such as bank voles (*Myodes glareolus*) and wood mice (*Apodemus sylvaticus*), while in Turkmenistan and Russia CPXV was isolated in the laboratory as well as in wild rodents [119]. Furthermore, serological surveys have also detected orthopoxvirus infections in France, Austria, and Norway in voles and wood mice [119]. Antibodies against orthopoxviruses were also detected in red foxes (*Vulpes vulpes*) in Western Europe being possibly related to CPXV infection, although red foxes are also known to be susceptible

to ectromelia virus [119,139]. These reports of CPXV infection have occurred alongside an increasing number of reported infections in different animal species, leading to the designation of CPXV as an emerging health threat [140]. The first reported case of CPXV in a domestic cat occurred in 1977 in the Netherlands, and the number of CPXV infections in cats has since increased. According to Essbauer and collaborators (2010), more than 400 cases of CPXV infections in domestic cats were described in Western Eurasia until 2004 [15]. In cats, CPXV infection causes multiple skin lesions on the head, neck, forelimb, paws, and eyes (conjunctivitis), and the appearance of vesicles in the oral cavity and tongue. In the most severe cases, the disease can be systemic, affecting inner organs (mainly the lungs), with fatal outcomes being mostly associated with secondary bacterial infection [141]. Cats are the most affected domestic animals, mainly due to their predatory behavior against rodents, which are the CPXV reservoir in domestic and peridomestic environments [15,141–144]. However, the exact prevalence of feline cowpox is uncertain. CPXV infections in cats are mostly observed after increases in the rat population density [15,144].

The infection of pet rats and domestic cats by CPXV brings a higher risk of exposure to humans in the domestic environment, but rural or wild areas may be important as the source of infection [36]. Cowpox in humans is mainly caused by contact with infected domestic cats or rodents (such as *Rattus norvegicus*) that are kept as pets [15,34,37,38,121]. Even though human cowpox cases are usually self-limiting and not lethal, most people are susceptible to the disease, particularly children who are more often in close contact with pet animals [37,121]. The zoonotic potential of CPXV and its capacity to cause infection in wild and domestic environments are well established; however, many aspects of its natural maintenance cycle remains unknown. Besides the domestic animals, CPXV has a vast range of hosts and the increase in the breeding and commercialization of exotic animals raises concerns among health authorities regarding the emergence of cowpox, including in new geographical regions.

2.3. Vaccinia Virus and Related Viruses

Although VACV is the most extensively studied orthopoxvirus, its origin remains unknown [145]. *Vaccinia virus*, the prototype species of the *Orthopoxvirus* genus, is best known as the live attenuated virus used worldwide by the WHO in the smallpox vaccine [146–148]. Despite the successful use of VACV as a vaccine, several vaccine strain-dependent complications have been reported, including progressive vaccinia, eczema vaccinatum, vaccinia gangraenousum, and neurological complications [145,149]. During smallpox eradication campaigns, various VACV strains with different degrees of virulence were used. The highly attenuated and modified VACV Ankara is a well-established third generation smallpox vaccine [150,151]. For a long time, VACV vaccine strains were assumed to be incapable of establishing a natural cycle due to their attenuation in the laboratory. However, several VACVs have been isolated from different host species, and in different locations around the world [42,152–154]. Similarly, sub-lineages of VACV (as buffalopox virus (BPXV) and rabbitpox virus (RPXV)) have been consistently isolated in different countries and from a wide range of hosts [14–16,43,53,155].

In India, BPXV was first described in 1934, and was responsible for infections that mainly affected domestic buffaloes (*Bubalus bubalis*), but also cows and humans [155]. BPXV resembles VACV in terms of its properties (size, shape, structure, and physicochemical properties) [156], pathogenesis, and pathology. Phylogenetic analyses confirmed the monophyly of the BPXV and its likely origin from the VACV Lister vaccine [155–159]. Since its first description, outbreaks of BPXV have been reported in India, Pakistan, Nepal, Egypt, Bangladesh, Indonesia, Russia, and Italy [15,43,53,160–162].

Humans become infected with BPXV through close contact with infected animals and no human-to-human transmission has been reported to date. In 2004–2005, a nosocomial outbreak in humans occurred in Pakistan, and the source of infection was traced to buffalo fat used as a first-aid medication for covering skin burns. This unusual source of infection was indicative of indirect BPXV transmission [14,163]. Additionally, a variety of animal

species, such guinea pigs, BALB and white Swiss mice, cows, buffalo calves, rabbits, and chickens have been experimentally demonstrated to be susceptible to BPXV. Nevertheless, the role of these species in BPXV transmission and maintenance in nature remains unknown [44,164] and requires clarification.

RPXV is another VACV described as affecting different animal species worldwide (Table 3). RPXV was first described between 1930–1933 after outbreaks in laboratory rabbits in the USA. Additional outbreaks were later reported in 1941 in the Netherlands, while several other cases were also reported in Europe and the USA [165,166]. To date, no human transmission has been described for RPXV [165,167].

Table 3. Hosts and susceptible animals to vaccinia and vaccinia-like viruses infection.

Order/Family	Species	Method of Investigation *	Association to Human Infection **
Artiodactyla/Bovidae	domestic buffaloes (<i>Bubalus bubalis</i>)	PCR/ Viral isolation	yes
Artiodactyla/Bovidae	cattle/cows (<i>Bos taurus</i>)	PCR/ Viral isolation	yes
Primates/Hominidae	Humans (<i>Homo sapiens</i>)	PCR/ Viral isolation	yes
Primates/Cebidae	Capuchin monkeys (<i>Sapajus apella</i>)	PCR	no
Primates/Atelidae	Black-howler monkeys (<i>Alouatta caraya</i>)	PCR	no
Didelphimorphia/Didelphidae	Black-eared possums (<i>Didelphis aurita</i>)	PCR	no
	White-eared possums (<i>Didelphis albiventris</i>)	PCR	no
	Woolly-cuycas (<i>Caluromys philander</i>)	PCR	no
Carnivora/Procyonidae	Ring-tailed coatis (<i>Nasua nasua</i>)	PCR	no
Carnivora/Felidae	Domestic cats (<i>Felis catus</i>)	PCR	no
Carnivora/Canidae	Domestic dogs (<i>Canis familiaris</i>)	PCR	no
Cingulata/Chlamyphoridae	Armadillos (<i>Euphractus sexcintus</i>)	PCR	no
Perissodactyla/Equidae	Horses (<i>Equus ferus caballus</i>)	PCR/ Viral isolation	yes
	Donkeys (<i>Equus africanus</i> sp.)	PCR	yes
	Mules (<i>Equus mulus</i>)	PCR	yes
Chiroptera/Molossidae	Black-molossus bats (<i>Molossus rufus</i>)	PCR	no
	Broad-eared bats (<i>Eumops perotis</i>)	PCR	no
Lagomorpha/Leporidae	Rabbits ⁺	PCR	yes
Rodentia/Cricetidae	(<i>Oryzomys</i> spp.)	PCR/ Viral isolation	no
	Black-footed colilargos (<i>Oligoryzomys nigripes</i>)	PCR	no
	Yellow pygmy rice rats (<i>Oligoryzomys flavescens</i>)	PCR	no
	Rat-headed rice rats (<i>Sooretamys angouya</i>)	PCR	no
	Vesper mice (<i>Calomys</i> spp.)	PCR	no
	Grass mice (<i>Akodon</i> spp.)	PCR	no
	Hairy-tailed Bolo Mice (<i>Necomys lasiurus</i>)	PCR	no
	Bush mice (<i>Cerradomys subflavus</i>)	PCR	no
Rodentia/Echimyidae	Hairy Atlantic spiny rats (<i>Trinomys setosus</i>)	PCR	no
Rodentia/Muridae	Inbred-mice (<i>Mus musculus</i>)	PCR/ Viral isolation	yes
	Black-mice (<i>Rattus rattus</i>)	PCR	no
Rodentia/Caviidae	Capybaras (<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>)	PCR	no

* Method of investigation: viral infection demonstrated by molecular assay (PCR) or viral isolation using samples obtained from naturally infected animals; Lab. Infec.: VACV infection susceptibility was observed during experimental studies in laboratory. ** Transmission to humans already reported in the literature. ⁺ Human infection from occupational exposure to rabbit skins inoculated with VACV.

Different VACV isolates also circulate in South American countries, including Uruguay, Argentina, Colombia, and Brazil [54–56,168]. In the last few decades, several outbreaks of VACV infection have occurred in Brazil where the disease caused by VACV is popularly known as “bovine vaccinia”, due to its association with dairy cattle [42,168]. Bovine vaccinia is characterized by vesiculopustular exanthematous disease in cattle, and dairy workers who have direct contact with infected animals [169–171].

Since the detection of VACV in rural areas in Southeast Brazil, in 1999, several Brazilian-VACV (Br-VACV) isolates have been identified in the country (Araçatuba virus, Belo Horizonte virus, Cantagalo virus, Carangola eye virus 1, Carangola eye virus 2, Guarani P1 virus, Guarani P2 virus, Mariana virus, Passatempo virus, Pelotas 1 virus, Pelotas 2 virus, and Serro virus) [148,169,172–175]. One hypothesis for the origin of the Br-VACVs assumes that they are derived from the spillback of a vaccine strain to the sylvatic environment [154,172], while another postulates that they may represent natural genetically and phenotypically diverse VACV populations, circulating in an unknown natural reservoir [148,152,173]. In particular, the presence or absence of an 18 nucleotide sequence within gene A56R gene (viral hemagglutinin) was proposed to be a molecular marker that can separate Br-VACVs into two distinct clades (group 1 and group 2) [176–178]. The existence of at least two clades was further confirmed through genetic and evolutionary analyses, of Br-VACVs, causing infection or co-infections in diversity of hosts in Brazil. [47,48,54–56,153,169,174,175,179–188]. In addition to the genetic diversity, some studies have also shown distinct biological profiles between the two Br-VACV groups [189,190]. The biological implications of this diversity in the context of the epidemiology and clinical evolution of the disease in humans should be further investigated.

Initially, VACV outbreaks were described as affecting dairy cattle and humans in rural environments. Consequently, the epidemiology of bovine vaccinia in Brazil is associated with economic losses resulting from compromised milking herds [42,171,191,192]. In Brazil, bovine vaccinia have been mainly reported in the Southeast (Minas Gerais State), which has the largest dairy cattle herds in the country [42,148]. Nevertheless, VACV circulation in Brazil has already been documented for all the regions, affecting farm animals other than cattle, as well as wild animals [42]. Consistent with its wide geographical occurrence in Brazil, VACV has been detected in different biomes and related fauna. VACV genomes and antibodies against orthopoxviruses have been detected in a broad range of animals including non-human primates (*Sapajus apella* and *Alouatta caraya*) [193]; procynoides (*Didelphis aurita*, *Didelphis albiventris*, and *Nasua nasua*) [188,194]; cingulates (*Euphractus sexcinctus*) [185]; marsupials (*Didelphis* sp. and *Caluromys philander*) [153,194]; bats (*Molossus rufus* and *Eumops perotis*) [185]; and wild rodents (*Oligoryzomys nigripes*, *Oligoryzomys flavescens*, *Sooretamys angouya*, *Calomys* sp., *Akodon* sp., *Necromys lasiurus*, *Necromys squamipes*, *Trinomys setosu*, *Cerradomys subflavus*, *Mus musculus*, *Rattus rattus*, and *Hydrochoerus hydrochaeris*) [153,180,185,195,196]. Furthermore, VACV has been detected in diverse peridomestic and domestic animals, including buffaloes [183,197,198], horses, donkeys [174,181,182,195], pigs [195], cows [195], dogs [188], cats [179], and mice [184] (Table 2).

Although direct VACV transmission between wild and domestic animals and between wild animals and humans has not been documented to date, these possibilities cannot be excluded. Several studies have indicated that cattle have a role as amplifiers in the bovine vaccinia cycle and have also demonstrated that VACV excretion in feces may favor viral transmission and its maintenance in the environment [170,199–201]. Subsequently, it was proposed that other farm animals could also be implicated in the VACV transmission chain, although direct transmission to humans has yet to be documented. Lastly, wild rodents could be VACV reservoirs, while peridomestic rodents could act as the link for VACV spread between wild and rural environments, promoting the transmission among wild mammals and farm animals [183,184].

Although VACV is known to have a broad range of hosts, many aspects of its natural history remain unknown. Bovine vaccinia is mainly caused by contact with infected cattle

and is associated with economic losses to the dairy industry in Asia and South America [42,43,45,53,148]; however, the epidemic potential of VACV is a reality. Although VACV infection is usually self-limiting and not lethal, the disease profile in immunocompromised individuals may be differentially affected, presenting with severe and generalized manifestation [202], similar to that observed for cowpox. As currently documented for VACV, until the 1970s, CPXV mainly infected cattle and milkers. However, when cattle were replaced by cats and other animals as the primary hosts of CPXV infection, the number of human cases of CPXV infection increased. Given the similarities with CPXV, it is plausible that VACV could follow similar path. Although farm animals are important sources of infection, the commercialization and consumption of dairy products could be alternative routes of zoonotic VACV transmission. In addition, VACV circulation in domestic animals such as cats and dogs bring the risk of viral transmission to humans in the domestic environment. The urban emergence of VACV could be an important health burden due to the unpreparedness of healthcare professionals to correctly identify and handle emerging cases [203]. Moreover, VACV infection presents a high attack rate, and VACV emerging cases in an urban area, where agglomeration of people is more frequent, could favor transmission, and trigger a public health emergency [148,204].

3. What Is Next for Monkeypox, Cowpox, and Vaccinia Viruses?

The history of poxviruses and orthopoxviruses has frequently been related to human cultural behavior. The establishment of agricultural settlements is considered one of the factors that favored the emergence of smallpox approximately 10,000 years ago. Orthopoxviruses continue to emerge and re-emerge due to the increasing proximity of humans to wild and rural habitats. Following smallpox eradication, the global scenario is marked by a vast naïve human population and the wide circulation of different orthopoxviruses. These facts raise concerns on the possible epidemic potential of these viruses in animals and humans. In fact, zoonotic orthopoxviruses already represent an important issue for animal health and economics. An example is the case of VACV and BPXV that have been associated with significant economic losses resulting from dairy cattle and livestock infection in several Asian and South American countries [42,43,53,191,192].

Currently, MPXV is mostly observed in Africa; CPXV in Europe and Asia; BPXV in Asia and the Middle East; and VACV in South America [53–56,119,140,160,162,168,205]. Although the factors that restrict the geographic distribution of some zoonotic orthopoxviruses are still unknown, their distribution range has been increasing as MPXV has been exported to parts of the USA [77], United Kingdom [96], Israel [98], and Singapore [99]. Legal or illegal trade of animals or animal-derived products, migration of animal populations, and traveling and migration of people are some factors that can contribute to the geographic dissemination of orthopoxviruses on local or global scales. Indeed, animal trade leading to the MPXV importation into the USA illustrated how globalization can favor the spatial spread of viruses [77]. On a local scale, migration of refugees within Africa is another example related to MPXV dissemination [84].

Because orthopoxviruses such as VACV, CPXV, and MPXV have genetic and phenotypic traits that allow them to possess a variety of mammal hosts [23], one cannot exclude the possibility of the virus infecting susceptible hosts in new geographical areas. These viruses are more prevalent in certain animal species, such as VACV in cattle and BPXV in buffalos. Molecular and immunological factors may be associated with productive infections in these animals while ecological factors may be linked to transmission between individuals of the same species. On the other hand, to cross host barriers and infect a new host, a virus must be able to infect and replicate in the new host, evade the immune system, and be efficiently transmitted [22]. Regardless of the remote possibility of an orthopoxvirus infecting new hosts, the current host plasticity is already notable, especially for MPXV, CPXV, and VACV. In addition, the emergence of a virus in a new host does not necessarily require evolutionary changes (mutations, rearrangements, etc.). One example

of this process is the canine distemper virus, which has a very wide host range in mammals and its emergence in these species appears to be limited primarily by contact [22].

Orthopoxvirus outbreaks are usually related to populations living in rural areas or small villages. However, factors such as a high population density, increased urbanization, agriculture activities, deforestation, approximation to wild habitats, and inter-continental travel of people from endemic to pox-free regions may introduce poxviruses into different zones including urban environments [3,206]. A primary concern related to infected animals in periurban and urbanized environments is associated with a possible increase in orthopoxvirus transmission in a naïve population and even human-to-human transmission.

The epidemic potential of a virus is related to several factors, including geographical distribution, route of transmission, pathogenicity, and host range, among others. The epidemic potential may be lower for orthopoxviruses than for other RNA viruses or viruses transmitted by airway routes. Nevertheless, orthopoxviruses are remarkable regarding their transmission and dissemination among several hosts and environments. Wild and domestic animals could act as intermediate hosts for the emergence or re-emergence of orthopoxviruses in the human population. For instance, CPXV is transmitted from wild to domestic animals and then to humans, MPXV can be transmitted directly from wild animals to humans, and VACV is transmitted from domestic animals to humans [15,42,85,86,104,144]. Zoonotic orthopoxviruses may be transmitted either directly or indirectly and new forms of viral transmission have been described, which is a concern for public health. Milk and dairy products might be a potential source of VACV exposure or transmission [191]. Even under a low transmission rate, human-to-human transmission has already been demonstrated for zoonotic orthopoxviruses (MPXV and VACV) [96,207]. These are significant findings that should be further evaluated and closely monitored.

The cessation of routine vaccination against smallpox decades ago has resulted in a large contingent of people that are susceptible to orthopoxvirus infections, which have high morbidity rates. Moreover, in immunosuppressed individuals, exposure to orthopoxvirus infection can result in severe forms of the disease, or even death [208]. To date, there have been no reports of fatalities resulting from CPXV or VACV infection; however, MPXV infection in humans can progress to a lethality of up to 10% [209]. These facts indicate that VACV, MPXV, and CPXV pose a potential threat not only for humans, but for animals in different regions of the world. Together, these factors highlight the need for continuous epidemiological surveillance and the need to better understand the natural cycles and evolution of orthopoxviruses, their host range and reservoirs, the burden of outbreaks and dissemination of orthopoxvirus-associated diseases. This information is crucial for the development and application of control measures such as sanitary barriers and public policies aimed at controlling these viruses.

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

Funding: This study was developed in the context of projects supported by different agencies. B.P.D., E.G.K., and G.d.S.T. were supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) (grant: Research fellowship). The authors acknowledge Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)—Finance codes CDS-APQ-01574-17 and APQ-04039-17, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and CNPq. G.D.S.T. acknowledges Centers for Disease, Control and Prevention (USA)—Finance Zoonotic Poxviruses. N.I.O.S. acknowledges CNPq (grant graduate scholarship). J.S.d.O. acknowledges CAPES—Finance code 001 (grant graduate scholarship). The funders had no role in study design, data collection, and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Acknowledgments: We thank the support of our colleagues from Laboratório de Virus-UFMG.

Conflicts of Interest: The authors declare that they have no competing interests.

References

- World Health Organization (WHO). Zoonoses. Available online: <https://www.who.int/topics/zoonoses/en/#:~:text=Azoonosisisanydisease,zoonoticinfectionsinnature> (accessed on 24 October 2020).
- Woolhouse, M.E.J.; Gowtage-Sequeria, S. Host range and emerging and reemerging pathogens. *Emerg. Infect. Dis.* **2005**. [CrossRef] [PubMed]
- Bird, B.H.; Mazet, J.A.K. Detection of Emerging Zoonotic Pathogens: An Integrated One Health Approach. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* **2018**. [CrossRef]
- Woolhouse, M.; Gaunt, E. Ecological origins of novel human pathogens. *Crit. Rev. Microbiol.* **2007**, *33*, 231–242. [CrossRef] [PubMed]
- Taylor, L.H.; Latham, S.M.; Woolhouse, M.E.J. Risk factors for human disease emergence. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **2001**. [CrossRef]
- Fenner, F. Adventures with poxviruses of vertebrates. *FEMS Microbiol. Rev.* **2000**, *24*, 123–133. [CrossRef] [PubMed]
- Moss, B. Poxviridae: The viruses and their replication. In *Fields Virology*; Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M., Griffin, D.E., Eds.; Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, USA, 2013; Volume 2, pp. 2126–2159. ISBN 9781451105636.
- Fenner, F. The Poxviruses. In *Portraits of Viruses—A History of Virology*; Gibbs, A., Ed.; Karger: Basel, Switzerland, 1988; pp. 1–23.
- Thèves, C.; Biagini, P.; Crubézy, E. The rediscovery of smallpox. *Clin. Microbiol. Infect.* **2014**, *20*, 210–218. [CrossRef] [PubMed]
- Ladnyi, I.D.; Breman, J.G. Smallpox eradication: Progress and problems. *Dev. Biol. Stand.* **1978**, *41*, 281–290.
- Damon, I.K. Poxviruses. In *Manual of Clinical Microbiology*, 10th ed.; Versalovic, J., Carroll, K., Funke, G., Jorgensen, J., Landry, M., Warnock, D., Eds.; American Society of Microbiology: Washington, DC, USA, 2011; pp. 1647–1658.
- Lefkowitz, E.J.; Wang, C.; Upton, C. Poxviruses: Past, present and future. *Virus Res.* **2006**, *117*, 105–118. [CrossRef]
- Mahy, B.W.J. An overview on the use of a viral pathogen as a bioterrorism agent: Why smallpox? *Antiviral Res.* **2003**, *57*, 1–5. [CrossRef]
- Gubser, C.; Hué, S.; Kellam, P.; Smith, G.L. Poxvirus genomes: A phylogenetic analysis. *J. Gen. Virol.* **2004**, *85*, 105–117. [CrossRef]
- Essbauer, S.; Pfeffer, M.; Meyer, H. Zoonotic poxviruses. *Vet. Microbiol.* **2010**, *140*, 229–236. [CrossRef] [PubMed]
- Shchelkunov, S.N. An Increasing Danger of Zoonotic Orthopoxvirus Infections. *PLoS Pathog.* **2013**, *9*, e1003756. [CrossRef] [PubMed]
- Khalafalla, A.I.; Abdelazim, F. Human and Dromedary Camel Infection. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **2017**, *17*, 281–284. [CrossRef]
- Vora, N.M.; Li, Y.; Ph, D.; Geleishvili, M.; Emerson, G.L.; Ph, D.; Khmaladze, E.; Maghlakelidze, G.; Navdarashvili, A. Human Infection with a Zoonotic Orthopoxvirus in the Country of Georgia. *N. Engl. J. Med.* **2016**, *372*, 1223–1230. [CrossRef] [PubMed]
- Doty, J.B.; Maghlakelidze, G.; Sikharulidze, I.; Tu, S.-L.; Morgan, C.N.; Mauldin, M.R.; Parkadze, O.; Kartskhia, N.; Turmanidze, M.; Matheny, A.M.; et al. Isolation and Characterization of Akhmeta Virus from Wild-Caught Rodents (*Apodemus* spp.) in Georgia. *J. Virol.* **2019**, *93*. [CrossRef] [PubMed]
- Reynolds, M.G.; Guagliardo, S.A.J.; Nakazawa, Y.J.; Doty, J.B.; Mauldin, M.R. Understanding orthopoxvirus host range and evolution: From the enigmatic to the usual suspects. *Curr. Opin. Virol.* **2018**, *28*, 108–115. [CrossRef]
- Woolhouse, M.E.J.; Taylor, L.H.; Haydon, D.T. Population biology of multihost pathogens. *Science* **2001**, *292*, 1109–1112. [CrossRef]
- Parrish, C.R.; Holmes, E.C.; Morens, D.M.; Park, E.-C.; Burke, D.S.; Calisher, C.H.; Laughlin, C.A.; Saif, L.J.; Daszak, P. Cross-Species Virus Transmission and the Emergence of New Epidemic Diseases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2008**. [CrossRef]
- Werden, S.J.; Rahman, M.M.; McFadden, G. Chapter 3 Poxvirus Host Range Genes. *Adv. Virus Res.* **2008**, *71*, 135–171. [CrossRef]
- Gallwitz, S.; Schutzbank, T.; Heberling, R.L.; Kalter, S.S.; Galpin, J.E. Smallpox: Residual antibody after vaccination. *J. Clin. Microbiol.* **2003**, *41*, 4068–4070. [CrossRef]
- Shchelkunov, S.N. Emergence and reemergence of smallpox: The need for development of a new generation smallpox vaccine. *Vaccine* **2011**, *29*, D49–D53. [CrossRef] [PubMed]
- Dubois, M.E.; Slifka, M.K. Retrospective analysis of monkeypox infection. *Emerg. Infect. Dis.* **2008**, *14*, 592. [CrossRef] [PubMed]
- Doshi, R.H.; Guagliardo, S.A.J.; Doty, J.B.; Babeaux, A.D.; Matheny, A.; Burgado, J.; Townsend, M.B.; Morgan, C.N.; Satheskumar, P.S.; Ndakala, N. Epidemiologic and ecologic investigations of monkeypox, Likouala Department, Republic of the Congo, 2017. *Emerg. Infect. Dis.* **2019**, *25*, 273. [CrossRef] [PubMed]
- Huhn, G.D.; Bauer, A.M.; Yorita, K.; Graham, M.B.; Sejvar, J.; Likos, A.; Damon, I.K.; Reynolds, M.G.; Kuehnert, M.J. Clinical characteristics of human monkeypox, and risk factors for severe disease. *Clin. Infect. Dis.* **2005**, *41*, 1742–1751. [CrossRef] [PubMed]
- Nakoune, E.; Lampaert, E.; Ndjapou, S.G.; Janssens, C.; Zuniga, I.; Van Herp, M.; Fongbia, J.P.; Koyazegbe, T.D.; Selekon, B.; Komoyo, G.F. A nosocomial outbreak of human monkeypox in the Central African Republic. *Open forum Infect. Dis.* **2017**, *4*, ofx168. [CrossRef]
- World Health Organization (WHO). Weekly Bulletin on Outbreaks and Other Emergencies, Week 48. 2017. Available online: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/259557/OEW482504122017.pdf?sequence=1> (accessed on 25 September 2020).
- World Health Organization (WHO). Weekly Bulletin on Outbreaks and Other Emergencies, Week 52. 2017. Available online: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/259794/OEW52-2329122017.pdf?sequence=1> (accessed on 25 September 2020).
- World Health Organization (WHO). Weekly Bulletin on Outbreaks and Other Emergencies, Week 01. 2020. Available online: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/330353/OEW01-05012020.pdf> (accessed on 26 September 2020).

33. World Health Organization (WHO). Weekly Bulletin on Outbreaks and Other Emergencies, Week 37. 2020. Available online: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/334303/OEW37-0713092020.pdf> (accessed on 26 September 2020).
34. Coras, B.; Eßbauer, S.; Pfeffer, M.; Meyer, H.; Schröder, J.; Stolz, W.; Landthaler, M.; Vogt, T. Cowpox and a cat. *Lancet* **2005**, *365*, 446. [CrossRef]
35. Ninove, L.; Domart, Y.; Vervel, C.; Voinot, C.; Salez, N.; Raoult, D.; Meyer, H.; Capek, I.; Zandotti, C.; Charrel, R.N. Cowpox virus transmission from pet rats to humans, France. *Emerg. Infect. Dis.* **2009**, *15*, 781–784. [CrossRef]
36. Popova, A.Y.; Maksyutov, R.A.; Taranov, O.S.; Tregubchak, T.V.; Zaikovskaya, A.V.; Sergeev, A.A.; Vlashchenko, I.V.; Bodnev, S.A.; Ternovoi, V.A.; Alexandrova, N.S.; et al. Cowpox in a human, Russia, 2015. *Epidemiol. Infect.* **2017**, *145*, 755–759. [CrossRef]
37. Nardin, C.; Dupond, A.S.; Pelletier, F.; Puzenat, E.; Aubin, F. Skin Lesions in a Child after Contact with a Domestic Rat. *Clin. Infect. Dis.* **2019**, *68*, 1063–1064. [CrossRef]
38. Haddadeen, C.; Van Ouwkerk, M.; Viecek, T.; Fityan, A. A case of cowpox virus infection in the UK occurring in a domestic cat and transmitted to the adult male owner. *Br. J. Dermatol.* **2020**, *193*, 19319. [CrossRef]
39. Wolfs, T.F.W.; Wagenaar, J.A.; Niesters, H.G.M.; Osterhaus, A.D.M.E. Rat-to-human transmission of cowpox infection. *Emerg. Infect. Dis.* **2002**, *8*, 1495. [CrossRef]
40. Ducournau, C.; Ferrier-Rembert, A.; Ferraris, O.; Joffre, A.; Favier, A.-L.; Flusin, O.; Van Cauteren, D.; Kecir, K.; Auburtin, B.; Védy, S. Concomitant human infections with 2 cowpox virus strains in related cases, France, 2011. *Emerg. Infect. Dis.* **2013**, *19*, 1996. [CrossRef] [PubMed]
41. Vogel, S.; Sárdy, M.; Glos, K.; Korting, H.C.; Ruzicka, T.; Wollenberg, A. The Munich outbreak of cutaneous cowpox infection: Transmission by infected pet rats. *Acta Derm. Venereol.* **2012**, *92*, 126–131. [CrossRef] [PubMed]
42. de Oliveira, J.S.; Figueiredo, P.d.O.; Costa, G.B.; De Assis, F.L.; Drumond, B.P.; Da Fonseca, F.G.; Nogueira, M.L.; Kroon, E.G.; de Souza Trindade, G. Vaccinia virus natural infections in Brazil: The good, the bad, and the ugly. *Viruses* **2017**, *9*. [CrossRef] [PubMed]
43. Venkatesan, G.; Balamurugan, V.; Prabhu, M.; Yogisharadhya, R.; Bora, D.P.; Gandhale, P.N.; Sankar, M.S.; Kulkarni, A.M.; Singh, R.K.; Bhanuprakash, V. Emerging and re-emerging zoonotic buffalopox infection: A severe outbreak in Kolhapur (Maharashtra), India. *Vet Ital* **2010**, *46*, 439–448. [PubMed]
44. Singh, R.K.; Hosamani, M.; Balamurugan, V.; Bhanuprakash, V.; Rasool, T.J.; Yadav, M.P. Buffalopox: An emerging and re-emerging zoonosis. *Anim. Heal. Res. Rev.* **2007**, *8*, 105. [CrossRef] [PubMed]
45. Gurav, Y.K.; Raut, C.G.; Yadav, P.D.; Tandale, B.V.; Sivaram, A.; Pore, M.D.; Basu, A.; Mourya, D.T.; Mishra, A.C. Buffalopox outbreak in humans and animals in Western Maharashtra, India. *Prev. Vet. Med.* **2011**, *100*, 242–247. [CrossRef]
46. Silva-Fernandes, A.T.; Travassos, C.E.P.F.; Ferreira, J.M.S.; Abrahão, J.S.; de Oliveira Rocha, E.S.; Viana-Ferreira, F.; dos Santos, J.R.; Bonjardim, C.A.; Ferreira, P.C.P.; Kroon, E.G. Natural human infections with Vaccinia virus during bovine vaccinia outbreaks. *J. Clin. Virol.* **2009**, *44*, 308–313. [CrossRef]
47. Nagasse-Sugahara, T.K.; Kisielius, J.J.; Ueda-Ito, M.; Curti, S.P.; Figueiredo, C.A.; Cruz, Á.S.; Silva, M.M.J.; Ramos, C.H.; Silva, M.C.C.; Sakurai, T. Human vaccinia-like virus outbreaks in Sao Paulo and Goias States, Brazil: Virus detection, isolation and identification. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* **2004**, *46*, 315–322. [CrossRef]
48. Abrahão, J.S.; Campos, R.K.; Trindade, G.S.; da Fonseca, F.G.; Ferreira, P.C.P.; Kroon, E.G. Outbreak of severe zoonotic vaccinia virus infection, Southeastern Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* **2015**, *21*, 695–698. [CrossRef]
49. Oliveira, D.B.; Assis, F.L.; Ferreira, P.C.P.; Bonjardim, C.A.; de Souza Trindade, G.; Kroon, E.G.; Abrahão, J.S. Group 1 vaccinia virus zoonotic outbreak in Maranhão State, Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2013**, *89*, 1142–1145. [CrossRef] [PubMed]
50. Becker, C.; Kurth, A.; Hessler, F.; Kramp, H.; Gokel, M.; Hoffmann, R.; Kuczka, A.; Nitsche, A. Cowpox virus infection in pet rat owners: Not always immediately recognized. *Dtsch. Arztebl. Int.* **2009**, *106*, 329. [CrossRef]
51. Lu, B.; Cui, L.-B.; Gu, M.-H.; Shi, C.; Sun, C.-W.; Zhao, K.-C.; Bi, J.; Tan, Z.-M.; Guo, X.-L.; Huo, X. Outbreak of Vaccinia Virus Infection from Occupational Exposure, China, 2017. *Emerg. Infect. Dis.* **2019**, *25*, 1192. [CrossRef] [PubMed]
52. Sklenovská, N.; Van Ranst, M. Emergence of Monkeypox as the Most Important Orthopoxvirus Infection in Humans. *Front. Public Heal.* **2018**, *6*, 1–12. [CrossRef] [PubMed]
53. Singh, R.K.; Balamurugan, V.; Bhanuprakash, V.; Venkatesan, G.; Hosamani, M. Emergence and reemergence of vaccinia-like viruses: Global scenario and perspectives. *Indian J. Virol.* **2012**, *23*, 1–11. [CrossRef] [PubMed]
54. Franco-Luiz, A.P.M.; Fagundes-Pereira, A.; Costa, G.B.; Alves, P.A.; Oliveira, D.B.; Bonjardim, C.A.; Ferreira, P.C.P.; de Souza Trindade, G.; Panei, C.J.; Galosi, C.M. Spread of vaccinia virus to cattle herds, Argentina, 2011. *Emerg. Infect. Dis.* **2014**, *20*, 1576. [CrossRef] [PubMed]
55. Franco-Luiz, A.P.M.; Oliveira, D.B.; Pereira, A.F.; Gasparini, M.C.S.; Bonjardim, C.A.; Ferreira, P.C.P.; de Souza Trindade, G.; Puentes, R.; Furtado, A.; Abrahão, J.S. Detection of vaccinia virus in dairy cattle serum samples from 2009, Uruguay. *Emerg. Infect. Dis.* **2016**, *22*, 2174. [CrossRef]
56. Usme-Ciro, J.A.; Paredes, A.; Walteros, D.M.; Tolosa-Pérez, E.N.; Laiton-Donato, K.; del Carmen Pinzón, M.; Petersen, B.W.; Gallardo-Romero, N.F.; Li, Y.; Wilkins, K. Detection and molecular characterization of zoonotic poxviruses circulating in the Amazon region of Colombia, 2014. *Emerg. Infect. Dis.* **2017**, *23*, 649. [CrossRef]
57. Eder, I.; Vollmar, P.; Pfeffer, M.; Naether, P.; Rodloff, A.C.; Meyer, H. Two distinct clinical courses of human cowpox, Germany, 2015. *Viruses* **2017**, *9*, 375. [CrossRef]

58. Likos, A.M.; Sammons, S.A.; Olson, V.A.; Frace, A.M.; Li, Y.; Olsen-rasmussen, M.; Davidson, W.; Galloway, R.; Khristova, M.L.; Reynolds, M.G.; et al. A tale of two clades: Monkeypox viruses. *J. Gen. Virol.* **2005**, *86*, 2661–2672. [[CrossRef](#)]
59. Yinka-Ogunleye, A.; Aruna, O.; Dalhat, M.; Ogoina, D.; McCollum, A.; Disu, Y.; Mamadu, I.; Akinpelu, A.; Ahmad, A.; Burga, J.; et al. Outbreak of human monkeypox in Nigeria in 2017–18: A clinical and epidemiological report. *Lancet Infect. Dis.* **2019**, *19*, 872–879. [[CrossRef](#)]
60. von Magnus, P.; Andersen, E.K.; Petersen, K.B.; Birch-Andersen, A. A pox-like disease in cynomolgus monkeys. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* **1959**, *46*, 156–176. [[CrossRef](#)]
61. Parker, S.; Nuara, A.; Schultz, D.A. Human monkeypox: An emerging zoonotic disease. *Future Microbiol.* **2007**, *2*, 17–34. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Khodakevich, L.; Ježek, Z.; Kinzanzka, K. Isolation of monkeypox virus from wild squirrel infected in nature. *Isol. Monkeypox Virus Wild Squirrel Infected Nat.* **1986**, 98–99. [[CrossRef](#)]
63. Doty, J.B.; Malekani, J.M.; Kalembe, L.N.; Stanley, W.T.; Monroe, B.P.; Nakazawa, Y.U.; Id, M.R.M.; Bakambana, L.; Liyandja, T.; Liyandja, D.; et al. Assessing Monkeypox Virus Prevalence in Small Mammals at the Human—Animal Interface in the Democratic Republic of the Congo. *Viruses* **2017**, *9*, 1–13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Wachtman, L.; Mansfield, K. Viral diseases of nonhuman primates. *Nonhum. Primates Biomed. Res.* **2012**, *1*. [[CrossRef](#)]
65. Ellis, C.K.; Carroll, D.S.; Lash, R.R.; Townsend Peterson, A.; Damon, I.K.; Malekani, J.; Formenty, P. Ecology and geography of human monkeypox case occurrences across Africa. *J. Wildl. Dis.* **2012**, *48*, 335–347. [[CrossRef](#)]
66. Reynolds, M.G.; Carroll, D.S.; Olson, V.A.; Hughes, C.; Galley, J.; Likos, A.; Montgomery, J.M.; Suu-Ire, R.; Kwasi, M.O.; Root, J.J.; et al. A silent enzootic of an orthopoxvirus in Ghana, West Africa: Evidence for multi-species involvement in the absence of widespread human disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2010**. [[CrossRef](#)]
67. Fuller, T.; Thomassen, H.A.; Mulembakani, P.M.; Johnston, S.C.; Lloyd-Smith, J.O.; Kisalu, N.K.; Lutete, T.K.; Blumberg, S.; Fair, J.N.; Wolfe, N.D.; et al. Using remote sensing to map the risk of human monkeypox virus in the Congo basin. *Ecohealth* **2011**, *8*, 14–25. [[CrossRef](#)]
68. Peters, J.C. An epizootic of monkey pox at Rotterdam Zoo. *Int. Zoo Yearb.* **1966**, *6*, 274–275. [[CrossRef](#)]
69. Hutin, Y.J.; Williams, R.J.; Malfait, P.; Pebody, R.; Loparev, V.N.; Ropp, S.L.; Rodriguez, M.; Knight, J.C.; Tshioko, F.K.; Khan, A.S. Outbreak of human monkeypox, Democratic Republic of Congo, 1996 to 1997. *Emerg. Infect. Dis.* **2001**, *7*, 434. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Arita, I.; Henderson, D.A. Smallpox and monkeypox in non-human primates. *Bull. World Health Organ.* **1968**, *39*, 277. [[PubMed](#)]
71. Marennikova, S.S.; Seluhina, E.M.; Mal'ceva, N.N.; Ladnyj, I.D. Poxviruses isolated from clinically ill and asymptotically infected monkeys and a chimpanzee. *Bull. World Health Organ.* **1972**, *46*, 613–620.
72. Gispén, R.; Brand Saathof, B.; Hekker, A.C. Monkeypox specific antibodies in human and simian sera from the Ivory Coast and Nigeria. *Bull. World Health Organ.* **1976**, *53*, 355–360. [[PubMed](#)]
73. Marennikova, S.S.; Seluhina, E.M. Susceptibility of some rodent species to monkeypox virus, and course of the infection. *Bull. World Health Organ.* **1976**, *53*, 13–20. [[PubMed](#)]
74. Falendysz, E.A.; Londoño-Navas, A.M.; Meteyer, C.U.; Pussini, N.; Lopera, J.G.; Osorio, J.E.; Rocke, T.E. Evaluation of monkeypox virus infection of black-tailed prairie dogs (*Cynomys ludovicianus*) using in vivo bioluminescent imaging. *J. Wildl. Dis.* **2014**, *50*, 524–536. [[CrossRef](#)]
75. Alakunle, E.; Moens, U.; Nchinda, G.; Okeke, M.I. Monkeypox Virus in Nigeria: Infection Biology, Epidemiology, and Evolution. *Viruses* **2020**, *12*, 1257. [[CrossRef](#)]
76. Mucker, E.M.; Chapman, J.; Huzella, L.M.; Huggins, J.W.; Shamblin, J.; Robinson, C.G.; Hensley, L.E. Susceptibility of marmosets (*Callithrix jacchus*) to monkeypox virus: A low dose prospective model for monkeypox and smallpox disease. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0131742. [[CrossRef](#)]
77. Reed, K.D.; Melski, J.W.; Graham, M.B.; Regnery, R.L.; Sotir, M.J.; Wegner, M.V.; Kazmierczak, J.J.; Stratman, E.J.; Li, Y.; Fairley, J.A.; et al. The Detection of Monkeypox in Humans in the Western Hemisphere. *N. Engl. J. Med.* **2004**, *350*, 342–350. [[CrossRef](#)]
78. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Update: Multistate Outbreak of Monkeypox—Illinois, Indiana, Missouri, Ohio, and Wisconsin. 2003. Available online: <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5227a5.htm> (accessed on 26 September 2020).
79. Sklenovská, N. Monkeypox Virus. In *Animal-Origin Viral Zoonoses—Livestock Diseases and Management*; Malik, Y.S., Singh, R.K., Kuldeep, D., Eds.; Springer: Singapore, 2020; pp. 39–68.
80. Ladnyj, I.D.; Ziegler, P.; Kima, E. A human infection caused by monkeypox virus in Basankusu Territory, Democratic Republic of the Congo. *Bull. World Health Organ.* **1972**, *46*, 593.
81. Heymann, D.L.; Szczeniowski, M.; Esteves, K. Re-emergence of monkeypox in Africa: A review of the past six years. *Br. Med. Bull.* **1998**, *54*, 693–702. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. World Health Organization. Human monkeypox in Kasai Oriental, Democratic Republic of the Congo (former Zaire): Preliminary report of October, 1997 investigation. *Wkly Epidemiol Rec.* **1997**, *72*, 369–372.
83. Petersen, E.; Kantele, A.; Koopmans, M.; Asogun, D.; Yinka-Ogunleye, A.; Ihekweazu, C.; Zumla, A. Human Monkeypox: Epidemiologic and Clinical Characteristics, Diagnosis, and Prevention. *Infect. Dis. Clin. N. Am.* **2019**, *33*, 1027–1043. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

84. Reynolds, M.G.; Emerson, G.L.; Pukuta, E.; Karhemere, S.; Muyembe, J.J.; Bikindou, A.; McCollum, A.M.; Moses, C.; Wilkins, K.; Zhao, H.; et al. Short report: Detection of human monkeypox in the Republic of the Congo following intensive community education. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2013**, *88*, 982–985. [CrossRef]
85. Berthet, N.; Nakouné, E.; Whist, E.; Selekon, B.; Burguire, A.M.; Manuguerra, J.C.; Gessain, A.; Kazanji, M. Maculopapular lesions in the Central African Republic. *Lancet* **2011**, *378*, 1354. [CrossRef]
86. McCollum, A.M.; Nakazawa, Y.; Ndongala, G.M.; Pukuta, E.; Karhemere, S.; Lushima, R.S.; Ilunga, B.K.; Kabamba, J.; Wilkins, K.; Gao, J.; et al. Case report: Human monkeypox in the kivus, a conflict region of the Democratic Republic of the Congo. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2015**, *93*, 718–721. [CrossRef]
87. Mwamba, D.K.; Kebela, B.I.; Shongo, R.L.; Pukuta, E.; Kayembe, N.J.M. Profil épidémiologique du monkeypox en RDC, 2010–2014. *Ann. African Med.* **2014**, *8*, 1855–1860.
88. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). About Monkeypox. Available online: <https://www.cdc.gov/poxvirus/monkeypox/about.html> (accessed on 24 September 2020).
89. Kalthan, E.; Dondo-Fongbia, J.P.; Yambele, S.; Dieu-Creer, L.R.; Zepio, R.; Pamatika, C.M. Twelve cases of monkeypox virus outbreak in Bangassou District (Central African Republic) in December 2015. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* **2016**, *109*, 358–363. [CrossRef]
90. World Health Organization (WHO). Monkeypox in Central African Republic. Available online: <https://www.who.int/csr/don/13-october-2016-monkeypox-caf/en/> (accessed on 25 September 2020).
91. World Health Organization (WHO). Weekly Bulletin on Outbreaks and Other Emergencies, Week 35. 2017. Available online: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/258888/OEW35-268192017.pdf?sequence=1> (accessed on 25 September 2020).
92. World Health Organization (WHO). Weekly Bulletin on Outbreaks and Other Emergencies, Week 22. 2019. Available online: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/325086/OEW22-270502062019.pdf> (accessed on 25 September 2020).
93. World Health Organization (WHO). Weekly Bulletin on Outbreaks and Other Emergencies, Week 11. 2020. Available online: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/331451/OEW11-0915032020.pdf> (accessed on 25 September 2020).
94. World Health Organization (WHO). Weekly Bulletin on Outbreaks and Other Emergencies, Week 21. 2017. Available online: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/255579/OEW21-202652017.pdf?sequence=1> (accessed on 25 September 2020).
95. World Health Organization (WHO). Weekly Bulletin on Outbreaks and Other Emergencies, Week 08. 2018. Available online: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/260335/OEW8-1723022018.pdf?sequence=1> (accessed on 26 September 2020).
96. World Health Organization (WHO). Weekly Bulletin on Outbreaks and Other Emergencies, Week 39. 2018. Available online: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/275136/OEW39-2228092018.pdf> (accessed on 26 September 2020).
97. World Health Organization (WHO). Weekly Bulletin on Outbreaks and Other Emergencies, Week 01. 2018. Available online: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/278952/OEW01-29122018-04012019.pdf?sequence=1&isAllowed=y> (accessed on 26 September 2020).
98. Ministry of Health, State of Israel—Monkeypox Patient Diagnosed. Available online: https://www.health.gov.il/English/News_and_Events/Spokespersons_Messages/Pages/12102018_1.aspx (accessed on 29 September 2020).
99. Mauldin, M.R.; Mccollum, A.M.; Nakazawa, Y.J.; Mandra, A.; Whitehouse, E.R.; Davidson, W.; Zhao, H.; Gao, J.; Li, Y.; Doty, J.; et al. Exportation of Monkeypox Virus From the African Continent. *J. Infect. Dis.* **2020**, 1–10. [CrossRef]
100. Radonić, A.; Metzger, S.; Dabrowski, P.W.; Couacy-Hymann, E.; Schuenadel, L.; Kurth, A.; Mätz-Rensing, K.; Boesch, C.; Leendertz, F.H.; Nitsche, A. Fatal monkeypox in wild-living sooty mangabey, Côte d’Ivoire, 2012. *Emerg. Infect. Dis.* **2014**, *20*, 1009–1011. [CrossRef]
101. Ligon, B.L. Monkeypox: A review of the history and emergence in the Western hemisphere. *Semin. Pediatr. Infect. Dis.* **2004**, *15*, 280–287. [CrossRef] [PubMed]
102. Hutson, C.L.; Lee, K.N.; Abel, J.; Carroll, D.S.; Montgomery, J.M.; Olson, V.A.; Li, Y.; Davidson, W.; Hughes, C.; Dillon, M.; et al. Monkeypox zoonotic associations: Insights from laboratory evaluation of animals associated with the multi-state US outbreak. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2007**, *76*, 757–768. [CrossRef] [PubMed]
103. Ježek, Z.; Grab, B.; Szczeniowski, M.; Paluku, K.M.; Mutombo, M. Clinico-epidemiological features of monkeypox patients with an animal or human source of infection. *Bull. World Health Organ.* **1988**, *66*, 459. [PubMed]
104. Kalthan, E.; Tenguere, J.; Ndjapou, S.G.; Koyazengbe, T.A.; Mbomba, J.; Marada, R.M.; Rombebe, P.; Yangueme, P.; Babamingui, M.; Sambella, A.; et al. Investigation of an outbreak of monkeypox in an area occupied by armed groups, Central African Republic. *Med. Mal. Infect.* **2018**, *48*, 263–268. [CrossRef]
105. Laudisoit, A.; Baelo, P.; Mussaw Awazi, M.; VanHoutte, N.; VanHees, M.; Amundala, N.; Leirs, H. Biodiversity, Bushmeat and Monkeypox in the Democratic Republic of the Congo: Another viral threat upon larger cities? *Trop. Med. Int. Heal.* **2015**, *1*, 30–31.
106. Kabuga, A.I.; El Zowalaty, M.E. A review of the monkeypox virus and a recent outbreak of skin rash disease in Nigeria. *J. Med. Virol.* **2019**, *91*, 533–540. [CrossRef]
107. Mauldin, M.R.; Antwerpen, M.; Emerson, G.L.; Li, Y.; Zoeller, G.; Carroll, D.S.; Meyer, H. Cowpox virus: What’s in a name? *Viruses* **2017**, *9*, 1–15. [CrossRef]
108. Baxby, D.; Bennett, M. Cowpox: A re-evaluation of the risks of human cowpox based on new epidemiological information. *Arch. Virol. Suppl.* **1997**, *13*, 1–12. [CrossRef]
109. Gehring, H.; Mahnel, H.; Mayer, H. Kurze Mitteilungen: Elefantepocken. *Zent. Veterinärmedizin Reihe B* **1972**. [CrossRef]
110. Mätz-Rensing, K.; Ellerbrok, H.; Ehlers, B.; Pauli, G.; Floto, A.; Alex, M.; Czerny, C.P.; Kaup, F.J. Fatal poxvirus outbreak in a colony of New World Monkeys. *Vet. Pathol.* **2006**, *43*, 212–218. [CrossRef]

111. Martina, B.E.E.; Van Doornum, G.; Dorrestein, G.M.; Niesters, H.G.M.; Stittelaar, K.J.; Wolters, M.A.B.I.; Van Bolhuis, H.G.H.; Osterhaus, A.D.M.E. Cowpox virus transmission from rats to monkeys, the Netherlands. *Emerg. Infect. Dis.* **2006**, *12*, 1005–1007. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
112. Girling, S.J.; Pizzi, R.; Cox, A.; Beard, P.M. Fatal cowpox virus infection in two squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). *Vet. Rec.* **2011**, *169*, 156. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. Baxby, D.; Jones, D.M.; Ashton, D.G.; Thomsett, L.R. An outbreak of cowpox in captive cheetahs: Virological and epidemiological studies. *J. Hyg.* **1982**, *89*, 365–372. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
114. Marennikova, S.S.; Maltseva, N.N.; Korneeva, V.I.; Garanina, N.M. Outbreak of pox disease among carnivora (Felidae) and edentata. *J. Infect. Dis.* **1977**, *135*, 358–366. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
115. Willemse, A.; Egberink, H.F. Transmission of cowpox virus infection from domestic cat to man. *Lancet* **1985**, *325*, 1515. [[CrossRef](#)]
116. Tryland, M.; Sandvik, T.; Hansen, H.; Haukenes, G.; Holtet, L.; Bennett, M.; Mehl, R.; Moens, U.; Olsvik, Ø.; Traavik, T. Characteristics of four cowpox virus isolates from Norway and Sweden. *APMIS* **1998**. [[CrossRef](#)]
117. Tryland, M.; Okeke, M.I.; af Segerstad, C.H.; Mörner, T.; Traavik, T.; Ryser-Degiorgis, M.P. Orthopoxvirus DNA in Eurasian Lynx, Sweden. *Emerg. Infect. Dis.* **2011**, *17*, 626–632. [[CrossRef](#)]
118. Smith, K.C.; Bennett, M.; Garrett, D.C. Skin lesions caused by orthopoxvirus infection in a dog. *J. Small Anim. Pract.* **1999**. [[CrossRef](#)]
119. Chantrey, J.; Meyer, H.; Baxby, D.; Begon, M.; Bown, K.J.; Hazel, S.M.; Jones, T.; Montgomery, W.I.; Bennett, M. Cowpox: Reservoir hosts and geographic range. *Epidemiol. Infect.* **1999**, *122*, 455–460. [[CrossRef](#)]
120. Hazel, S.M.; Bennett, M.; Chantrey, J.; Bown, K.; Cavanagh, R.; Jones, T.R.; Baxby, D.; Begon, M. A longitudinal study of an endemic disease in its wildlife reservoir: Cowpox and wild rodents. *Epidemiol. Infect.* **2000**, *124*, 551–562. [[CrossRef](#)]
121. Campe, H.; Zimmermann, P.; Glos, K.; Bayer, M.; Bergemann, H.; Dreweck, C.; Graf, P.; Weber, B.K.; Meyer, H.; Büttner, M.; et al. Cowpox virus transmission from Pet Rats to humans, Germany. *Emerg. Infect. Dis.* **2009**, *15*, 777–780. [[CrossRef](#)]
122. Marennikova, S.S.; Ladnyj, I.D.; Ogorodnikova, Z.I.; Shelukhina, E.M.; Maltseva, N.N. Identification and study of a poxvirus isolated from wild rodents in Turkmenia. *Arch. Virol.* **1978**, *56*, 7–14. [[CrossRef](#)]
123. Essbauer, S.; Hartnack, S.; Misztela, K.; Kießling-Tsalos, J. Patterns of Orthopox Virus Wild Rodent Host in South Germany. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **2009**, *9*, 301–311. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
124. Sandvik, T.; Tryland, M.; Hansen, H.; Mehl, R.; Moens, U.; Olsvik, Ø.; Traavik, T. Naturally occurring orthopoxviruses: Potential for recombination with vaccine vectors. *J. Clin. Microbiol.* **1998**, *36*, 2542–2547. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
125. Kik, M.J.L.; Liu, P.L.; Van Asten, J.A.M. Cowpoxvirus infection in the Patagonian cavy (*Dolichotis patagonum*) emerging disease in an educational animal park the first reported case. *Vet. Q.* **2006**, *28*, 42–44. [[CrossRef](#)]
126. Tryland, M.; Sandvik, T.; Arnemo, J.M.; Stuve, G.; Olsvik, Ø.; Traavik, T. Antibodies against orthopoxviruses in wild carnivores from Fennoscandia. *J. Wildl. Dis.* **1998**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
127. Boulanger, D.; Brochier, B.; Crouch, A.; Bennett, M.; Gaskell, R.M.; Baxby, D.; Pastoret, P.P. Comparison of the susceptibility of the red fox (*Vulpes vulpes*) to a vaccinia-rabies recombinant virus and to cowpox virus. *Vaccine* **1995**. [[CrossRef](#)]
128. Schaller, V.K.; Pilaski, J. Pocken bei Breitmaulnashornern (*Ceratotherium s. simum*) im Zoologischen Garten Münster. *Zool. Gatten N.F.* **1979**, *49*, 169–184.
129. Kurth, A.; Straube, M.; Kucska, A.; Dunsche, A.J.; Meyer, H.; Nitsche, A. Cowpox virus outbreak in banded mongooses (*Mungos mungo*) and jaguarundis (*Herpailurus yagouaroundi*) with a time-delayed infection to humans. *PLoS ONE* **2009**, *4*, e6883. [[CrossRef](#)]
130. Zwart, P.; Gispén, R.; Peters, J.C. Cowpox in okapis *Okapia johnstoni* at Rotterdam zoo. *Br. Vet. J.* **1971**. [[CrossRef](#)]
131. Franke, A.; Kershaw, O.; Jenckel, M.; König, L.; Beer, M.; Hoffmann, B.; Hoffmann, D. Fatal cowpox virus infection in an aborted foal. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **2016**, *16*, 431–433. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
132. Wissler, J.; Pilaski, J.; Strauss, G.; Meyer, H.; Burck, G.; Truyen, U.; Rudolph, M.; Frölich, K. Cowpox virus infection causing stillbirth in an Asian elephant (*Elphas maximus*). *Vet. Rec.* **2001**, *149*, 244–246. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
133. Hentschke, J.; Meyer, H.; Wittstatt, U.; Ochs, A.; Burkhardt, S.; Aue, A. Kuhpocken bei kanadischen bibern (*Castor fiber canadensis*) und katzenbaren (*Ailurus fulgens*). *Tierarztl. Umsch.* **1999**, *54*.
134. Cardeti, G.; Brozzi, A.; Eleni, C.; Polici, N.; D'Alterio, G.; Carletti, F.; Scicluna, M.T.; Castilletti, C.; Capobianchi, M.R.; di Caro, A.; et al. Cowpox virus in Llama, Italy. *Emerg. Infect. Dis.* **2011**, *17*, 1513–1515. [[CrossRef](#)]
135. Schuppel, K.F.; Menger, S.; Eulenberger, K.; Bernhard, A.; Pilaski, J. Kuhpocken Infektion bei Alpakas (*Lama glama pacos*). *Verh. ber Erkr. Zootiere* **1997**, *38*, 259–264.
136. Essbauer, S.; Meyer, H. Genus Orthopoxvirus: Cowpox virus. In *Poxviruses. Birkhäuser Advances in Infectious Diseases*; Mercer, A.A., Schmidt, A., Weber, O., Eds.; Birkhäuser: Basel, Switzerland, 2007.
137. Stemmler, M.; Neubauer, H.; Meyer, H. Comparison of closely related orthopoxvirus isolates by random amplified polymorphic DNA and restriction fragment length polymorphism analysis. *J. Vet. Med. Ser. B* **2001**. [[CrossRef](#)]
138. Baxby, D. Is cowpox misnamed? A review of 10 human cases. *Br. Med. J.* **1977**, *1*, 1379–1381. [[CrossRef](#)]
139. Mahnel, H.; Holejsovsky, J.; Bartak, P.; Czerny, C.P. Kongenitale “Ektromelie” bei Pelztieren durch Orthopoxvirus muris. *Tierärztliche Prax.* **1993**, *21*, 469–472.
140. Vorou, R.M.; Papavassiliou, V.G.; Pierroutsakos, I.N. Cowpox virus infection: An emerging health threat. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **2008**, *21*, 153–156. [[CrossRef](#)]

141. Bennett, M.; Gaskell, C.J.; Baxby, D.; Gaskell, R.M.; Kelly, D.F.; Naidoot, J. Feline cowpox virus infection. *J. Small Anim. Pract.* **1990**, *31*, 167–173. [[CrossRef](#)]
142. Thomsett, L.R.; Baxby, D.; Denham, E.M. Cowpox in the domestic cat. *Vet. Rec.* **1978**, *103*, 567. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
143. Hinrichs, U.; Van De Poel, H.; Van Den Ingh, T.S.G.A.M. Necrotizing pneumonia in a cat caused by an orthopox virus. *J. Comp. Pathol.* **1999**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
144. Pfeffer, M.; Pflieger, S.; von Bomhard, D.; Kaaden, O.R.; Meyer, H. Retrospective investigation of feline cowpox in Germany. *Vet. Rec.* **2002**, *150*, 50–51. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
145. Smith, G.L. *Poxviruses, Birkhäuser Advances in Infectious Diseases*; Mercer, A.A., Schmidt, A., Weber, O., Eds.; Birkhäuser Verlag: Basel, Switzerland, 2007; ISBN 3-7643-7556-6.
146. World Health Organization (WHO). The Global Eradication of Smallpox: Final Report of the Global Commission for the Certification of Smallpox Eradication, Geneva, December 1979. Available online: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/39253/a41438.pdf?sequence=1&isAllowed=y> (accessed on 30 September 2020).
147. Henderson, D.A. *Smallpox: The Death of a Disease: The Inside Story of Eradicating a Worldwide Killer*; Prometheus Books: New York, NY, USA, 2009; ISBN 161592230X.
148. Kroon, E.G.; Mota, B.E.F.; Abrahão, J.S.; da Fonseca, F.G.; de Souza Trindade, G. Zoonotic Brazilian Vaccinia virus: From field to therapy. *Antiviral Res.* **2011**, *92*, 150–163. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
149. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Laboratory Acquired Vaccinia Exposures and Infections—United States, 2005–2007. Available online: <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5715a3.htm> (accessed on 30 September 2020).
150. Drexler, I.; Staib, C.; Sutter, G. Modified vaccinia virus Ankara as antigen delivery system: How can we best use its potential? *Curr. Opin. Biotechnol.* **2004**, *15*, 506–512. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
151. Meseda, C.A.; Garcia, A.D.; Kumar, A.; Mayer, A.E.; Manischewitz, J.; King, L.R.; Golding, H.; Merchlinsky, M.; Weir, J.P. Enhanced immunogenicity and protective effect conferred by vaccination with combinations of modified vaccinia virus Ankara and licensed smallpox vaccine Dryvax in a mouse model. *Virology* **2005**, *339*, 164–175. [[CrossRef](#)]
152. Trindade, G.S.; Emerson, G.L.; Carroll, D.S.; Kroon, E.G.; Damon, I.K. Brazilian vaccinia viruses and their origins. *Emerg. Infect. Dis.* **2007**, *13*, 965. [[CrossRef](#)]
153. Miranda, J.B.; Borges, I.A.; Campos, S.P.S.; Vieira, F.N.; De Ázara, T.M.F.; Marques, F.A.; Costa, G.B.; Luis, A.P.M.F.; De Oliveira, J.S.; Ferreira, P.C.P.; et al. Serologic and molecular evidence of vaccinia virus circulation among small mammals from different biomes, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* **2017**, *23*, 931–938. [[CrossRef](#)]
154. Medaglia, M.L.G.; Moussatché, N.; Nitsche, A.; Dabrowski, P.W.; Li, Y.; Damon, I.K.; Lucas, C.G.O.; Arruda, L.B.; Damaso, C.R. Genomic Analysis, Phenotype, and Virulence of the Historical Brazilian Smallpox Vaccine Strain IOC: Implications for the Origins and Evolutionary Relationships of Vaccinia Virus. *J. Virol.* **2015**, *89*, 11909–11925. [[CrossRef](#)]
155. Baxby, D.; Hill, B.J. Characteristics of a new poxvirus isolated from Indian buffaloes. *Arch. Gesamte Virusforsch.* **1971**, *35*, 70–79. [[CrossRef](#)]
156. Bloch, B.; Lal, S.M. A study of the ultrastructure of the buffalo pox virus. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B Microbiol.* **1975**, *83*, 191–200. [[CrossRef](#)]
157. Bera, B.C.; Shanmugasundaram, K.; Barua, S.; Anand, T.; Riyesh, T.; Vaid, R.K.; Virmani, N.; Bansal, M.; Shukla, B.N.; Malik, P. Sequence and phylogenetic analysis of host-range (E3L, K3L, and C7L) and structural protein (B5R) genes of buffalopox virus isolates from buffalo, cattle, and human in India. *Virus Genes* **2012**, *45*, 488–498. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
158. Eltom, K.H.; Samy, A.M.; Abd El Wahed, A.; Czerny, C.-P. Buffalopox Virus: An Emerging Virus in Livestock and Humans. *Pathogens* **2020**, *9*, 676. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
159. Yadav, P.D.; Mauldin, M.R.; Nyayanit, D.A.; Albariño, C.G.; Sarkale, P.; Shete, A.; Guerrero, L.W.; Nakazawa, Y.; Nichol, S.T.; Mourya, D.T. Isolation and phylogenomic analysis of buffalopox virus from human and buffaloes in India. *Virus Res.* **2020**, *277*, 197836. [[CrossRef](#)]
160. Goyal, T.; Varshney, A.; Bakshi, S.K.; Barua, S.; Bera, B.C.; Singh, R.K. Buffalo pox outbreak with atypical features: A word of caution and need for early intervention! *Int. J. Dermatol.* **2013**, *52*, 1224–1230. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
161. Bhanuprakash, V.; Venkatesan, G.; Balamurugan, V.; Hosamani, M.; Yogisharadhya, R.; Chauhan, R.S.; Pande, A.; Mondal, B.; Singh, R.K. Pox outbreaks in sheep and goats at Makhdoom (Uttar Pradesh), India: Evidence of sheeppox virus infection in goats. *Transbound. Emerg. Dis.* **2010**, *57*, 375–382. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
162. Kumar, A.; Venkatesan, G.; Singh, R.K. Buffalopox Virus. In *Animal-Origin Viral Zoonoses—Livestock Diseases and Management*; Malik, Y.S., Singh, R.K., Kuldeep, D., Eds.; Springer: Singapore, 2020; pp. 145–162.
163. Zafar, A.; Swanepoel, R.; Hewson, R.; Nizam, M.; Ahmed, A.; Husain, A.; Grobbelaar, A.; Bewley, K.; Mioulet, V.; Dowsett, B. Nosocomial buffalopoxvirus infection, Karachi, Pakistan. *Emerg. Infect. Dis.* **2007**, *13*, 902. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
164. Singh, M.; Bhat, P.P.; Mishra, B.P.; Singh, R.K. Biological transmissibility of buffalopox virus. *J. Appl. Anim. Res.* **1996**, *9*, 79–88. [[CrossRef](#)]
165. Nalca, A.; Nichols, D.K. Rabbitpox: A model of airborne transmission of smallpox. *J. Gen. Virol.* **2011**, *92*, 31–35. [[CrossRef](#)]
166. Christensen, L.R.; Bond, E.; Matanic, B. “Pock-less” rabbit pox. *Lab. Anim. Care* **1967**, *17*, 281.
167. Fenner, F. The biological characters of several strains of vaccinia, cowpox and rabbitpox viruses. *Virology* **1958**, *5*, 502–529. [[CrossRef](#)]

168. Dumbell, K.; Richardson, M. Virological investigations of specimens from buffaloes affected by buffalopox in Maharashtra State, India between 1985 and 1987. *Arch. Virol.* **1993**, *128*, 257–267. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
169. Leite, J.A.; Drumond, B.P.; Trindade, G.S.; Lobato, Z.I.P.; Da Fonseca, F.G.; Dos Santos, J.R.; Madureira, M.C.; Guedes, M.I.M.C.; Ferreira, J.M.S.; Bonjardim, C.A.; et al. Passatempo virus, a vaccinia virus strain, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* **2005**, *11*, 1935–1938. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
170. Rivetti, A.V.; Guedes, M.I.M.C.; Rehfeld, I.S.; Oliveira, T.M.L.; Matos, A.C.D.; Abrahão, J.S.; Kroon, E.G.; Lobato, Z.I.P. Bovine vaccinia, a systemic infection: Evidence of fecal shedding, viremia and detection in lymphoid organs. *Vet. Microbiol.* **2013**, *162*, 103–111. [[CrossRef](#)]
171. Matos, A.C.D.; Rehfeld, I.S.; Guedes, M.I.M.C.; Lobato, Z.I.P. Bovine vaccinia: Insights into the disease in cattle. *Viruses* **2018**, *10*, 120. [[CrossRef](#)]
172. Damaso, C.R.A.; Esposito, J.J.; Condit, R.C.; Moussatché, N. An emergent poxvirus from humans and cattle in Rio de Janeiro State: Cantagalo virus may derive from Brazilian smallpox vaccine. *Virology* **2000**, *277*, 439–449. [[CrossRef](#)]
173. De Souza Trindade, G.; Da Fonseca, F.G.; Marques, J.T.; Nogueira, M.L.; Mendes, L.C.N.; Borges, A.S.; Peiró, J.R.; Pituco, E.M.; Bonjardim, C.A.; Ferreira, P.C.P.; et al. Araçatuba virus: A vaccinia-like virus associated with infection in humans and cattle. *Emerg. Infect. Dis.* **2003**, *9*, 155–160. [[CrossRef](#)]
174. Campos, R.K.; Brum, M.C.S.; Nogueira, C.E.W.; Drumond, B.P.; Alves, P.A.; Siqueira-Lima, L.; Assis, F.L.; Trindade, G.S.; Bonjardim, C.A.; Ferreira, P.C.; et al. Assessing the variability of Brazilian Vaccinia virus isolates from a horse exanthematic lesion: Coinfection with distinct viruses. *Arch. Virol.* **2011**, *156*, 275–283. [[CrossRef](#)]
175. Lima, M.T.; Oliveira, G.P.; Assis, F.L.; de Oliveira, D.B.; Vaz, S.M.; de Souza Trindade, G.; Abrahão, J.S.; Kroon, E.G. Ocular vaccinia infection in dairy worker, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* **2018**, *24*, 161. [[CrossRef](#)]
176. Trindade, G.d.S.; Emerson, G.L.; Sammons, S.; Frace, M.; Govil, D.; Mota, B.E.F.; Abrahão, J.S.; de Assis, F.L.; Olsen-Rasmussen, M.; Goldsmith, C.S.; et al. Serro 2 virus highlights the fundamental genomic and biological features of a natural vaccinia virus infecting humans. *Viruses* **2016**, *8*, 328. [[CrossRef](#)]
177. Drumond, B.P.; Leite, J.A.; da Fonseca, F.G.; Bonjardim, C.A.; Ferreira, P.C.P.; Kroon, E.G. Brazilian Vaccinia virus strains are genetically divergent and differ from the Lister vaccine strain. *Microbes Infect.* **2008**, *10*, 185–197. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
178. de Souza Trindade, G.; Li, Y.; Olson, V.A.; Emerson, G.; Regnery, R.L.; da Fonseca, F.G.; Damon, I. Real-time PCR assay to identify variants of Vaccinia virus: Implications for the diagnosis of bovine vaccinia in Brazil. *J. Virol. Methods* **2008**, *152*, 63–71. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
179. Costa, G.B.; Miranda, J.B.; Almeida, G.G.; Silva de Oliveira, J.; Pinheiro, M.S.; Gonçalves, S.A.; Pimenta Dos Reis, J.K.; Gonçalves, R.; Ferreira, P.C.P.; Bonjardim, C.A.; et al. Detection of Vaccinia Virus in Urban Domestic Cats, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* **2017**, *23*, 360–362. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
180. Dutra, L.A.L.; de Freitas Almeida, G.M.; Oliveira, G.P.; Abrahão, J.S.; Kroon, E.G.; Trindade, G.d.S. Molecular evidence of Orthopoxvirus DNA in capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) stool samples. *Arch. Virol.* **2017**, *162*, 439–448. [[CrossRef](#)]
181. Brum, M.C.S.; dos Anjos, B.L.; Nogueira, C.E.W.; Amaral, L.A.; Weiblen, R.; Flores, E.F. An outbreak of orthopoxvirus-associated disease in horses in southern Brazil. *J. Vet. Diagn. Investig.* **2010**, *22*, 143–147. [[CrossRef](#)]
182. Abrahão, J.S.; de Souza Trindade, G.; Pereira-Oliveira, G.; de Oliveira Figueiredo, P.; Costa, G.; Moreira Franco-Luiz, A.P.; Lopes Assis, F.; Bretas de Oliveira, D.; Mattos Paim, L.R.; de Araújo Oliveira, C.E.; et al. Detection of Vaccinia virus during an outbreak of exanthemous oral lesions in Brazilian equids. *Equine Vet. J.* **2017**. [[CrossRef](#)]
183. Lima, M.T.; Oliveira, G.P.; Afonso, J.A.B.; Souto, R.J.C.; De Mendonça, C.L.; Dantas, A.F.M.; Abrahão, J.S.; Kroon, E.G. An update on the known host range of the Brazilian vaccinia virus: An outbreak in Buffalo Calves. *Front. Microbiol.* **2019**, *9*, 3327. [[CrossRef](#)]
184. Abrahão, J.S.; Guedes, M.I.M.; Trindade, G.S.; Fonseca, F.G.; Campos, R.K.; Mota, B.F.; Lobato, Z.I.P.; Silva-Fernandes, A.T.; Rodrigues, G.O.L.; Lima, L.S.; et al. One more piece in the VACV ecological puzzle: Could peridomestic rodents be the link between wildlife and bovine vaccinia outbreaks in Brazil? *PLoS ONE* **2009**, *4*, e7428. [[CrossRef](#)]
185. Martins da Costa, P.S.P.; Oliveira, J.S.; Domingos, I.J.d.S.; e Silva, P.H.B.; Dutra, A.G.S.; Amaral, C.D.; Abrahão, J.S.; Richini Pereira, V.B.; Kroon, E.G.; Barbosa Costa, G.; et al. Circulation of vaccinia virus in southern and south-eastern wildlife, Brazil. *Transbound. Emerg. Dis.* **2020**. [[CrossRef](#)]
186. Costa, G.B.; de Almeida, L.R.; Cerqueira, A.G.R.; Mesquita, W.U.; de Oliveira, J.S.; Miranda, J.B.; Saraiva-Silva, A.T.; Abrahão, J.S.; Drumond, B.P.; Kroon, E.G.; et al. Vaccinia virus among domestic dogs and wild coatis, Brazil, 2013–2015. *Emerg. Infect. Dis.* **2018**, *24*, 2338–2342. [[CrossRef](#)]
187. Assis, F.L.; Borges, I.A.; Peregrino Ferreira, P.C.; Bonjardim, C.A.; de Souza Trindade, G.; Portela Lobato, Z.I.; Maldonado Guedes, M.I.; Mesquita, V.; Kroon, E.G.; Abrahão, J.S. Group 2 vaccinia virus, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* **2012**. [[CrossRef](#)]
188. Peres, M.G.; Barros, C.B.; Appolinário, C.M.; Antunes, J.M.A.P.; Mioni, M.S.R.; Bacchiega, T.S.; Allendorf, S.D.; Vicente, A.F.; Fonseca, C.R.; Megid, J. Dogs and opossums positive for vaccinia virus during outbreak affecting cattle and humans, São Paulo State, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* **2016**, *22*, 271–273. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
189. Ferreira, J.M.S.; Drumond, B.P.; Guedes, M.I.M.C.; Pascoal-Xavier, M.A.; Almeida-Leite, C.M.; Arantes, R.M.E.; Mota, B.E.F.; Abrahão, J.S.; Alves, P.A.; Oliveira, F.M.; et al. Virulence in murine model shows the existence of two distinct populations of Brazilian Vaccinia virus strains. *PLoS ONE* **2008**, *3*, e3043. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

190. Oliveira, G.; Assis, F.; Almeida, G.; Albarnaz, J.; Lima, M.; Andrade, A.C.; Calixto, R.; Oliveira, C.; Neto, J.D.; Trindade, G.; et al. From lesions to viral clones: Biological and molecular diversity amongst autochthonous Brazilian Vaccinia virus. *Viruses* **2015**, *7*, 1218–1237. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
191. Abrahão, J.S.; Oliveira, T.M.L.; Campos, R.K.; Madureira, M.C.; Kroon, E.G.; Lobato, Z.I.P. Bovine vaccinia outbreaks: Detection and isolation of vaccinia virus in milk samples. *Foodborne Pathog. Dis.* **2009**, *6*, 1141–1146. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
192. Rehfeld, I.S.; Matos, A.C.D.; Guedes, M.I.M.C.; Costa, A.G.; Fraiha, A.L.S.; Lobato, Z.I.P. Subclinical bovine vaccinia: An important risk factor in the epidemiology of this zoonosis in cattle. *Res. Vet. Sci.* **2017**, *114*, 233–235. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
193. Abrahão, J.S.; Silva-Fernandes, A.T.; Lima, L.S.; Campos, R.K.; Guedes, M.I.M.C.; Cota, M.M.G.; Assis, F.L.; Borges, I.A.; Souza-Júnior, M.F.; Lobato, Z.I.P.; et al. Vaccinia virus infection in monkeys, Brazilian Amazon. *Emerg. Infect. Dis.* **2010**, *16*, 976–979. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
194. Peres, M.G.; Bacchiega, T.S.; Appolinário, C.M.; Vicente, A.F.; De Souza Ribeiro Mioni, M.; Ribeiro, B.L.D.; Fonseca, C.R.S.; Pelícia, V.C.; Ferreira, F.; Oliveira, G.P.; et al. Vaccinia virus in blood samples of humans, domestic and wild mammals in Brazil. *Viruses* **2018**, *10*, 42. [[CrossRef](#)]
195. Peres, M.G.; Bacchiega, T.S.; Appolinário, C.M.; Vicente, A.F.; Allendorf, S.D.; Antunes, J.M.A.P.; Moreira, S.A.; Legatti, E.; Fonseca, C.R.; Pituco, E.M.; et al. Serological study of vaccinia virus reservoirs in areas with and without official reports of outbreaks in cattle and humans in São Paulo, Brazil. *Arch. Virol.* **2013**, *158*, 2433–2441. [[CrossRef](#)]
196. Barbosa, A.V.; Medaglia, M.L.G.; Soares, H.S.; Quixabeira-Santos, J.C.; Gennari, S.M.; Damaso, C.R. Presence of neutralizing antibodies to orthopoxvirus in capybaras (*hydrochoerus hydrochaeris*) in Brazil. *J. Infect. Dev. Ctries.* **2014**, *8*, 1646–1649. [[CrossRef](#)]
197. de Assis, F.L.; Pereira, G.; Oliveira, C.; Rodrigues, G.O.L.; Cotta, M.M.G.; Silva-Fernandes, A.T.; Ferreira, P.C.P.; Bonjardim, C.A.; de Souza Trindade, G.; Kroon, E.G.; et al. Serologic evidence of orthopoxvirus infection in buffaloes, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* **2012**, *18*, 698–700. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
198. Franco-Luiz, A.P.M.; Fagundes Pereira, A.; de Oliveira, C.H.S.; Barbosa, J.D.; Oliveira, D.B.; Bonjardim, C.A.; Ferreira, P.C.P.; de Souza Trindade, G.; Abrahão, J.S.; Kroon, E.G. The detection of Vaccinia virus confirms the high circulation of Orthopoxvirus in buffaloes living in geographical isolation, Marajó Island, Brazilian Amazon. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **2016**. [[CrossRef](#)]
199. Siqueira Ferreira, J.M.; Abrahão, J.S.; Drumond, B.P.; Oliveira, F.M.; Alves, P.A.; Pascoal-Xavier, M.A.; Lobato, Z.I.P.; Bonjardim, C.A.; Peregrino Ferreira, P.C.; Kroon, E.G. Vaccinia virus: Shedding and horizontal transmission in a murine model. *J. Gen. Virol.* **2008**, *89*, 2986–2991. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
200. Costa, G.B.; Lavergne, A.; Darcissac, E.; Lacoste, V.; Drumond, B.P.; Abrahão, J.S.; Kroon, E.G.; de Thoisy, B.; de Souza Trindade, G. Absence of vaccinia virus detection in a remote region of the Northern Amazon forests, 2005–2015. *Arch. Virol.* **2017**, *162*, 2369–2373. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
201. Abrahão, J.S.; de Souza Trindade, G.; Ferreira, J.M.S.; Campos, R.K.; Bonjardim, C.A.; Ferreira, P.C.P.; Kroon, E.G. Long-lasting stability of Vaccinia virus strains in murine feces: Implications for virus circulation and environmental maintenance. *Arch. Virol.* **2009**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
202. Fassbender, P.; Zange, S.; Ibrahim, S.; Zoeller, G.; Herbstreit, F.; Meyer, H. Generalized cowpox virus infection in a patient with HIV, Germany, 2012. *Emerg. Infect. Dis.* **2016**, *22*, 553. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
203. de Oliveira, J.S.; Costa, G.B.; Franco Luiz, A.P.M.; Leite, J.A.; Bonjardim, C.A.; Abrahão, J.S.; Drumond, B.P.; Kroon, E.G.; Trindade, G.d.S. Cross-sectional study involving healthcare professionals in a Vaccinia virus endemic area. *Vaccine* **2017**, *35*, 3281–3285. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
204. Lobato, Z.I.P.; Trindade, G.S.; Frois, M.C.M.; Ribeiro, E.B.T.; Dias, G.R.C.; Teixeira, B.M.; Lima, F.A.; Almeida, G.M.F.; Kroon, E.G. Outbreak of exantemal disease caused by Vaccinia virus in human and cattle in Zona da Mata region, Minas Gerais. *Arq. Bras. Med. Vet. e Zootec.* **2005**. [[CrossRef](#)]
205. Reynolds, M.G.; Doty, J.B.; McCollum, A.M.; Olson, V.A.; Nakazawa, Y. Monkeypox re-emergence in Africa: A call to expand the concept and practice of One Health. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **2019**, *17*, 129–139. [[CrossRef](#)]
206. Hassell, J.M.; Begon, M.; Ward, M.J.; Fèvre, E.M. Urbanization and Disease Emergence: Dynamics at the Wildlife–Livestock–Human Interface. *Trends Ecol. Evol.* **2017**, *32*, 55–67. [[CrossRef](#)]
207. Oliveira, G.P.; Fernandes, A.T.S.; De Assis, F.L.; Alves, P.A.; Luiz, A.P.M.F.; Figueiredo, L.B.; De Almeida, C.M.C.; Travassos, C.E.P.F.; De Souza Trindade, G.; Abrahão, J.S.; et al. Short report: Intrafamilial transmission of Vaccinia virus during a bovine vaccinia outbreak in Brazil: A new insight in viral transmission chain. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2014**. [[CrossRef](#)]
208. Laiton-Donato, K.; Ávila-Robayo, P.; Páez-Martínez, A.; Benjumea-Nieto, P.; Usme-Ciro, J.A.; Pinzón-Nariño, N.; Giraldo, I.; Torres-Castellanos, D.; Nakazawa, Y.; Patel, N.; et al. Progressive vaccinia acquired through zoonotic transmission in a patient with HIV/AIDS, Colombia. *Emerg. Infect. Dis.* **2020**, *26*, 601–605. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
209. Petersen, E.; Abubakar, I.; Ihekweazu, C.; Heymann, D.; Ntoumi, F.; Blumberg, L.; Asogun, D.; Mukonka, V.; Lule, S.A.; Bates, M.; et al. Monkeypox—Enhancing public health preparedness for an emerging lethal human zoonotic epidemic threat in the wake of the smallpox post-eradication era. *Int. J. Infect. Dis.* **2019**, *78*, 78–84. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]