

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Programa de Pós-graduação em Microbiologia**

**Gabriela Fernanda Garcia Oliveira**

**INVESTIGAÇÃO MOLECULAR DO VÍRUS DA FEBRE AMARELA EM  
PRIMATAS NÃO HUMANOS DO ESTADO DE MINAS GERAIS (2017, 2021-2022) E  
ADAPTAÇÃO DE TESTE DE NEUTRALIZAÇÃO PARA O VÍRUS DA FEBRE  
AMARELA**

Belo Horizonte

2023

Gabriela Fernanda Garcia Oliveira

**INVESTIGAÇÃO MOLECULAR DO VÍRUS DA FEBRE AMARELA EM  
PRIMATAS NÃO HUMANOS DO ESTADO DE MINAS GERAIS (2017, 2021-2022) E  
ADAPTAÇÃO DE TESTE DE NEUTRALIZAÇÃO PARA O VÍRUS DA FEBRE  
AMARELA**

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

**Orientadora: Profa. Dra. Betânia Paiva  
Drumond.**

Belo Horizonte

2023

- 043 Oliveira, Gabriela Fernanda Garcia.  
Investigação molecular do vírus da Febre Amarela em primatas não humanos do Estado de Minas Gerais (2017, 2021-2022) e adaptação de teste de neutralização para o vírus da Febre Amarela [manuscrito] / Gabriela Fernanda Garcia Oliveira. – 2023.  
111 f. : il. ; 29,5 cm.
- Orientadora: Profa. Dra. Betânia Paiva Drumond..  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.
1. Microbiologia. 2. Saúde Pública. 3. Arbovirus. 4. Vírus da Febre Amarela. 5. Diagnóstico. 6. Primatas. 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 DISSERTAÇÃO**

**ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE GABRIELA FERNANDA GARCIA OLIVEIRA**

**Nº REGISTRO: 2021664338**

Às 15:00 horas do dia 31 de maio de 2023, reuniu-se por via remota, a Comissão Examinadora composta pela Drs. Natália Ingrid Oliveira da Silva (University of Texas Medical Branch - UTMB), Pedro Augusto Alves (Instituto René Rachou/Fundação Oswaldo Cruz) e a Profa. Dra. Betânia Paiva Drumond (Orientadora), para julgar o trabalho final "**Investigação molecular do vírus da febre amarela em primatas não humanos do estado de Minas Gerais (2017, 2021-2022) e adaptação de teste de neutralização para o vírus da febre amarela**", da aluna **Gabriela Fernanda Garcia Oliveira**, requisito final para a obtenção do Grau de MESTRA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profa. Dra. Betânia Paiva Drumond - orientadora, 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. A candidata tem 60 (sessenta) dias, a partir desta data, para entregar a versão final da dissertação ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da UFMG e requerer seu diploma.

Belo Horizonte, 31 de maio de 2023

Membros da banca:

Dra. Natália Ingrid Oliveira da Silva

Dr. Pedro Augusto Alves

De acordo:

Profa. Dra. Betânia Paiva Drumond

(Orientadora)

Profa. Dra. Daniele da Glória de Souza

(Coordenadora do Programa de Pós-graduação)

em Microbiologia)



Documento assinado eletronicamente por **Betania Paiva Drumond, Professora do Magistério Superior**, em 01/06/2023, às 08:27, 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 01/06/2023, às 15:41, 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 **Pedro Augusto Alves, Usuário Externo**, em 04/06/2023, às 19:07, 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 **Natalia Ingrid Oliveira Silva, Usuária Externa**, em 14/06/2023, às 22:08, 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](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador 2303185 e o código CRC 846083B9.

## AGRADECIMENTOS

Este estudo foi possível devido ao financiamento de diversas agências de fomentos e colaboração de pesquisadores, professores e alunos de diferentes instituições. A equipe deste trabalho expressa seus agradecimentos a seguir:

Ao financiamento pelo National Institute of Health (NIH) por meio do Pilot Research Program 2021 do Centro de Pesquisa em Doenças Infecciosas Emergentes (Centers for Research in Emerging Infectious Disease - CREID) (1U01AI15378, e 0217530). Gabriela Fernanda Garcia Oliveira recebeu bolsa de pesquisa NIH (1U01AI15378, e 0217530) e CAPES (001).

Ao suporte do Programa de Pós-graduação em Microbiologia da UFMG (PPGMICRO-UFMG), que é financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brasil (CAPES) (processo: 88882.348380/2010-1 e processo número 001), a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

À Pró-reitora de Pesquisa da UFMG e aos pesquisadores e funcionários do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (ICB-UFMG).

Aos professores e alunos do Laboratório de Vírus da UFMG (LV-UFMG).

À equipe do Laboratório de Zoonoses da prefeitura de Belo Horizonte (LZOON-BH) e a Dra. Érica Munhoz do centro de controle de zoonoses da prefeitura de Belo Horizonte (CCZ-BH).

À coordenação e secretaria do PPGMICRO-UFMG, e a coordenação do biotério do PPGMICRO-UFMG.

À banca examinadora, composta pela Dra. Natália Ingrid Oliveira da Silva, Dr. Pedro Augusto Alves e Dra. Ana Paula Moreira Franco Luiz.

Aos colaboradores do CREATE-NEO (Coordinating Research on Emerging Arboviral Threats Encompassing the Neotropics), Dra. Kathryn Hanley e Dr. Nikos Vasilakis.

Aos colaboradores deste trabalho Dr. Érik Reis, Thaís Alkifeles Costa, Matheus Soares Arruda, Gabriel Dias Moreira e todos os membros do grupo de pesquisa de arbovírus (GPARBO).

Ao antigo BTT, que continua me dando suporte e orientação na bancada e fora. Vocês são importantes demais para minha continuidade nessa caminhada.

Aos meus amigos de dentro e de fora da UFMG que me incentivaram e aliviaram o peso que eu carreguei muitas vezes atoa. Aos queridos Iago, Pedro, Vic e Karol e todos os colegas e amigos do Lab Vírus. Um abraço e menção especial a Thaís e Matheus, meus jarrinhos, parceiros de bancada e caminhada.

Ao meu parceiro e namorado que participou de todo este processo, me deu apoio, companhia e ajuda nas análises de resultados madrugada afora. Você fez e faz meus dias muito menos sofridos e muito melhores.

À minha família, por todo suporte e incentivo em cada uma das etapas que me levaram a conclusão deste trabalho. Vocês são meu porto seguro.

E à professora Betânia, minha orientadora e grande exemplo profissional. Obrigada por todo suporte, toda paciência, pelo carinho, e por tirar as rodinhas, mas me avisar antes.

## RESUMO

A infecção pelo vírus da febre amarela (YFV; *Orthoflavivirus flavi*) pode resultar em febre amarela (FA). O vírus é transmitido por um vetor artrópode hematófago durante o repasto sanguíneo e sua manutenção pode ocorrer em três ciclos: silvestre, urbano e intermediário/rural, envolvendo primatas não humanos (PNHs), vetores e humanos. No Brasil, onde há grande diversidade de PNHs, o ciclo de manutenção da FA é o silvestre, com vetores *Haemagogus sp.* e *Sabethes sp.*. Entre 2017 e 2018, o país enfrentou um grande surto de FA, com casos humanos e de epizootias confirmados, sobretudo na região sudeste e em Minas Gerais (MG). Desde então casos em humanos e epizootias associadas à infecção por YFV são reportados. A morte de PNHs é investigada e sua notificação é obrigatória devido à sua importância como sentinelas da FA. No entanto, a utilização de amostras de carcaças pode limitar algumas metodologias de diagnóstico. Neste estudo, os objetivos foram investigar a infecção por YFV em amostras de PNHs de MG por meio de técnicas de biologia molecular, e otimizar um teste de neutralização viral utilizando amostras de tecido hepático macerado em substituição ao soro. Para isso foi realizada a extração de RNA total de amostras provenientes de carcaças de PNHs. Posteriormente, o RNA foi submetido a protocolo de RT-qPCR utilizando iniciadores e sonda específicos para região 5'UTR do genoma do YFV. Para adaptar os ensaios de neutralização viral utilizou-se fragmentos de 50mg de tecido hepático de camundongos experimentalmente infectados com YFV 17DD (n=6) e amostras de um grupo MOCK (n=6) macerados em meio MEM (200µL) e clarificados. Em seguida foram feitas diluições seriadas e adição de vírus (YFV 17DD) para inóculo em triplicata (diluições 1:20 a 1:160) em monocamada de células VERO em placas de 12 poços. Foi detectado por RT-qPCR o genoma de YFV em rins e cérebros (15/144 e 6/58, respectivamente) provenientes de carcaças de PNHs de 2017 cujos fígados eram negativos para detecção do YFV por RT-qPCR e em amostras provenientes de PNHs coletados nos anos 2021 e 2022 (18/124). Com o teste de neutralização viral adaptado foi observada diferença significativa entre as reduções dos grupos MOCK e infectados. Os resultados aqui gerados aumentam o número de PNHs infectados por YFV no ano de 2017 e corroboram a circulação continuada de YFV em PNHs do estado de Minas Gerais em 2021 e 2022, também demonstram a viabilidade da adaptação proposta à técnica de neutralização viral por redução de placa, utilizando uma amostra alternativa a soro.

Palavras-chave: Arbovírus; Diagnóstico; MG (Minas Gerais); Neutralização viral; Primatas não humanos; RT-qPCR; Saúde pública; Vírus da febre amarela.

## ABSTRACT

Infection with yellow fever virus (YFV; *Orthoflavivirus flavi*) can result in yellow fever disease (YFD). The virus is transmitted by a hematophagous arthropod vector during blood repast. Maintenance of YFV can occur in three cycles: sylvatic, with nonhuman primates (NHPs) as primary hosts and humans as incidental hosts; urban and intermediate/rural, with humans as primary hosts. In Brazil, where there is a great diversity of NHPs, the maintenance cycle of YFD is the sylvatic one, with vectors *Haemagogus sp.* and *Sabethes sp.*. Between 2017 and 2018, the country faced a major outbreak of YFD, with confirmed human and epizootic cases, especially in the southeast region and in Minas Gerais (MG). Since then, cases in humans and epizootics associated with YFV infection continue to be reported. The death of NHPs is investigated and their notification is mandatory due to their importance as sentinels of YFD. However, the use of carcass samples may limit some diagnostic methodologies. In this study, the objectives were to investigate YFV infection in samples of NHPs from MG by means of molecular biology techniques and to optimize a viral neutralization test using macerated liver tissue samples in place of serum. To this end, total RNA was extracted from samples of NHPs carcasses. Subsequently, the RNA was submitted to RT-qPCR protocol using primers and probe specific for the 5'UTR region of the YFV genome. To adapt viral neutralization assays, 50mg fragments of liver tissue from mice experimentally infected with YFV 17DD (n=6) and samples from a MOCK group (n=6) macerated in MEM medium (200µL) and clarified were used. Serial dilutions were then made and virus (YFV 17DD) was added for inoculation in triplicate (dilutions 1:20 to 1:160) in a monolayer of VERO cells in 12-well plates. YFV genome was detected by RT-qPCR in kidneys and brains (15/144 and 6/58, respectively) from 2017 NHPs carcasses whose livers were negative for YFV detection by RT-qPCR and in samples from NHPs collected in the years 2021 and 2022 (18/124). For the results of the adapted viral neutralization test, a significant difference was observed between the reductions of the MOCK and infected groups. The results generated here increase the number of NHPs infected by YFV in the year 2017 and corroborate the continued circulation of YFV in NHPs in the state of Minas Gerais in 2021 and 2022, they also demonstrate the feasibility of the proposed adaptation to the viral neutralization technique by plaque reduction using an alternative sample to serum.

Keywords: Arbovirus; Diagnosis; MG (Minas Gerais); Viral neutralization; Non-human primates; RT-qPCR; Public health; Yellow fever virus.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática do genoma de <i>Orthoflavivirus</i> . .....	<u>18</u>
Figura 2: Representação esquemática da multiplicação dos <i>orthoflavivírus</i> . .....	<u>20</u>
Figura 3: Árvore com representação filogenética dos genótipos de YFV. ....	<u>21</u>
Figura 4: Ilustração representando os ciclos de transmissão da Febre Amarela. ....	<u>23</u>
Figura 5: Famílias de primatas neotropicais, seus gêneros e ilustração de representantes. ....	<u>24</u>
Figura 6: Reporte de casos mundiais de Febre Amarela até 2018. Preto: Global. ....	<u>25</u>
Figura 7: Áreas endêmicas para o vírus da febre amarela e distribuição de surtos de Febre Amarela desde 1950. ....	<u>26</u>
Figura 8: Esquema representando preparo de placas deepwell para diluição seriada de amostras. ....	<u>47</u>
Figura 9: Esquema ilustrado demonstrando o padrão de infecção de placas utilizado no teste de neutralização adaptado. ....	<u>48</u>
Figura 10: Gráfico de densidade das distribuições de percentuais de neutralização observados para cada diluição e grupo de amostras. ....	<u>57</u>
Figura 11: Boxplot para comparação de percentuais de neutralização observados para amostras dos grupos (MOCK e Infectados). ....	<u>59</u>
Figura 12: Boxplot comparando percentuais de neutralização por diluição em cada grupo. ....	<u>60</u>
Figura 13: Distribuição de medianas de percentuais de neutralização por diluição de amostra dos grupos experimentais .....	<u>61</u>

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Amostras de rins provenientes de carcaças de primatas não humanos com fígado YFV RT-qPCR negativos coletado durante o ano de 2017.....	<u>38</u>
Tabela 2: Amostras de cérebros provenientes de carcaças de Primatas não humanos com fígado YFV RT-qPCR negativos coletado durante o ano de 2017.....	<u>38</u>
Tabela 3: Total de amostras provenientes de carcaças de Primatas não humanos coletadas durante o ano de 2021 e 2022.....	<u>39</u>
Tabela 4: Iniciadores para investigação de RNA codificador para B-actina e RNA de YFV, por RT-qPCR.....	<u>42</u>
Tabela 5: Detecção molecular do RNA de vírus da febre amarela em amostras de rim provenientes de carcaças de primatas não humanos, de Minas Gerais, 2017.....	<u>51</u>
Tabela 6: Detecção molecular do RNA de vírus da febre amarela em amostras de cérebro provenientes de carcaças de primatas não humanos, de Minas Gerais, 2017.....	<u>52</u>
Tabela 7: Detecção molecular do RNA de vírus da febre amarela em amostras de carcaças de primatas não humanos dos anos 2021-2022, Minas Gerais.....	<u>53</u>
Tabela 8: Razão entre as medianas dos percentuais de neutralização obtidos nas diluições 1:20 e 1:40 para cada amostra utilizada.....	<u>62</u>

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

Arbovírus – do inglês *arthropod-borne virus*

°C – grau Celcius

µg – micrograma

µL – microlitro

BOD – do inglês *biological oxygen demand*

C – Proteína do capsídeo

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

Cm – centímetro

CMC – carboximetilcelulose

CO<sub>2</sub> – gás carbônico

CONCEA - Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal

Cq – ciclo de quantificação

DENV – dengue vírus

DMSO - dimetilsulfóxido

Dr. – doutor

Dra. – doutora

E – Proteína do envelope

ELISA – do inglês *enzyme-linked immunosorbent assay*

FA – febre amarela

G – grama

IFNAR –/– C57BL/6 – C57 *black 6 knockout* para receptores de interferon tipo I

IgG – imunoglobulina G

IgM – imunoglobulina M

IUCN – União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais

kg – quilograma

L-15 – Leibovitz

LV – Laboratório de Vírus da Universidade Federal de Minas Gerais

LZOON-BH – Laboratório de zoonoses da prefeitura de Belo Horizonte

prM – proteína de Membrana

MEM – *minimum essential medium*

mg - miligrama

mL – mililitro

mm – milímetro

MOI – do inglês *multiplicity of infection*

mRNA – RNA mensageiro

MS – Ministério da Saúde

MTT – 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina

n – número

NCR – do inglês *noncoding region*

nm – nanometro

NS – do inglês *nonstructural*

nt – nucleotídeo

OMS – Organização mundial de Saúde

ORF - *open reading frame*

p/v – parte por volume

PBS – do inglês *phospate-bufferid saline*)

PCR – do inglês *polymerase chain reaction*

PFUs – do inglês *plaque forming unit*

PNH – pimata não humano

PRNT – do inglês *plaque reduction neutralization test*

q.s.p – quantidade suficiente para

RNA – ácido ribonucleico

RNase – ribonuclease

RT-qPCR – do inglês *reverse transcription quantitative polymerase chain reaction*

SFB – soro fetal bovino

SisGen – Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento

Tradicional Associado

ssRNA + - do inglês *single strand positive RNA*

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

UTR – do inglês *untranslated region*

v/v – volume por volume

WNV – west Nile virus

YFV – vírus da febre amarela

ZIKV – Zika virus

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO:</b>	<u>17</u>
1.1	Flaviviridae	<u>19</u>
1.2	Febre Amarela	<u>20</u>
1.2.1	Ciclo de transmissão	<u>22</u>
1.2.2	Epidemiologia	<u>25</u>
1.2.3	Patogênese viral e Diagnóstico de FA	<u>30</u>
1.2.4	Vigilância Epidemiológica	<u>31</u>
<b>2.</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	<u>34</u>
<b>3.</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<u>36</u>
3.1	Objetivo Geral.....	<u>36</u>
3.2	Objetivos Específicos	<u>36</u>
<b>4.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS:</b>	<u>37</u>
4.1	Autorizações legais	<u>37</u>
4.2	Amostras biológicas	<u>37</u>
	Tabela 1: Amostras de rins provenientes de carcaças com fígado YFV RT-qPCR negativos coletado durante o ano de 2017	<u>38</u>
	Tabela 2: Amostras de cérebros provenientes de carcaças de Primatas não humanos com fígado YFV RT-qPCR negativos coletado durante o ano de 2017	<u>38</u>
	Tabela 3: Total de amostras provenientes de carcaças de Primatas não humanos coletadas durante o ano de 2021 e 2022	<u>39</u>
4.3	Células e Vírus	<u>40</u>
4.4	Titulação Viral	<u>41</u>
4.5	Triagem molecular de YFV	<u>41</u>
	Tabela 4: Iniciadores para investigação de RNA codificador para B-actina e RNA de YFV, por RT-qPCR	<u>42</u>
4.6	Isolamento viral	<u>43</u>
4.7	Adaptação do Teste de Neutralização Viral por Redução de Placas	<u>44</u>
4.7.1	Animais Experimentalmente infectados	<u>44</u>
4.7.2	Testes de Neutralização Viral por Redução de Placas	<u>45</u>

4.8	Análises estatísticas	49
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5.1	Investigação molecular do vírus da febre amarela em primatas não humanos de Minas Gerais.	50
	Tabela 5: Detecção molecular do RNA de vírus da febre amarela em amostras de rim provenientes de carcaças de primatas não humanos, de Minas Gerais, 2017.	51
	Tabela 6: Detecção molecular do RNA de vírus da febre amarela em amostras de cérebro provenientes de carcaças de primatas não humanos, de Minas Gerais, 2017	52
	Tabela 7: Detecção molecular do RNA de vírus da febre amarela em amostras de carcaças de primatas não humanos dos anos 2021-2022, Minas Gerais	53
5.2	Teste Adaptado de Neutralização Viral por Redução de Placa com Tecido Hepático de Animais Experimentalmente Infectados	56
	Tabela 8: Razão entre as medianas dos percentuais de neutralização obtidos nas diluições 1:20 e 1:40 para cada amostra utilizada	62
6.	CONCLUSÕES	66
7.	PERSPECTIVAS	67
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
	PRODUÇÃO CIENTÍFICA E OUTRAS ATIVIDADES	75
	Artigos publicados em periódicos	75
	Artigos submetidos em periódicos	75
	Organização de eventos e congressos	75
	Projetos de extensão	76
	Participação em eventos científicos e cursos de capacitação	76
	Resumos publicados em anais de eventos científicos	77
	ANEXOS	79
	ANEXO 1	77
	ANEXO 2	81
	ANEXO 3	84
	ANEXO A	87

ANEXO B	.....	<u>95</u>
ANEXO C	.....	<u>103</u>

## 1. INTRODUÇÃO:

O termo Arbovírus (cunhado a partir da abreviação da frase em inglês *arthropod-borne virus*) se refere aos vírus transmitidos por vetores artrópodes. Estes vírus são ecologicamente distintos de muitos patógenos devido ao envolvimento de vetores artrópodes e reservatórios animais em seu ciclo de transmissão. A emergência e reemergência de arbovírus resulta em grandes surtos e têm distribuição mundial, tornando-os de grande importância à saúde pública. As doenças causadas por arbovírus são difíceis de diagnosticar devido à presença de sintomas inespecíficos além da necessidade de laboratórios e profissionais especializados para o diagnóstico (HUANG; HIGGS; VANLANDINGHAM, 2019; PIANTADOSI; KANJILAL, 2020). As seguintes famílias virais contêm arbovírus envolvidos em diferentes ciclos ecológicos de transmissão responsáveis por causar doenças em humanos e animais: *Peribunyaviridae*, *Phenuiviridae* e *Togaviridae*, e *Flaviviridae* (HUANG; HIGGS; VANLANDINGHAM, 2019).

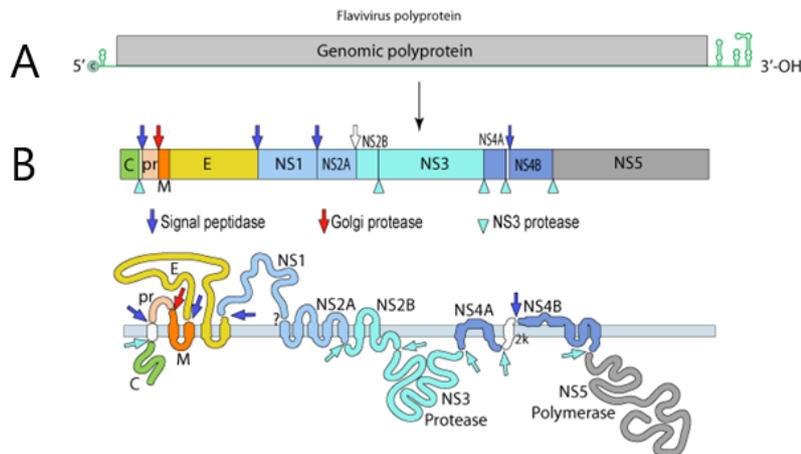
### 1.1 *Flaviviridae*

A família *Flaviviridae* é composta por quatro gêneros: *Hepacivirus*, *Orthoflavivirus*, *Pegivirus* e *Pestivirus* e 97 espécies. O gênero *Orthoflavivirus* é composto por 53 espécies de vírus descritas (RICO-HESSE, 2017). Este gênero possui espécies que representam alguns dos arbovírus de maior importância à saúde pública e economia mundial, visto que são responsáveis por altas taxas de morbidade e mortalidade. Dentre os membros do gênero *Orthoflavivirus* destacam-se as espécies *Orthoflavivirus denguei* (*dengue virus* ou DENV), *Orthoflavivirus zikaense* (*Zika virus* ou ZIKV), *Orthoflavivirus nilense* (*west Nile virus* ou WNV), e *Orthoflavivirus flavi* (vírus da febre amarela ou YFV) (FIELDS; KNIPE; HOWLEY, 2013; ICTV, 2020; INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES, 2023). Os vírus anteriormente citados são agentes etiológicos de doenças com quadros clínicos que incluem sintomas gastrointestinais, febres, febres hemorrágicas, encefalites e hepatites (FIELDS; KNIPE; HOWLEY, 2013; ICTV, 2020; MACKENZIE; GUBLER; PETERSEN, 2004; PIANTADOSI; KANJILAL, 2020).

Os vírus pertencentes à família *Flaviviridae* apresentam partícula envelopada. O envelope viral é formado por uma bicamada lipídica, circundando a membrana que envolve o nucleocapsídeo. Este por sua vez, é formado em conjunto ao genoma, que é composto por uma fita simples de RNA com polaridade positiva (FIELDS; KNIPE; HOWLEY, 2013). O vírion dos flavivírus apresenta aproximadamente 50 nm de diâmetro e tem simetria icosaédrica. As

proteínas que formam o vírion são as proteínas de: envelope (E), membrana (prM), e capsídeo (C).

O genoma dos flavivírus é constituído por uma fita simples de RNA com polaridade positiva (ssRNA+) formado por 11.000 nucleotídeos (nt), e possui uma estrutura *cap* na porção 5'. O genoma apresenta uma única janela de leitura (ORF, do inglês: *open reading frame*) flanqueada por regiões não codificantes (NCRs, do inglês: *noncoding regions*) nas extremidades 5' e 3', que além de ser infeccioso, também tem função de mRNA. Esta ORF produz uma única poliproteína que posteriormente é clivada em três proteínas estruturais (E, prM, C) e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (Figura 1) (FIELDS; KNIPE; HOWLEY, 2013).

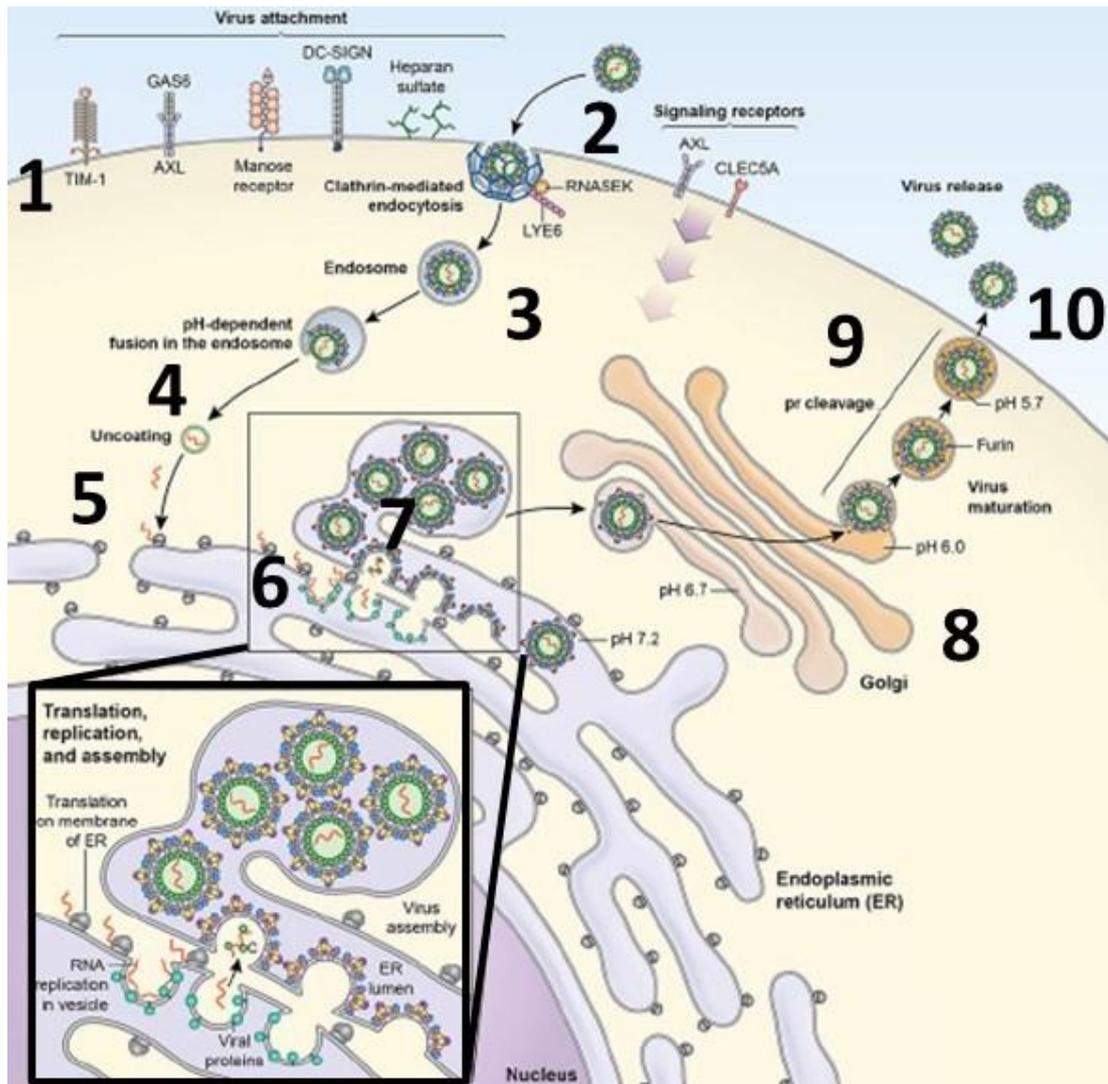


**Figura 1:** Representação esquemática do genoma de Orthoflavivirus. A) Genoma de ssRNA (+) linear de cerca de 11kb, presença de estrutura *cap* na porção 5' e porção 3' não poliadenilada. B) Poliproteína clivada em três proteínas estruturais (E, prM, C) e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5). Adaptado de: Flavivirus <https://viralzone.expasy.org/24>

A multiplicação dos flavivírus se inicia com a adsorção (figura 2[1]). A proteína E viral liga-se aos receptores celulares, ainda pouco elucidados, e a penetração inicia-se por endocitose mediada por clatrina (figura 2[2]) seguida pelo transporte em endossomos (figura 2[3]). Com a acidificação dos endossomos as membranas celular e viral sofrem fusão, o que leva ao desnudamento do nucleocapsídeo viral (figura 2[4]) seguida pela liberação do RNA genômico no citoplasma (figura 2[5]). Após a fusão e liberação do nucleocapsídeo no citoplasma celular a atividade do RNA viral é expressa em três funções principais: como RNA mensageiro inicial

no ciclo de infecção, como modelo para replicação e transcrição de RNA e como substrato para a montagem de novos vírus (figura 2[6]).

O ciclo de multiplicação dos flavivírus é inteiramente citoplasmático, ocorrendo em associação as membranas intracelulares, incluindo montagem e liberação da partícula viral. O processo de montagem inicia-se pela associação de dímeros de proteína C com o RNA genômico (figura 2[7]), seguido por brotamento em membranas do retículo endoplasmático, que contém o complexo de glicoproteína E, e prM. Após a montagem, as partículas virais são transportadas através da via secretora (figura 2[8]), e passam pela maturação através de rearranjos nas proteínas E e prM, com clivagem da prM (figura 2[9]), e são então liberadas através da superfície celular para o meio externo (Figura 2[10]).

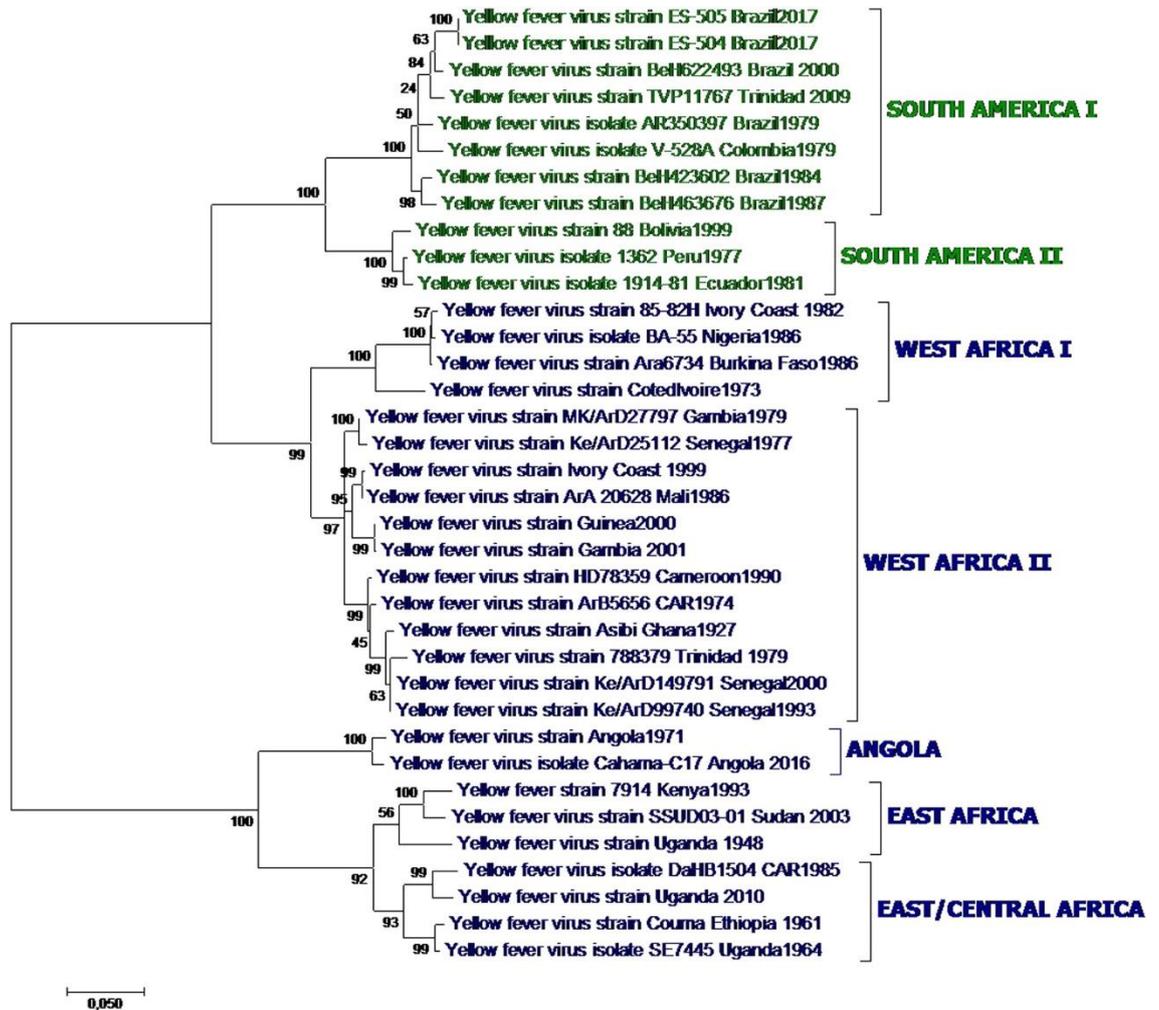


**Figura 2:** Representação esquemática da multiplicação dos orthoflavivírus. Adsorção (1); Penetração (2 e 3); Desnudamento (4 e 5); Replicação do genoma (6); Montagem (7); Maturação (8 e 9); e Liberação (10).

Adaptado de: Nat Microbiol. 2020 June (FIELDS; KNIPE; HOWLEY P, 2016).

## 1.2 Febre Amarela

A febre amarela (FA) e seu agente etiológico, o YFV, foram respectivamente, a primeira febre hemorrágica e o primeiro vírus humano transmitido por mosquito descritos (KLEINERT et al., 2019; WALTER REED, 1901). O YFV é classificado filogeneticamente em apenas um tipo e sete genótipos, estes são relacionados ao local de circulação do vírus (figura 3). Dos genótipos do YFV, cinco são africanos (*West Africa I*, *West Africa II* ou *West/Central Africa*, *East Africa*, *East/Central Africa* e *Angola*) e dois são sul-americanos (*South-American I* e *South-American II*) (MONATH; VASCONCELOS, 2015).



**Figura 3:** Árvore com representação filogenética dos genótipos de YFV. Análise feita com base no alinhamento da região prM e E do genoma de 36 YFV americanos e africanos, usando o método de máxima verossimilhança com base no modelo geral de tempo reverso (GTR). Valores de bootstraps indicados para 500 replicatas. Fonte: Emerging Microbes & Infections.

Historicamente, os surtos de FA são uma ameaça aos continentes Americano e Africano. Com grandes surtos urbanos de FA em cidades portuárias da América do Sul durante os séculos 18 e 19, acredita-se que o YFV tenha emergido no continente Africano e foi introduzido no continente americano junto ao *A. aegypti*, durante o tráfico de pessoas escravizadas entre países europeus e suas colônias (revisado por BRYANT; HOLMES; BARRETT, 2007; e JÁCOME et al., 2019). A partir de análises filogenéticas correspondentes às sequências das proteínas estruturais do YFV (prM e E), foi observado que (I) os isolados *South-American I e II* compõem um grupo monofilético, (II) os isolados *South-American I e II* são divididos de acordo com a circulação inicial no leste ou oeste do continente, (III) os isolados *South-*

*American I e II* são mais próximos, filogeneticamente, dos isolados *West Africa*, e **(IV)** os isolados *East Africa* são os mais divergentes (BRYANT; HOLMES; BARRETT, 2007).

### 1.2.1 Ciclo de transmissão

Em 1900 já era conhecido o vírus responsável pela FA e o modo de transmissão envolvendo o mosquito vetor *Aedes aegypti* (SOPER, 1937). Diversos programas de erradicação de vetores e quarentena de infectados possibilitaram o controle da FA em áreas urbanas (FINLAY, 1955; SOPER, 1937). Apesar da manutenção das medidas previamente bem-sucedidas, a FA continuou como uma ameaça no continente americano. Foi observada a continuidade da FA especialmente em áreas rurais e silvestres com baixa densidade populacional e ausência de *A. aegypti*, o que não poderia ser atribuída a infecções humanas, e assim levantou novas questões sobre a epidemiologia da doença (SOPER, 1937).

Em 1933 estudos de vigilância imunológica estavam disponíveis, e foi observado que a FA continuou presente, de forma silenciosa, em regiões da bacia amazônica nos 20 anos anteriores. Assim, devido aos surtos de 1934 a 1936 descobriu-se que a FA possui um ciclo de transmissão zoonótico independente, envolvendo primatas não humanos (PNHs) e vetores silvestres, inicialmente chamado de febre amarela da selva (MONATH, 1994; SOPER, 1937). Acredita-se que o vírus estabeleceu um ciclo silvestre nas bacias dos rios Amazonas, Araguaia e Orinoco, com os mosquitos *Haemagogus spp.* e *Sabethes spp.* como vetores, a partir dos surtos urbanos anteriores (revisado por BRYANT; HOLMES; BARRETT, 2007).

Atualmente são conhecidos três ciclos de transmissão distintos para a FA: **(I)** ciclo de transmissão silvestre, anteriormente conhecido como febre amarela da selva; **(II)** ciclo de transmissão urbano; e **(III)** ciclo de transmissão intermediário ou rural (figura 4). No ciclo de transmissão silvestre os hospedeiros primários são os PNHs. Neste ciclo os humanos são hospedeiro acidentais, sendo os vetores mosquitos do gênero *Aedes* na África e *Sabethes* ou *Haemagogus* nas Américas. No ciclo de transmissão urbano os hospedeiros principais são os humanos e o vetor é o *Aedes aegypti*, não havendo necessidade de um hospedeiro silvestre para a manutenção da circulação viral. O ciclo de transmissão intermediário (rural) foi descrito no continente Africano e ocorre na interface entre áreas urbanas e rurais ou silvestres, com vetores *Aedes spp.* envolvidos, ocasionando pequenas epidemias rurais com grande potencial para desencadear surtos urbanos (MONATH, 2001; WHO, 2017).



**Figura 4:** Ilustração representando os ciclos de transmissão da Febre Amarela. Silvatic: silvestre. Urban: urbano. Rural: rural/intermediário. Fonte: A global strategy to Eliminate Yellow fever Epidemics 2017–2026 (WHO, 2017).

No continente Africano, os principais hospedeiros amplificadores do YFV são os PNHs dos gêneros: *Cercopithecus*, *Colobus*, *Cercocebus* e *Papio* (RODHAIN, 1991). Os primatas neotropicais, ou do Novo Mundo, descritos são divididos em cinco famílias: Pitheciidae, Aotidae, Atelidae, Cebidae, e Callitrichidae (JACOB C. DUNN & JURGI CRISTÓBAL-AZKARAT, 2016; ZUKAL, 2020) (figura 5). A família Cebidae compreende os gêneros: *Cebus*, *Sapajus* e *Saimiri*; a família Callitrichidae compreende os gêneros: *Callibella*, *Callimico*, *Cebuella*, *Leontopithecus*, *Mico*, *Saguinus* e *Callithrix*; Família Atelidae compreende os gêneros: *Ateles*, *Brachyteles*, *Lagothrix*, *Alouatta* e *Oreonax*; a família Pitheciidae possui os gêneros: *Callicebus*, *Cacajao*, *Chiropotes* e *Pithecia*; enquanto a família Aotidae é composta apenas pelo gênero *Aotus* (JACOB C. DUNN & JURGI CRISTÓBAL-AZKARAT, 2016). Nas américas, a maior diversidade e distribuição de PNHs é observada no Brasil, com distribuição de espécies nos seis biomas brasileiros (<https://www.taxeus.com.br/lista/3035>).

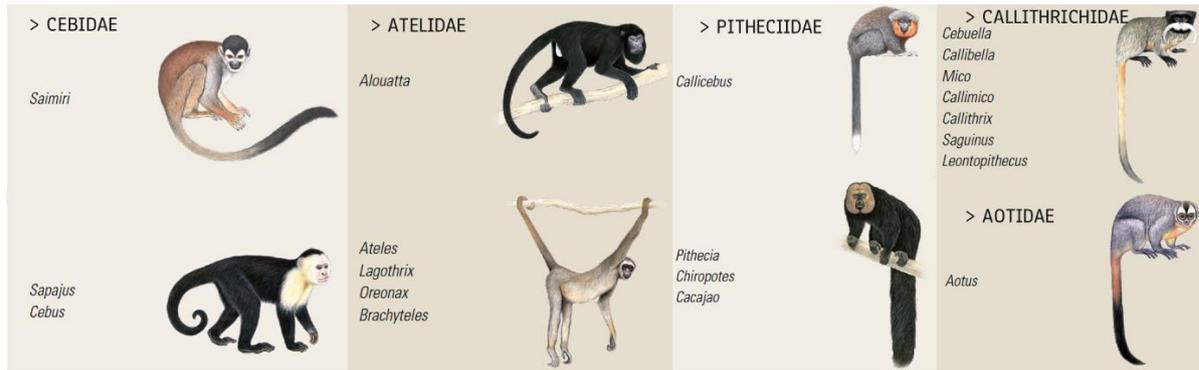


Figura 5: Famílias de primatas neotropicais, seus gêneros e ilustração de representantes (adaptado de ZUKAL, 2020).

Um dos riscos relacionados ao vetor citados pela Organização Mundial de Saúde (OMS), é a propagação mundial dos principais vetores responsáveis pelos surtos urbanos: os mosquitos do gênero *Aedes spp.* (WHO, 2017), desta forma, mais cidades e países estão em risco de emergência de FA. As atuais epidemias de febre Zika, dengue e febre Chikungunya (MAYER; TESH; VASILAKIS, 2017), doenças cujo vírus é transmitido por mosquitos do gênero *Aedes*, são indicativos do sucesso ecológico deste vetor. As epidemias citadas anteriormente levantam o alerta quanto à possível reurbanização da FA em áreas onde este ciclo não é relatado, como por exemplo o Brasil, país cuja erradicação do ciclo urbano de FA ocorreu em 1942 (FRANCO, 1969).

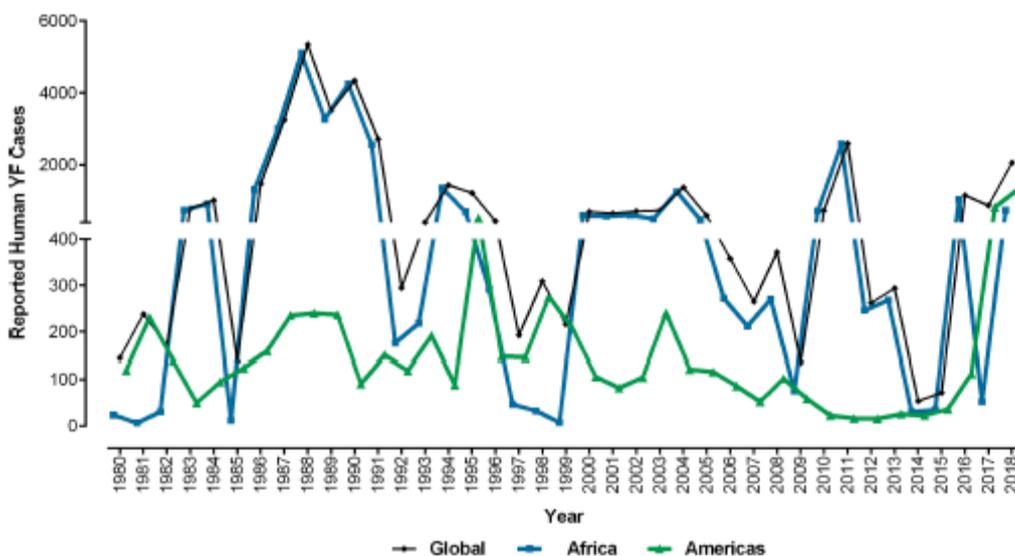
Os eventos de *spillover* ocorrem quando um patógeno é transmitido a partir de uma população hospedeira reservatária para uma nova população potencialmente hospedeira (POWER; MITCHELL, 2004). Visto que no Brasil há a presença dos vetores associados aos ciclos de transmissão silvestre e urbano da FA, e todos os PNHs são susceptíveis a infecção por YFV, o aumento do contato humano com ambientes silvestres representa um risco para eventos de *spillover* da FA silvestre, como também sua reurbanização (POSSAS et al., 2018).

Segundo a OMS, alguns dos riscos relacionados ao ambiente e ao comportamento humano associados à emergência do YFV observados em cidades africanas são: a aproximação humana dos ambientes, reservatórios e vetores silvestres através do desmatamento; mudança climática; aumento de incursões em áreas silvestres; construção e limpeza de terras para a agropecuária; a migração pendular entre áreas silvestres e cidades ou grandes assentamentos; e o constante movimento populacional para diversas regiões. Estes fatores citados, em conjunto, contribuem para a potencial disseminação do vírus da febre amarela (WHO, 2017).

### 1.2.2 Epidemiologia

A FA continua uma ameaça à saúde pública mundial, visto que não há tratamento específico. A vacina (YFV 17DD) continua a melhor forma de combate à doença e prevenção de novos surtos. A OMS preconiza como estratégia para controle e prevenção da FA a imunização de pessoas a partir de nove meses de idade, campanhas de vacinação em massa para aumento da cobertura vacinal em áreas de risco, além da vacinação de viajantes para áreas endêmicas para a FA (WHO, 2019). O Ministério da Saúde brasileiro (MS) indica a aplicação de dose única da vacina contra a febre amarela desde o ano de 2017, seguindo as diretrizes da OMS, sem necessidade de aplicação de dose de reforço (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017a; WHO, 2013) visto que uma dose única é suficiente para conferir imunidade ao indivíduo ao longo de sua vida.

A FA é endêmica em países da África e América do Sul (MONATH; VASCONCELOS, 2015), locais onde o ciclo de transmissão silvestre é mantido (ROBERTSON, 1996). Existe uma vacina contra a FA desde 1937 (THEILER; SMITH, 1937), entretanto estima-se que cerca de 400 milhões de pessoas não vacinadas vivem em áreas de risco para a doença (SHEARER et al., 2017). São reportados anualmente cerca de 200 mil casos de FA, com 30 mil casos de óbito associados (figura 6) (PAHO, 2021; SACCHETTO et al., 2020a).



**Figura 6:** Reporte de casos mundiais de Febre Amarela até 2018. Preto: Global. Azul: África. Verde: Américas. Year= ano; Reported Human YF Cases= casos de FA humana reportados. Adaptado de: (SACCHETTO et al., 2020a).



doença. Desta forma, as populações são rapidamente renovadas e o ciclo enzoótico da FA é mantido com intervalos reduzidos entre surtos (MORENO et al., 2013; SILVA et al., 2020). Diferentemente, os PNHs endêmicos da América do Sul são altamente susceptíveis à infecção por YFV, levando a taxas significativas de morbidade e mortalidade nestes animais (KLITTING et al., 2018). Na América do Sul, fora da bacia amazônica, o YFV reemerge esporadicamente com caráter temporal e sazonal, especialmente em períodos chuvosos com temperaturas elevadas (DE THOISY et al., 2020). Acredita-se que o padrão temporal, com intervalos de cinco a sete anos, observado para os surtos de FA, é devido à renovação das populações de PNHs necessárias para a amplificação viral (revisado por KLITTING et al., 2018).

Desde meados da década de 2000 o padrão epidemiológico das infecções por YFV no Brasil mudou, e a maior parte dos casos reportados no período foram fora da região amazônica (VASCONCELOS, 2003). Vasconcelos descreve que essa reemergência nas regiões sudeste e sul do país deve-se a cinco fatores: exposição de uma população humana suscetível ao vírus; alta densidade de vetores e hospedeiros silvestres (PNHs); condições climáticas favoráveis, especialmente aumento da precipitação; emergência de uma nova linhagem genética; e circulação de humanos e/ou PNHs infectados (VASCONCELOS, 2010).

Considerando que o Brasil tem a maior diversidade de PNHs neotropicais descrita, com 179 espécies dentre as cinco famílias neotropicais conhecidas (IUCN, 2022) majoritariamente distribuídas em três biomas (Floresta Amazônica, Mata Atlântica, e Cerrado), um deles, o Cerrado, tem importância para a ecologia da doença, visto que ocorre em aproximadamente 24% do território brasileiro e se interpõem entre os biomas Amazônia, Mata Atlântica, Pantanal e Caatinga (IBGE, 2019). Uma vez que a região sudeste é majoritariamente coberta por Cerrado e Mata Atlântica, esta, configura um importante local para conservação de espécies e vigilância de epizootias.

Durante 2008 e 2009 casos de FA em humanos foram reportados inicialmente no estado do Pará, com posteriores notificações em Tocantins, Goiás, Mato Grosso do Sul, São Paulo e Rio Grande do Sul. Grande eventos de epizootias de PNHs ocorreram em 2009 nos estados de Goiás, Mato Grosso do Sul e alcançou o sul do país, no Rio Grande do Sul (MONATH; VASCONCELOS, 2015). Os casos nas regiões Sul e Sudeste durante 2008-2009 foram causados por uma nova linhagem, o genótipo 1E, que emergiu do genótipo 1D, linhagem que circulou no país e causou surtos de 1998 a 2007 (revisado por VASCONCELOS, 2010).

No período 2008/2009 grande parte dos casos de FA reportados foram fora da área endêmica para o YFV no Brasil (regiões Sul e Sudeste), logo, a rotina de imunização contra a FA não era recomendada nestes locais (MONATH; VASCONCELOS, 2015). Após o período de surto 2008/2009 no Brasil, fora da bacia amazônica, o MS direcionou a ampliação da vacinação contra FA para as regiões consideradas de transição, o que incluiu os estados do Rio Grande do Sul, São Paulo, Santa Catarina e a região sul do estado de Minas Gerais (MS; SVS, 2009). Possivelmente devido a estes fatores, os maiores surtos de FA silvestre desde a descrição do ciclo de transmissão silvestre na década de 1930, ocorreram de 2016 a 2018 na região sudeste brasileira (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020), com início no estado de Minas Gerais.

Desde 2008 o estado de Minas Gerais faz parte da área onde a vacinação contra FA é recomendada pelo MS. Contudo, conforme o Informe Especial Febre Amarela No Brasil Nº 01/2017, publicado pelo MS, até o fim de 2016 a cobertura vacinal do estado permaneceu baixa, com aproximadamente metade dos municípios do estado apresentando cobertura vacinal abaixo de 50% (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). Tal situação tornou a população do estado susceptível à infecção por YFV (FIGUEIREDO et al., 2020). Desde o surto de FA iniciado em 2016, as áreas com recomendação para vacinação contra FA em seu calendário vacinal foram expandidas em território nacional para incluir todos os estados das regiões norte, centro-oeste, sudeste e sul, além de alguns estados da região nordeste e municípios do Piauí, Alagoas e Sergipe (SAÚDE, 2019).

No período de monitoramento de 2016 a 2017 foram notificados ao MS 3.564 casos humanos suspeitos de FA, com confirmação de 777 casos e 2.270 foram descartados, os demais casos foram inconclusivos devido à falta de critérios clínicos e epidemiológicos ou amostras para diagnóstico, ou permaneceram em investigação (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017b). No mesmo período (2016/2017) foram notificados ao MS 5.364 casos de epizootias em PNHs, deste, 1.412 foram confirmados para FA, 878 foram descartados e os demais permaneceram em investigação ou foram determinadas inconclusivas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017b).

Durante o monitoramento de FA no período de 2017 a 2018 foram notificados ao MS 6.589 casos humanos suspeitos de FA, com 1.266 confirmados e 4.091 descartados para FA, enquanto foram notificados 7.417 casos de epizootias, com 752 confirmações e 2.458 casos descartados para FA, os demais casos de epizootias permaneceram em investigação ou foram inconclusivos devido a falta de critérios clínicos e epidemiológicos ou amostras para diagnóstico laboratorial (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, 2018).

Durante os períodos de monitoramento de FA entre 2016 e 2019 uma alta positividade de infecção por YFV foi observada em amostras de PNHs coletadas em áreas urbanas, periurbanas e rurais de diferentes municípios de Minas Gerais (SACCHETTO et al., 2020b). Estimativas da carga genômica de YFV nas amostras de PNHs naturalmente infectados testadas por Sacchetto e colaboradores (2020) demonstram uma carga maior, de forma similar entre primatas dos gêneros *Alouatta*, *Callithrix*, e *Callicebus* coletados em áreas rurais, quando em comparação a amostras de *Callithrix* coletadas em áreas urbanas e periurbanas. Análises filogenéticas utilizando essas amostras demonstraram que as epizootias e casos humanos do período foram provocados pela mesma linhagem de YFV.

No monitoramento de 2019 a 2020 as primeiras detecções do YFV foram confirmadas entre os meses de julho a outubro nos estados de São Paulo e Paraná (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020). Neste período (2019/2020) foram notificados mais de 3.000 eventos de PNHs mortos com suspeita de FA, destes, foram confirmadas por critério laboratorial 358 epizootias, 722 foram descartados, 505 permanecem em investigação e 1.611 foram classificadas como indeterminadas, devido à falta de amostras para diagnóstico. No mesmo período (2019/2020) foram notificados 881 casos humanos suspeitos para FA, destes, 18 foram confirmados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020).

Durante o período de monitoramento 2020 a 2021 foram reportadas mais de 1.400 epizootias em PNHs suspeitas de FA, destas, 218 foram confirmadas enquanto 635 foram classificadas como indeterminadas devido à falta de amostra para diagnóstico laboratorial. No mesmo período (2020/2021) foram notificados 287 casos humanos suspeitos de FA, cinco foram confirmados. Todos os casos humanos e a maior parte dos casos de epizootias confirmados foram no período sazonal da FA (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

Resultados publicados por Rezende e colaboradores demonstram a circulação do YFV na região sudeste do país de forma silenciosa antes do início do surto, em 2016 (DE REZENDE et al., 2018). Análises evolutivas e epidemiológicas suportam a hipótese de introdução do YFV na região sudeste do Brasil, a partir da região centro-oeste, e avanço em direção a região sul do país (DE REZENDE et al., 2018; DELATORRE et al., 2019a; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020, 2021).

Delatorre e colaboradores (2019) confirmaram a introdução do YFV no estado de Minas Gerais a partir de Goiás, estado da região centro-oeste do Brasil. Em seu trabalho relataram ainda a circulação desta mesma linhagem em Minas Gerais há dois períodos sazonais anteriores

ao surto de 2016 e sua introdução no estado de Goiás em 2014 (DELATORRE et al., 2019b). Em 2019 foi detectada a infecção por YFV em PNHs no estado do Rio de Janeiro, a persistência desta linhagem ocorreu por pelo menos três períodos sazonais (DE ABREU et al., 2019). Já em 2020 a Dra. Natália da Silva relata em sua tese de doutorado a presença da mesma linhagem viral em PNHs de Minas Gerais, o que sugere a circulação silenciosa do vírus na região sudeste (DE ABREU et al., 2019; NATALIA INGRID OLIVEIRA DA SILVA, 2021). Estes dados demonstram a circulação de uma mesma linhagem de YFV fora da bacia amazônica por pelo menos oito anos.

De forma concordante, epizootias são continuamente reportadas e casos de infecção por YFV foram confirmados em humanos, vetores e PNHs na região sudeste e sul do país nos anos seguintes a 2020 (SVS; MS, 2023; DE THOISY et al., 2020; OLIVEIRA DA SILVA, 2021; OLIVEIRA et al., 2023). Em boletim epidemiológico do MS publicado em janeiro de 2023, durante o período de monitoramento 2022/2023 foram notificadas mais de 600 epizootias envolvendo PNHs suspeitos para FA em território nacional, com duas (0,3%) delas confirmadas por critério laboratorial no estado de Minas Gerais e Paraná, também foram notificados 158 casos humanos suspeitos (SVS; MS, 2023). No entanto, para o mesmo período a SES-MG registrou 400 epizootias com confirmação de infecção por YFV em dois casos; houve também a notificação de 58 casos humanos suspeitos de FA e a confirmação de um óbito por FA em março de 2023, (CENTRO DE INFORMAÇÕES ESTRATÉGICAS EM VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2023), indicando uma subnotificação de epizootias e baixa confirmação laboratorial em escala nacional. Estes dados apresentam evidências de manutenção e circulação do YFV nas regiões Sul e Sudeste brasileiras, com risco de transmissão à população humana, o que demonstra a importância da vigilância epidemiológica para manejo e contenção de surtos nestas áreas.

### 1.2.3 Patogênese viral e Diagnóstico de FA

A partir da inoculação do YFV via vetor infectado, os indivíduos passam por um período de incubação de três a seis dias. Acredita-se que o YFV é amplificado inicialmente nos linfonodos e após viremia a FA torna-se viscerotrópica, com o fígado como principal sítio de multiplicação viral (revisado por DOUAM; PLOSS, 2018). Após o período de incubação, os primeiros sinais clínicos apresentados são similares a sintomas gripais, como início abrupto de calafrios, febre, dor de cabeça, fotofobia, dor lombossacral, náuseas, prostração, e mialgias generalizadas, chamado de período virêmico (revisado por DOUAM; PLOSS, 2018; e

MONATH, 2001). Seguido ao período virêmico pode ocorrer a recuperação da infecção ou então duas a 24 horas de melhora clínica, chamada de período de remissão (MONATH, 2001).

Posteriormente ao período de remissão, o indivíduo pode desenvolver o período de intoxicação, apresentando o quadro grave da doença que pode resultar em óbito (20 a 50% dos casos) (SACCHETTO et al., 2020a). Alguns dos sintomas associados a quadros graves da FA são: icterícia, bradicardia, delírio, estupor, acidose metabólica que leva a choque e hemorragia, e falência renal e hepática (revisado por DOUAM; PLOSS, 2018; e SACCHETTO et al., 2020a). No fígado o YFV induz a apoptose de hepatócitos e necrose lítica, que, junto à esteatose, resulta na maior parte dos danos hepáticos observados durante a doença. Lesões significativas nos rins, timo, e baço, também já foram reportadas, tanto em humanos quanto animais (revisado por DOUAM; PLOSS, 2018).

Sabe-se que a produção de anticorpos anti-YFV inicia-se, em média, entre o 3º e 6º dia de infecção, com a produção de IgM na fase aguda da infecção e, posteriormente, IgG, com o pico de detecção próximo ao 14º dia pós-infecção (WAGGONER; ROJAS; PINSKY, 2018). Considerando que anticorpos têm meia vida e tempo de detecção maior do que partículas virais utilizando amostras de tecido em decomposição (ALBAS et al., 1999; GAMBLE; PATRASCU, 1996), estes são importantes recursos para o diagnóstico e detecção de infecção por vírus envelopados de RNA, como é o caso do YFV.

A Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) preconiza o diagnóstico da febre amarela através de métodos denominados virológicos, e/ou através de métodos sorológicos. Para os métodos denominados virológicos podem ser realizados testes moleculares como PCR (do inglês *polymerase chain reaction*) para detecção do genoma ou antígenos viral, técnicas de imuno-histoquímica e o isolamento viral utilizando as amostras suspeitas, estes métodos são indicativos de infecção ativa no período de coleta (PAHO-WHO, 2018). Os métodos sorológicos incluem detecção de IgM anti-YFV através de ELISA (do inglês *enzyme-linked immunosorbent assay*) ou ensaio de redução de placas (PRNT, do inglês *plaque reduction neutralization test*) (PAHO-WHO, 2018), e indicam infecção prévia pelo YFV.

#### 1.2.4 Vigilância Epidemiológica

Considerando a reemergência da FA, a vigilância de epizootias tem como objetivo a detecção precoce da circulação do YFV em seus reservatórios silvestres, os PNHs. Dessa forma, os eventos de FA em PNHs são considerados sentinela para a detecção de casos humanos

(MORENO et al., 2013). No Brasil, a Vigilância de Epizootias teve início em 1999, após um período de surto na região centro-oeste, com casos de epizootia antecedendo casos de FA em humanos. Desde então, o MS incentiva iniciativas regionais para detecção do YFV ainda em seu ciclo enzoótico (MS; SVS., 2017).

Azevedo Fernandes e colaboradores realizaram análises comparativas entre amostras humanas e de PNHs de diferentes gêneros, obtidas durante o último grande surto de FA no Brasil (2017). Os primatas do gênero *Alouatta* foram considerados as sentinelas mais confiáveis visto que são altamente sensíveis à infecção por YFV e apresentam, proporcionalmente, a maior taxa de mortalidade atribuída à FA; primatas dos gêneros *Sapajus* e *Callicebus* apresentaram cargas virais mais altas em comparação aos demais, entretanto apresentaram menores taxas de mortalidade. Já os primatas do gênero *Callithrix* são considerados os menos sensíveis, apresentando cargas virais e taxas de mortalidade mais baixas em relação aos demais (DE AZEVEDO FERNANDES et al., 2021).

A fim de prevenir a ocorrência de casos humanos de FA, a vigilância de epizootias em PNHs realiza a notificação de casos confirmados de infecção por YFV de forma compulsória e imediata (MS; SVS., 2017). Diferenças na suscetibilidade, carga viral e taxas de mortalidade devem ser consideradas na vigilância estratégica de epizootias e medidas de controle da FA (DE AZEVEDO FERNANDES et al., 2021). Os casos suspeitos devem guiar os setores competentes dos municípios afetados para a tomada de ações *in loco*, como: acionar os setores de zoonoses, coleta e avaliação de amostras para diagnóstico, envio de amostras para laboratório de referência, investigação local sobre presença de vetores e hospedeiros, além de histórico vacinal da população. Os casos confirmados de infecção por YFV em PNHs são usados como guia para campanhas de imunização e manejo em áreas e populações em risco para a infecção por YFV (MG - SES, 2021).

Embora haja um programa de vigilância de epizootias, ele é principalmente baseado em amostras de carcaças de PNHs (MS; SVS., 2017), o que pode limitar a obtenção de amostras representativas de diferentes períodos ou adequadas para certas técnicas de diagnóstico. Esses desafios, somados à aspectos da infecção pelo YFV como período e carga virêmica (MONATH, 2001), podem dificultar ou impedir a aplicação de metodologias diagnósticas precisas. Desta forma, são necessárias metodologias complementares e adaptadas a esta situação.

Assim, em consonância com a literatura, em que foi descrito resultados promissores para ensaios de detecção de anticorpos utilizando fluidos de tecidos *post mortem* macerados

(GAMBLE; PATRASCU, 1996), foi possível considerar a utilização de amostras de tecido sólido para testes sorológicos. Com base na possibilidade de recuperar anticorpos a partir de tecidos sólidos provenientes de animais infectados, em seu doutorado, a Dra. Natalia da Silva executou ensaios de neutralização viral a partir de amostras de tecido hepático macerado, provenientes de PNHs PCR-positivos para detecção do genoma de YFV. Os resultados descritos por ela indicam viabilidade do uso deste tipo de amostra e possivelmente a neutralização viral em ensaios utilizando uma delas, e descreve ainda a detecção positiva por teste imunocromatográfico (EcoDiagnóstica, Brasil) para a mesma (OLIVEIRA DA SILVA, 2021).

Suscitado por estes resultados foram produzidos homogenatos por meio de maceração (descrito no tópico [7.8.2](#)) de fragmentos de fígados coletados de animais experimentalmente infectados, além de realizados ensaios de citotoxicidade pelo Dr. Erik Reis, durante suas atividades de pós-doutorado. Estes ensaios foram performados com o inóculo de diferentes diluições do homogenato de fígado em placas contendo células VERO (ATCC, EUA), seguido do uso de 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina (MTT), dimetilsulfóxido (DMSO) e então levadas ao espectrofotômetro para leitura do resultado. Os resultados obtidos confirmaram viabilidade celular superior a 80% na menor diluição utilizada (1:20), e aumento progressivo de viabilidade, alcançando 100% na maior diluição (1:640), demonstrando possibilidade de uso deste tipo de amostra sem prejuízo para a monocamada celular a ser inoculada.

Desta forma, durante os anos de 2021 e 2022 o grupo de pesquisa ao qual este trabalho pertence, realizou diversos testes a fim de se avaliar a possibilidade de usar tecido hepático para obtenção de um homogenato a ser utilizado em ensaios de neutralização viral. Uma vez que homogenatos provenientes de carcaças animais demonstraram-se viáveis em ensaios preliminares. Assim, aqui será descrita uma adaptação da técnica de PRNT para o uso de amostras de tecido hepático.

## 2. JUSTIFICATIVA

A febre amarela permanece um grande problema para a saúde pública global. Algumas regiões dos continentes africano e sul-americano são endêmicas para o YFV e surtos recentes nestes continentes evidenciaram a necessidade de ações preventivas quanto a reemergência da febre amarela. A principal região endêmica para o YFV no continente sul-americano é a bacia amazônica. Contudo, o último grande surto notificado no continente ocorreu em 2016 fora da bacia amazônica, e teve o estado de Minas Gerais como centro. Este surto teve elevado número de casos humanos e epizootias confirmadas. O ministério da Saúde notificou casos humanos e epizootias ocorridos no ano de 2020, as secretarias de estado de saúde confirmaram casos humanos e epizootias devido à febre amarela também em 2021 e 2022. A literatura descreve, também, a detecção de YFV em carcaça de PNHs e em vetores do estado de MG, estes dados demonstram a continuidade da circulação viral no estado, mesmo após o período de surto intenso. A circulação silenciosa deste vírus foi constatada em Minas Gerais antes do início do surto (2015) e sabe-se que a introdução do vírus da febre amarela no estado ocorreu a partir da região centro-oeste. Estas informações confirmam a circulação do vírus da febre amarela fora da bacia amazônica por pelo menos sete anos.

Os eventos de epizootias e morte de animais devido a FA levantam a preocupação quanto ao declínio de espécies ameaçadas e a consequente perda de biodiversidade e sentinelas para prevenção de novos surtos, visto que todas as famílias de PNHs do novo mundo possuem espécies criticamente ameaçadas na *Red List* de Espécies Ameaçadas, disponibilizada pela União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais (IUCN) (<https://www.iucnredlist.org/>). Outras preocupações quanto ao vírus da febre amarela são a possibilidade de eventos de *spillover* e ressurgimento do ciclo urbano. Isto pois há circulação viral próxima a áreas urbanas, e proximidade humana aos animais infectados. Estes ocorrem por meio de corredores ecológicos, fragmentos de mata e parques urbanos, locais onde casos de infecção por vírus da febre amarela em PNHs já foram reportados. É importante ressaltar que o ciclo de transmissão da febre amarela é multifatorial e ecologicamente complexo pois envolve diferentes vetores, e hospedeiros. Assim, as ações de vigilância epizooticas são de extrema importância para a vigilância da Febre Amarela. Estas ações visam o monitoramento de áreas endêmicas e predição de possíveis surtos, a fim de reconhecer regiões de ocorrência e subsidiar a definição de áreas de risco e áreas com recomendação de ações públicas.

Enquanto a investigação molecular de infecção por vírus da febre amarela é uma importante forma de detecção da circulação viral, evidenciando infecções ativas, o uso de técnicas sorológicas pode ampliar esta janela de detecção, visto que são indicativos de infecção prévia. Contudo, a vigilância de epizootias é limitada devido ao uso majoritário de amostras provenientes de carcaças de PNHs, dificultando a obtenção de amostras adequadas aos protocolos e técnicas diagnósticas estabelecidos. Este desafio somado aos aspectos da infecção por vírus da febre amarela pode ser limitante para a aplicação de metodologias diagnósticas.

Desta forma a investigação epidemiológica com combinação de abordagens é preferencial. Neste trabalho ocorre a investigação de infecção por vírus da febre amarela, em primatas não humanos amostrados em diferentes regiões do estado de Minas Gerais durante e após os surtos de 2017, além de otimização de ensaios para teste sorológico, com método adaptado à escassez de amostras de soro. Este trabalho pode gerar resultados capazes de fomentar a compreensão da dinâmica de distribuição e circulação do vírus da febre amarela durante e após o último surto de febre amarela. Os resultados aqui obtidos têm potencial para guiar estratégias de controle e manejo tanto em humanos quanto PNHs, para melhor auxiliar no monitoramento e compreensão da dinâmica de infecção por YFV. Portanto, pode prevenir o risco de infecção por *spillover*, além de promover a vigilância da circulação do YFV no estado de Minas Gerais, epicentro do último grande surto.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

- Investigar a circulação de vírus da febre amarela em PNHs no estado de Minas Gerais e testar um ensaio de neutralização viral com amostra alternativa a soro.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Investigar presença do genoma de vírus da febre amarela em carcaças de PNHs coletados em MG, nos anos de 2017, 2021 a 2022;
- Adaptar um teste de neutralização viral para estimar presença de anticorpos contra o vírus da febre amarela.

#### 4. MATERIAIS E MÉTODOS:

##### 4.1 Autorizações legais

Conforme determina a Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), o uso das amostras biológicas no presente trabalho foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS (UFMG) nos seguintes projetos e protocolos 33/2021, CEUA: 176/2021, CEUA: 98/2017 (Anexo 1, Anexo 2 e Anexo 3). As amostras utilizadas estão registradas no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob o código de cadastro A3A89D6.

##### 4.2 Amostras biológicas

A partir de 2017, quando se iniciou a parceria entre Laboratório de Vírus (LV) e Laboratório de Zoonoses da Prefeitura de Belo Horizonte (LZOON-BH), foram recebidas diversas carcaças e fragmentos de tecido provenientes de PNHs de vida livre do estado de Minas Gerais. As amostras utilizadas neste trabalho são oriundas desta parceria e compreendem espécimes de diferentes gêneros (*Alouatta*, *Callithrix*, *Sapajus* e *Callicebus*), coletadas pelo Programa de vigilância de febre amarela.

As carcaças, anteriormente citadas, foram coletadas em áreas rurais, periurbanas e urbanas de diferentes regiões do estado durante o período de surto de FA (2017-2018) e após o surto de FA (2019 a 2022). As amostras de PNHs coletadas e recebidas em diferentes anos correspondem a diferentes tecidos: em 2017 foram recebidos baço, cérebro, fígados, gônadas, pulmões, rins entre outros; em 2018 as amostras recebidas foram de fígados; já as amostras referentes às coletas de 2019 até a presente data, incluem fígado e pulmão.

Parte dessas amostras foi armazenada *in natura* enquanto outra parte foi armazenada na presença de solução estabilizadora RNAlater™ Stabilization Solution (Invitrogen – Thermo Fisher Scientific, EUA) a -80°C. As amostras preservadas em RNAlater™ foram utilizadas para testes moleculares. As amostras de 2017 a 2020 foram, em sua maioria, previamente triadas pelas Dras. Livia Saccheto e Natália Silva (OLIVEIRA DA SILVA, 2021; SACCHETTO et al., 2020b) de forma complementar, 144 rins e 58 cérebros correspondentes às carcaças de 2017 (Tabelas

1 e 2) terão resultados apresentados neste estudo. Já as amostras coletadas e recebidas em 2021-2022 (Tabela 3) foram triadas por RT-qPCR (do inglês *reverse transcription polymerase chain reaction*) para detecção do genoma de YFV também neste trabalho.

Tabela 1: Amostras de rins provenientes de carcaças de primatas não humanos previamente YFV RT-qPCR negativos coletado durante o ano de 2017

	PNH	Total	%
Período	Úmido	32	22,2
	Seco	112	77,8
Área	Urbana	91	63,2
	Periurbana	16	11,1
	Rural/Silvestre	36	25,0
	Sem Dados	1	0,7
Táxon	<i>Callithrix Sp.</i>	132	91,7
	<i>Alouatta Sp.</i>	4	2,8
	Cebidae	1	0,7
	<i>Callicebus Sp.</i>	7	4,9
Total		144	100

PNH: *primata não humano*

Tabela 2: Amostras de cérebros provenientes de carcaças de primatas não humanos previamente YFV RT-qPCR negativos coletado durante o ano de 2017

	PNH	Total	%
Período	Úmido	5	8,6
	Seco	53	91,4
Área	Urbana	40	69,0
	Periurbana	5	8,6
	Rural/Silvestre	11	19,0
	Sem Dados	2	3,4
Táxon	<i>Callithrix Sp.</i>	55	94,8
	<i>Alouatta Sp.</i>	1	1,7
	<i>Callicebus Sp.</i>	2	3,4
Total		58	100

PNH: *primata não humano*.

Tabela 3: Total de amostras provenientes de carcaças de primatas não humanos coletadas durante o ano de 2021 e 2022

	PNH	Total	%
Período	Úmido	23	18,5
	Seco	94	75,8
	Sem Dados	7	5,6
Área	Urbana	83	66,9
	Periurbana	8	6,5
	Rural/Silvestre	16	12,9
	Sem Dados	17	13,7
Táxon	<i>Callithrix Sp.</i>	110	88,7
	<i>Alouatta Sp.</i>	3	2,4
	<i>Sapajus Sp.</i>	3	2,4
	Cebidae	1	0,8
	Sem Dados	7	5,6
Mesorregiões	Central Mineira	15	12,1
	Metropolitana De Belo Horizonte	62	50,0
	Noroeste De Minas	2	1,6
	Norte De Minas	4	3,2
	Oeste De Minas	7	5,6
	Triangulo Mineiro	7	5,6
	Vale Do Rio Doce	13	10,5
	Zona Da Mata	5	4,0
	Jequitinhonha	1	0,8
	Sul / Sudoeste De Minas	1	0,8
Amostras	Sem Dados	7	5,6
	Fígado	124	100,0
	Pulmão	124	100,0
Total		248	100

*PNH: primata não humano*

Em 2020, a Dra. Natália da Silva descreve em sua tese a detecção de RNA de YFV por RT-qPCR e sequenciamento parcial de genoma a partir de amostra de pulmão coletada de carcaça de PNH (OLIVEIRA DA SILVA, 2021). Desta forma, deu-se possibilidade de testagem para amostras de órgãos, não testadas anteriormente, provenientes do surto de FA (2017) e a continuidade de teste de fígados e pulmões recebidos posteriormente a 2020. Foram testados, portanto, 144 rins oriundos de carcaças de PNHs coletadas durante o surto de 2017 cujos fígados foram negativos para detecção do genoma do YFV e 58 cérebros destas mesmas carcaças; e referente aos anos de 2021 e 2022 foram recebidas e testadas 248 amostras de fígado e pulmão, coletadas de 124 carcaças de PNHs de vida livre, cedidas pelo LZOON-BH. Ainda no LZOON-

BH, todas as amostras foram submetidas a investigação de infecção por vírus da raiva, e foram negativas para sua presença, além de identificadas a nível de família ou gênero com exceção de oito carcaças.

#### 4.3 Células e Vírus

Foram utilizadas células VERO CCL81 (ATCC/EUA), uma linhagem celular de tecido epitelial transformada a partir de rim de macaco verde (*Cercopithecus aethiops*), para a produção e titulação de estoque viral e como plataforma para isolamento viral. Para as tentativas de isolamento viral, além de VERO também foram utilizadas células C6/36 (ATCC/EUA), uma linhagem celular derivada do mosquito *Aedes albopictus*.

As células VERO foram mantidas em meio MEM (*Minimal Essential Medium*, Cultilab, Brasil) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB), e antibióticos (100 U/mL de penicilina, 50µg/mL de estreptomicina e 2µg/mL de anfotericina B) em estufa a 37°C, em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>. As células C6/36 foram mantidas em meio L-15 (Leibovitz, Cultilab, Brasil) suplementado com 10% de SFB e antibióticos, como descrito anteriormente, a 28°C em estufa com demanda biológica de oxigênio (BOD, do inglês *biological oxygen demand*).

Para a produção de estoques virais, foram utilizadas amostras de YFV vacinal 17-DD Fiocruz (gentilmente cedidas pelo Dr. Pedro Augusto Alves e Andreza Parreiras Gonçalves). Foram utilizadas garrafas de 75cm<sup>2</sup> contendo 1,8x10<sup>6</sup> células Vero, semeadas no dia anterior à infecção, que, por sua vez, foi realizada a uma multiplicidade de infecção (MOI, do inglês *multiplicity of infection*) de 0,01, com adsorção feita a partir da homogeneização a cada 10 minutos, durante uma hora. Após infecção foi adicionado MEM suplementado com 1% de SFB e antibióticos até o volume final de 20mL. As células foram mantidas em estufa, nas mesmas condições citadas anteriormente, e observadas diariamente, ao microscópio óptico invertido para verificação de efeito citopático. Ao observar de 80% a 90% de efeito citopático, caracterizado pela lise celular das células VERO, o sobrenadante da infecção celular foi coletado e transferido para tubos cônicos de 50mL para centrifugação por 15 minutos a 2000 x g, e 4°C. O sobrenadante clarificado foi aliquoteado em tubos de 0,6mL contendo 50µL de sobrenadante e armazenado a -70°C para uso posterior.

#### 4.4 Titulação Viral

Os estoques virais foram titulados através de ensaios de formação de placas de lise. Para tal, os experimentos foram feitos com duas alíquotas diferentes do estoque viral em duplicata, utilizando placas de cultivo celular de seis poços, preparadas no dia anterior ao ensaio para uma confluência celular em torno de 90% da área total do poço. Cada poço foi semeado com  $4 \times 10^5$  células VERO por poço, adição de 1mL de MEM 5% S.F.B, e então as placas foram incubadas *overnight* para aderência das células e formação da monocamada.

Para o experimento de titulação viral, as alíquotas do estoque viral utilizadas foram diluídas de forma seriada em MEM 0% S.F.B e 2,5% HEPES na proporção de 1:10. Utilizou-se 300µL das diluições ( $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ) e o mesmo volume do meio utilizado nas diluições para o controle celular em cada uma das replicatas. Após uma hora de adsorção com homogeneização por agitação a cada 10 minutos, o inóculo foi retirado e foi, então, adicionado meio carboximetilcelulose 2% (p/v) (CMC) acrescido de meio 199 2x (Gibco-Life Technologies, EUA) no volume de 1:2 (v/v), 2% de SFB e antibióticos. As placas foram incubadas em estufa a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> por cinco dias. Decorridos os cinco dias de incubação foram fixadas com solução formalina (formaldeído 3,7%) por uma hora e então coradas com solução de cristal violeta 1% em PBS (p/v) por 30 minutos, para contagem de placas de lise e obtenção de resultado em unidades formadoras de placa por mL (PFU/mL, do inglês *plaque forming unit* por mL).

#### 4.5 Triagem molecular de YFV

Para a extração de RNA total foram utilizados fragmentos de 20 a 30mg dos rins, cérebros, pulmões e fígados preservadas em solução RNAlater™ *Stabilization Solution* a -80°C (Invitrogen – Thermo Fisher Scientific, EUA). Para cada amostra com RNA total extraído foi registrado o peso correspondente ao fragmento de tecido utilizado. O RNA total foi obtido com o uso do kit de extração de RNA total RNeasy® Mini Kit (QIAGEN, EUA), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. As extrações foram feitas em lotes de até 13 amostras junto a um controle negativo de extração, a fim de minimizar a manipulação de material biológico e risco de contaminação. Para o controle negativo foram utilizados apenas reagentes e água livre de RNase. O produto obtido foi armazenado em freezer -80°C e utilizado para triagem molecular empregando a técnica da reação em cadeia da polimerase em tempo real precedida de transcrição reversa (RT-qPCR), para investigação da presença de RNA de YFV.

Com o RNA obtido, foi realizado o teste de RT-qPCR para controle endógeno (gene codificador da  $\beta$ -actina) (tabela 4) para confirmar viabilidade de RNA total extraído (DE REZENDE, *et al.*, 2019; SACCHETTO *et al.*, 2020). Para triagem molecular da presença do RNA de YFV nas amostras, foi utilizada a metodologia e iniciadores descritos por Domingo e colaboradores (tabela 4) (DOMINGO *et al.*, 2012) por meio da técnica de RT-qPCR *One Step* com alvo a região 5' UTR (do inglês *untranslated region*) do genoma viral (Sistema GoTaq®Probe 1-StepRT-qPCR Promega, EUA).

Para a RT-qPCR foram utilizados, em duplicatas, 2,5 $\mu$ L de RNA total extraído como molde adicionados à 7,5 $\mu$ L de Master Mix de reação. A reação de RT-qPCR foi realizada nas seguintes condições: a 5 $\mu$ L de tampão 2x (GoTaq 1step, Promega, USA) serão adicionados 0,5 $\mu$ L de cada iniciador, 0,2 $\mu$ L YFV-probe-TAMRA, 0,2 $\mu$ L da Transcriptase Reversa, 2,5 $\mu$ L de RNA e água ultrapura q.s.p. 10  $\mu$ L. A reação ocorreu em termociclador StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ou QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System (Applied Biosystems), nas seguintes condições: 45°C por 15 minutos, 95°C por 2 minutos e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 60 segundos.

Tabela 4: Iniciadores para investigação de RNA codificador para B-actina e RNA de YFV, por RT-qPCR

Iniciadores e sondas	Sequência	Gene alvo	Tamanho do fragmento (pb)	Referência
YFV-F	GCTAATTGAGGTGYATTGGTCTG			
	C			
YFV-R	CTGCTAATCGCTCAAMGAACG	UTR 5'	88	DOMINGO <i>et al.</i> , 2012
YFV-Probe	ATCGAGTTGCTAGGCAATAAAC			
	AC			
$\beta$ actina-F	CCAACCGCGAGAAGATGA			De Rezende <i>et al.</i> , 2019
$\beta$ actina-R	CCAGAGGCGTACAGGGATAG	$\beta$ -actina	65	

YFV: vírus da febre amarela; F: iniciador sentido senso; R: iniciador sentido anti-senso; Probe: sonda.

Os controles (I) negativos de extração, (II) sem DNA alvo e (III) positivo para presença do genoma de YFV; foram devidamente utilizados em cada reação realizada. O limiar de detecção utilizado foi o Cq (do inglês *Cycle quantification value*) 39. Assim, foram consideradas positivas as amostras cuja amplificação em todas replicatas feitas foi igual ou

inferior ao Cq 39; as amostras consideradas indeterminadas foram aquelas cuja amplificação ocorreu até o Cq 39 em apenas uma das replicatas, enquanto as amostras negativas foram aquelas que não apresentaram amplificação abaixo do limiar de detecção utilizado (Cq > 39). Todas as amostras com resultado positivo ou indeterminado para detecção de RNA de YFV por RT-qPCR foram novamente submetidas ao teste de PCR. Desta vez, com e sem a presença de enzima RT, a fim de se detectar possíveis contaminações ambientais por *amplicons*.

As amostras com detecção de YFV foram registradas no SisGen sob o código de cadastro A3A89D6. Além disso, uma amostra positiva por RT-qPCR neste estudo e uma amostra sabidamente positiva para detecção de YFV foram utilizadas para tentativa de isolamento e sequenciamento de genoma viral.

#### 4.6 Isolamento viral

Foi realizada uma tentativa de isolamento viral utilizando 50mg de tecido pulmonar (PNH 695, amostra 1041/2020) (NATALIA INGRID OLIVEIRA DA SILVA, 2021) e hepático (PNH 876, amostra 1205/2021) de PNHs com detecção genômica de YFV por RT-qPCR. Dois sistemas *in vitro* foram utilizados e os inóculos ocorreram em placas de cultivo celular de 12 poços. Um dos sistemas *in vitro* utilizado foi a infecção de células C6/36, mantidas em meio L-15 suplementado com 10% SFB, a 28°C em BOD. O segundo dos sistemas de infecção foi de células VERO mantidas em meio MEM suplementado com 5% de SFB, a 37°C em estufa com 5% de CO<sub>2</sub>. As placas de 12 poços utilizadas foram preparadas com adição de  $3,6 \times 10^5$  células C6/36 por poço, e  $1,8 \times 10^5$  células VERO por poço, nos respectivos dias anteriores à infecção de cada uma delas.

As infecções foram feitas em seis passagens cegas. Para a primeira passagem, utilizou-se como inóculo um homogenato preparado a partir de 50mg do tecido em questão em 200µL de meio MEM ou L-15 sem suplementação de SFB suplementado com 2,5% de solução tampão HEPES 1M. Em tubos apropriados para uso em *beadbeater* (Mini-Beadbeater-16, BioSpec Products, EUA), foram adicionadas: quatro *beads* de borossilicato de 2mm de diâmetro (Sigma-Aldrich, Alemanha), 200 µL do meio adequado para cada tipo celular em concentração de 0% SFB e 2% de solução tampão HEPES. Após maceração, o produto obtido foi armazenado a -20°C por 2 minutos e então novamente macerado, após a segunda maceração este produto foi submetido a centrifugação em 8000 x g por 3 minutos, o sobrenadante foi coletado e transferido para um novo tubo para armazenamento temporário em -20°C. Ao tubo contendo o *pellet* de tecido macerado, foram adicionados novos 100µL de meio, nas condições descritas

anteriormente, sendo este submetido a uma nova maceração. Após maceração única, este novo produto foi submetido aos mesmos procedimentos descritos para o homogenato anterior e adicionado a ele, a fim de se obter 30 $\mu$ L de homogenato. O homogenato final foi filtrado em filtro de 0,22 $\mu$ m e utilizado para duas diluições (1:2 e 1:4) e inóculo de 180 $\mu$ L por poço da placa de cultura celular, onde foi feita a infecção de um poço para cada diluição das amostras e dois poços de controle celular de infecção, um com meio nas mesmas condições de preparo do homogenato, e um com meio sem adição de suplementações.

Após cinco dias de infecção para a C6/36 e quatro dias para a VERO, o sobrenadante de cada poço foi coletado e, centrifugado em 8000 x g por 3 minutos, 180 $\mu$ L destes sobrenadantes foram utilizados para uma nova passagem cega enquanto o restante foi armazenado em freezer -80°C. Os sobrenadantes coletados durante as seis passagens nas células foram utilizados para extração de RNA total utilizando o kit QIamp Viral RNA Minikit (QIAGEN, USA) seguido de RT-qPCR para a detecção de genoma de YFV.

#### 4.7 Adaptação do Teste de Neutralização Viral por Redução de Placas

##### 4.7.1 Animais Experimentalmente infectados

Com autorização da CEUA - UFMG, sob os números de protocolos 33/2021 e 176/2021, foram utilizadas amostras de animais experimentais provenientes de projetos anteriores do grupo, além de adquiridos e mantidos camundongos *knockout* para receptores de interferon tipo I C57 *black* 6 (IFNAR  $-/-$  C57BL/6) em gaiolas e ambientes próprios para manutenção. Os animais tiveram disponibilidade de alimento, água e enriquecimento ambiental livres, além de trocas e limpezas periódicas das gaiolas. Foram utilizados dois grupos: MOCK (n = 6) e infectados (n = 6). A infecção ocorreu por via intraplantar, com inóculo de 10 $\mu$ L de sobrenadante utilizando seringas de 0,3mL (BD Ultra-Fine, EUA). os animais foram inoculados com sobrenadante de infecção em células VERO, ou sobrenadante de células VERO não infectadas com YFV (MOCK). A manutenção e infecção destes animais foi responsabilidade majoritária do Dr. Erik Reis, como parte do seu projeto de pós-doutorado e da técnica Thaís Alkifeles, ambos vinculados a este projeto.

A partir do momento de infecção, os animais foram monitorados periodicamente por 21 dias, a fim de se observar sinais clínicos. Decorridos os 21 dias pós infecção, os animais foram eutanasiados por administração de 0,2mL (para cada 20g de peso do animal) de solução elaborada com *overdose* de 1,0mL de Cetamina 10% (100mg/kg); 0,5 mL de Cloridrato de

Xilazina 2% (10 mg/kg) e 8,5mL de água para injeção, seguido de deslocamento cervical a partir de imobilização do crânio do animal e tração da base da cauda após confirmação da sedação total dos animais. Os fígados dos animais dos três grupos experimentais foram coletados, sendo alocados, em seguida, em micro tubos de 1,5mL identificado e armazenado a -20°C.

#### 4.7.2 Testes de Neutralização Viral por Redução de Placas utilizando amostras de camundongo

A partir de ensaios preliminares, foram feitas algumas observações que suscitaram novas modificações ao protocolo. Visto que as aprovações do CEUA permitiam o uso de amostras provenientes de projetos anteriores, inicialmente, utilizou-se fígado coletado de animais perfusionados para coleta sanguínea. Os fígados coletados após perfusão cardíaca apresentaram resultados divergentes entre animais do mesmo grupo experimental; o que foi atribuído à coleta de sangue, e esta não foi continuada. Modificou-se também o tipo de placa de cultura celular utilizado, anteriormente de seis poços, para placas de 12 poços, visto que os ensaios realizados em placas de seis poços (dados não apresentados), limitavam números de replicatas e diluições possíveis.

Ainda nestes ensaios preliminares observou-se que as contagens de PFU obtidas não eram condizentes com as quantidades esperadas, assim, foram feitas modificações para a titulação de estoque viral e preparo de controle de vírus utilizado nos experimentos. Desta forma passou-se a suplementar o meio de cultura com 2,5% de solução HEPES 1M, e 1% de SFB quando em contato com estoque viral. Por conseguinte, novos ensaios foram realizados e as amostras foram diluídas de forma seriada até a concentração final de 1:1240 (dados não apresentados). Não sendo observada redução do número de placas de lise a partir das diluições 1:320 e uma baixa neutralização a partir da diluição 1:160, escolheu-se então continuar os experimentos sem as diluições seguintes a 1:160.

Estabelecidos estes parâmetros, foram preparados homogenatos clarificados obtidos a partir de 50mg de tecido hepático proveniente de animais experimentalmente infectados com YFV 17DD (IFNAR  $-/-$  C57BL/6, n=6), e MOCK (IFNAR  $-/-$  C57BL/6 n=6), macerados em meio MEM. Após eutanásia, os fígados coletados foram utilizados para confecção de um homogenato. Este homogenato, por sua vez, foi preparado a partir da adição de fragmentos de 50mg de fígado à micro tubo de 1,5mL adequado para uso em *beadbeater* (Mini-Beadbeater-16, BioSpec Products, EUA), contendo 200 $\mu$ L de meio MEM 0% e quatro *beads* tratadas. Estes

tubos foram alocados em *beadbeater* para maceração, que ocorreu por dois minutos. Seguiu-se com centrifugação a 8000 x g por 10 minutos e coleta do sobrenadante, depositado em um novo micro tubo. O sobrenadante obtido foi novamente centrifugado, nas mesmas condições cinco vezes, a fim de se obter ao final um sobrenadante homogêneo com pouco *debris* celular, resultando em um homogenato.

Os homogenatos e soro foram incubados à 56°C em banho seco (Thermomixer comfort – Eppendorf), para inativação do sistema complemento. Os homogenatos foram utilizados em substituição ao soro, de forma similar ao usado para o protocolo de PRNT. Em todos os experimentos em paralelo às amostras testadas, foram incluídos controles positivos e negativos. Como controle positivo foi usado soro de doador imunizado para YFV, por meio de vacinação (YFV-17DD), com produção de anticorpos neutralizantes anti-YFV conhecida. Um segundo controle positivo foi feito usando uma mistura na proporção de 1:1 de homogenato de fígado de animal MOCK e soro de animal previamente infectado com YFV. Este controle teve o intuito de analisar possível interação entre homogenato de fígado na neutralização de partículas virais por anticorpos presentes no soro. Como controle negativo, foi usado homogenato de tecido hepático de animal MOCK.

Inicialmente, foram preparadas as diluições do homogenato dos animais MOCK (n=6) ou infectados (n=6), bem como dos controles (positivos e negativos) na concentração 1:10. Esta diluição foi feita a partir da adição de 80µL de homogenato e soro à 720µL de meio MEM suplementado em 1% SFB e 2,5% solução HEPES 1M, em seguida foi homogeneizada e submetida a uma nova etapa de centrifugação, desta vez 16000 x g por três minutos. Em seguida, homogenatos e controles na concentração de 1:10 foram transferidos para placa de 96 poços modelo *deepwell* e usados para o preparo de diluições seriadas na base 2 (1:20 a 1:160), utilizando micropipetas multicanal para a transferência de 350µL de volume dos poços superiores para os inferiores, contendo também 350µL de MEM suplementado em 1% SFB e 2,5% HEPES 1M (sentido A para D, Figura 8.1).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
8.1 A	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10
B	1:20	1:20	1:20	1:20	1:20	1:20	1:20	1:20	1:20
C	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40
D	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80
E									

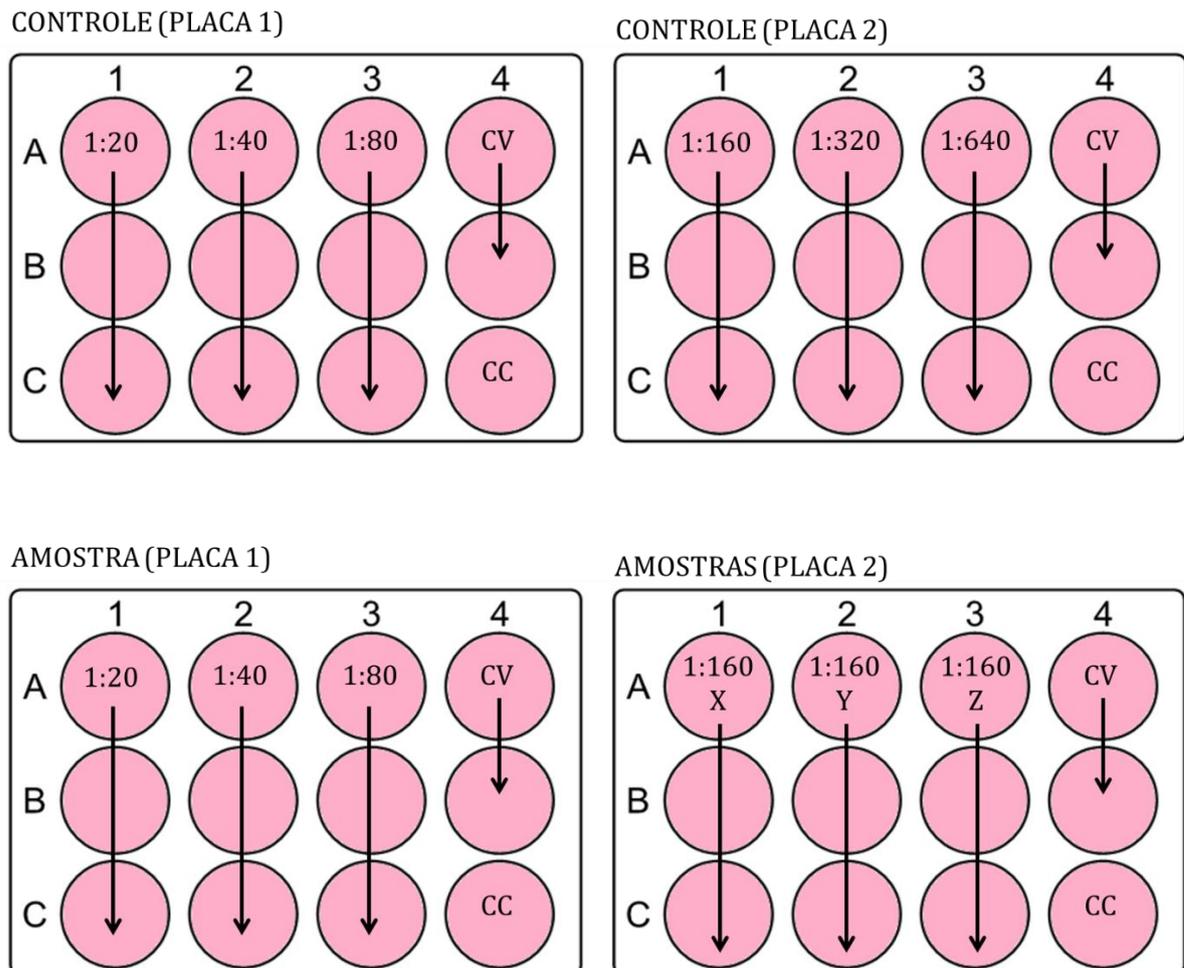
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
8.2 A	1:20	1:20	1:20	1:20	1:20	1:20	1:20	1:20	1:20	CV	CV	CC
B	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	CV	CV	CC
C	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	CV	CV	CC
D	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	CV	CV	CC
E										CV	CV	CC
F										CV	CV	CC
G										CV	CV	CC

**Figura 8:** Esquema representando preparo de placas deepwell para diluição seriada de amostras. 8.1: Poços das colunas 1 a 6 correspondem a diluições de amostras. Poços das colunas 7, 8 e 9 correspondem às diluições de controles. Colunas 1 a 9: colunas correspondentes às amostras e controles. A a E: linhas correspondentes às diluições. CV: controle de vírus. CC: controle celular. 8.2: Poços entre as colunas 1 e 9, linhas A e E correspondem a diluições final de cada amostra e controles. Poços das colunas 10 e 11 correspondem aos poços de controle de vírus. Poços da coluna 12 são de controle celular. 1 a 12: colunas correspondentes às amostras e controles. A a E: linhas correspondentes às diluições. CV: controle de vírus. CC: controle celular.

A diluição do YFV vacinal, utilizado como controle de vírus, foi realizada em meio MEM suplementado com 1% S.F.B e 2,5% HEPES 1M. Foram transferidos 300 $\mu$ L de cada diluição das amostras para uma segunda placa de 96 poços modelo *deepwell* (mantendo ordens utilizadas anteriormente). Também foram adicionados volumes correspondentes de MEM suplementado em 1% SFB e 2,5% solução HEPES 1M, nas colunas equivalentes aos controles de vírus e celular. A esta placa um total de 300 $\mu$ L de YFV (contendo entre 100 e 150 PFU de YFV 17DD) foi adicionado a cada poço das colunas de 1 a 10, resultando nos controles de vírus e em diluições seriadas finais dos homogenatos nas concentrações de 1:20 a 1:160 (Figura 8.2).

Após a adição de vírus às amostras foi feita a incubação das diluições dos homogenatos (1:10 a 1:320) por uma hora (37°C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>). Decorrida uma hora de incubação o material foi usado para inóculo em placas de 12 poços contendo 1,8x10<sup>5</sup> células VERO por poço. O inóculo foi de 180 $\mu$ L por poço, sendo três replicatas por diluição, dois poços de controle de vírus e um poço de controle celular, totalizando duas placas por controle

e quatro placas a cada três amostras (Figura 10). Após uma hora de adsorção (37°C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>) com homogeneização por agitação a cada 10 minutos, o inóculo foi retirado e adicionado meio CMC (1%) 1% SFB. Posteriormente as placas foram incubadas (37°C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>) por cinco dias. Após o tempo de incubação as células foram fixadas com solução de formalina por uma hora, e coradas utilizando solução de cristal violeta 1% em salina fosfatada (PBS) (p/v) por 30 minutos, para contagem de placas de lise.



**Figura 9:** Esquema ilustrado demonstrando o padrão de infecção de placas utilizado no teste. CV: controle de vírus; CC: controle celular. X, Y e Z: amostras hipotéticas.

Em cada uma das placas inoculadas foram utilizados dois controles: dois poços de controle de vírus, e um poço de controle celular. Para prosseguir com as análises estatísticas foram estabelecidos os seguintes critérios: as replicatas de cada grupo (MOCK e Infectados) não deveriam apresentar grandes variações entre si, com máxima de 25% para as replicatas de amostras; nos controles de vírus a variação máxima deveria ser de 35% para número de PFUs

observados em relação ao total esperado para o inóculo (110 PFU); o controle celular não deveria apresentar placas de lise ou deformações visíveis na monocamada, eliminando suspeitas de contaminação; e os controles positivos e negativo deveriam apresentar comportamento de neutralização concordante. Ao descumprir estes critérios, os resultados foram desconsiderados, e os demais resultados foram então utilizados para análises estatísticas.

#### 4.8 Análises estatísticas

As análises estatísticas deste trabalho foram realizadas na linguagem R, com uso do programa RStudio, versão 3.4.2 (RSTUDIO TEAM, 2020; WICKHAM, 2016), usando os pacotes ggplot2. Para teste de normalidade dos dados foi utilizado o Teste de *Shapiro-Wilk* (1965), para análise de tendência central e diferenças estatísticas foi usado teste de *Wilcoxon/Mann-Whitney* (1945/1947) e valor de  $p < 0,05$  considerado significativo.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Investigação molecular do vírus da febre amarela em primatas não humanos de Minas Gerais.

Entre 2019 e 2022, embora casos confirmados de FA em humanos não sejam reportados em Minas Gerais, o registro de epizootias acometendo PNHs ocorre, inclusive com casos confirmados de infecção por YFV (ANDRADE et al., 2022; NATALIA INGRID OLIVEIRA DA SILVA, 2021). Contudo, em fevereiro de 2023 foi confirmado pela SES-MG um caso humano de infecção por FA (CENTRO DE INFORMAÇÕES ESTRATÉGICAS EM VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2023). Assim, neste estudo continuou-se a investigação da infecção em carcaças de PNHs coletadas no estado de Minas Gerais.

Foram testadas amostras de rim provenientes de 144 carcaças de PNHs coletadas durante o surto de 2017 cujos fígados foram negativos para detecção do genoma do YFV anteriormente (SACCHETTO et al., 2020b). Das 144 amostras de rim testadas 22,2% foram coletadas durante período úmido e 77,8% em período seco; além de majoritariamente em áreas urbanas (63,2%) seguida por áreas rurais/silvestres (25%) e periurbanas (11,1%), com uma única amostra sem registro de área. Também foram coletadas de representantes de quatro famílias neotropicais: *Callithrichidae* (representada pelo gênero *Callithrix sp.* n = 132/91,7%), *Atelidae* (representada pelo gênero *Allouata sp.* n = 4/2,8%), *Cebidae* (n = 1/0,7%), e *Pitheciidae* (representada pelo gênero *Callicebus sp.* n = 7/4,9%) (Tabela 5). Do total de amostras testadas (n=144), 15 (10,4%) foram positivas, quatro foram indeterminadas (2,8%), e 125 (86,8%) foram negativas para a detecção de genoma de YFV. As amostras de rins positivos tiveram Ct médio de 35,1.

Tabela 5: Detecção molecular do RNA de vírus da febre amarela em amostras de rim provenientes de carcaças de primatas não humanos, de Minas Gerais, 2017

	PNH	PCR			Total	%
		Pos	Ind	Neg		
Período	Úmido	3	1	28	32	22,2
	Seco	12	3	97	112	77,8
Área	Urbana	9	3	79	91	63,2
	Periurbana	1	0	15	16	11,1
	Rural/Silvestre	5	1	30	36	25,0
	Sem dados	0	0	1	1	0,7
Táxon	<i>callithrix sp.</i>	13	3	116	132	91,7
	<i>Alouatta sp.</i>	1	1	2	4	2,8
	<i>Cebidae</i>	0	0	1	1	0,7
	<i>Callicebus sp.</i>	1	0	6	7	4,9
	Total	15	4	125	144	
	%	10,4	2,8	86,8	100,0	

PNH: primata não humano; Pos: RT-qPCR positivo; Ind: RT-qPCR indeterminado; Neg: RT-qPCR negativo.

As amostras de cérebro testadas neste trabalho (n = 58) são provenientes de carcaças cujos fígados, previamente testados pela Dra. Lívia Sacchetto (SACCHETTO et al., 2020b; SACCHETTO PENGO, 2020) eram negativos para detecção de YFV por RT-qPCR. Estas, foram coletadas durante os períodos úmido (8,6%), e seco (91,4%), em áreas urbana (69%), periurbana (8,6%), rural/silvestre (19%), e duas (3,4%) não continham dados de área. Foram amostras retiradas de carcaças de representantes de três famílias de PNHs neotropicais: *Callithrichidae* (gênero *Callithrix sp.* n = 55/94,8%), *Atelidae* (gênero *Allouata sp.* n = 1/1,7%), e *Pitheciidae* (gênero *Callicebus sp.* n = 2/3,4%). Destas 58 amostras, 50 foram consideradas negativas para detecção do genoma de YFV, seis (10,3%) positivas, e duas (3,4%) indeterminadas (Tabela 6). Os cérebros positivos para detecção de RNA de YFV tiveram Cq médio de 34,9, enquanto o Cq médio das amostras com resultado indeterminado foi de 36,3.

Tabela 6: Detecção molecular do RNA de vírus da febre amarela em amostras de cérebro provenientes de carcaças de primatas não humanos, de Minas Gerais, 2017

	PNH	PCR			Total	%
		Pos	Ind	Neg		
Período	Úmido	1	0	4	5	8,6
	Seco	5	2	46	53	91,4
Área	Urbana	5	1	34	40	69,0
	Periurbana	0	0	5	5	8,6
	Rural/Silvestre	1	1	9	11	19,0
	Sem Dados	0	0	2	2	3,4
	<i>Callithrix Sp.</i>	5	2	48	55	94,8
Táxon	<i>Alouatta Sp.</i>	1	0	0	1	1,7
	<i>Callicebus Sp.</i>	0	0	2	2	3,4
	Total	6	2	50	58	
	%	10,3	3,4	86,2	100,0	

PNH: primata não humano; Pos: RT-qPCR positivo; Ind: RT-qPCR indeterminado; Neg: RT-qPCR negativo.

Dos anos 2021-2022 foram testadas amostras de fígado e pulmão (n = 124/ n = 124) de 124 carcaças de PNHs. Estas carcaças foram coletadas durante os períodos úmido (18,5%), seco (75,8%), e seis delas não possuem dados de período de coleta (5,6%), em 10 mesorregiões de MG: Central Mineira (12,1%), Metropolitana De Belo Horizonte (50%), Noroeste De Minas (1,6%), Norte De Minas (3,2%), Oeste De Minas (5,6%), Triângulo Mineiro (5,6%), Vale Do Rio Doce (10,5%), Zona Da Mata (4%), Jequitinhonha (0,8%), Sul / Sudoeste De Minas (0,8%) e 5,6% delas não possuem dados de local de coleta. Estas amostras são provenientes de áreas urbana (66,9%), periurbana (6,5%), rural/silvestre (12,9%), e 13,7% delas não apresentam estes dados. Das 124 carcaças, 88,7% eram do gênero *Callithrix sp.*, 2,4% eram do gênero *Alouatta sp.*, 2,4% do gênero *Sapajus sp.*, e 7,3% delas não foram identificadas. Todas as 18 amostras positivas foram referentes aos fígados e apresentaram Cqs variando de 32,8 a 37,3 com Cq médio de 36,1. O Cq médio das amostras indeterminadas foi de 36,3, todas de fígado, já as consideradas negativas foram 96 fígados e 124 pulmões. Estas amostras apresentaram positividade de 14,5% (n = 18), além de 8,1% (n = 10) de resultado indeterminado e 77,4% (n = 96) de resultado negativo para detecção do genoma de YFV. As amostras positivas e indeterminadas são provenientes de seis mesorregiões: Central Mineira (n= 4) Metropolitana de Belo Horizonte (n=14), Norte de Minas (n=1), Oeste de Minas (n=3), Triângulo Mineiro / Alto Paranaíba (n=3), e Vale do Rio Doce (n=1) (Tabela 7).

Tabela 7: Detecção molecular do RNA de vírus da febre amarela em amostras de carcaças de primatas não humanos dos anos 2021-2022, Minas Gerais

	PNH	PCR			Total	%
		Pos	Ind	Neg		
Período	Úmido	7	0	16	23	18,5
	Seco	9	10	75	94	75,8
	Sem Dados	2	0	5	7	5,6
Área	Urbana	13	3	67	83	66,9
	Periurbana	0	2	6	8	6,5
	Rural/Silvestre	2	3	11	16	12,9
	Sem Dados	3	2	12	17	13,7
Táxon	<i>Callithrix Sp.</i>	16	10	84	110	88,7
	<i>Alouatta Sp.</i>	0	0	3	3	2,4
	<i>Sapajus Sp.</i>	0	0	3	3	2,4
	<i>Cebidae</i>	0	0	1	1	0,8
	Sem Dados	2	0	5	7	5,6
Mesorregiões	Central Mineira	2	2	11	15	12,1
	Metropolitana De Belo Horizonte	10	4	48	62	50,0
	Noroeste De Minas	0	0	2	2	1,6
	Norte De Minas	0	1	3	4	3,2
	Oeste De Minas	2	1	4	7	5,6
	Triangulo Mineiro	1	2	4	7	5,6
	Vale Do Rio Doce	1	0	12	13	10,5
	Zona Da Mata	0	0	5	5	4,0
	Jequitinhonha	0	0	1	1	0,8
	Sul / Sudoeste De Minas	0	0	1	1	0,8
	Sem Dados	2	0	5	7	5,6
Amostras	fígado	18	10	96	124	100,0
	pulmão	0	0	124	124	100,0
Total		18	10	96	124	
(%)		14,5	8,1	77,4	100	

PNH: primata não humano; Pos: RT-qPCR positivo; Ind: RT-qPCR indeterminado; Neg: RT-qPCR negativo.

Foram feitas também, tentativas de isolamento viral a partir de duas amostras, uma de tecido pulmonar e outra de tecido hepático, ambas suspeitas de detecção de YFV. não foi possível isolar o vírus. Tal resultado pode estar relacionado a fatores como baixa carga viral das amostras, período de infecção no hospedeiro, persistência de genoma viral sem infecção produtiva, a natureza sensível de vírus envelopados de RNA a variáveis ambientais e degradação facilitada, ou mesmo a ausência de partícula de YFV em sua forma infecciosa nestas amostras (C, 2015; RUSSO et al., 2016; SILVA et al., 2020).

Como estas amostras são correspondentes a tecidos coletados de carcaças, portanto, já em processo de decomposição, podem ter viabilidade de RNA comprometidas (BAUER, 2007;

SAMPAIO-SILVA et al., 2013). A detecção genômica do YFV em rins, e cérebros, oriundos de carcaças de PNHs cujos fígados foram negativos, embora inesperada visto que o fígado é um sítio primário de infecção para o YFV, pode estar relacionada a diferentes fatores, como por exemplo a degradação do RNA alvo no fígado (BAUER, 2007). Sabe-se que diferentes amostras apresentam diferentes taxas de degradação de RNA, isto porque a presença de ribonucleases varia entre órgãos, a exemplo de cérebro e pulmão quando comparado ao fígado (BAUER, 2007). Desta forma, torna-se necessário investigar a presença do RNA de YFV em diferentes tecidos, visto que o principal órgão amostrado para vigilância, o fígado, é também rico em ribonucleases entre outras enzimas (BAUER, 2007; DE MOREAU DE GERBEHAYE et al., 2002; FINGER et al., 1987).

Considerando o caráter sazonal e silvestre da FA (DE THOISY et al., 2020; HAMLET et al., 2021) poderia ser esperado uma maior circulação do vírus em áreas silvestres e em períodos úmido. Contudo, as amostras com detecção de RNA de YFV neste estudo eram majoritariamente provenientes de áreas urbanas, da região metropolitana de Belo Horizonte, do período seco, além de provindas de carcaças de PNHs do gênero *Callithrix sp.*.

De forma similar, durante as epidemias de 2017 e 2018, a maioria dos animais testados eram de área urbana, e gênero *Callithrix sp.* (SACCHETTO et al., 2020c). Embora animais do gênero *Callithrix sp.* apresentem menor carga viral durante a infecção por YFV, e menor desenvolvimento de sintomas (DE AZEVEDO FERNANDES et al., 2021; HILL et al., 2020; MARES-GUIA et al., 2020; SACCHETTO et al., 2020b) os animais deste gênero apresentam grande plasticidade comportamental e capacidade de viver em áreas antropizadas e urbanas (VILELA; DEL-CLARO, 2011), o que pode tornar sua amostragem facilitada, visto que serão mais facilmente localizadas as carcaças presentes em áreas mais densamente povoadas. O fato da maioria das amostras positivas serem provenientes de período caracterizado como seco e com temperaturas amenas, pode também estar relacionado a um viés de amostragem, visto que a taxa de decomposição de carcaças é menor nestas condições (ARCHER, 2004; TAYLOR, 2020) e desta forma pode resultar em uma maior facilidade na localização destas quando comparado aos períodos caracteristicamente chuvosos e com altas umidade e temperaturas. Além disso, a detecção do vírus em períodos sazonais secos e após os surtos de 2017-2018, como encontrado neste estudo e outros trabalhos (DE ABREU et al., 2019; OLIVEIRA DA SILVA, 2021; OLIVEIRA et al., 2023), é um indicativo de manutenção do ciclo da FA no estado.

Portanto, estes resultados, quando referidos ao ano de 2017, aumentam em 15, o número de animais infectados para aquele ano além de evidenciarem a importância de se usar outros tecidos para a vigilância da circulação e presença do YFV em PNHs (MS; SVS., 2017). Além disso, destaca-se a detecção de genoma de YFV em carcaças de PNHs de MG durante ausência de surto de FA em humanos e período com poucas epizootias associadas ao YFV confirmadas (MS; SVS, 2022). Estes resultados podem estar associados à circulação continuada da sub-linhagem de 2017-2018, visto que em 2020 esta ainda circulava no estado (OLIVEIRA DA SILVA, 2021) ou também uma reintrodução do vírus a partir de outros estados e regiões, dado que, em 2021 foram encontrados animais infectados com uma sub-linhagem de YFV diferente das de 2017-2018 (ANDRADE et al., 2022).

## 5.2 Teste Adaptado de Neutralização Viral por Redução de Placa com Tecido Hepático de Animais Experimentalmente Infectados

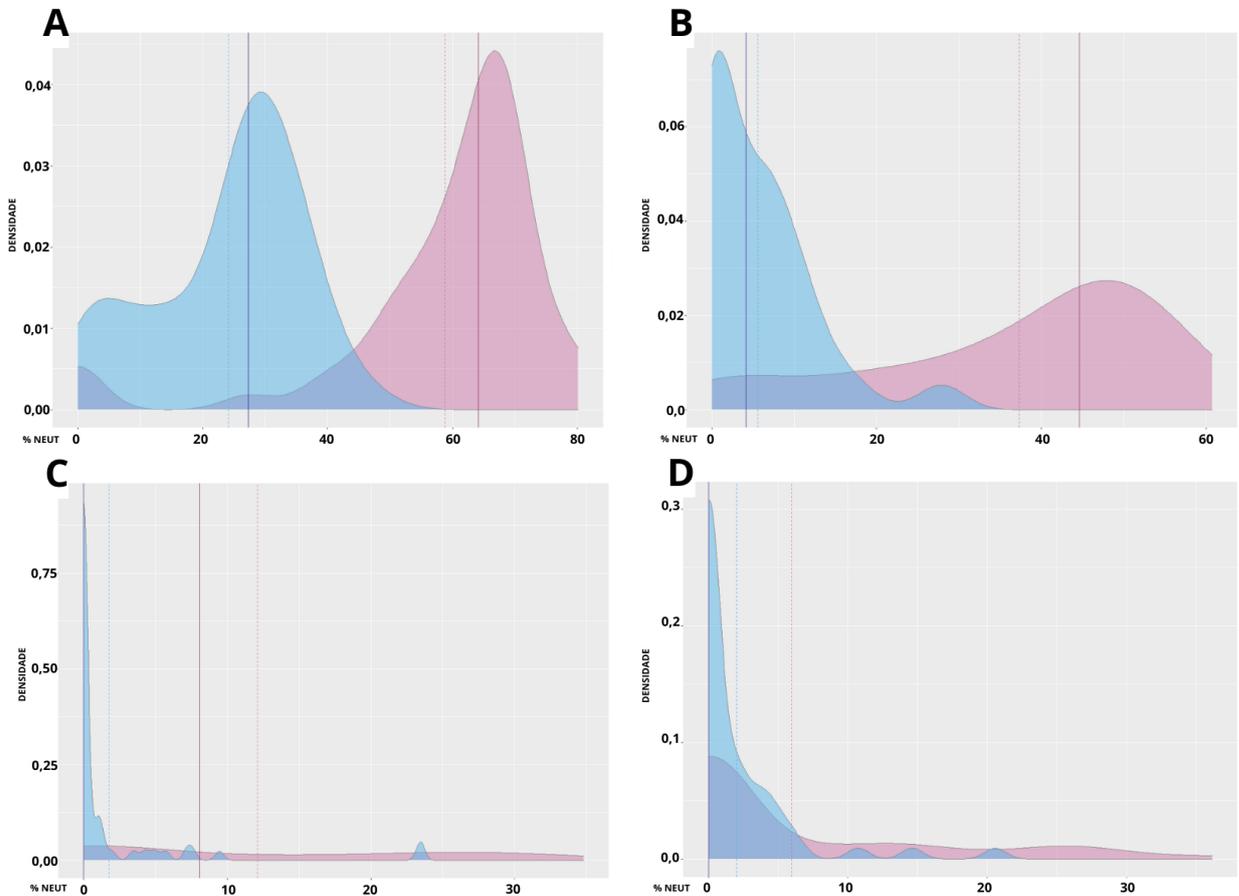
A vigilância da Febre Amarela é feita por iniciativas individuais e regionais fomentadas pelo Ministério da Saúde e com intenção de detectar a circulação do YFV ainda em seu ciclo enzoótico. Dentre as diversas áreas de atuação deste programa, as principais para a detecção do YFV são as vigilâncias entomológicas e de epizootias. A investigação de epizootia ocorre com o uso de amostras de PNHs de qualquer espécie encontrado morto, incluindo ossadas e dentes, além de feita em qualquer local do território nacional por meio de tentativas de isolamento, testes por RT-qPCR, ensaios histopatológicos e imuno-histoquímicos (MS; SVS., 2017).

Embora as amostras preferenciais para diagnóstico sejam sangue total, soro e fígado (MS; SVS., 2017) nem sempre são possíveis de se obter e algumas limitações quanto à própria infecção e amostras utilizadas devem ser destacados, como por exemplo: viremia curta e baixa, fase de infecção no animal, e estado de preservação da carcaça; aspectos que podem comprometer viabilidade de RNA e partícula viral no material amostrado e conseqüentemente o diagnóstico, ocasionando resultados falso negativos. Desta forma, testes sorológicos podem auxiliar e complementar as investigações de epizootias, visto que anticorpos podem ser detectados após a fase aguda de infecção e podem apresentar maior estabilidade em carcaças (TRYLAND et al., 2006).

Isto posto, neste estudo foi avaliada a possibilidade de se utilizar tecidos sólidos como alternativa para investigação de infecção viral por meio de ensaios sorológicos. Optou-se pelo uso de fígados de camundongos infectados como forma de mimetizar amostras provenientes de carcaças. Inicialmente, foram feitos ensaios de neutralização viral utilizando homogenatos provenientes do tecido hepático de camundongos infectados com YFV (n=6) e MOCK (n=6), além do soro coletado a partir de sangue total de um doador imunizado.

A fim de se observar o perfil de neutralização das amostras de animais infectados ou MOCK frente aos controles virais, as porcentagens de neutralização apresentadas para cada um dos animais e diluição foram plotadas em gráficos de densidade (figura 11). Foi possível observar que, o grupo MOCK apresentou uma concentração maior de amostras com percentual de neutralização inferior a 30%. O grupo Infectado, por sua vez, apresentou uma densidade maior nos pontos mais elevados da escala nas diluições 1:20 e 1:40, e uma distribuição mais uniforme nas diluições 1:80, 1:160, isto indica uma tendência a maiores taxas de neutralização para as amostras do grupo Infectado. Devida a não normalidade e assimetria da distribuição dos

resultados das amostras, a mediana foi usada para avaliar os níveis de diluição observados nos testes, já que, em relação à média, ela é menos sensível a *outliers*.

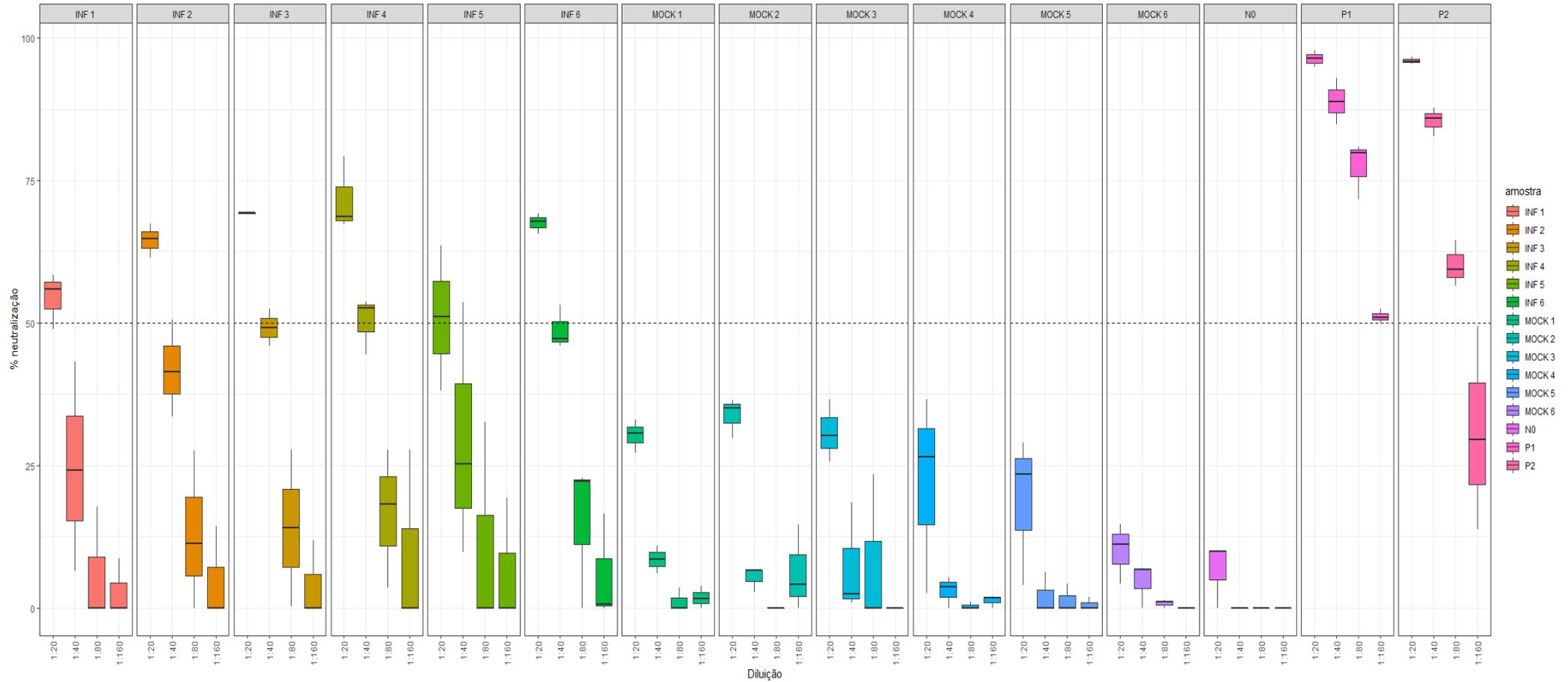


**Figura 10:** Gráfico de densidade das distribuições de percentuais de neutralização observados para cada diluição e grupo de amostras. Cada animal representado nestes gráficos apresenta 36 valores correspondentes a três experimentos contendo três replicatas de quatro diluições, exceto para o animal 3 do grupo Infectados que apresenta apenas 24 valores (dados de duas réplicas experimentais independentes). MOCK em azul e Infectado em rosa, destacando médias em linhas tracejadas e medianas em linhas contínuas. A: diluição 1:20; B: diluição 1:40; C: diluição 1:80; e D: diluição 1:160. INF: infectados.

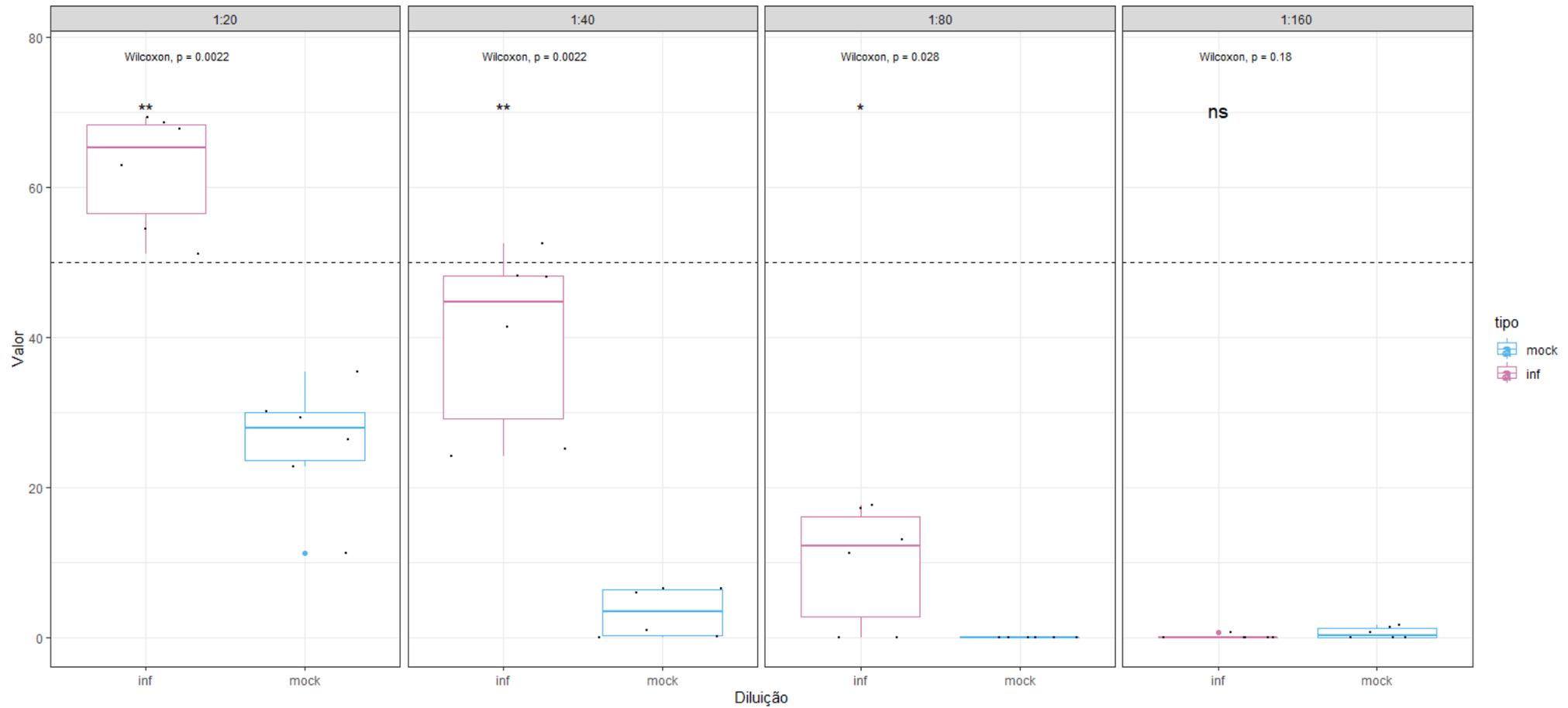
Ao comparar as amostras de ambos os grupos e suas diferentes diluições (figura 11) notou-se, diferentes perfis com relação aos percentuais de neutralização entre indivíduos de um mesmo grupo e sobretudo, entre indivíduos de grupos amostrais diferentes. Foi observada neutralização viral nos poços correspondentes aos animais do grupo Infectado com medianas maiores que 50% na diluição 1:20. Foi observado um percentual de neutralização viral maior entre os animais infectados em relação ao grupo MOCK para as diluições 1:40 e 1:80. Em paralelo, observou-se medianas de percentual de neutralização menores que 40% para os

animais do grupo MOCK na diluição 1:20 e queda de neutralização nas diluições subsequentes (figura 12).

As medianas de porcentagem de neutralização para cada diluição, foram comparadas entre os grupos MOCK e Infectados. Com isso, foram observadas diferenças entre os grupos para as diluições 1:20 ( $p = 0,0022$ , teste Wilcoxon, bicaudal), 1:40 ( $p = 0,0022$ , teste Wilcoxon, bicaudal) e 1:80 ( $p = 0,028$ , teste Wilcoxon, bicaudal). Contudo para a diluição 1:160 ( $p = 0,18$ , teste Wilcoxon, bicaudal) não foi observada diferença entre os grupos (figura 12).



**Figura 11:** Boxplot para comparação de percentuais de neutralização observados para amostras dos grupos (MOCK e Infectados). INF: animal infectado; MOCK: animal MOCK; N0: controle negativo; P1: controle positivo um; e P2: controle positivo dois



**Figura 12:** Boxplot comparando percentuais de neutralização por diluição em cada grupo. MOCK em azul e Infectados em rosa. Inf: grupo Infectados. No grupo Infectados animal três apresenta valores de apenas dois experimentos. Teste Wilcoxon/Mann-Whitney; \* ( $p < 0,05$ ) e \*\* ( $p < 0,001$ ); ns: diferença não significativa.

Usando os valores de mediana de neutralização para cada animal em cada diluição foram plotadas curvas de neutralização observada para animais MOCK, infectados e controles. As medianas de percentuais de neutralização obtidos para cada animal e diluição dos grupos MOCK e Infectados demonstram perfis distintos de neutralização ao longo das diluições (figura 13). Os animais infectados apresentaram taxas de neutralização acima de 50% na diluição 1:20, enquanto os animais do grupo MOCK tiveram taxas de neutralização menores que 40%. Na diluição 1:40, alguns animais infectados apresentaram neutralização acima de 50%, outros tiveram neutralização próxima a 50%, e dois deles mostraram uma redução maior na taxa de neutralização, com uma mediana próxima a 25%. Na diluição 1:80, dois animais infectados tiveram uma taxa de neutralização próxima a 0%, enquanto os demais atingiram esse ponto na diluição seguinte (1:160). Por sua vez, as amostras do grupo MOCK apresentaram uma redução maior e mais homogênea dos percentuais de neutralização, alcançando neutralização próxima a 0% a partir da diluição 1:40 em três indivíduos, e nas diluições seguintes todos estavam na mesma faixa de neutralização.

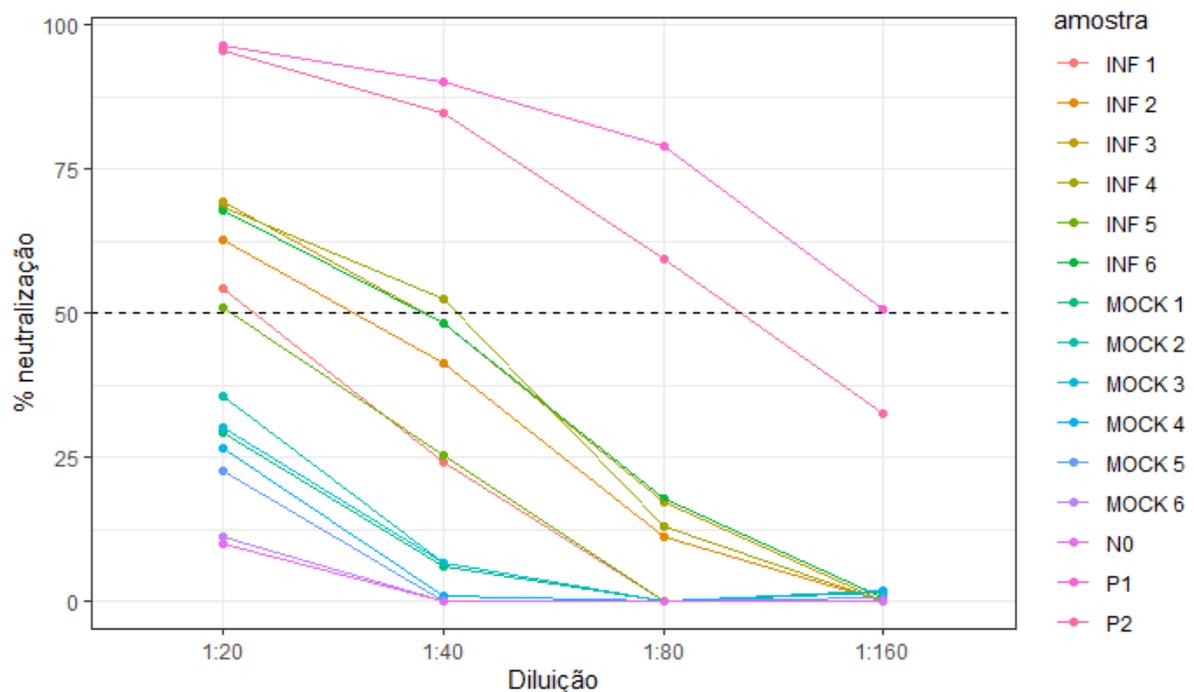


Figura 13: Distribuição de medianas de percentuais de neutralização por diluição de amostra dos grupos experimentais. INF: animais do grupo Infectados; MOCK: animais do grupo MOCK; P1: controle positivo 1; P2: Controle positivo 2; N0: controle negativo.

Se a hipótese de presença de anticorpos for verdadeira, espera-se uma redução dos percentuais de neutralização à medida que se aumenta a diluição das amostras, comportamento observado para amostras com presença de anticorpos neutralizantes em ensaios de PRNT. Como não foi possível fazer uma regressão linear, foi feita uma análise da razão entre os percentuais de neutralização das diluições 1:20/1:40 (tabela 8). Para os animais infectados observa-se razão de 1,3 a 2,25, entre a diluição 1:20 para 1:40, o que é esperado, considerando a diluição 1:2 usada nos testes. Já para MOCK a razão é maior do que 4,6 para todos os animais, mostrando uma redução maior independente da diluição e mostra um decréscimo mais significativo da neutralização nos animais MOCK (>4) Infectados (1,3 a 2,2 e valor de  $p = 0.002165$ ). Espera-se que a neutralização observada, quando se aumenta a diluição de forma seriada na base dois, apresente um decréscimo de 50% em ensaios de neutralização utilizando soro positivo para presença de anticorpos específicos. Assim, os valores obtidos nas razões entre diluição 1:20 e 1:40 do grupo Infectados indicam uma relação proporcional entre percentuais de neutralização e diluição.

Tabela 8: Razão entre as medianas dos percentuais de neutralização obtidos nas diluições 1:20 e 1:40 para cada amostra utilizada

Grupo	Amostra	Mediana 1:20	Mediana 1:40	Razão 1:20/1:40
MOCK	MOCK 1	29,35	5,98	4,91
	MOCK 2	35,48	6,58	5,39
	MOCK 3	30,18	6,51	4,64
	MOCK 4	26,48	0,98	27,02
	MOCK 5	22,74	0,14	162,43
	MOCK 6	11,21	0,01	1121,00
Infectado	INF 1	54,42	24,19	2,25
	INF 2	62,86	41,42	1,52
	INF 3	69,27	48,18	1,44
	INF 4	68,59	52,56	1,3
	INF 5	51,08	25,18	2,03
	INF 6	67,79	48,1	1,41

*INF: animal Infectado; MOCK: animal MOCK.*

A presença de anticorpos em órgãos é conhecida e utilizada para diagnóstico de diversas doenças, em especial, anticorpos presentes no fígado e as doenças autoimunes associadas à ele (HIMOTO; NISHIOKA, 2013). Visto que o fígado é um órgão grande, altamente vascularizado e com uma complexa arquitetura de fluxo sanguíneo (LORENTE; HAUTEFEUILLE; SANCHEZ-CEDILLO, 2020), torna-se facilitada a presença de anticorpos neste. A literatura já relatou a presença de anticorpos específicos em órgãos, carcaças e material líquido recuperado de tecidos (BECK et al., 2005; GAMBLE; PATRASCU, 1996; LAI et al., 2022; TRYLAND et al., 2006), assim como um trabalho recente deste grupo de pesquisa (Dissertação de mestrado Matheus Soares Arruda, dados não publicados). Com base nisso, os resultados obtidos neste trabalho suportam a hipótese de neutralização viral por ação de anticorpos.

As variações observadas para resultados de um mesmo animal podem estar associadas a realização do experimento, uma vez que esta técnica é sensível à execução. Os resultados distintos apresentados por animais de um mesmo grupo, mesmo que isogênicos, são também reportados pela literatura (GÄRTNER, 2012; SELLERS et al., 2012; VIDAL, 2017). Dado que o modelo animal utilizado neste trabalho é *knockout* para a produção de receptor de INF-I, a resposta imune destes, frente a infecção viral, é reduzida, com menor produção de anticorpos específicos e maior susceptibilidade à infecção (MESEV; LEDESMA; PLOSS, 2019). A neutralização viral observada a partir das amostras de homogenato de fígado de animais infectados teve perfil similar quando comparados aos controles positivos, embora em menor porcentagem. A menor porcentagem de neutralização viral das amostras em comparação aos controles positivos pode ser também explicada, pelo modelo animal e tipo de amostra usada.

Os percentuais de neutralização observados nas maiores diluições do grupo MOCK devem ser cuidadosamente analisados, visto que estes resultados podem ser erroneamente interpretados como neutralização por ação de anticorpos. Contudo, as diferenças entre os perfis das curvas de neutralização, bem como a razão de neutralização entre diluições 1:20/1:40, quando os animais MOCK são comparados aos infectados, e controle, indicam que a redução de placas de lise nos testes com homogenato de animais MOCK podem ser inespecíficas. Uma vez que interação viral similar a adsorção, já foi descrita para debris de células susceptíveis a infecção causando diminuição de efeito citopático esperado a monocamada (JOHN J. HOLLAND, 1959), infere-se que o mesmo ocorra nestes ensaios, como observado nos resultados obtidos para as amostras do grupo MOCK. Uma possibilidade a ser testada é o

acréscimo de uma etapa à preparação dos homogenatos, com implementação de filtragem, a fim de se reduzir a neutralização inespecífica causada por debris celulares e teciduais.

Testes padronizados de neutralização viral por redução de placas de lise celular para flavivírus consideram positivas amostras com neutralização mínima de 50% em relação aos controles de vírus, podendo variar até o mínimo de 90% a depender do protocolo utilizado (MAEDA; MAEDA, 2013). Contudo, a fim de minimizar interpretações errôneas dos resultados, é indicado utilizar um *cutoff* mínimo de 60% de redução de placas de lise quando executado o protocolo adaptado de neutralização viral utilizando homogenato de tecido hepático. Recomenda-se também o uso de diluições seriadas para cada amostra a ser investigada, com análise conjunta dessas, a fim de assegurar uma relação causal proporcional entre os resultados observados e diluições testadas. Deve-se também realizar ensaios paralelos utilizando controles conhecidamente positivo e negativo para comparação do perfil de redução observado para estes e as amostras em questão. É importante ressaltar, contudo, limitações quanto a execução desta técnica adaptada e interpretação dos resultados. Recomenda-se atentar ao fato de resultados não neutralizantes para as amostras não indicarem necessariamente a falta de anticorpos específicos, o que pode estar associado à uma baixa carga destes para detecção neste protocolo adaptado.

Os resultados aqui apresentados para teste adaptado de neutralização viral demonstram a viabilidade do uso de amostras de homogenato sem prejuízo para a técnica, tendo em vista o perfil de neutralização esperado para ensaios de PRNT. Demonstram também a possibilidade de uso dessa técnica para detecção sorológica de YFV de forma viável em situações que amostras de soro não são passíveis de coleta, a exemplo casos de epizootia em que são encontradas carcaças em estágios avançados de decomposição.

Visto que anticorpos já foram detectados a partir de tecidos de animais experimentalmente infectados e em tecido cadavérico humano (GAMBLE; PATRASCU, 1996; LAI et al., 2022) esta abordagem pode ser vista como uma estratégia complementar para a investigação preconizada em casos de epizootias. Neste estudo escolheu-se a adaptação do protocolo de PRNT visto que este é uma forma de detectar e mensurar atividade neutralizante de anticorpos, permitindo assim, maior confiabilidade de resultados quando comparado a detecção de anticorpos totais. Então, com os resultados obtidos neste trabalho novas perspectivas se apresentaram como a utilização deste protocolo em casos suspeitos de epizootia

por infecção por YFV, e eventualmente o teste para o uso deste tipo de amostras em outros testes sorológicos, como ELISA.

## 6. CONCLUSÕES

- Foi detectado genoma de vírus da febre amarela em 14 amostras de rim e seis amostras de cérebro provenientes de carcaças de primatas não humanos do ano de 2017 cujos fígados eram negativos para detecção do vírus da febre amarela por RT-qPCR;
- Foi detectado o genoma de vírus da febre amarela em 18 amostras provenientes de carcaças de primatas não humanos coletados durante os anos 2021 e 2022;
- Estes resultados também aumentam o número de casos positivos conhecidos para epizootia de PNHs por YFV em 2017;
- Os resultados indicam circulação continuada do vírus da febre amarela em primatas não humanos no estado de Minas Gerais nos anos de 2021 e 2022;
- Os testes de neutralização viral adaptado corroboram hipótese de neutralização específica por anticorpos e dependente da diluição;
- Este protocolo adaptado permite detectar atividade de anticorpos específicos em tecido hepático;
- O teste de neutralização viral usando amostras de homogenato de fígado pode ser apresentado como complementação a investigação de epizootias.

## 7. PERSPECTIVAS

- Continuidade pelo Grupo de Prospecção de Arbovírus (GParbo) no Laboratório de Vírus da investigação de YFV e outros arbovírus em amostras de PNHs coletadas no ano de 2023;
- Adição de uma etapa à preparação do homogenato com uso de filtro de seringa para reduzir resíduos teciduais e diminuição de efeito neutralizante inespecífico;
- Realização de ensaio de neutralização viral adaptado ao uso de homogenato proveniente de tecidos macerados para testes a partir de fígados de carcaças de PNHs YFV RT-qPCR negativas;
- Otimização do uso de homogenato proveniente de tecidos macerados para testes do tipo ELISA.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBAS, A. et al. Influence of canine brain decomposition on laboratory diagnosis of rabies. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n. 1, p. 19–22, 1999.
- ANDRADE, M. S. et al. Fast surveillance response reveals the introduction of a new yellow fever virus sub-lineage in 2021, in Minas Gerais, Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 117, p. e220127, 2022.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403–410, 1990.
- ARCHER, M. S. Rainfall and temperature effects on the decomposition rate of exposed neonatal remains. **Science and Justice - Journal of the Forensic Science Society**, v. 44, n. 1, p. 35–41, 2004.
- BAUER, M. RNA in forensic science. **Forensic Science International: Genetics**, v. 1, n. 1, p. 69–74, 2007.
- BECK, R. et al. Evaluation of ELISA for detection of Trichinella antibodies in muscle juice samples of naturally infected pigs. **Veterinary Parasitology**, v. 132, n. 1- 2 SPEC. ISS., p. 91–95, 2005.
- BRASIL; SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE; MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim Epidemiológico: Violência interpessoal contra pessoas com deficiência/transtorno no Brasil. **Boletim Epidemiológico**, v. 51, n. 46, p. 8–19, 2020.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. Monitoramento do Período Sazonal da Febre Amarela - Informe 26. **Informe Nº 26**, n. Figura 1, p. 1–12, 2018.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Informe especial Febre Amarela no Brasil. n01/2017. **Ministério de Saúde**, v. 850, 2017.
- BRYANT, J. E.; HOLMES, E. C.; BARRETT, A. 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. 0668–0673, 2007.
- C, F. Polymerase chain reaction: advantages and drawbacks. **Congresso Latinoamericano de Dermatologia Veterinaria**, v. 3, n. November, 2015.
- CENTRO DE INFORMAÇÕES ESTRATÉGICAS EM VIGILÂNCIA EM SAÚDE. NOTA TÉCNICA - Óbito Humano Febre Amarela. v. 2023, n. Se 10, p. 2022–2024, 2023.
- DA, S. DE E.; SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE; MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim Epidemiológico: monitoramento dos casos de arboviroses em Goiás até a semana epidemiológica 22 de 2022. **Boletim Epidemiológico: monitoramento dos casos de arboviroses em Goiás**, v. 1, n. 1, p. 1–13, 2023.
- DE ABREU, F. V. S. 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. 3, 2019.
- DE AZEVEDO FERNANDES, N. C. C. et al. Differential yellow fever susceptibility in new world nonhuman primates, comparison with humans, and implications for surveillance. **Emerging Infectious Diseases**, v. 27, n. 1, p. 47–56, 2021.

- DE MOREAU DE GERBEHAYE, A. I. et al. Stable hepatitis C virus RNA detection by RT-PCR during four days storage. **BMC Infectious Diseases**, v. 2, p. 2–7, 2002.
- DE REZENDE, I. M. et al. Persistence of Yellow fever virus outside the Amazon Basin, causing epidemics in Southeast Brazil, from 2016 to 2018 Izabela Maurício de Rezende 1 , Lívia Sacchetto 1 , E ´rica Munhoz de Mello. p. 1–12, 2018.
- DE REZENDE, I. M. et al. Yellow fever virus genotyping tool and investigation of suspected adverse events following yellow fever vaccination. **Vaccines**, v. 7, n. 4, p. 206, dez. 2019.
- 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, 2020.
- DELATORRE, E. et al. **Distinct YFV Lineages Co-circulated in the Central-Western and Southeastern Brazilian Regions from 2015 to 2018** *Frontiers in Microbiology* Frontiers Media S.A., , 2019a.
- DOMINGO, C. et al. Yellow fever in the diagnostics laboratory review-article. **Emerging Microbes and Infections**, v. 7, n. 1, 2018.
- DOMINGO, C. 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.
- DOUAM, F.; PLOSS, A. Yellow Fever Virus: Knowledge Gaps Impeding the Fight Against an Old Foe. **Trends in Microbiology**, v. 26, n. 11, p. 913–928, 2018.
- ESTRADA, A. et al. Primates in peril: The significance of Brazil, Madagascar, Indonesia and the Democratic Republic of the Congo for global primate conservation. **PeerJ**, v. 2018, n. 6, p. 1–57, 2018.
- FARIA, N. R. et al. Genomic and epidemiological monitoring of yellow fever virus transmission potential. **Science**, v. 361, n. 6405, p. 894–899, 2018.
- FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M. (DAVID M.-; HOWLEY, P. M. **Fields virology / editors-in-chief, David M. Knipe, Peter M. Howley ; associate editors, Jeffrey I. Cohen ... [et al.]**. 6th. ed. [s.l.] Philadelphia : Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, c2013., 2013.
- FIGUEIREDO, P. DE O. et al. Re-emergence of yellow fever in Brazil during 2016–2019: Challenges, lessons learned, and perspectives. **Viruses**, v. 12, n. 11, 2020.
- FINGER, J. M. et al. Stability of protein and mRNA in human postmortem liver-analysis by two-dimensional gel electrophoresis. **Clinica Chimica Acta**, v. 170, n. 2–3, p. 209–218, 1987.
- FINLAY, C. J. Yellow Fever : The Complete Symposium Let us know how access to this document benefits you. 1955.
- Flavivirus**. Disponível em: <<https://viralzone.expasy.org/24>>.
- GAMBLE, H. R.; PATRASCU, I. V. Whole blood, serum, and tissue fluids in an enzyme immunoassay for swine trichinellosis. **Journal of Food Protection**, v. 59, n. 11, p. 1213–

1217, 1996.

GÄRTNER, K. Commentary: Random variability of quantitative characteristics, an intangible epigenomic product, supporting adaptation. **International Journal of Epidemiology**, v. 41, n. 2, p. 342–346, 2012.

GARIBYAN, L.; AVASHIA, N. Polymerase Chain Reaction. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 133, n. 3, p. 1–4, mar. 2013.

HAMLET, A. et al. Seasonal and inter-annual drivers of yellow fever transmission in south America. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 1, p. 1–18, 2021.

HILL, S. C. et al. Genomic surveillance of yellow fever virus epizootic in São Paulo, Brazil, 2016 – 2018. **PLoS Pathogens**, v. 16, n. 8, 2020.

HIMOTO, T.; NISHIOKA, M. Autoantibodies in liver disease: important clues for the diagnosis, disease activity and prognosis. **Autoimmunity Highlights**, v. 4, n. 2, p. 39–53, 2013.

HUANG, Y. J. S.; HIGGS, S.; VANLANDINGHAM, D. L. Emergence and re-emergence of mosquito-borne arboviruses. **Current Opinion in Virology**, v. 34, p. 104–109, 2019.

IBGE. **Biomass e Sistema Costeiro-Marinho do Brasil**. [s.l.: s.n.]. v. 45

ICTV. **Genus: Flavivirus**. Disponível em: <[https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_online\\_report/positive-sense-rna-viruses/w/flaviviridae/360/genus-flavivirus](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/flaviviridae/360/genus-flavivirus)>. Acesso em: 8 nov. 2021.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES. **Current ICTV Taxonomy Release**. Disponível em: <<https://ictv.global/taxonomy>>.

IUCN. **The International Union for Conservation of Nature's Red List of Threatened Species**. Disponível em: <<https://www.iucnredlist.org/>>. Acesso em: 13 mar. 2023

JACOB C. DUNN & JURGI CRISTÓBAL-AZKARAT. **New World Monkeys**. Disponível em: <<https://www.nature.com/scitable/knowledge/library/new-world-monkeys-148121150/>>. Acesso em: 18 nov. 2021.

JÁCOME, R. et al. A yellow flag on the horizon: The looming threat of yellow fever to North America. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 87, p. 143–150, 2019.

JOHN J. HOLLAND, L. C. M. Poliovirus Attachment and Penetration Influence of Ionic Environment on Rate and Reversibility of Poliovirus Attach-. p. 487–504, 1959.

KESSLER, H. H. et al. Effects of storage and type of blood collection tubes on hepatitis C virus level in whole blood samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 5, p. 1788–1790, 2001.

KLEINERT, R. D. V. et al. Yellow fever: Integrating current knowledge with technological innovations to identify strategies for controlling a re-emerging virus. **Viruses**, v. 11, n. 10, 2019.

KLITTING, R. et al. What does the future hold for yellow fever virus? (I). **Genes**, v. 9, n. 6,

p. 12–16, 2018.

LAI, A. et al. Evidence of SARS-CoV-2 Antibodies and RNA on Autopsy Cases in the Pre-Pandemic Period in Milan (Italy). **Frontiers in Microbiology**, v. 13, n. June, p. 1–6, 2022.

LORENTE, S.; HAUTEFEUILLE, M.; SANCHEZ-CEDILLO, A. The liver, a functionalized vascular structure. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–10, 2020.

LUDWIG, G. et al. Volume 26 Number 2 December 2020. **Neotropical Primates**, v. 26, n. 2, p. 7–16, 2020.

MACKENZIE, J. S.; GUBLER, D. J.; PETERSEN, L. R. Emerging flaviviruses: The spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. **Nature Medicine**, v. 10, n. 12S, p. S98–S109, 2004.

MAEDA, A.; MAEDA, J. Review of diagnostic plaque reduction neutralization tests for flavivirus infection. **Veterinary Journal**, v. 195, n. 1, p. 33–40, 2013.

MARES-GUIA, M. A. M. D. M. et al. Yellow fever epizootics in non-human primates, Southeast and Northeast Brazil (2017 and 2018). **Parasites & Vectors**, v. 13, n. 1, p. 90, 19 dez. 2020.

MAYER, S. V.; TESH, R. B.; VASILAKIS, N. The emergence of arthropod-borne viral diseases: A global prospective on dengue, chikungunya and Zika fevers. **Acta Tropica**, v. 166, p. 155–163, 2017.

MÉIO, B. B. et al. Influência da flora das florestas Amazônica e Atlântica na vegetação do cerrado sensu stricto. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 26, n. 4, p. 437–444, 2003.

MESEV, E. V.; LEDESMA, R. A.; PLOSS, A. Decoding type I and III interferon signalling during viral infection. **Nature Microbiology**, v. 4, n. 6, p. 914–924, 2019.

MG - SES. Atualização Epidemiológica - Arboviroses ( Febre Amarela ). 2021.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **NOTA INFORMATIVA Nº4, DE 2017/CGPNI/DEVIT/SVS/MST**, 2017a. Disponível em: <<https://sbim.org.br/images/files/nota-ms-fa-170410.pdf>>

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Emergência epidemiológica de febre amarela no Brasil, no período de dezembro de 2016 a julho de 2017. **Boletim Epidemiológico**, v. 48, n. 28, p. 1–22, 2017b.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo Aedes. **Boletim Epidemiológico Arboviroses**, v. 51, n. 24, p. 1–13, 2020.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Monitoramento dos casos de Arboviroses urbanas transmitidas pelo Aedes (dengue, chikungunya e Zika). **Boletim Epidemiológico Arboviroses**, v. 52, n. 31, p. 1–13, 2021.

MONATH, T. P. **Yellow fever and dengue-The interactions of virus, vector and host in the re-emergence of epidemic disease** *Seminars in Virology*, 1994.

MONATH, T. P. Yellow fever: An update. **Lancet Infectious Diseases**, v. 1, n. 1, p. 11–20, 2001.

MONATH, T. P.; VASCONCELOS, P. F. C. Yellow fever. **Journal of Clinical Virology**, v.

64, p. 160–173, 2015.

MONDET, B. et al. Isolation of yellow fever virus from nulliparous *Haemagogus* (*Haemagogus*) *janthinomys* in eastern Amazonia. **Vector borne and zoonotic diseases** (Larchmont, N.Y.), v. 2, n. 1, p. 47–50, 2002.

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 São Paulo**, v. 55, n. 1, p. 45–50, 2013.

MS; SVS. **GUIA DE VIGILÂNCIA DE EPIZOOTIAS EM PRIMATAS NÃO HUMANOS E ENTOMOLOGIA APLICADA À VIGILÂNCIA DA FEBRE AMARELA** MINISTÉRIO DA SAÚDE 2ª edição atualizada. 2ª edição ed. Brasília: [s.n.].

MS; SVS. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. 7ª ed. [s.l.: s.n.].

MS; SVS. Monitoramento dos casos de arboviroses até a semana epidemiológica 51 de 2022. **Boletim Epidemiológico**, v. 52, n. 48, p. 1–17, 2022.

NATALIA INGRID OLIVEIRA DA SILVA. **Dinâmica de circulação de vírus zoonóticos emergentes: investigação de arbovírus em primatas não humanos no Brasil**. [s.l.] Universidade Federal de Minas Gerais, 2021.

NUNN, C.; ALTIZER, S. **Infectious Diseases in Primates: Behavior, Ecology and Evolution**. [s.l.] OUP Oxford, 2006.

OLIVEIRA DA SILVA, N. I. **DINÂMICA DE CIRCULAÇÃO DE VÍRUS ZOONÓTICOS EMERGENTES: investigação de arbovírus em primatas não humanos no Brasil**. [s.l.] Universidade Federal de Minas Gerais, 2021.

OLIVEIRA, C. H. DE et al. Yellow Fever Virus Maintained by Sabethes Mosquitoes during the Dry Season in Cerrado, a Semiarid Region of Brazil, in 2021. **Viruses**, v. 15, n. 3, p. 757, 2023.

PAGLIA, A. P. et al. **Lista Anotada dos Mamíferos do Brasil 2ª Edição**. [s.l.: s.n.]. v. 6

PAHO-WHO. Laboratory Diagnosis of Yellow Fever Virus infection. **Pan American Health Organization and World Health Organization**, n. September, p. 1–8, 2018.

PAHO. **Yellow Fever**. Disponível em: <<https://www.paho.org/en/topics/yellow-fever>>. Acesso em: 10 nov. 2021.

PIANTADOSI, A.; KANJILAL, S. Diagnostic approach for arboviral infections in the united states. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 58, n. 12, p. 1–12, 2020.

POSSAS, C. et al. Urgent call for action: Avoiding spread and re-urbanisation of yellow fever in Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 1, p. 1–2, 2018.

POWER, A. G.; MITCHELL, C. E. Pathogen spillover in disease epidemics. **American Naturalist**, v. 164, n. 5 SUPPL., 2004.

RICO-HESSE, R. **Flaviviridae**. Disponível em: <<https://talk.ictvonline.org/ictv->

reports/ictv\_online\_report/positive-sense-rna-viruses/w/Flaviviridae>. Acesso em: 29 out. 2021.

ROBERTSON, S. E. Yellow Fever. **JAMA**, v. 276, n. 14, p. 1157, 9 out. 1996.

RODHAIN, F. The role of monkeys in the biology of dengue and yellow fever. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 14, n. 1, p. 9–19, jan. 1991.

RSTUDIO TEAM. **RStudio: Integrated Development for R** Boston, 2020.

RUSSO, F. et al. Circulating Noncoding RNAs as Clinical Biomarkers. **Epigenetic Biomarkers and Diagnostics**, p. 239–258, 2016.

SACCHETTO, L. et al. Re-emergence of yellow fever in the neotropics - Quo vadis? **Emerging Topics in Life Sciences**, v. 4, n. 4, p. 411–422, 2020a.

SACCHETTO, L. 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 Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 10, p. 1–16, 2020b.

SACCHETTO PENGO, L. **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**. [s.l.] Universidade Federal de Minas Gerais, 2020.

SAMPAIO-SILVA, F. et al. Profiling of RNA Degradation for Estimation of Post Mortem Interval. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, p. e56507, 20 fev. 2013.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, n. 12, p. 5463–5467, 1 dez. 1977.

SAÚDE, S. DE V. EM S.-M. DA. Monitoramento de Febre Amarela Brasil 2019. **Boletim Secretaria de Vigilância em Saúde**, n. 18, p. 1–8, 2019.

SELLERS, R. S. et al. Immunological variation between inbred laboratory mouse strains: Points to consider in phenotyping genetically immunomodified mice. **Veterinary Pathology**, v. 49, n. 1, p. 32–43, 2012.

SELLON, R. K. Update on molecular techniques for diagnostic testing of infectious disease. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 33, n. 4, p. 677–693, 2003.

SHEARER, F. M. et al. Global yellow fever vaccination coverage from 1970 to 2016: an adjusted retrospective analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 11, p. 1209–1217, 2017.

SILVA, N. I. O. et al. Recent sylvatic yellow fever virus transmission in Brazil: The news from an old disease. **Virology Journal**, v. 17, n. 1, p. 1–12, 2020.

SOPER, F. L. The Newer Epidemiology of Yellow Fever. **American Journal of Public Health**, v. 27, n. 1, 1937.

STUCKY, B. J. SeqTrace: A Graphical Tool for Rapidly Processing DNA Sequencing

Chromatograms. p. 90–93, 2012.

TAYLOR, L. S. **A high resolution study of long-term vertebrate decomposition in human and animal model systems.** [s.l.] University of Tennessee, 2020.

THEILER, M.; SMITH, H. H. The use of yellow fever virus modified by in vitro cultivation for human immunization. **Journal of Experimental Medicine**, v. 65, n. 6, p. 787–800, 1937.

TRYLAND, M. et al. Persistence of antibodies in blood and body fluids in decaying fox carcasses, as exemplified by antibodies against *Microsporium canis*. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 48, n. 1, p. 1–4, 2006.

UNESCO. **Diversity and Sustainable Development in Tropical Forests.** [s.l.] UNESCO Office in Mexico, 2018.

VASCONCELOS, P. Yellow fever in Brazil: thoughts and hypotheses on the emergence in previously free areas. **Revista de Saúde Pública**, v. 44, n. 6, p. 1144–1149, 2010.

VASCONCELOS, P. F. DA C. Febre amarela. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 2, p. 275–293, abr. 2003.

VIDAL, J. Individual differences in the antibody response of inbred C57Bl/6J mice and their relation to individual differences in open-field behavior. **Anuario de Psicología**, v. 47, n. 1, p. 17–22, 2017.

VILELA, A. A.; DEL-CLARO, K. Feeding behavior of the black-tufted-ear Marmoset (*Callithrix penicillata*) (Primata, Callitrichidae) in a tropical cerrado savanna. **Sociobiology**, v. 58, n. 2, p. 309–314, 2011.

WAGGONER, J. J.; ROJAS, A.; PINSKY, B. A. Yellow fever virus: Diagnostics for a persistent arboviral threat. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 56, n. 10, p. 1–13, 2018.

WALTER REED, M. D. The etiology of yellow fever. **JAMA**, v. 36, p. 431–440, 1901.

WHO. Vaccines and vaccination against yellow fever. WHO position paper -- June 2013. **Relevé épidémiologique hebdomadaire / Section d'hygiène du Secrétariat de la Société des Nations = Weekly epidemiological record / Health Section of the Secretariat of the League of Nations**, v. 88, n. 27, p. 269–283, 2013.

WHO. **A Global Strategy to Eliminate Yellow Fever Epidemics (EYE) 2017-2026.** [s.l.: s.n.].

WHO. **Yellow fever.** Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/yellow-fever>>.

WICKHAM, H. **ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis.** Disponível em: <<https://ggplot2.tidyverse.org/reference/index.html>>.

ZUKAL, J. Handbook of the Mammals of the World. **Journal of Vertebrate Biology**, v. 69, n. 4, 2020.

## PRODUÇÃO CIENTÍFICA E OUTRAS ATIVIDADES

### Artigos publicados em periódicos

1. Rezende Imd, Cenachi ARC, Costa TA, **Oliveira GFG**, Rabelo L, Menezes LM, Penido I, Pereira LS, Arruda MS, Gonçalves AP, Alves PA, Kroon EG, Calzavara-Silva CE, Ramalho DB, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Labeaud AD And Drumond BP (2022) Wild-Type Yellow Fever Virus In Cerebrospinal Fluid From Fatal Cases In Brazil, 2018. *Front. Virol.* 2:936191. Doi: 10.3389/Fviro.2022.936191 (ANEXO A)
2. De Rezende IM, **Oliveira GFG**, Costa TA, Khan A, Pereira LS, Santos TA, Alves PA, Calzavara-Silva CE, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Labeaud AD, Drumond BP. Yellow Fever Molecular Diagnosis Using Urine Specimens During Acute And Convalescent Phases Of The Disease. *J Clin Microbiol.* 2022 Aug 17;60(8):E0025422. Doi: 10.1128/Jcm.00254-22. Epub 2022 Aug 2. PMID: 35916519; PMCID: PMC9383191 (ANEXO B)
3. Bentes, A.A., Dos Santos Junior, W.R., Pessoa, N.L. *Et Al.* Neuro-COVID-19 With Or Without The Multisystem Inflammatory Syndrome (MIS-C): A Single-Center Study. *J Mol Neurosci* (2023). <https://doi.org/10.1007/S12031-023-02109-Y> (ANEXO C)

### Artigos submetidos em periódicos

1. “Ecological drivers of sustained enzootic yellow fever virus transmission in Brazil, 2017-2021”. Submetido a PLOS Neglected Tropical Diseases. Preprint disponível em: <https://doi.org/10.1101/2022.10.19.512702>

### Organização de eventos e congressos

1. “**VIII Simpósio de Microbiologia da UFMG – CONECTA SIM 2021**”, promovido pelo Programa de Pós-graduação em Microbiologia, do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, realizado entre os dias 16 e 19 de novembro de 2021.

#### Projetos de extensão

1. **“Assessoria científica sobre viroses emergentes”** desenvolvido no Laboratório de Vírus, do Departamento de Microbiologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais;
2. **“CooLabs: Cooperativa de laboratórios da UFMG para enfrentamento à COVID-19”** desenvolvido no Laboratório de Vírus, do Departamento de Microbiologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais

#### Participação em eventos científicos e cursos de capacitação

1. Capacitação no Uso e Manejo de Animais de Laboratório. (Carga horária: 60h). Instituto de Ciências Biomédicas - USP, ICB - USP, Brasil.
2. Introdução à Estrutura, Evolução e Análise por NGS de Genomas Virais. (Carga horária: 9h). Sociedade Brasileira de Virologia, SBV, Brasil.
3. Biosafety level 2-3. (Carga horária: 8h). University of Texas Medical Branch at Galveston, UTMB HEALTH, Estados Unidos.
4. Introdução à Computação para Bioinformática. (carga horária: 40h). Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais.
5. "Bioinformatics Workshop on Virus Evolution and Molecular Epidemiology" Online Webinar (COVEME).
6. “Bioinformatics Workshop on Virus Evolution and Molecular Epidemiology” formato presencial (VEME Light).
7. NGS-BRICS workshop on phylogenetic and molecular epidemiology of human viral pathogens.
8. VIII Simpósio de Microbiologia da UFMG – “CONNECTA SIM 2021”, promovido pelo Programa de Pós Graduação em Microbiologia, do Departamento de

Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, entre os dias 16 e 19 de novembro de 2021, contabilizando carga horária total de 16 horas.

9. XXXII Congresso Brasileiro de Virologia - Virologia em Casa, realizado online, no período de 19/10/2021 a 23/10/2021, contabilizando carga horária total de 24 horas.
10. XXXIII Congresso Brasileiro de Virologia, evento técnico-científico promovido pela Sociedade Brasileira de Virologia na cidade de Porto Seguro - BA durante o período de 17 a 21 de outubro de 2022 com carga horária de 30 horas.

Resumos publicados em anais de eventos científicos

1. **YFV INVESTIGATION IN HUMAN URINE AND CEREBROSPINAL FLUID SAMPLES** de autoria de **Gabriela Fernanda Garcia Oliveira**, Izabela Maurício de Rezende, Thais Alkifeles Costa, Leonardo Soares Pereira, Matheus Soares Arruda, Pedro Augusto Alves, Andreza Parreiras Gonçalves, Erna Geessien Kroon, Carlos Eduardo Calzavara, Dario Brock Ramalho, Olindo Assis Martins-Filho, Andréa Teixeira-Carvalho, A. Desiree LaBeaud e Betania Drumond, foi apresentado como E-Pôster no **XXXII Congresso Brasileiro de Virologia - Virologia em Casa**, realizado em 19/10/2021 a 23/10/2021.
2. **Screening kidney and brain samples for yellow fever virus infection increases the chances of viral detection during surveillance programs** de autoria de Thais Alkifeles Costa, **Gabriela Fernanda Garcia Oliveira**, Matheus Soares Arruda, ERIK VINICIUS DE SOUSA REIS, Érica Munhoz de Mello e Betania Drumond, foi apresentado como E-Pôster no **XXXII Congresso Brasileiro de Virologia - Virologia em Casa**, realizado em 19/10/2021 a 23/10/2021.
3. **INVESTIGATION OF MAYARO VIRUS CIRCULATION IN NON-HUMAN PRIMATES IN MINAS GERAIS STATE DURING AND AFTER RECENT YELLOW FEVER OUTBREAKS** de autoria de Matheus Soares Arruda, Natalia Ingrid O Silva, Thais Alkifeles Costa, **Gabriela Fernanda Garcia Oliveira**, Érica

Munhoz de Mello, ERIK VINICIUS DE SOUSA REIS e Betania Drumond, foi apresentado como E-Pôster no **XXXII Congresso Brasileiro de Virologia - Virologia em Casa**, realizado em 19/10/2021 a 23/10/2021.

4. **“INVESTIGAÇÃO MOLECULAR DO YELLOW FEVER VIRUS EM PRIMATAS NÃO HUMANOS EM MINAS GERAIS, 2021”** de autoria de **Gabriela Fernanda Garcia Oliveira**, Gabriel Dias Moreira, Thais Alkifeles Costa, Érica Munhoz de Mello, Matheus Soares Arruda, Betania Paiva Drumond, foi apresentado na CATEGORIA PÔSTER no **“IX Simpósio de Microbiologia da UFMG – A Microbiologia no Brasil: A ciência de hoje para soluções dos problemas do amanhã”**, promovido pelo Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, nos dias 27 a 29 de setembro de 2022.
  
5. **Investigation of neutralizing antibodies against arboviruses using hepatic tissue**, de autoria de Erik Vinicius de Sousa Reis; Thaís Alkifeles Costa; Matheus Soares Arruda; **Gabriela Fernanda Garcia Oliveira**; Nidia Esther Colquehuanca Arias; Kathryn Hanley; Nikos Vasilakis; Betânia Paiva Drumond foi apresentado durante o XXXIII Congresso Brasileiro de Virologia, evento técnico-científico promovido pela Sociedade Brasileira de Virologia na cidade de Porto Seguro - BA durante o período de 17 a 21 de outubro de 2022.

ANEXOS  
ANEXO 1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

**CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação de um teste serológico, ensaio de neutralização viral (PRNT), utilizando órgãos sólidos de animais", protocolo do CEUA: 33/2021 sob a responsabilidade de Betania Paiva Drumond que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 08/03/2021.

Vigência da Autorização	08/03/2021 a 07/03/2026
Finalidade	Pesquisa
*Espécie/linhagem	Banco de amostras / A129
Nº de animais	6
Peso/Idade	20g / 3(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Bioterio Microbiologia ICB
*Espécie/linhagem	Banco de amostras / A129
Nº de animais	6
Peso/Idade	20g / 3(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Bioterio Microbiologia ICB
*Espécie/linhagem	Banco de amostras / A129
Nº de animais	6
Peso/Idade	20g / 3(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Bioterio Microbiologia ICB
*Espécie/linhagem	Banco de amostras / A129
Nº de animais	6
Peso/Idade	20g / 3(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Bioterio Microbiologia ICB
*Espécie/linhagem	Banco de amostras / C57BL/6
Nº de animais	6
Peso/Idade	20g / 3(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Bioterio Central
*Espécie/linhagem	Banco de amostras / C57BL/6
Nº de animais	6

Peso/Idade	20g / 3(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério Central
*Espécie/linhagem	Banco de amostras / C57BL/6
Nº de animais	6
Peso/Idade	20g / 3(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério Central
*Espécie/linhagem	Banco de amostras / C57BL/6
Nº de animais	6
Peso/Idade	20g / 3(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério Central

<b>Dados dos animais agrupados (uso do biotério)</b>	
*Espécie/linhagem	Banco de amostras / A129
Nº de animais	12
Idade	3(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério Microbiologia ICB
*Espécie/linhagem	Banco de amostras / A129
Nº de animais	12
Idade	3(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério Microbiologia ICB
*Espécie/linhagem	Banco de amostras / C57BL/6
Nº de animais	24
Idade	3(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério Central

Considerações posteriores:

08/03/2021	Aprovado na reunião on-line do dia 08/03/2021. Validade: 08/03/2021 à 07/03/2026
------------	---

Belo Horizonte, 11/04/2023.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG  
[https://aplicativos.ufmg.br/solicite\\_ceua/](https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/)

Universidade Federal de Minas Gerais  
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005  
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil  
Telefone: (31) 3409-4516  
[www.ufmg.br/bioetica/ceua](http://www.ufmg.br/bioetica/ceua) - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)

ANEXO 2



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

**CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação de um teste sorológico, ensaio de neutralização viral (PRNT), utilizando órgãos sólidos de animais e comparação com teste padrão usando soro", protocolo do CEUA: 176/2021 sob a responsabilidade de Betania Paiva Drumond que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 23/08/2021.

Vigência da Autorização	23/08/2021 a 22/08/2026
Finalidade	Pesquisa
*Espécie/linhagem	Camundongo Knockout / IFNAR-/- (a129)
Nº de animais	6
Peso/Idade	25g / 3(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério de Imunologia das Doenças Infecciosas
*Espécie/linhagem	Camundongo Knockout / IFNAR-/- (a129)
Nº de animais	6
Peso/Idade	25g / 3(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério de Imunologia das Doenças Infecciosas
*Espécie/linhagem	Camundongo Knockout / IFNAR-/- (a129)
Nº de animais	6
Peso/Idade	25g / 3(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério de Imunologia das Doenças Infecciosas
*Espécie/linhagem	Camundongo Knockout / C57BL/6
Nº de animais	6
Peso/Idade	25g / 3(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério Central UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo Knockout / C57BL/6
Nº de animais	6

Peso/Idade	25g / 3(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério Central UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo Knockout / C57BL/6
Nº de animais	6
Peso/Idade	25g / 3(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério Central UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo Knockout / C57BL/6
Nº de animais	6
Peso/Idade	25g / 3(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério Central UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo Knockout / IFNAR-/- (C57Bl6)
Nº de animais	6
Peso/Idade	25g / 3(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério de Imunologia das Doenças Infecciosas
*Espécie/linhagem	Camundongo Knockout / IFNAR-/- (C57Bl6)
Nº de animais	6
Peso/Idade	25g / 3(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério de Imunologia das Doenças Infecciosas

<b>Dados dos animais agrupados (uso do biotério)</b>	
*Espécie/linhagem	Camundongo Knockout / C57BL/6
Nº de animais	24
Idade	3(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério Central UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo Knockout / IFNAR-/- (a129)
Nº de animais	24
Idade	3(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério de Imunologia das Doenças Infecciosas
*Espécie/linhagem	Camundongo Knockout / IFNAR-/- (C57Bl6)
Nº de animais	12
Idade	3(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério de Imunologia das Doenças Infecciosas

Considerações posteriores:

23/08/2021	Aprovado na reunião ordinária on-line do dia 23/08/2021. Validade: 23/08/2021 à 22/08/2026.
------------	---

Belo Horizonte, 11/04/2023.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG  
[https://aplicativos.ufmg.br/solicite\\_ceua/](https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/)

Universidade Federal de Minas Gerais  
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005  
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil  
Telefone: (31) 3409-4516  
[www.ufmg.br/bioetica/ceua](http://www.ufmg.br/bioetica/ceua) - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)

ANEXO 3



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

**CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto intitulado "INVESTIGAÇÃO DE VÍRUS EM ANIMAIS SILVESTRES E DOMÉSTICOS EM MINAS GERAIS", protocolo do CEUA: 98/2017 sob a responsabilidade de Betania Paiva Drumond que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 26/09/2022.

Vigência da Autorização	26/06/2022 a 25/06/2024
Finalidade	Pesquisa
*Espécie/linhagem	Espécie silvestre brasileira / ---
Nº de animais	540
Peso/Idade	234mg / 2(anos)
Sexo	indiferente
Origem	Animais recebidos no CETAS-IBAMA
Número da Solicitação ou Autorização SISBIO	1
Atividade(s)	Recebimento de alíquota de peça (amostra biológica) coletadas na rotina (sangue, swab oral, swab anal) por veterinários do CETAS-IBAMA
Espécie/Grupos Taxonômicos	Primates não humanos, gambás e outros mamíferos e roedores
Local(is)	Belo Horizonte e cidades do entorno
*Espécie/linhagem	Espécie silvestre brasileira / ---
Nº de animais	200
Peso/Idade	2kg / 2(anos)
Sexo	indiferente
Origem	Animais recebidos no CETAS-IBAMA
Número da Solicitação ou Autorização SISBIO	1
Atividade(s)	Recebimento de alíquota de amostras (sangue, swab oral e anal) coletados na rotina do CETAS-IBAMA
Espécie/Grupos Taxonômicos	Aves
Local(is)	Belo Horizonte e cidades do entorno
*Espécie/linhagem	Primata não-humano / ---
Nº de animais	490
Peso/Idade	5kg / 2(anos)
Sexo	indiferente
Origem	Carcaças recebidas no Laboratório de Zoonoses da da Prefeitura de Belo Horizonte (LZOON-BH)
Número da Solicitação ou Autorização SISBIO	1

Atividade(s)	Recebimento de carcaça ou peça (amostra biológica de tecidos coletada de carcaças- fragmentos de vísceras e órgãos, swab oral e anal) coletados na rotina do CCZ-BH
Espécie/Grupos Taxonômicos	Primates não humanos
Local(is)	Belo Horizonte e cidades do interior de Minas Gerais
*Espécie/linhagem	Camundongo heterogênico / Swiss
Nº de animais	100
Peso/Idade	33mg / 4(meses)
Sexo	indiferente
Origem	Carcaças de animais usados no Laboratório de Zoonoses da Prefeitura de Belo Horizonte (LZOOON-BH)
*Espécie/linhagem	Morcego / Não definida
Nº de animais	300
Peso/Idade	100g / 12(meses)
Sexo	indiferente
Origem	Carcaças de animais recebidas do CCZ-BH
Número da Solicitação ou Autorização SISBIO	1
Atividade(s)	Coleta de carcaças recebidas no CCZ
Espécie/Grupos Taxonômicos	Mamífero/morcego
Local(is)	Grande Belo Horizonte

<b>Dados dos animais agrupados (uso do biotério)</b>	
*Espécie/linhagem	Morcego / Não definida
Nº de animais	300
Idade	12(meses)
Sexo	indiferente
Origem	Carcaças de animais recebidas do CCZ-BH
Número da Solicitação ou Autorização SISBIO	1
Atividade(s)	Coleta de carcaças recebidas no CCZ
Espécie/Grupos Taxonômicos	Mamífero/morcego
Local(is)	Grande Belo Horizonte
*Espécie/linhagem	Camundongo heterogênico / Swiss
Nº de animais	100
Idade	4(meses)
Sexo	indiferente
Origem	Carcaças de animais usados no Laboratório de Zoonoses da Prefeitura de Belo Horizonte (LZOOON-BH)
*Espécie/linhagem	Espécie silvestre brasileira / ----
Nº de animais	200
Idade	2(anos)
Sexo	indiferente
Origem	Animais recebidos no CETAS-IBAMA
Número da Solicitação ou Autorização SISBIO	1
Atividade(s)	Recebimento de alíquota de amostras (sangue, swab oral e anal) coletados na rotina do CETAS-IBAMA
Espécie/Grupos Taxonômicos	Aves

Local(is)	Belo Horizonte e cidades do entorno
*Espécie/linhagem	Espécie silvestre brasileira / ---
Nº de animais	540
Idade	2(anos)
Sexo	indiferente
Origem	Animais recebidos no CETAS-IBAMA
Número da Solicitação ou Autorização SISBIO	1
Atividade(s)	Recebimento de alíquota de peça (amostra biológica) coletadas na rotina (sangue, swab oral, swab anal) por veterinários do CETAS-IBAMA
Espécie/Grupos Taxonômicos	Primates não humanos, gambás e outros mamíferos e roedores
Local(is)	Belo Horizonte e cidades do entorno
*Espécie/linhagem	Primata não-humano / ---
Nº de animais	490
Idade	2(anos)
Sexo	indiferente
Origem	Carcaças recebidas no Laboratório de Zoonoses da da Prefeitura de Belo Horizonte (LZOOM-BH)
Número da Solicitação ou Autorização SISBIO	1
Atividade(s)	Recebimento de carcaça ou peça (amostra biológica de tecidos coletada de carcaças- fragmentos de vísceras e órgãos, swab oral e anal) coletados na rotina do CCZ-BH
Espécie/Grupos Taxonômicos	Primates nao humanos
Local(is)	Belo Horizonte e cidades do interior de Minas Gerais

Considerações posteriores:

26/09/2022	Pedido de Prorrogação Aprovado na reunião ordinária on-line do dia 26/09/2022. Validade: 26/06/2022 à 25/06/2024.
26/06/2017	Aprovado na reunião do dia 26/06/2017. Validade: 26/06/2017 à 25/06/2022

Belo Horizonte, 11/04/2023.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG  
[https://aplicativos.ufmg.br/solicite\\_ceua/](https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/)

Universidade Federal de Minas Gerais  
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005  
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil  
Telefone: (31) 3409-4516  
[www.ufmg.br/bioetica/ceua](http://www.ufmg.br/bioetica/ceua) - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)



## OPEN ACCESS

EDITED BY  
Gerald Misinzo,  
Sokoine University of Agriculture,  
Tanzania

REVIEWED BY  
Raphaëlle Klitting,  
The Scripps Research Institute,  
United States  
Pilar Moreno,  
Universidad de la República, Uruguay

\*CORRESPONDENCE  
Izabela Mauricio de Rezende  
irezende@stanford.edu;  
izabelamauriciorezende@gmail.com  
Betânia Paiva Drumond  
betaniadrmond@gmail.com;  
betaniadrmond@ufmg.br

†PRESENT ADDRESS  
Izabela Mauricio de Rezendem,  
Department of Pediatrics, Division of  
Infectious Disease, Stanford University  
School of Medicine, Stanford, CA,  
United States  
Leticia Mattos Menezes,  
Hospital das Clínicas, Faculdade de  
Medicina da Universidade de São  
Paulo, São Paulo, SP, Brazil

SPECIALTY SECTION  
This article was submitted to  
Emerging and Reemerging Viruses,  
a section of the journal  
Frontiers in Virology

RECEIVED 04 May 2022  
ACCEPTED 23 August 2022  
PUBLISHED 09 September 2022

CITATION  
Rezende IMd, Cenachi ARC, Costa TA,  
Oliveira GFG, Rabelo L, Menezes LM,  
Penido I, Pereira LS, Arruda MS,  
Gonçalves AP, Alves PA, Kroon EG,  
Calzavara-Silva CE, Ramalho DB,  
Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A,  
LaBeaud AD and Drumond BP (2022)  
Wild-type Yellow fever virus in  
cerebrospinal fluid from fatal cases in  
Brazil, 2018.  
*Front. Viral.* 2:936191.  
doi: 10.3389/fviro.2022.936191

## Wild-type Yellow fever virus in cerebrospinal fluid from fatal cases in Brazil, 2018

Izabela Mauricio de Rezende<sup>1,2\*†</sup>,  
Adriana Regina Campolina Cenachi<sup>3</sup>, Thais Alkifeles Costa<sup>1</sup>,  
Gabriela Fernanda Garcia Oliveira<sup>1</sup>, Livia Rabelo<sup>3</sup>,  
Leticia Mattos Menezes<sup>3†</sup>, Indiara Penido<sup>3</sup>,  
Leonardo Soares Pereira<sup>3,4</sup>, Matheus Soares Arruda<sup>1</sup>,  
Andreza Parreiras Gonçalves<sup>5</sup>, Pedro Augusto Alves<sup>5</sup>,  
Erna Geessien Kroon<sup>1</sup>, Carlos Eduardo Calzavara-Silva<sup>6</sup>,  
Dario Brock Ramalho<sup>7</sup>, Olindo Assis Martins-Filho<sup>8</sup>,  
Andrea Teixeira-Carvalho<sup>8</sup>, A. Desiree LaBeaud<sup>2</sup>  
and Betânia Paiva Drumond<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Viruses, Microbiology Department, Biological Sciences Institute, Federal University of Minas Gerais, Minas Gerais, Brazil, <sup>2</sup>Department of Pediatrics, Division of Infectious Disease, Stanford University School of Medicine, Stanford, CA, United States, <sup>3</sup>Eduardo de Menezes Hospital, Belo Horizonte, Brazil, <sup>4</sup>Bendigo Health Hospital, Bendigo, VIC, Australia, <sup>5</sup>Immunology of Viruses Diseases, René Rachou Institute, Oswaldo Cruz Foundation/FIOCRUZ, Minas Gerais, Brazil, <sup>6</sup>Cellular and Molecular Immunology, René Rachou Institute, Oswaldo Cruz Foundation/FIOCRUZ, Minas Gerais, Brazil, <sup>7</sup>Secretary of Health of Minas Gerais state, Belo Horizonte, Brazil, <sup>8</sup>Integrated Group of Biomarkers Research, René Rachou Institute, Oswaldo Cruz Foundation/FIOCRUZ, Minas Gerais, Brazil

Yellow fever virus (YFV) is the causative agent of yellow fever (YF), a hemorrhagic and viscerotropic acute disease. Severe YF has been described in approximately 15–25% of YF patients, with 20–50% of severe YF cases being fatal. Here we analyzed cerebrospinal fluid (CSF) samples collected during the YF outbreak in Brazil in 2018, aiming to investigate CNS neuroinvasion in fatal YFV cases. YFV RNA was screened by RT-qPCR targeting the 3'UTR region of the YFV genome in CSF. CSF samples were tested for the presence of anti-YFV IgM and neutralizing antibodies, coupled with routine laboratory examinations. Among the 13 patients studied, we detected anti-YFV IgM in CSF from eight patients and YFV RNA in CSF from five patients. YFV RNA genomic load in CSF samples ranged from  $1.75 \times 10^3$  to  $5.42 \times 10^3$  RNA copies/mL. We genotyped YFV from three CSF samples that grouped with other YFV samples from the 2018 outbreak in Brazil within the South-American I genotype. Even though descriptions of neurologic manifestations due to wild type YFV (WT-YFV) infection are rare, since the last YF outbreak in Brazil in 2017–2018, a few studies have demonstrated WT-YFV RNA in CSF samples from YF fatal cases. Serological tests indicated the presence of IgM and neutralizing antibodies against YFV in CSF samples from two patients. Although the presence of viral RNA, IgM and neutralizing antibodies in CSF samples could indicate

neuroinvasiveness, further studies are needed to better elucidate the role of YFV neuroinvasion and possible impacts in disease pathogenesis.

#### KEYWORDS

Yellow fever virus, yellow fever, cerebrospinal fluid, wild-type Yellow fever virus, neurotropic, central nervous system

## Introduction

Yellow fever virus (YFV) causes approximately 30,000 deaths out of 200,000 infections annually in tropical Africa and South America (1, 2). Severe YF has been described in approximately 15–25% of yellow fever (YF) patients, with 20–50% of severe YF cases being fatal (1, 3). YF is a viscerotropic hemorrhagic disease in humans, causing a variety of signs and symptoms including fever, headache, vomiting, jaundice, chills, nausea, abdominal pain, myalgia, arthralgia, rash, diarrhea, and bleeding, among others (1, 4). In patients with severe clinical manifestations, high levels of aspartate (AST) and alanine aminotransferases (ALT), thrombocytopenia, and a multifactorial bleeding disorder caused by reduced synthesis of clotting factors are usually observed. Acute liver disorders are considered one of the main factors causing brain pathology. Indeed, cytokine storm developed during the YF viscerotropic disease could contribute to central nervous system inflammation and YFV neuroinvasion (5).

The currently attenuated vaccine strains derived from the lineage 17D were originated from wild-type virus strain Asibi (6). This vaccine can cause adverse events such as YF vaccine-associated viscerotropic disease (YEL-AVD), which resembles the disease caused by WT-YFV, and YF vaccine-associated neurotropic disease (YEL-AND) with infection of the central nervous system (CNS). YEL-AND includes at least one of the following signs and symptoms: fever higher than 38°C, headache, focal neurological symptom (including ataxia, aphasia, and paresis), meningeal signs, altered mental status, seizure and cerebrospinal fluid (CSF) pleocytosis (7). Both YEL-AVD and YEL-AND are rare but often fatal (6). It is believed that these severe adverse events are influenced mainly by host factors, including the immune response. In contrast, wild-type YF (WT-YFV) infection in brain tissue, causing viral encephalitis, is rarely described (8).

Despite the viscerotropic aspect of YFV infection, since the last YF outbreak in Brazil in 2016–2019, few studies have detected WT-YFV genomic RNA in CSF from fatal cases (3, 9, 10). CNS involvement has been associated with other flavivirus infections such as Japanese encephalitis virus, West Nile virus, Zika virus (ZIKV), and dengue virus (DENV) (9, 11–16). The clinicopathological presentations of

flavivirus CNS infection range from mild meningitis to fulminant meningoencephalomyelitis (16). These viruses usually reach the CNS through blood and brain-blood barrier (BBB) disruption (16, 17) due to increased endothelial cell permeability induced by viral replication or neuroinflammation (18). More recently, a new extension of the CNS was found, described as a network of lymphatic vessels within the dura mater that runs alongside blood vessels. This network provides an alternate conduit for the drainage of immune cells and CSF from the brain (19), and could also be involved during CNS invasion. This data suggests that BBB permeability and CNS lymph drainage in the setting of an exaggerated proinflammatory cytokine response may lead to the shock phase of yellow fever (1). The goal of this study was to further investigate CNS neuroinvasion in fatal YFV cases during the YF outbreak in Brazil in 2018.

## Methodology

### Biological samples and ethics

All patients were admitted at Eduardo de Menezes Hospital (HEM), Belo Horizonte, Brazil, a reference hospital for infectious diseases in Minas Gerais state, during the 2018 YF outbreak. Diagnosis of YF was confirmed through positive YFV RT-qPCR, YFV isolation from serum sample, or detection of anti-YFV IgM in serum, followed by negative anti-DENV and anti-ZIKV IgM tests. Diagnostic tests were run at Reference Laboratory in Minas Gerais (Ezequiel Dias Foundation), following routine tests at this institution. Test results were referred to us. Of the 53 fatal cases admitted at HEM during the 2018 YF outbreak, 13 underwent postmortem CSF collection. CSF was collected at the Eduardo de Menezes Hospital and kept in liquid nitrogen until adequate transport to the Laboratory of Viruses/UFMG/Brazil and stored at -70°C. Ethics Committee on Human Research approved the research at René Rachou Institute/FIOCRUZ on CAAE 65814417.0.0000.5091 and CAAE: 43000815.7.0000.5091 and at Stanford University School of Medicine, under the eProtocol number 53676.

## YFV investigation

Total RNA extraction was done using 140  $\mu$ L of CSF sample and QIAmp Viral RNA Mini kit (Qiagen, Germany), following the manufacturer's instructions. Total RNA (5  $\mu$ L) was used in RT-qPCR targeting the 3'UTR region of the YFV genome (20). Positive samples were then used for quantitative PCR, using Bio Gene Research Yellow Fever PCR kit, following manufacturer's instructions (Bioclin, Brazil).

## YFV genotyping

YFV RNA isolated from CSF samples were subjected to genotyping, as previously described (21). Briefly, part of NS5 gene was amplified (260 bp) (22) and sequenced (23). The sequences generated here were then aligned with a sequence panel previously used (21), using Clustal W, implemented on Mega7 (24). The Maximum-likelihood tree was generated using Kimura-2-parameters nucleotide substitution model with gamma distribution, and 1,000 bootstraps replicates, using MEGA7 (24).

## Serological analysis

An anti-YFV IgM immunochromatographic test was run (ECO Diagnóstica, Brazil) on CSF samples. YFV RNA positive CSF samples that were also IgM anti-YFV reactive were used in plaque reduction neutralization test (PRNT), as previously described (25). Briefly, CSF samples were two-fold diluted from 1:20 to 1:1280. Dilutions of CSF were incubated with 150 plaque-forming units (PFUs) of YFV vaccine strain YFV-17DD. The mix of CSF and vaccine YFV-17DD were then used for Vero cells' infection. After five days post-infection, cells were fixed, stained using crystal violet, and viral plaques were counted. Samples were considered positive when presented with a reduction of 50% of total counted plaques compared to virus control. Samples were tested in duplicate in PRNT.

## Laboratory exams

As part of the Intensive Care Unit (ICU) routine of HEM, a complete hemogram was run, including counting of hemoglobin, hematocrit, platelets, neutrophils, leukocytes, lymphocytes, eosinophils. Routine tests also included blood urea, albumin, AST, ALT, gamma-glutamyl transferase (GGT), alkaline phosphatase (ALP), lactate, total (Tbil) and direct bilirubin (Dbil), creatinine (Cr), and International normalized ratio (INR). Values for each exam were following the Laboratory Test Ranges (26).

## Statistical analysis

Considering the small number of patients in this study, we performed the nonparametric Mann-Whitney U test comparing laboratory variables regarding patients with and without YFV RNA detection in CSF. Analyzed variables were selected according to previous studies that have been shown predictive factors for severe YF disease (3), and hepatic injury markers, including neutrophil count, ALT, AST, INR, indirect bilirubin, and creatinine on day of admission. Significant difference was considered when  $p < 0.05$ .

## Results

During the YF outbreak in Brazil in 2018, CSF samples were collected postmortem from 13 patients at HEM. Our results showed that, among those, five patients were RT-qPCR positive for YFV RNA in CSF. We estimated the YFV RNA genomic load in CSF samples from four patients, and values ranged from  $1.75 \times 10^3$  to  $5.42 \times 10^3$  RNA copies/mL (Table 1). Positive CSF samples were collected on the day of death, corresponding to 4 to 25 days post-symptoms (DPS) (Table 1).

The five YFV positive CSF samples were from male patients, ranging from 24 to 62 years of age (Table 2). At hospital admission, the most common clinical findings included fever,

TABLE 1 Laboratory results of patients with detection of YFV RNA in CSF.

ID	P #1	P #2	P #3	P #4	P #5
AGE	24	54	62	45	41
DPS - CSF sample	9	25	4	6	9
YFV RT-qPCR (CSF)	positive	positive	positive	positive	positive
Genomic viral load	3.85E+03	n/a	1.75E+03	4.47E+03	5.42E+03
IgM (CSF)	Reactive	NR	NR	Reactive	NR
PRNT <sub>50</sub> (CSF)	1:40	n/a	n/a	1:640	n/a

P, Patient; DPS, days post symptoms; CSF, cerebrospinal fluid; YFV, Yellow fever virus; NR, non-reactive; n/a, not available; PRNT, plaque reduction neutralization test.

TABLE 2 Clinical data at admission and death day of 13 YF patients analyzed in this study.

GENERAL DATA		P 1	P 2	P 3	P 4	P 5	P 6	P 7	P 8	P 9	P 10	P 11	P 12	P 13
ID	AGE	24	54	62	45	41	80	55	55	64	27	46	56	68
SEX	anti-YFV IgM (CSF)	male	male	male	male	male	male	male	male	male	male	male	male	male
YFV VACCINE RECORD		reactive	reactive	NR	reactive	NR	reactive	reactive	reactive	reactive	NR	reactive	NR	NR
		2001	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV
Admission day	DPS	6	13	4	1	5	3	5	11	2	3	3	3	2
Death day		9	25	*	6	9	7	*	41	8	4	9	6	7
Admission day	Fever	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Death day		A	A	*	0	P	A	*	n/a	A	A	A	A	A
Admission day	Headache	P	P	A	P	P	A	P	P	P	P	A	P	P
Death day		0	0	*	A	A	A	*	n/a	A	A	A	A	A
Admission day	Confusion	P	P	A	0	P	A	A	P	A	P	P	A	A
Death day		0	P	*	A	A	A	*	n/a	P	A	A	P	A
Admission day	Seizure	P	A	A	0	0	A	A	A	A	P	P	A	A
Death day		A	A	*	0	0	A	*	n/a	A	A	A	P	P
Admission day	Other neurological disorder	coma	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Death day		coma	coma	*	coma	coma	A	*	n/a	A	coma	A	A	A
Admission day	Jaundice	P	P	P	P	P	P	P	P	A	P	P	P	P
Death day		P	P	*	A	P	A	*	n/a	P	A	P	A	A
Admission day	Platelets	34,000	87,000	86,000	55,000	162,000	62,000	55,000	61,000	96,000	16,200	40,000	46,000	81,000
Death day	(150,000 – 400,000 mm <sup>3</sup> )	75,000	67,000	*	59,000	89,000	57,000	*	67,000	109,000	67,000	47,000	70,000	57,000
Admission day	Neutrophils	7,458	7,544	4,536	1,200	13,600	4,712	3,016	1,872	1,098	3,844	3,936	5,472	n/a
Death day	(2,000 – 8,250 mm <sup>3</sup> )	n/a	n/a	*	n/a	n/a	n/a	*	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
Admission day	Creatinine	7.2	1	4.7	1	8.1	4.4	5.2	1.9	1.4	1.3	0.6	5.7	1.7
Death day	(0.7 – 1.30 mg/dL)	6.8	5.5	*	5.6	5.6	6.1	*	4.9	5.6	5.9	4.4	4.7	4.6
Admission day	Albumin	2.7	1.9	n/a	2.9	3	2.5	2.6	2.5	3.6	2.8	3.3	2.1	3.2
Death day	(3.4 – 4.5 g/dL)	2.2	2.4	*	2.8	n/a	2.5	*	2.4	2.4	3.2	2.1	3.4	
Admission day	AST	14,060	231	410	7,491	17,000	6,674	8,369	7,630	4	5,475	7,679	19,000	13,437
Death day	(10 – 40 U/L)	4,019	574	*	14,928	4,943	4,807	*	120	7,269	15,098	5,141	4,728	9,228
Admission day	ALT	5,681	668	3,800	5,029	13,544	4,417	4,000	2,390	4,227	176	5,059	4,708	6,178
Death day	(10 – 40 U/L)	1,896	171	*	5,790	2,735	2,376	*	52	131	2,049	3,705	878	2,324
Admission day	TBil	7.2	21.7	5	2.9	4.9	13.6	6.8	9.9	1.7	5.6	4.8	6.3	2.8
Death day	(0.3 – 1.0 mg/dL)	7.4	n/a	*	13.3	6.9	18.1	*	29.4	14.5	5.6	16.7	4.7	10.1
Admission day	Dbil	6.7	19.7	2.2	2.2	3.2	13	6.5	8.6	1.3	5.6	3.7	5.9	2.3
Death day	(0.1 – 0.3 mg/dL)	6.4	29.9	*	12	3.1	17.4	*	26	13.9	3.8	14.2	4.3	8.6
Admission day	GGT	210	172	n/a	151	n/a	422	165	397	82	169	661	189	n/a

(Continued)

TABLE 2 Continued  
GENERAL DATA

	ID	P 1		P 2		P 3		P 4		P 5		P 6		P 7		P 8		P 9		P 10		P 11		P 12		P 13		
		male	reactive	male																								
Death day	(9 – 50 U/L)	24	2001	54	126	62	n/a	45	194	41	164	80	346	55	*	55	108	64	131	27	96	46	188	56	116	68	186	
Admission day	Aphos	24	156	54	109	62	n/a	45	120	41	234	80	215	55	77	55	187	64	84	27	n/a	46	68	56	109	68	n/a	
Death day	(30 – 120 U/L)	24	254	54	199	62	n/a	45	394	41	982	80	206	55	*	55	224	64	121	27	147	46	98	56	104	212	68	n/a
Admission day	INR	24	3.99	54	1.78	62	4.82	45	2.39	41	9.27	80	1.47	55	1.99	55	2.01	64	1.82	27	6	1.57	46	1.89	56	1.31	68	1.31
Death day		24	2.86	54	1.69	62	*	45	4.61	41	> 5.00	80	1.15	55	*	55	1.17	64	n/a	27	3.4	2.95	46	1.97	56	1.58	68	1.58

\*data from admission and death day are the same; P 1 – P 13, patient 1 to 13 DPS, days post symptom onset; NR, non-reactive; n/a, not available; NV, non-vaccinated; P, presence; A, absence; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; Tbil, Total bilirubin; Dbil, Direct bilirubin; GGT, gamma-glutamyl transferase; APhos, alkaline phosphatase; INR, international normalized ratio. Laboratory test reference ranges followed ABRM (26).

jaundice (5/5 patients), followed by headache, vomiting (4/5 patients); confusion, oliguria, myalgia (3/5 patients); asthenia, bleeding (2/5 patients); seizure, abdominal pain, diarrhea, dehydration, and palpable liver (1/5 patients) (Table 2). One patient died on the day of hospitalization (P #3) and four remained hospitalized from 4 up to 25 DPS (Table 2), until the day of death. Patients P #1, P #2, and P #5 had CNS signs at presentation (altered mental status). Patients #3 and #4 arrived at HEM already intubated, with a report of seizure and altered mental status.

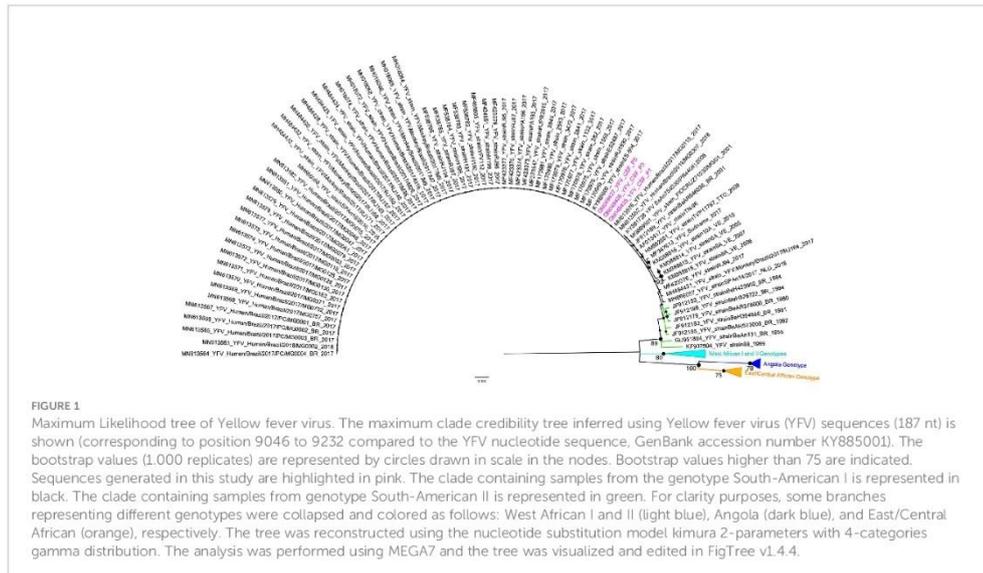
Among the 13 CSF samples, 12 were tested using an IgM anti-YFV immunochromatographic test, and eight were IgM positive (Table 2). We could not run this test using CSF sample from P #13, due to insufficient quantity. Samples that had YFV RNA detected in CSF and were IgM reactive (P #1, P #2, P #4), were used in a PRNT assay. CSF samples from patients P #1 and P #4 presented neutralizing antibodies against YF 17DD strain (P #1: up to sera dilution 1:40 and P #4: up to sera dilution 1:640) (Table 1).

Regardless the fact that none of the patients had been vaccinated against YF up to 30 days before symptoms onset, we performed YFV genotyping using CSF from three patients that presented YFV RNA (P #1, P #3, and P #5). The other two patients were negative after the genotyping RT-qPCR. All YFV RNA sequences detected in CSF were assigned to the South-American I genotype cluster, together with other YFV samples from the 2018 outbreak in Brazil (Figure 1).

Severe yellow fever cases could be associated with encephalopathy and altered liver injury markers, which can lead to an increase in the BBB permeability, facilitating the virus from crossing this barrier and being found in the central nervous system (16, 17). Considering previously described risk factors for severe YF (3) (older age, male sex, higher neutrophil counts, higher levels of AST, indirect bilirubin, creatinine, prolonged prothrombin time, and YFV RNA viral load in plasma) and hepatic injury markers, we performed statistical analysis comparing data from the five patients with positive CSF and the other eight patients with no detection of YFV RNA in CSF. None of the analyzed variables presented a statistically significant difference. However, all 13 patients presented with at least two risk factors for severe disease (Table 2).

## Discussion

This study demonstrates the presence of wild type YFV RNA in CSF from five naturally infected YF patients during the 2018 YF outbreak in Brazil. We were also able to detect antibodies against YFV in CSF in three of those five patients. These results suggest that YFV can be neuroinvasive in severe disease, but more studies are needed to confirm the role of YFV in neuroinvasion given our small sample size. Although YFV genomic RNA has also been detected in CSF of naturally



infected patients by other studies (3, 9, 10), encephalitis caused by YFV neuroinvasion is rarely described (1, 8) and more studies are needed to better understand this phenomenon in humans. While neurological disease can also occur as an adverse event following YF vaccination, neurologic manifestations due to WT-YFV infection are rare, and early studies described delirium, seizures (1, 8, 27), and coma as one of the events preceding death due to YF infection (1). It is known that these manifestations are more associated with cerebral edema and metabolic factors associated with severe disease than with the action of the virus itself in the CNS (8).

According to protocols of patient management recommended by the Ministry of Health in Brazil, all 13 patients analyzed in this study were classified as YF severe cases (group C) and hospitalized in an intensive care unit (ICU) (7). This classification includes the presence of signs and symptoms as oliguria, somnolence, lethargy, mental confusion, coma, seizure, bleeding, difficulty to breathing, hypotension, poor perfusion or AST or ALT  $\geq 2,000$  UI/L, CR  $\geq 2$ , INR  $\geq 1.5$ , and platelets  $< 50,000$  cells/mL (7). In addition, Kallas and colleagues (2019) described older age ( $> 45$  years old), male sex, higher neutrophil counts ( $> 4,000$  cells/mL), higher levels of AST ( $\geq 3,500$  UI/L), indirect bilirubin ( $\geq 0.64$  mg/dL), creatinine ( $\geq 2.36$  UI/L), prolonged prothrombin time ( $\geq 1.46$ ), and YFV RNA viral load in plasma ( $\geq 5.1$  log copies/mL) as risk factors for fatal cases (3).

Analyzing our patients on the day of their death, they presented with indirect bilirubin, INR, and creatinine above

the cut-off found by Kallas et al. (3), and all were considered comatose on the day of death. Four patients showed AST and neutrophil counts higher than cut-off values described as risk factors for fatal disease (3). In addition, two patients studied here presented with serum YFV genomic RNA load higher than the established threshold for fatal YF (3). All patients presented with three or more signs and symptoms described by the Ministry of Health (7) as an important factor for severe YF clinical illness (Table 2), and at least two several markers for poor prognosis, described by Kallas et al. (3) (3, 7), that could lead to neurologic manifestations (8). However, we did not find any risk factor that could be associated with detection of YFV RNA in CSF.

Together, our findings suggest severe cellular damage by YFV in the five patients with YFV RNA in CSF. The combination of liver, kidney, and bone marrow damage indicates the involvement of multiple organs, resulting in a systemic damage. In most cases, this damage might be irreversible due to systemic impairment and the interdependence of organ systems in their functioning. Liver failure probably contributes to encephalitis (28), and the already fragile BBB allowed virus crossing to CNS, likely mediated by cytokine storm produced during viscerotropic YF infection. It has been described for other flaviviruses, that this cytokine storm can alter the permeability of the endothelium through the disturbance of the tight junctions of BBB (reviewed by 29). Bearing in mind that WT-YFV must have a relative neurovirulence in humans, the virus probably reached the

CNS due to the severe clinical illness of the studied patients during YF infection. The virus could have reached the CNS as a free particle or inside an infected cell (Trojan-horse entry mechanism) (30). Possibly as a consequence of immune response against YFV, infected cells could have crossed the BBB carrying viruses' particles and immunoglobins to the CNS (reviewed by 30). Another pathway that might have allowed neuroinvasion by YFV could be the recently described network of lymphatic vessels within the dura mater that runs alongside blood vessels and is responsible for fluid flow and lymphatic drainage from the central nervous system (19).

While the presence of IgM in CSF without direct detection of virus could indicate neuroinvasiveness, it is important to note that this phenomenon might be a consequence of a passive crossing through the BBB and does not necessarily implicate the presence of YFV particle or active virus replication in CNS. However, the recent YF outbreak in Brazil was caused by a new viral lineage with unique mutations and amino acid substitutions (2, 4) and the possible impacts of these alterations in viral biology and pathogenesis still need to be addressed. Nevertheless, it is plausible to consider that the presence of YFV RNA, and possibly viral particles in CNS, could have harmed the outcome of these patients.

## Conclusion

In this study YFV genomic RNA, IgM, and neutralizing antibodies were detected in CSF in fatal YF cases at HEM with presenting signs and symptoms of severe viscerotropic YF disease. Severe clinical illness may facilitate the virus invasion in CNS. Further studies are needed to better elucidate the role of CNS involvement in YF disease.

## Data availability statement

The datasets presented in this study can be found in online repositories. The names of the repository/repositories and accession number(s) can be found in the article/Supplementary Material.

## Ethics statement

The studies involving human participants were reviewed and approved by This study was approved by the institutional review boards at René Rachou Institute/FIOCRUZ on CAAE 65814417.0.0000.5091 and CAAE: 43000815.7.0000.5091 and at Stanford University School of Medicine, under the number eProtocol 53676. The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

## Author contributions

IR performed scientific experiments, results analysis, first draft, tables and figures conceptualization. IR and BD wrote the first draft. IR, TC, GO, MA and APG performed the scientific experiments. AC, LR, LM, IP and LP assisted with medical record analysis and medical discussion. LP and DR provided resources. IR, LP, and BD designed the study. DR and BD conceptualized the study. PA provided the sequencing facility, PA, EK, CC-S, OM-F, AT-C, AL and BD provided funding, and coordinated the project. All authors contributed to manuscript editing, and revision, and approved the submitted version. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

## Funding

This work was supported by different agencies. BD was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), under Grant APQ-01574-17. PA, BD, AT-C, OM-F were supported by Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais (SES-MG)/Secretaria de Estado de Planejamento de Minas Gerais (SEPLAG-MG)/Instituto René Rachou/Fundação Oswaldo Cruz (IRR/FIOCRUZ) under grant yellow fever. IR, PA, BD, AT-C, OM-F, AL were supported by CNPq/NIH, under Grant 404192-2019-0/R01 AI149614. CC-S was supported by Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), under grant VPPIS-004- FIO-18-32. PA was supported by FAPEMIG under grant APQ-01989-18. IR were supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)/Brazil graduate scholarship grant (0001). TC, and GO were supported by CNPq FAPEMIG, and CAPES undergraduate scholarship grants. BD, AT-C, OM-F are CNPq Research Fellows. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

## Conflict of interests

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

## Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

## References

- Monath TP. Yellow fever: an update. *Lancet Infect Dis* (2001) 1:11–20. doi: 10.1016/S1473-3099(01)00016-0
- Sacchetto L, Drumond BP, Han BA, Nogueira ML, Vasilakis N. Re-emergence of yellow fever in the neotropics — quo vadis? *Emerg Top Life Sci* (2020) 4:411–22. doi: 10.1042/ETLS20200187
- Kallas EG, D'Elia Zanella L, G. F. A. B., 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) 19:750–8. doi: 10.1016/S1473-3099(19)30125-2
- Silva NIO, Sacchetto L, de Rezende IM, Trindade GDS, Labeaud AD, De Thoisy B, et al. Recent sylvatic yellow fever virus transmission in Brazil: The news from an old disease. *Viral J* (2020) 17:1–12. doi: 10.1186/s12985-019-1277-7
- Hadjihambi A, Arias N, Sheikh M, Jalan R. Hepatic encephalopathy: a critical current review. *Hepatal Int* (2018) 12:135–47. doi: 10.1007/s12072-017-9812-3
- Beck AS, Barrett AD. Current status and future prospects of yellow fever vaccines. *Expert Rev Vaccines* (2015) 14:1479–92. doi: 10.1586/14760584.2015.1083430
- MS-BR. *Manual de manejo clínico da febre amarela*. 1st ed. (2020), Brasília.
- McEntire CRS, Song K-W, McInnis RP, Rhee JY, Young M, Williams E, et al. Neurologic manifestations of the world health organization's list of pandemic and epidemic diseases. *Front Neurol* (2021) 12:634827. doi: 10.3389/fneur.2021.634827
- Marinho PES, Alvarenga PPM, Crispim APC, Candiani TMS, Alvarenga AM, Bechler IM, et al. Wild-type yellow fever virus rna in cerebrospinal fluid of child. *Emerg Infect Dis* (2019) 25:1567–70. doi: 10.3201/eid2508181479
- Ribeiro AF, Cavalin RF, Suleiman JMAH, Da Costa JA, De Vasconcelos MJ, Málague 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) 101:180–8. doi: 10.4269/ajtmh.18-0882
- Carod-Artal FJ, Wichmann O, Farrar J, Gascón J. Neurological complications of dengue virus infection. *Lancet Neurol* (2013) 12:906–19. doi: 10.1016/S1474-4422(13)70150-9
- Suthar MS, Diamond MS, Gale. West Nile Virus infection and immunity. *Nat Rev Microbiol* (2013) 11:115–28. doi: 10.1038/nrmicro2950
- Oliveira DB, Machado G, de Almeida GMF, Ferreira PCP, Bonjardim CA, deTrindade GS, et al. Infection of the central nervous system with dengue virus 3 genotype I causing neurological manifestations in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* (2016) 49:125–9. doi: 10.1590/0037-8682-0208-2015
- Petersen LR, Jamieson DJ, Powers AM, Honein MA. Zika virus. *N Engl J Med* (2016) 374:1552–63. doi: 10.1056/NEJMra1602113
- Li G-H, Ning Z-J, Liu Y-M, Li X-H. Neurological manifestations of dengue infection. *Front Cell Infect Microbiol* (2017) 7:449. doi: 10.3389/fcimb.2017.00449
- Maximova OA, Pletnev AG. Flaviviruses and the central nervous system: Revisiting neuropathological concepts. *Annu Rev Virol* (2018) 5:255–72. doi: 10.1146/annurev-virology-092917-043439
- Papa MP, Meuren LM, Coelho SVA, de Oliveira Lucas CG, Mustafá YM, Matassoli FL, et al. Zika virus infects, activates, and crosses brain microvascular endothelial cells, without barrier disruption. *Front Microbiol* (2017) 8:2557. doi: 10.3389/fmicb.2017.02557
- Daniels B, Klein R. Viral sensing at the blood-brain barrier: New roles for innate immunity at the CNS vasculature. *Clin Pharmacol Ther* (2015) 97:372–9. doi: 10.1002/cpt.75
- Absinta M, Ha S-K, Nair G, Sati P, Luciano NJ, Palisoc M, et al. Human and nonhuman primate meninges harbor lymphatic vessels that can be visualized noninvasively by MRI. *Elife* (2017) 6:e29738. doi: 10.7554/eLife.29738
- Domingo C, Patel P, Yillah J, Weidmann M, Mendez JA, Nakoune ER, et al. Advanced yellow fever virus genome detection in point-of-care facilities and reference laboratories. *J Clin Microbiol* (2012) 50:4054–60. doi: 10.1128/JCM.01799-12
- 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) 7:1–10. doi: 10.3390/vaccines7040206
- Patel P, Landt O, Kaiser M, Faye O, Koppe T, Lass U, et al. Development of one-step quantitative reverse transcription PCR for the rapid detection of flaviviruses. *Viral J* (2013) 10:58. doi: 10.1186/1743-422X-10-58
- Sanger F, Nicklen S. DNA Sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* (1977) 74:5463–7. doi: 10.1073/pnas.74.12.5463
- Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* (2016) 33:1870–4. doi: 10.1093/molbev/msw054
- Wieten RW, Jonker EFF, Pieren DKJ, Hodiament CJ, van Thiel PPAM, van Gorp ECM, et al. Comparison of the PRNT and an immune fluorescence assay in yellow fever vaccinees receiving immunosuppressive medication. *Vaccine* (2016) 34:1247–51. doi: 10.1016/j.vaccine.2016.01.037
- ABIM. *Laboratory test reference ranges* (2020). Available at: <https://www.abim.org/~media/ABIM%20Public/Files/pdf/exam/laboratory-reference-ranges.pdf> (Accessed January 13, 2020).
- Stevenson LD. Pathologic changes in the nervous system in yellow fever. *Arch Pathol* (1939) 27:249–66.
- Monath TP, Barrett ADT. Pathogenesis and pathophysiology of yellow fever. (2003) 60:3527. doi: 10.1016/S0065-3527(03)60009-6
- Puccioni-Sohler M, Rosadas C. Advances and new insights in the neuropathogenesis of dengue infection. *Arq Neuropsiquiatr* (2015) 73:698–703. doi: 10.1590/0004-282X20150074
- Neal JW. Flaviviruses are neurotropic, but how do they invade the CNS? *J Infect* (2014) 69:203–15. doi: 10.1016/j.jinf.2014.05.010

### COPYRIGHT

© 2022 Rezende, Cenachi, Costa, Oliveira, Rabelo, Menezes, Perido, Pereira, Arruda, Gonçalves, Alves, Kroon, Calzavara-Silva, Ramalho, Martins-Filho, Teixeira-Carvalho, LaBeaud and Drumond. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



## Yellow Fever Molecular Diagnosis Using Urine Specimens during Acute and Convalescent Phases of the Disease

Izabela Maurício de Rezende,<sup>a,b</sup> Gabriela Fernanda Garcia Oliveira,<sup>a</sup> Thais Alkifeles Costa,<sup>a</sup> Aslam Khan,<sup>b</sup> Leonardo Soares Pereira,<sup>a,c</sup> Tayrine Araújo Santos,<sup>c</sup> Pedro Augusto Alves,<sup>d</sup> Carlos Eduardo Calzavara-Silva,<sup>e</sup> Olindo Assis Martins-Filho,<sup>f</sup> Andréa Teixeira-Carvalho,<sup>f</sup> Angelle Desiree LaBeaud,<sup>b</sup> Betânia Paiva Drumond<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratory of Viruses, Microbiology Department, Biological Sciences Institute, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

<sup>b</sup>Department of Pediatrics, Division of Infectious Disease, Stanford University School of Medicine, Stanford, California, USA

<sup>c</sup>Eduardo de Menezes Hospital, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

<sup>d</sup>Immunology of Viruses Diseases, René Rachou Institute, Oswaldo Cruz Foundation/FIOCRUZ MG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

<sup>e</sup>Cellular and Molecular Immunology, René Rachou Institute, Oswaldo Cruz Foundation/FIOCRUZ, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

<sup>f</sup>Integrated Group of Biomarkers Research, René Rachou Institute, Oswaldo Cruz Foundation/FIOCRUZ, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

**ABSTRACT** Prior studies have demonstrated prolonged presence of yellow fever virus (YFV) RNA in saliva and urine as an alternative to serum. To investigate the presence of YFV RNA in urine, we used RT-PCR for YFV screening in 60 urine samples collected from a large cohort of naturally infected yellow fever (YF) patients during acute and convalescent phases of YF infection from recent YF outbreaks in Brazil (2017 to 2018). Fifteen urine samples from acute phase infection (up to 15 days post-symptom onset) and four urine samples from convalescent phase infection (up to 69 days post-symptom onset), were YFV PCR-positive. We genotyped YFV detected in seven urine samples (five collected during the acute phase and two collected during the YF convalescent phase). Genotyping indicated the presence of YFV South American I genotype in these samples. To our knowledge, this is the first report of wild-type YFV RNA detection in the urine this far out from symptom onset (up to 69 DPS), including YFV RNA detection during the convalescent phase of YF infection. The detection of YFV RNA in urine is an indicative of YFV infection; however, the results of RT-PCR using urine as sample should be interpreted with care, since a negative result does not exclude the possibility of YFV infection. With a possible prolonged period of detection beyond the viremic phase, the use of urine samples coupled with serological tests, epidemiologic inquiry, and clinical assessment could provide a longer diagnostic window for laboratory YF diagnosis.

**KEYWORDS** yellow fever virus, yellow fever, virus surveillance, diagnosis, urine

After decades of causing small outbreaks in remote areas of the globe, yellow fever virus (YFV) caused large outbreaks of yellow fever (YF) in African and South American countries from 2016 to 2019. In 2016, YFV spread through Angola and the Democratic Republic of Congo, resulting in 884 confirmed cases and 381 deaths (1). These cases were also imported to other countries, such as China (2). Later in 2016, the virus reemerged in Southern Brazil and caused 2,166 confirmed cases and 752 deaths from 2016 to 2019 (3–5).

The clinical course of YF is classically divided into three stages: (i) infection, characterized by viremia and occurrence of flulike symptoms; (ii) remission, when seroconversion is observed while fever and symptoms disappear; and (iii) intoxication, which is considered the severe form of YF, when symptoms reappear and patients experience hemorrhagic fever, multiorgan dysfunction, jaundice, oliguria, and anuria, among other symptoms (4, 6, 7). After these three stages, there is a convalescent phase of disease, which is characterized by prolonged weakness and fatigue lasting several weeks (7–11).

**Editor** Randall Hayden, St. Jude Children's Research Hospital

**Copyright** © 2022 de Rezende et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.

Address correspondence to Betânia Paiva Drumond, betaniadrumond@gmail.com, or betaniadrumond@ufmg.br.

The authors declare no conflict of interest.

**Received** 4 March 2022

**Returned for modification** 9 May 2022

**Accepted** 28 June 2022

**Published** 2 August 2022

According to the World Health Organization (WHO), a YF suspected case is defined as any individual who presents with an acute febrile illness and jaundice development within 14 days after symptom onset. A YF probable case is defined by a suspected individual testing positive for YF IgM antibodies in the absence of YF vaccination or an epidemiological link with a YF confirmed case or outbreak (12). In both cases, laboratory testing must be performed to confirm YF diagnosis. YF laboratory testing is performed through molecular, virologic or serological methods using mainly serum collected in different phases of the infection, with preference for serum from the acute phase of infection (13). Serological tests targeting detection of anti-YFV IgM antibodies are recommended after seroconversion, often utilizing samples collected from the sixth day after the onset of symptoms onward. However, the detection of antibodies against YFV poses multiple challenges as serologic tests do not necessarily indicate an active YFV infection, cross-reactivity with other flaviviruses can occur, and routine serological tests for detection of IgM or IgG do not discriminate between immunologic responses created by natural infection or by the YF vaccine. The gold standard for laboratory diagnosis is real-time reverse transcriptase PCR (RT-qPCR) using whole blood or serum collected from days one to 10 post-symptom onset (DPS) (13). However, according to the WHO, there is a limited window of 10 DPS of YFV RNA detection in serum, and the use of alternative biological samples like urine may provide a useful approach for molecular diagnosis.

Prior studies have demonstrated prolonged presence of RNA in urine or saliva from other flaviviruses such as Zika virus (ZIKV) and dengue virus (DENV) (14, 15). Regarding the YFV, previous studies had demonstrated the presence of YFV RNA in urine samples when viral RNA is no longer detected in sera (16–18). One study demonstrated the presence of YFV RNA in urine up to 32 DPS in patients who recovered after YF disease and urine samples in some cases contained higher viral loads compared to blood samples collected on the same day (16). In another study, YFV RNA was detected in urine and semen samples from a naturally infected YF patient up to 21 DPS, when the serum was already RT-qPCR negative (18).

We evaluated the applicability of urine as a sample for YFV laboratory molecular detection by testing a range of samples collected from a large cohort of YF infected patients at acute and convalescent phases of YF infection during recent YF outbreaks in Brazil, from 2017 to 2018.

## MATERIALS AND METHODS

**Biological samples and ethics.** A total of 480 patients were attended at Eduardo de Menezes Hospital (HEM), Belo Horizonte, Brazil, a reference hospital for infectious diseases in Minas Gerais state, during the 2017 to 2018 YF outbreak. Routine YF laboratory diagnosis tests (PCR or ELISA) were performed at Reference Laboratory in Minas Gerais (Ezequiel Dias Foundation—FUNED). The YF laboratory diagnosis was confirmed through positive YFV PCR or detection of anti-YFV IgM, followed by negative anti-DENV and anti-ZIKV IgM tests. Of the 302 patients with confirmed YF, 60 patients provided consent and urine samples for the current study. Urine samples from the 60 patients enrolled in this study were obtained in different DPS (Table 1) and analyzed. One urine sample per patient was analyzed, and whenever available, serum samples were also analyzed (Table 1). Twenty-seven urine samples were collected during the YF acute phase (up to 15 DPS), and 33 urine samples were obtained during the convalescent phase (from 19 to 94 DPS) (Table 1). Urine and serum samples were collected at the hospital and kept in liquid nitrogen until adequate transport to Virus Laboratory/ICB/UFMG, where the samples were maintained in an ultra-freezer at  $-70^{\circ}\text{C}$  until use. Out of 60 patients enrolled in the study, 58 patients had no record of YF vaccination, while two patients had been vaccinated against YF 10 days before symptom onset. This study was approved by the Ethics Committee for studies with human subjects on Human Research at René Rachou Institute/FIOCRUZ-MG on CAAE 65814417.0.0000.5091 and CAAE: 430008157.0000.5091.

**YFV RNA screening.** A total of 140  $\mu\text{L}$  of each urine sample was used for total RNA extraction, using the QIAmp Viral RNA minikit (Qiagen), following the manufacturer's instructions. Total RNA (5  $\mu\text{L}$ ) was used in an RT-qPCR targeting part of the YFV 3'UTR region of the YFV genome (19), for YFV RNA screening. Positive samples were then used for YFV genotyping, as described below. Whenever possible, YFV RNA was also screened in serum from patients who had YFV RNA detected in urine.

**YFV genotyping.** Urine samples presenting YFV RNA were genotyped (20). For this, 5  $\mu\text{L}$  of total RNA obtained from a positive urine sample was submitted to a different RT-qPCR, using primers targeting the NS5 region (21), and amplicons were used for nucleotide sequencing (22). The sequences generated were then aligned with a sequence panel previously used (20), using Clustal W, implemented on Mega7 (22). The Maximum-likelihood tree was generated using Kimura-2-parameters nucleotide substitution model with gamma distribution and 1,000 bootstraps replicates, using MEGA7 (23).

**Data availability.** Sequence data generated in this study were deposited in GenBank under accession numbers [OM692343](#) to [OM692349](#).

**TABLE 1** Urine and serum samples collected during the acute and convalescent phases of yellow fever infection tested for the presence of yellow fever virus RNA, using RT-qPCR<sup>a</sup>

ID	Symptom onset	YFV diagnosis (performed by the reference laboratory FUNED) <sup>b</sup>		RT-qPCR result (performed in research lab—Virus Lab/ICB/UFGM)			Vaccination date	YFV genotype
		DPS	PCR or ELISA	DPS	SERA	URINE		
1	3/3/18	10	PCR +	3	P	P	NV	NA
2	1/14/18	2	PCR +	4	P	P	NV	NA
3	1/22/18	3	PCR +	5	NA	P	NV	SA-I
4	1/28/18	3	PCR +	5	NA	P	NV	NA
5	2/12/18	4	PCR +	6	NA	P	NV	NA
6	2/1/18	8	PCR +	8	NA	P	NV	SA-I
7	2/26/18	3	PCR +	8	NA	P	NV	SA-I
8	2/12/18	3	PCR +	9	NA	P	NV	NA
9	1/6/18	6	PCR +	10	N	P	NV	SA-I
10	2/9/18	6	PCR +	13	N	P	NV	SA-I
11	1/18/18	6	PCR +	15	NA	P	NV	NA
12	1/16/18	10	PCR +	22	N	P	NV	NA
13	3/15/18	3	PCR +	28	N	P	NV	NA
14	1/22/17	5	PCR +	67	N	P	1/16/17	SA-I
15	1/15/17	3	PCR +	69	N	P	1/14/17	SA-I
16	1/20/18	5	PCR +	1	NA	N	NV	NA
17	2/4/18	NA <sup>c</sup>	PCR +	4	NA	N	NV	NA
18	1/22/18	2	PCR +	5	NA	N	NV	NA
19	2/15/18	NA <sup>c</sup>	PCR +	5	NA	N	NV	NA
20	1/28/18	33	PCR +	7	NA	N	NV	NA
21	2/23/18	1	PCR +	7	NA	N	NV	NA
22	3/16/18	NA <sup>c</sup>	PCR +	7	NA	N	NV	NA
23	2/5/18	3	PCR +	8	NA	N	NV	NA
24	3/5/18	NA <sup>c</sup>	PCR +	8	NA	N	NV	NA
25	1/12/18	NA <sup>c</sup>	PCR +	9	NA	N	NV	NA
26	1/22/18	5	PCR +	9	NA	N	NV	NA
27	1/12/18	10	PCR +	10	NA	N	1/16/18	NA
28	1/22/18	3	PCR +	11	NA	N	1/22/18	NA
29	1/28/18	9	PCR +	11	NA	N	NV	NA
30	1/21/18	10	PCR +	12	NA	N	1/24/18	NA
31	2/15/18	NA <sup>c</sup>	PCR +	15	NA	N	NV	NA
32	1/22/18	NA <sup>c</sup>	PCR +	19	NA	N	NV	NA
33	1/18/18	3	PCR +	21	NA	N	>20 DAYS	NA
34	2/5/18	6	PCR +	31	NA	N	NV	NA
35	1/16/18	4	PCR +	36	NA	N	NV	NA
36	1/25/17	2	PCR +	45	NA	N	NV	NA
37	2/26/18	NA <sup>c</sup>	PCR +	46	NA	N	NV	NA
38	1/22/17	NA <sup>c</sup>	PCR +	48	NA	N	1/12/17	NA
39	1/13/18	4	PCR +	48	NA	N	NV	NA
40	1/28/17	4	PCR +	50	NA	N	1/16/17	NA
41	1/15/17	NA <sup>c</sup>	PCR +	55	NA	N	NV	NA
42	1/22/17	3	PCR +	62	NA	N	1/10/17	NA
43	1/15/17	6	PCR +	64	NA	N	1/16/17	NA
44	1/17/17	5	PCR +	67	NA	N	1/16/17	NA
45	1/23/17	3	PCR +	68	NA	N	1/23/17	NA
46	1/22/17	5	PCR +	69	NA	N	1/22/17	NA
47	1/8/17	5	PCR +	69	NA	N	3/21/01	NA
48	1/8/17	24	ELISA +	69	NA	N	NV	NA
49	1/18/17	NA <sup>c</sup>	PCR +	73	NA	N	NV	NA
50	1/11/17	23	PCR +	73	NA	N	NV	NA
51	1/26/18	NA <sup>c</sup>	PCR +	77	NA	N	NV	NA
52	1/7/17	6	ELISA +	77	NA	N	NV	NA
53	1/7/17	1	PCR +	77	NA	N	NV	NA
54	1/10/17	5	PCR +	78	NA	N	1/11/17	NA
55	1/5/17	8	ELISA +	79	NA	N	1/14/17	NA
56	1/10/17	4	PCR +	81	NA	N	NV	NA
57	1/5/17	8	PCR +	81	NA	N	NV	NA
58	1/14/17	5	PCR +	84	NA	N	NV	NA

(Continued on next page)

TABLE 1 (Continued)

ID	Symptom onset	YFV diagnosis (performed by the reference laboratory FUNED) <sup>b</sup>		RT-qPCR result (performed in research lab—Virus Lab/ICB/UFMG)			Vaccination date	YFV genotype
		DPS	PCR or ELISA	DPS	SERA	URINE		
59	1/25/18	5	PCR +	85	NA	N	NV	NA
60	1/4/17	14	PCR +	94	NA	N	NV	NA

<sup>a</sup>The positive urine samples from yellow fever acute phase (until 15 DPS) were highlighted in gray. Positive urine samples from yellow fever convalescent phase (after 16 DPS) were highlighted in blue. ID: patient identification. DPS: days post-symptom onset. P: positive for the presence of yellow fever virus RNA by RT-qPCR (16). N: negative for the presence of yellow fever RNA (16). NA: not available. NV: not vaccinated (patients did not report a history of vaccination against yellow fever).

<sup>b</sup>YFV diagnosis confirmed by Central Reference Laboratory (FUNED) linked to Ministry of Health and Health Secretary of Minas Gerais state.

<sup>c</sup>Date of exam's result is not available; however, the positive YF case was confirmed.

## RESULTS

Of 60 analyzed urine samples, 15 (25%) were positive for the presence of YFV RNA (Ct range: 29–33) (Table 1). Eleven urine samples were taken from the acute phase (11/27 = 40.7%) (collected from 2 to 15 DPS; Table 1) and four urine samples were taken from the convalescent phase (4/33 = 12.1%) (collected at 22-, 28-, 66-, and 69-DPS; Table 1). From eight patients we were able to analyze serum collected on the same day of the analyzed urine sample. In two patients (ID 1 and ID 2; Table 1) YFV RNA was detected in serum and urine samples collected on the same day (3 and 4 DPS, respectively; Table 1). Six patients (IDs 9, 10, 12, 13, 14, and 15; Table 1) tested positive in urine while YFV RNA was no longer detected in serum samples collected on the same day as urine (Table 1).

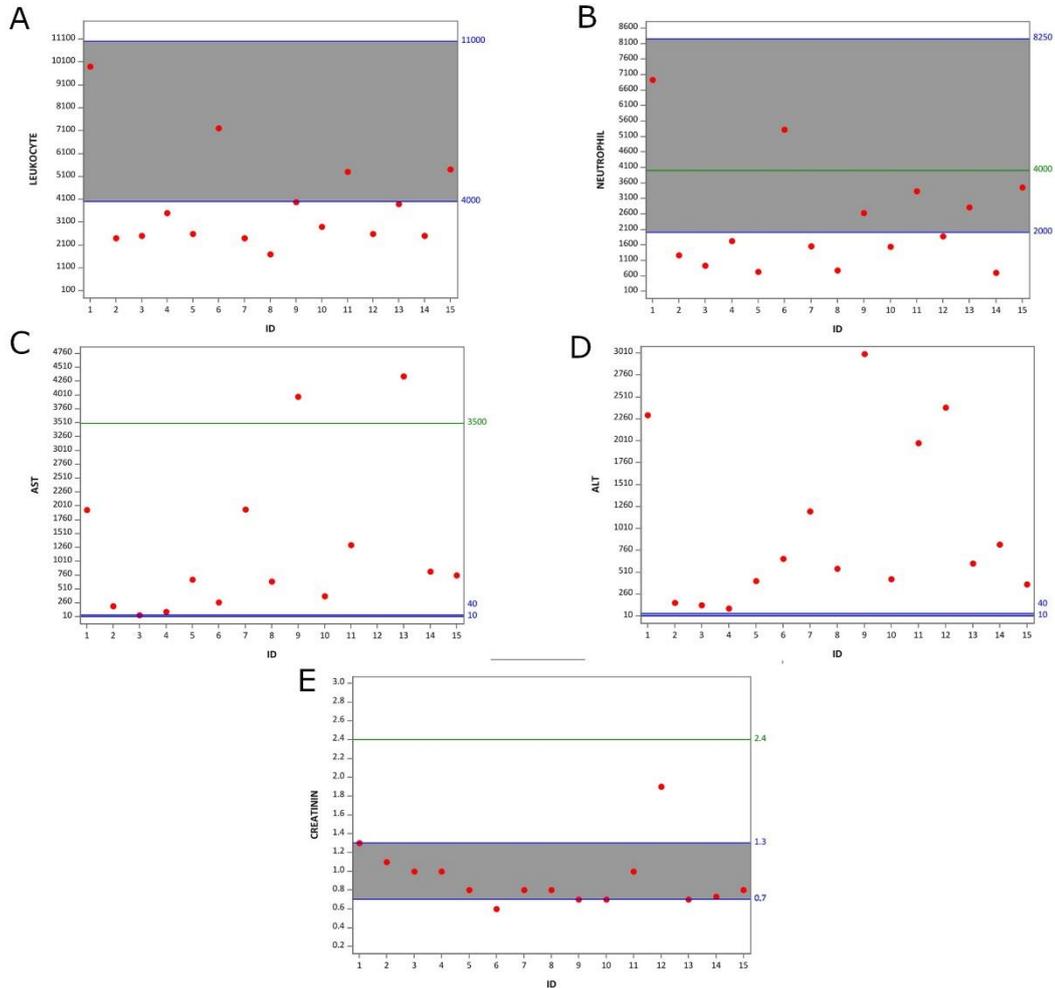
The precise mechanisms governing the YF pathogenesis and disease outcome are still unknown. It has been proposed that older age, male sex, higher leukocyte and neutrophil counts, higher alanine aminotransferase, aspartate transaminase (AST), bilirubin, and creatinine, prolonged prothrombin time, and higher yellow fever virus RNA plasma viral load were associated with severe YF disease (24). Although the majority of patients with urine detection of YFV RNA presented with altered values for important liver and kidney injuries biomarkers (Fig. 1, Table S1), in accordance with the YF Management book guidelines (25) they all were classified as mild YF disease, with the exception of one patient (ID 12), who was hospitalized in an intensive care unit and died 1 month after hospitalization (Fig. 1, Table S1). The 45 patients without YFV RNA detected in urine were also classified as having mild to severe disease, and they presented similar ranges of biomarkers as observed for patients with YFV RNA in urine (biomarkers presented in Table S2).

Two urine samples, from the convalescent phase of YF infection (67 and 69 DPS), were collected from patients who received YF vaccine 10 days before symptom onset (ID 14 and ID 15; Table 1) and were genotyped as previously described (20), to investigate possible persistence of the YFV vaccine strain. We were also able to genotype YFV from other three urine samples collected during acute YF infection (GenBank accession number: [OM692343](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucl/OM692343) to [OM692349](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucl/OM692349)) (Table 1 and Fig. 2). Other urine samples were included in this genotype experiment, but sequencing was not successful, likely because of the lower YFV viral load in the used sample. The phylogenetic analyses indicated that all six YFV genotyped samples belonged to the wild-type South American I genotype (Fig. 2), which was associated with the recent outbreaks in Brazil (26–28).

## DISCUSSION

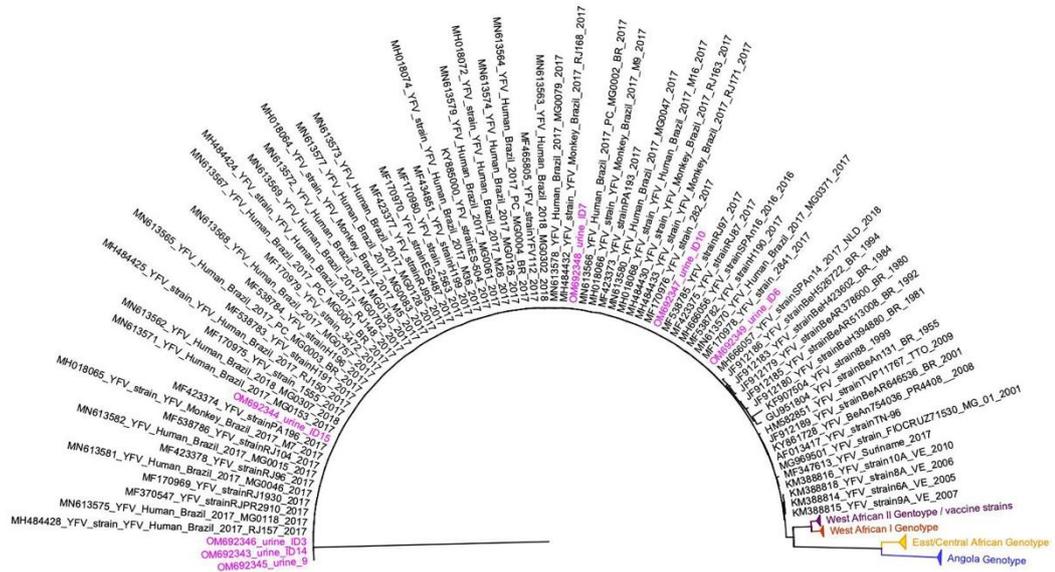
The detection of YFV RNA and South American I genotype in convalescent phase YF samples up to 69 DPS indicates the presence and persistence of YFV RNA in the urine for an extended period of time than previously described. To our knowledge, this is the first report of wild-type YFV RNA presence in the urine of YF patients up to 69 days post-symptom onset. Previous studies had demonstrated the presence of wild-type YFV RNA in the urine up to 32 DPS (16–18).

As recommended by WHO, YF diagnosis must be confirmed by a positive RT-qPCR or with a 4-fold increase in IgG anti-YFV antibody titers between acute and convalescent paired serum samples (12). When retrospective YF outbreaks are under investigation, especially in



**FIG 1** Plot of laboratory exams values of patients from whom YFV RNA were detected in urine samples. Shown here are leukocyte count ( $\text{mm}^3$ ) (A), neutrophil count ( $\text{mm}^3$ ) (B), ALT (U/L) (C), AST (U/L) (D), and creatinine (mg/dL) (E). Normal range values are shown between blue lines and highlighted in gray. The cutoff described by Kallas et al. (2019) for developing severe YF disease is represented by the green line. Data from P2, P3, P4, P5, P7, P8, and P13 were collected 3 DPS. Data from P9 and P14 were collected 5 DPS. Data from P10 and P11 were collected 6 DPS. Data from P1, P6, and P15 were collected 7 DPS. Data from P12 were collected 11 DPS. The y axis indicates the values of different biomarkers. Red dots indicate the measure of each patient according to the patient ID plotted in x axis.

lower-resourced communities or remote areas, it is often difficult to collect paired serum samples for serologic diagnosis or a serum sample during the short viremic period of YFV. Although international guidelines advocate using YFV molecular tests in sera until 10 days postsymptom onset, the detection of YF RNA in urine during the acute phase of YF indicates the suitability of urine for molecular diagnosis, even when sera are RT-qPCR negative, as demonstrated in this study. Additionally, the limited diagnostic window of YFV RNA detection in sera may be extended with the evaluation of urine samples as demonstrated here and in previous studies (16–18). A few studies had already demonstrated the detection of YFV-17D RNA in urine (29, 30), and with the data presented here, we could suggest that urine can be used as an alternative sample in cases when YFV genotyping is necessary.



**FIG 2** Maximum likelihood tree of yellow fever virus. The maximum clade credibility tree inferred using yellow fever virus (YFV) sequences (213 nt) is shown (corresponding to position 9020 to 9232 compared to the nucleotide sequence of YFV-17D, GenBank accession number: X03700). The bootstrap values (1,000 replicates) are represented by circles drawn in scale in the nodes. Sequences generated in this study are highlighted in pink. The clade containing samples from genotype South American I is represented in black. For clarity purposes, some branches representing different genotypes were collapsed and colored as follows: West African II/ vaccine strains (purple), West African I (red), East/Central African (yellow), and Angola (blue). The tree was reconstructed using the nucleotide substitution model kimura 2-parameters with 4-categories gamma distribution. The analysis was performed using MEGAX and the tree visualized and edited in FigTree v1.4.4.

Urine collection is a noninvasive, simple, and inexpensive process that could effectively contribute to the investigation of suspected YF cases. The use of urine specimens can extend the window for YFV RNA detection and genotyping with differentiation of wild-type YFV from vaccine virus strains (20). This strategy could be especially useful (i) for retrospective investigation of outbreaks when viremia can no longer be detectable in patients (ii) for investigation of suspected cases of adverse events related to YFV vaccination, (iii) when there is difficulty with phlebotomy as some cases with younger children, or (iv) in conditions lacking proper facilities to process and store biological samples after harvesting. Urine does not need processing after collection (as opposed to the processing of whole blood for obtaining sera), and the inclusion of an RNA stabilizer after collection, if necessary due to collection conditions, can contribute to preservation of urine samples and further enhancement of RNA detection. We understand that one of the limitations of this study is that it was done using samples already collected during the YF outbreak in Brazil. We could not plan an ideal scenario for urine samples collection. Nonetheless, the detection of YFV RNA in urine in 25% of 60 patients tested here supports future prospective cohort studies, providing preliminary data regarding the detection of YFV RNA in urine samples even after 69 days after symptom onset.

Although larger studies are needed, our results from naturally infected YF patients suggest that investigation of YFV RNA in urine can be an effective and supportive additional diagnostic approach, particularly considering the larger detection window compared to serum samples and genotyping suitability. The results of molecular tests using urine as sample for laboratory diagnosis should be carefully interpreted. While a positive result can contribute to YFV diagnosis, a negative (nondetectable) result does not exclude YFV infection.

**SUPPLEMENTAL MATERIAL**

Supplemental material is available online only.  
**SUPPLEMENTAL FILE 1**, PDF file, 0.1 MB.

### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Eduardo de Menezes Hospital's staff for collecting the samples. We thank Secretary State of Health of Minas Gerais and Fundação Ezequiel Dias, Instituto Octávio Magalhães, Laboratório Central de Saúde Pública de Minas Gerais-Lacen/MG, for support during the yellow fever outbreak. Special thanks to the Yellow Fever Study Team for discussions and to Caroline Ichura for helping with figures and discussions. Olindo Assis Martins-Filho and Andréa Teixeira-Carvalho are members of PRÓ-ESTADO program (FAPEAM, Program number 005/2019).

This work was supported by different agencies. B.P.D. was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), under grants APQ-01574-17 and APQ03360-17. P.A.A., B.P.D., A.T.-C., and O.A.M.-F. were supported by Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais (SES-MG)/Secretaria de Estado de Planejamento de Minas Gerais (SEPLAG-MG)/Instituto René Rachou/Fundação Oswaldo Cruz (IRR/FIOCRUZ) under grants yellow fever. I.M.R., P.A.A., B.P.D., A.T.-C., O.A.M.-F., and A.D.L. were supported by the NIH, under grant R01 AI149614. C.E.C.-S. was supported by Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) under grant VPPIS-004-FIO-18-32. P.A.A. was supported by FAPEMIG under grant APQ-01989-18. I.M.R. was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)/Brazil (grants 88882.348380/2010-1 and 0001). G.F.G.O. and T.A.C. were supported by CNPq (<http://www.cnpq.br/>), FAPEMIG (<https://fapemig.br/pt/>), and CAPES (<https://www.capes.gov.br/>) undergraduate scholarship grants. B.P.D., A.T.-C., and O.A.M.-F. are CNPq Research Fellows. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

We have no conflicts of interest to declare.

### REFERENCES

- Maguire HCF, Heymann DL. 2016. Yellow fever in Africa. *Bmj* 3764. <https://doi.org/10.1136/bmj.i3764>.
- Song R, Guan S, Lee SS, Chen Z, Chen C, Han L, Xu Y, Li A, Zeng H, Ye H, Zhang F. 2018. Late or lack of vaccination linked to importation of yellow fever from Angola to China. *Emerg Infect Dis* 24:1383–1386. <https://doi.org/10.3201/eid2407.171868>.
- PAHO. 2019. Yellow fever epidemiological report. The Pan American Health Association.
- Silva NIO, Sacchetto L, de Rezende IM, Trindade GDS, Labeaud AD, De Thois B, Drumond BP. 2020. Recent sylvatic yellow fever virus transmission in Brazil: the news from an old disease. *Virology* 17:9–12. <https://doi.org/10.1186/s12985-019-1277-7>.
- Sacchetto L, Drumond BP, Han BA, Nogueira ML, Vasilakis N. 2020. Re-emergence of yellow fever in the neotropics—*quo vadis?* *Emerg Top Life Sci* 4: 399–410. <https://doi.org/10.1042/ETLS20200187>.
- Jentes ES, Pomeroy G, Gershman MD, Hill DR, Lemarchand J, Lewis RF, Staples JE, Tomori O, Wilder-Smith A, Monath TP. 2011. 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* 11:622–632. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(11\)70147-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(11)70147-5).
- Monath TP. 2001. Yellow fever: an update. *Lancet Infect Dis* 1:11–20. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(01\)00016-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(01)00016-0).
- Rezende IM, Pereira LS, Barbosa Fradico JR, Pascoal Xavier MA, Alves PA, Campi-Azevedo AC, Speziali E, Moreira dos Santos LZ, Albuquerque NS, Penido I, Santos TA, Dinis Ano Bom AP, Vieira da Silva AM, Fernandes CB, Calzavara CE, Kroon EG, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Drumond BP. 2020. Late-relapsing hepatitis after yellow fever. *Viruses* 12:222–230. <https://doi.org/10.3390/v12020222>.
- Casadio L, Nastri AC, Malta FM, Araujo J, Silva JB, Salomao J, Yamashiro J, Salles AP, Gouvea MG, Kanamura C, Lima FR, Tanigawa RY, Melo ES, Lima R, Terrabuo D, Caçado E, Ho Y-L, Sabino EC, Pinho JR, Carrilho FJ, Alves VA, Levin AS. 2020. Late-onset relapsing hepatitis associated with yellow fever. *N Engl J Med* 382:2059–2061. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1913036>.
- Denis B, Chirio D, Ponscarne D, Bricler S, Colin de Verdière N, Simon F, Molina J-M. 2019. Hepatitis rebound after infection with yellow fever virus. *Emerg Infect Dis* 25:1248–1249. <https://doi.org/10.3201/eid2506.190069>.
- Francis TI, Moore DL, Edington GM, Smith JA. 1972. A clinicopathological study of human yellow fever. *Bull World Health Organ* 46:659–667.
- WHO. 2020. Yellow fever. World Health Organization.
- PAHO/WHO. 2018. Laboratory Diagnosis of Yellow Fever Virus Infection. The Pan American Health Association and World Health Organization.
- Jorge FA, Thomazella MV, Castro Moreira D, Lopes LDG, Teixeira JJV, Bertolini DA. 2020. Evolutions and upcoming on Zika virus diagnosis through an outbreak: a systematic review. *Rev Med Virol* 30:e2105. <https://doi.org/10.1002/rmv.2105>.
- Mizuno Y, Kotaki A, Harada F, Tajima S, Kurane I, Takasaki T. 2007. Confirmation of dengue virus infection by detection of dengue virus type 1 genome in urine and saliva but not in plasma. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 101:738–739. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2007.02.007>.
- Barbosa CM, Di Paola N, Cunha MP, Rodrigues-Jesus MJ, Araujo DB, Silveira VB, Leal FB, Mesquita FS, Botosso VF, Zanotto PMA, Durigon EL, Silva MV, Oliveira DBL. 2018. Yellow fever virus DNA in urine and semen of convalescent patient, Brazil. *Emerg Infect Dis* 24:176–178. <https://doi.org/10.3201/eid2401.171310>.
- Reusken CBEM, Knoester M, Geurtsvankessel C, Koopmans M, Knapen DG, Bierman WFW, Pas S. 2017. Urine as sample type for molecular diagnosis of natural yellow fever virus infections. *J Clin Microbiol* 55:3294–3296. <https://doi.org/10.1128/JCM.01113-17>.
- Chen C, Jiang D, Ni M, Li J, Chen Z, Liu J, Ye H, Wong G, Li W, Zhang Y, Wang B, Bi Y, Chen D, Zhang P, Zhao X, Kong Y, Shi W, Du P, Xiao G, Ma J, Gao GF, Cui J, Zhang F, Liu W, Bo X, Li A, Zeng H, Liu D. 2018. Phylogenomic analysis unravels evolution of yellow fever virus within hosts. *PLoS Negl Trop Dis* 12:e006738. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006738>.
- Domingo C, Patel P, Yillah J, Weidmann M, Mendez JA, Nakoune ER, Niedrig M. 2012. Advanced yellow fever virus genome detection in point-of-care facilities and reference laboratories. *J Clin Microbiol* 50:4054–4060. <https://doi.org/10.1128/JCM.01799-12>.
- Rezende IM, Alves PA, Arruda MS, Gonçalves AP, Oliveira GFG, Pereira LS, Dutra MRT, Campi-Azevedo AC, Valim V, Tourinho R, de Oliveira JG, Calzavara CE, Said RFDC, Kroon EG, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Drumond BP. 2019. Yellow fever virus genotyping tool and investigation of suspected adverse events following yellow fever vaccination. *Vaccines* 7:206–210. <https://doi.org/10.3390/vaccines7040206>.
- Patel P, Landt O, Kaiser M, Faye O, Koppe T, Lass U, Sall AA, Niedrig M. 2013. Development of one-step quantitative reverse transcription PCR for the rapid detection of flaviviruses. *Virology* 44:58. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-10-58>.

22. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:5463–5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>.
23. Kumar S, Stecher G, Tamura K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* 33:1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>.
24. Kallas EG, D'Elia Zanella LGFAB, Moreira CHV, Buccheri R, Diniz GBF, Castiñeiras ACP, Costa PR, Dias JZC, Marmorato MP, Song ATW, Maestri A, Borges IC, Joelsons D, Cerqueira NB, Santiago e Souza NC, Morales Claro I, Sabino EC, Levi JE, Avelino-Silva VI, Ho Y-L. 2019. Predictors of mortality in patients with yellow fever: an observational cohort study. *Lancet Infect Dis* 19:750–758. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(19\)30125-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(19)30125-2).
25. MS-BR. 2020. Manual de manejo clínico da febre amarela, 1st ed Brasília.
26. Giovanetti M, de Mendonça MCL, Fonseca V, Mares-Guia MA, Fabri A, Xavier J, de Jesus JG, Gräf T, dos Santos Rodrigues CD, dos Santos CC, Sampaio SA, Chalhoub FLL, de Bruycker Nogueira F, Theze J, Romano APM, Ramos DG, de Abreu AL, Oliveira WK, do Carmo Said RF, de Albuquerque CFC, de Oliveira T, Fernandes CA, Aguiar SF, Chieppe A, Sequeira PC, Faria NR, Cunha RV, Alcantara LCJ, de Filippis AMB. 2019. Yellow fever virus reemergence and spread in south-east Brazil, 2016–2019. *J Virol* 94:e01623-19. <https://doi.org/10.1128/JVI.01623-19>.
27. Faria NR, Kraemer MUG, Hill SC, Goes de Jesus J, Aguiar RS, Iani FCM, Xavier J, Quick J, Du Plessis L, Dellicour S, Thézé J, Carvalho RDO, Baele G, Wu C-H, Silveira PP, Arruda MB, Pereira MA, Pereira GC, Lourenço J, Obolski U, Abade L, Vasylyeva TI, Giovanetti M, Yi D, Weiss DJ, Wint GRW, Shearer FM, Funk S, Nikolay B, Fonseca V, Adelino TER, Oliveira MAA, Silva MVF, Sacchetto L, Figueiredo PO, Rezende IM, Mello EM, Said RFC, Santos DA, Ferraz ML, Brito MG, Santana LF, Menezes MT, Brindeiro RM, Tanuri A, dos Santos FCP, Cunha MS, Nogueira JS, Rocco IM, da Costa AC, Kominakis SV, Azevedo V, Chieppe AO, Araujo ESM, Mendonça MCL, dos Santos CC, dos Santos CD, et al. 2018. Genomic and epidemiological monitoring of yellow fever virus transmission potential. *Science* 361:894–899. <https://doi.org/10.1126/science.aat7115>.
28. Sacchetto L, Silva NIO, Rezende IM, Arruda MS, Costa TA, de Mello É, Oliveira GFG, Alves PA, de Mendonça VE, Stumpp RGAV, Prado AIA, Paglia AP, Perini FA, Lacerda NM, Kroon EG, de Thoisy B, Trindade GS, Drumond BP. 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:e0008658. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008658>.
29. Martínez MJ, Vilella A, Pumarola T, Roldan M, Sequera VG, Vera I, Hayes EB. 2011. Persistence of yellow fever vaccine RNA in urine. *Vaccine* 29: 3374–3376. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.02.075>.
30. Domingo C, Yactayo S, Agbenu E, Demanou M, Schulz AR, Daskalow K, Niedrig M. 2011. Detection of yellow fever 17D genome in urine. *J Clin Microbiol* 49:760–762. <https://doi.org/10.1128/JCM.01775-10>.



## Neuro-COVID-19 With or Without the Multisystem Inflammatory Syndrome (MIS-C): A Single-Center Study

### COVID-19: Neurologic Manifestations in Children

Aline Almeida Bentes<sup>1,2</sup> · Walter Rebuite dos Santos Junior<sup>3</sup> · Natalia Lima Pessoa<sup>3,4</sup> · Thais Alkifeles Costa<sup>3</sup> · Gabriela Fernanda Garcia Oliveira<sup>3</sup> · Lilian Martins Oliveira Diniz<sup>1,2</sup> · Bruna Ribeiro Torres<sup>2</sup> · Daniela Caldas Teixeira<sup>2</sup> · Renata Barandas Mendes<sup>2</sup> · Ana Beatriz Alvim Avelar<sup>2</sup> · Marco Antônio Campos<sup>4</sup> · Erna Geessien Kroon<sup>3</sup> · Betania Paiva Drumond<sup>3</sup>

Received: 17 January 2023 / Accepted: 22 February 2023  
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2023

#### Abstract

This study evaluates the range of neurological manifestation in children with COVID-19 (neuro-COVID-19) both with and without the multisystem inflammatory syndrome (MIS-C) and the persistence of symptoms after hospital discharge. The study was conducted as a prospective study of children and adolescents under 18 years of age who were admitted to a children's hospital for infectious diseases from January 2021 to January 2022. The children had no previous neurological or psychiatric disorders. Out of the 3021 patients evaluated, 232 were confirmed to have COVID-19 and 21 of these patients (9%) showed neurological manifestations associated with the virus. Of these 21 patients, 14 developed MIS-C, and 7 had neurological manifestations unrelated to MIS-C. There was no statistical difference regarding the neurological manifestations during hospitalization and outcomes between patients with neuro-COVID-19 who had or did not have MIS-C, except for seizures that occurred more frequently in patients with neuro-COVID-19 without MIS-C ( $p$ -value = 0.0263). One patient died, and 5 patients still had neurological or psychiatric manifestations at discharge, which persisted for up to 7 months. The study highlights that SARS-CoV-2 infection can affect the central and peripheral nervous system, particularly in children and adolescents with MIS-C, and that it is crucial to be vigilant for long-term adverse outcomes, as the neurological and psychiatric effects of COVID-19 in children are emerging during an important stage of brain development.

**Keywords** COVID-19 · Children · Neuro-COVID-19 · COVID-19-associated multisystem inflammatory syndrome · SARS-CoV-2 · MIS-C

#### Introduction

Brazil has been severely affected by the COVID-19 pandemic, caused by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) (Oliveira et al. 2021). Studies in different countries reported lower severity and mortality from SARS-CoV-2 infection in children and adolescents than in

adults and elders (Ray et al. 2021; Feldstein et al. 2020; WHO 2020). Nevertheless, a nationwide database reported a case fatality rate of 7.6% among 11,613 hospitalized children and adolescents with confirmed COVID-19. These subjects' death variables were age, indigenous ethnicity, poor geopolitical region, and pre-existing medical conditions (Oliveira et al. 2021).

There is also growing evidence that SARS-CoV-2 infection is associated with direct and indirect neurological symptoms and central nervous system (CNS) complications, called neuro-COVID-19 (Stafstrom 2022; Shoraka et al. 2021). Clinical manifestations of neuro-COVID-19 include headaches, seizures, meningitis, encephalitis, encephalopathy, and peripheral nervous system (PNS)

Aline Almeida Bentes, Walter Rebuite dos Santos Junior, Erna Geessien Kroon, and Betania Paiva Drumond contributed equally to this work.

✉ Aline Almeida Bentes  
alinebentes2000@gmail.com

Extended author information available on the last page of the article

Published online: 28 March 2023

manifestations, such as Guillain-Barré syndrome, myelitis, and neuralgia (Stafstrom 2022; Shoraka et al. 2021; Abdel-Mannan et al. 2020; Moriguchi et al. 2020; Huang et al. 2020; Abu-Rumeileh et al. 2021; Toscano et al. 2020). Although neuro-COVID-19 has been associated with long-term sequelae in adults, little information is known regarding long-term adverse developmental in pediatric patients (Stafstrom 2022; Panda et al. 2021; Lindan et al. 2021; LaRovere et al. 2021). In addition, reports of neurological complications in children and adolescents have also been associated with multisystem inflammatory syndrome in children (MIS-C) (LaRovere et al. 2021).

Children and adolescents infected with SARS-CoV-2 are at increased risk for COVID-19-associated multisystem inflammatory syndrome in children (MIS-C), also known as a pediatric inflammatory multisystem syndrome, temporally associated with SARS-CoV-2 (PIMS-TS) (Ray et al. 2021). MIS-C occurs due to a dysregulation of the innate and adaptive immune responses in the face of an intense inflammatory response (Feldstein et al. 2020). MIS-C is characterized by at least 3 days of fever; altered inflammatory tests; damage of at least two organs and tissues; evidence of COVID-19; and no other apparent causes of inflammation, according to the criteria of the World Health Organization (2020).

This study aimed to evaluate the spectrum and prevalence of neurological manifestations associated or not with MIS-C in hospitalized children infected by SARS-CoV-2 and the persistence of symptoms after hospital discharge.

## Methods

This study was approved by the Research Ethics Committee of Hospital Infantil João Paulo II (HIJPII) (Belo Horizonte – MG, Brazil) under number 132/2009 and by the Universidade Federal de Minas Gerais: CAE number: 09273012.9.0000.5149. For all study subjects, legal guardians signed the consent form for research.

We carried out a prospective study in Hospital Infantil João Paulo II, a reference children's hospital, to care for infectious diseases in Minas Gerais state, Southeast Brazil, throughout 2021. Children and adolescents aged 18 or under were included in the study if they had (i) laboratory-confirmed SARS-CoV-2 infection and new-onset neurological, or (ii) complication of previous neurological disease, or (iii) psychiatric disorders during or after COVID-19. Patients were excluded if diagnosed with another viral or bacterial co-infection or if the legal guardians did not sign the consent form for research. None of the children and adolescents in this study had received the COVID-19 vaccine.

All children and adolescents admitted to the hospital with flu-like symptoms, or severe acute respiratory syndrome, were investigated for SARS-CoV-2 infection by real-time polymerase

chain reaction (CDC Protocol respiratory virus or NCOV 500 T SINTESE BIO 10006713 IDT—Integrate) or nasopharyngeal swab antigen test (qualitative immunoassay, ACRO BIOTECH, INC). Patients with signs of MIS-C, or neurological manifestations, but without flu-like symptoms, were investigated by serological examination using the chemiluminescence immunoassay method with sensibility of 84.7 (CI 95% 79.2–96) and specificity of 97% (CI 95% 95–99.5) (kit SARS-CoV-2 IgG and IgM Abbott). Only patients with neurological symptoms and laboratory-confirmed SARS-CoV-2 infection were included in the analysis. We used the World Health Organization criteria adopted by the Brazilian Ministry of Health to define clinical cases of MIS-C associated with COVID-19 (WHO 2020).

All neurological symptoms or manifestations were evaluated by pediatric neurologists and classified as headache, meningitis, encephalitis/encephalopathy, simple febrile seizures, complex seizures, cerebrovascular event, or peripheral neuropathies (Guillain-Barré syndrome, paresis, myelitis).

Patients, who presented neurological manifestations secondary to acute infection or post-infection by SARS-CoV-2 and did not meet the criteria for MIS-C, were gathered in the neuro-COVID-19 without MIS-C group. Patients with neurological symptoms associated with the multisystem inflammatory syndrome were defined as the neuro-COVID-19/MIS-C group.

Cerebrospinal fluid (CSF) was collected from patients suspected of having a central nervous system acute infection or Guillain-Barré syndrome by lumbar puncture. Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to investigate viral RNA or DNA of SARS-CoV-2, dengue virus (DENV), Zika virus (ZIKV), chikungunya virus (CHIKV), herpes 1, 2, and 3 virus, Epstein-Barr virus (EBV), and West Nile virus (WNV), according to research protocol. To rule out other infections, patients with meningitis were also investigated by RT-PCR, routine isolation, and culture for *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, and *Streptococcus pneumoniae*.

Children who had severe acute respiratory syndrome were evaluated by RT-PCR for other respiratory viruses such as respiratory syncytial virus, adenovirus, influenza A and B, parainfluenza, metapneumovirus, and bocavirus, according to hospital laboratory routine. Children and adolescents were also evaluated for D-dimer, troponin, C-reactive protein, and blood count according to medical assistance evaluation (Table 1).

All patients followed up with neurologists and child psychiatrists until clinical improvement. Some patients continue in clinical follow-up until the publication of this study.

The statistical analysis was made using notification data and test results for SARS-CoV-2 to estimate the prevalence of cases admitted to the hospital between January 2021 and January 2022. Descriptive analyses were performed using Student's *t*-tests or Mann-Whitney *U* tests to compare quantitative variables and the chi-square test for categorical variables. The tests investigated any significant differences between groups in the COVID-19-related

**Table 1** Clinical features, investigations, treatment, and outcomes of patients with COVID-19 and neurological manifestations

	Neuro-COVID-19 without MIS-C (n = 7)	Neuro-COVID-19/ MIS-C (n = 14)	p-value
	Number of patients (%)	Number of patients (%)	
Age	4.4 (1 mo–10.5 yr)	5.9 (4 mo–12.2 yr)	0.3887
Sex			
Male	6 (85.7%)	10 (71.4%)	
Female	1 (14.3%)	4 (28.6%)	0.6244
Clinical features			
Rash	0 (0%)	8 (57.1%)	<b>0.0179<sup>a</sup></b>
Myocarditis or coronary dilatation	0 (0%)	6 (42.8%)	0.0609
Shock or hypotension	1 (14.3%)	8 (57.1%)	0.1588
Respiratory symptoms	5 (71.4%)	6 (42.8%)	0.3615
Headache	3 (71.4%)	9 (64.3%)	0.3972
Meningitis	3 (42.8%)	2 (14.3%)	0.2800
Encephalitis	3 (42.8%)	5 (35.7%)	1
Seizures	3 (42.8%)	0 (0%)	<b>0.0263<sup>a</sup></b>
Ataxia	2 (28.7%)	1 (7.1%)	0.2474
Peripheral nervous system involvement	3 (42.8%)	2 (14.3%)	0.2800
Behavioral changes	1 (14.3%)	0 (0%)	0.3333
Investigations			
SARS-CoV-2 PCR positive	6 (85.7%)	6 (42.8%)	0.1588
SARS-CoV-2 IgG positive	2 (28.6%)	9 (64.3%)	0.1827
Elevated acute-phase reactants*	0 (0%)	13 (92.8%)	<b>0.0003<sup>a</sup></b>
C-reactive protein, mg/dl	22.7 (0.9–261)	233 (72–595)	<b>0.0118<sup>b</sup></b>
Blood white cell count (cells/mm <sup>3</sup> )	8280 (4470–10,280)	15,895 (5080–47,000)	<b>0.0149<sup>b</sup></b>
CSF white cell count (cells/mm <sup>3</sup> )	51.8 (1–250)	38.2 (1–175)	0.8033
Treatment			
Intensive care unit admission	4 (57.1%)	7 (50%)	1
Inotropic support	1 (14.3%)	4 (28.6%)	0.6244
Immunomodulation**	1 (14.3%)	11 (78.6%)	<b>0.0158<sup>a</sup></b>
Outcome			
Disability***	2 (28.6%)	2 (14.3%)	0.5743
Death	1 (14.3%)	0 (0%)	0.3333

\*Combined acute-phase reactants were defined as lactate dehydrogenase, ferritin, and D-dimers

\*\*Immunoglobulin and/or corticosteroid

\*\*\*Disability: defined as an altered neurological examination performed by a neurologist at hospital discharge

<sup>a</sup>Student's t-tests

<sup>b</sup>Mann–Whitney U tests

symptoms, laboratory exams, and neurological symptoms. Statistical analyses were done with R software, and *p*-values less than 0.05 were considered significant.

## Results

Between January 2021 and January 2022, 3021 children and adolescents with clinical suspicion of COVID-19 were admitted to the hospital and eligible to participate in the study.

Samples from the 3021 patients were collected and screened for SARS-CoV-2 infection. A total of 232 patients had laboratory confirmation of SARS-CoV-2 infection. COVID-19 diagnosis was performed by RT-PCR from nasopharyngeal swabs in 114/232 patients (49.1%), by antigen test in 97/232 (41.8%), and by serological test in 21/232 (9.1%) patients.

Regarding the 232 patients with confirmed SARS-CoV-2 infection, the mean age of the patients was 4 years

and 6 months (ranging from 1 month to 18 years), but 163 (70.2%) were younger than 6 years. A total of 128 patients (55%) were male, and 151 (65.1%) had no known comorbidity (Centers for Disease Control and Prevention 2022). The clinical presentations of COVID-19 observed were severe acute respiratory syndrome in 171 (73.7%), a flu-like syndrome in 33 (14.3%), and COVID-19-associated MIS-C in 28 patients (12%). Neurological manifestations were identified in 21 patients (9%), of which 14 presented neuro-COVID-19/MIS-C and 7 presented neuro-COVID-19 without MIS-C (Table 1). The pediatric neurologists diagnosed and evaluated all children during the hospital stay. There was 1 death, and at hospital discharge, 4 (19%) still had some neurological manifestations such as paresis, ataxia, or diplopia (Table 1). Only one 7-year-old child presented psychiatric manifestations with auditory hallucinations and behavioral changes, such as aggression, during acute SARS-CoV-2 infection. In this cohort, the patients who developed neurological and psychiatric manifestations associated with SARS-CoV-2 infection had no previous neurological or psychiatric disorders.

Cerebrospinal fluid was harvested from 12 patients. Ten patients were male between 1 month and 10 years (mean: 3.9 years; median: 2.6 years). SARS-CoV-2 infection was diagnosed in eight patients detecting the presence of SARS-CoV-2 antigen or RNA indicating acute infection. Four patients had laboratory tests showing the previous infection by detecting SARS-CoV-2 IgG (Table 2).

A total of 14 patients diagnosed with MIS-C were classified as neuro-COVID-19/MIS-C. The neurological symptoms or manifestations presented by 9 patients were headaches, 5 had encephalitis/encephalopathy, 2 had meningitis, 2 had peripheral neuropathy, and 1 patient presented with ataxia, diplopia, and muscle weakness (Table 1). Four of the 6 CSF samples collected from these patients showed alterations in cellularity, ranging from 8 to 175 cells/mm<sup>3</sup>, with a predominance of lymphomononuclear cells (80–100%). Two patients in this group also showed a significant increase in CSF protein (210–270 mg/dL) (Table 2).

Regarding the 7 patients with neuro-COVID-19 without MIS-C symptoms, 3 patients presented headache, 3 encephalitis/encephalopathy, 3 meningitis, 3 seizures, 2 ataxia, 1 Guillain-Barré syndrome, 1 meningitis, seizures, and cerebrovascular event, and 1 patient presented a psychiatric disorder. Six patients had neurological symptoms during the acute phase of SARS-CoV-2 infection. Two of the 6 CSF collected from these patients showed cellularity alterations (55–250 cells/mm<sup>3</sup>), and 3 had increased protein levels (117–580 mg/dL). Viral investigations in CSF performed by RT-PCR of PCR for SARS-CoV-2, DENV, ZIKV, CHIKV, herpes 1, 2, and 3 viruses, EBV, and WNV were negative (Table 2).

Four patients (19%) at hospital discharge still had some neurological manifestations such as muscle weakness, ataxia, and diplopia. Only one child presented with muscle weakness and diplopia for 7 months; the other 3 patients improved between 1 and 2 months. The child who presented changes in behavior continues to use risperidone and is being followed up with a psychiatrist.

When we compared patients with neuro-COVID-19 without MIS-C ( $n=7$ ) and neuro-COVID-19 with MIS-C ( $n=14$ ), we found no statistical difference between the neurological manifestations presented during hospitalization and outcomes at hospital discharge between the 2 groups, except for seizures that occurred more frequently in the group without MIS-C ( $p=0.0263$ ). However, as expected in the neuro-COVID-19 with MIS-C group, there was a significant statistical difference regarding inflammatory response markers such as D-dimer, ferritin, and lactate dehydrogenase ( $p<0.0003$ ), C-reactive protein ( $p=0.0118$ ), and treatment with immunoglobulin and corticosteroid ( $p=0.0158$ ).

## Discussion

This study evaluated the neurological manifestations of SARS-CoV-2 infection in pediatric patients with neuro-COVID-19 without or with MIS-C. We observed 9% of neurological manifestations among all pediatric patients confirmed for COVID-19. The main neurological manifestations observed were headache, meningitis, and encephalitis/encephalopathy.

Previous studies in the UK and the USA observed 3.8% and 22% of the prevalence of neurological manifestations in pediatric patients with COVID-19 (Feldstein et al. 2020; LaRovere et al. 2021). A systematic review with meta-analysis that evaluated 3707 children and adolescents with SARS-CoV-2 infection in 25 studies reported 15.6% of nonspecific neurological manifestations such as headache, myalgia, and fatigue and 1% of neurological complications such as encephalopathy, seizures, and meningeal signs (Panda et al. 2021). However, a study conducted in Poland, and limited to children with MIS-C using data from national registers found a higher prevalence of neurological symptoms, including lethargy (59.4%), headache (46.1%), irritability (41.7%), photophobia (11%), and meningeal signs (10.4%) (Ludwikowska et al. 2021).

The differences between the prevalence of neurological manifestations of COVID-19 detected in children and adolescents may be due to the different neurological manifestations considered in the studies and whether there is an association with MIS-C. There may be significant differences in neurovirulence SARS-CoV-2 variants circulating during the periods.

Six patients of each group neuro-COVID-19 without MIS-C or neuro-COVID-19/MIS-C had CSF collected

**Table 2** Laboratory results, SARS-CoV-2 tests, and neurological and MISC symptoms of patients from whom cerebrospinal fluid was collected

Tests (units demographic / patient)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Reference range
Age (y/m)	3y,2m	1y,11m	1m	6y	7y	10y	2y	1y	4y	5m	8y,3m	3ys	-
Sex	M	M	M	M	M	M	M	F	M	M	M	F	-
Neurological symptoms	E	Guillain-Barré	E	E	Paresis behavior changes	Seizures, thrombosis	Cerebellitis	Meningitis	E	E	Meningitis	E	-
MISC symptoms	No	No	No	No	No	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	-
Treatment	-	IGH*, gabapentin	Cefepime	Aciclovir, phenytoin	Risperidone	Ceftriaxone, noudetmalin	IGH prednisolone, aspirin	IGH, prednisolo, ne, aspirin	IGH, predni solone, aspirin	IGH, aspi rin	IGH, predni solone, aspirin, cetria some xone	IGH predni solone, aspirin, cetria some xone	-
Days of hospitalization	2	10	12	6	9	4	12	16	6	4	14	13	-
SARS-CoV-2 IgG/IgM	-	-	-	IgG: 12.4 IgM: 0.36	-	-	-	-	IgG: 3074 IgM: 0.71	IgG: 1119 IgM: 0.12	IgG: 2036 IgM: 0.28	IgG: 3245 IgM: 0.76	IgG>50.0 IGM>1.00
SARS-CoV-2 Antigen	-	-	-	-	P	P	-	-	N	N	N	N	N
Real-time RT SARS-CoV-2	D	D	D	U	-	-	D	D	D	U	U	U	U
Real-time RT <i>Haemophilus</i>	U	-	U	U	-	U	-	U	-	-	U	U	U
<i>Neisseria</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pneumococ</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Other negative diagnostic tests	-	DENV, CHIKV, ZIKV, Polio, HTLV, EBV, CMV	Influenza test rapid	Adenovirus, metapneumo-virus, parainfluenza 1-3, influenza A and B, VRS, rinovirus	I	250	12 (100%)	175 (90%)	1 (90%)	32.87%	8 (80%)	1 (100%)	<5
LCR leukocytes (cells/mm <sup>3</sup> ) (%) LMN)	1 (98%)	3 (90%)	1 (80%)	55 (88%)	1	250	12 (100%)	175 (90%)	1 (90%)	32.87%	8 (80%)	1 (100%)	<5
LCR glucose (mg/dL)	51	55	63	40	50	53	47	25	48	46	60	57	>40
LCR protein (mg/dL)	<10	117	41	152	9	580	<10	210	14	43	277	<10	<40
Hemoglobin (g/dL)	13	12.4	7.1	11.9	11.7	10.2	10.1	8.3	11.2	9.3	11.0	11.4	11.5-13.5
Leukocytes (cells/mm <sup>3</sup> )	8700	10,280	8900	4470	6010	7860	22,236	23,590	8430	11,110	14,600	30,530	5000-14,500
Neutrophil/lymphocyte ratio	1.72	0.8	0.98	2.88	1.34	18.8	3.45	2.7	7.2	0.65	10.6	11.25	<5

Table 2 (continued)

Tests (units/ demographic / patient)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Reference range
Platelets (cells/ mm <sup>3</sup> × 10 <sup>3</sup> )	411	480	365	<b>103</b>	275	<b>131</b>	<b>86</b>	<b>702</b>	<b>78</b>	226	229	<b>89</b>	150–400
C-reactive protein (mg/L)	0.9	27.7	19.7	25.7	13.1	<b>261</b>	<b>371</b>	<b>216.5</b>	<b>149.2</b>	<b>192</b>	<b>346.3</b>	<b>595</b>	<12
D-dimer (mcg/ mL)	-	0.92	-	-	-	-	<b>5.91</b>	<b>3.77</b>	<b>51.09</b>	1.03	<b>4.22</b>	<b>5.24</b>	≤0.5
Troponin (ng/mL)	-	<11.5	-	-	-	-	<b>49.14</b>	<11.5	<b>53.4</b>	9.86	<b>627.2</b>	<b>1498</b>	<11

*JGH* immunoglobulin, *E* encephalitis/encephalopathy, *D* detectable, *U* undetectable, *M* male, *F* female, *P* positive, *N* negative, -, not done

Bold numbers or results represent alterations related to reference range

by lumbar puncture, but we did not detect SARS-CoV-2 genomic RNA by RT-PCR in any CSF; however, 58% showed changes in cellularity or CSF protein (Table 2). Failure to detect the SARS-CoV-2 in the CSF patient samples supports an immune mechanism rather than direct CNS viral invasion in patients with neuro-COVID-19 (Stafstrom 2022; Shoraka et al. 2021; Abdel-Mannan et al. 2020; Moriguchi et al. 2020; Huang et al. 2020; Abu-Rumeileh et al. 2021; Toscano et al. 2020; Panda et al. 2021; Lindan et al. 2021; LaRovere et al. 2021; Centers for Disease Control and Prevention 2022).

A review study of the neurological manifestations in children with SARS-CoV-2 infection also reported a low rate of viral detection in CSF, which may be due to either low viral invasion or poor sensitivity of the test (Valderas et al. 2022).

The intense inflammatory response and immune dysregulation triggered by SARS-CoV-2 infection are pathophysiological mechanisms that can cause the neurological manifestations seen in patients with COVID-19 (Stafstrom 2022; Shoraka et al. 2021; Valderas et al. 2022). Metabolic hypoxemia and acidosis triggered by severe acute respiratory syndrome can cause symptoms of mental confusion, delirium, encephalopathy, hypotonia, and ataxia (Fotuhi et al. 2020; Valderas et al. 2022). The immune dysregulation described in children with MIS-C leads to a cytokine storm, with a significant increase in the interleukins (IL-1, IL-6, IL-10) and tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ), increasing the permeability of the blood–brain barrier, attracting leukocytes, and causing inflammation in the CNS with symptoms of encephalitis and meningitis (Stafstrom 2022; Moriguchi et al. 2020; Boldrini et al. 2021; Valderas et al. 2022).

Within the neuro-COVID-19 without MIS-C group, a 1-year and 11-month-old child was diagnosed with Guillain-Barré syndrome associated with acute COVID-19, with the presentation of muscle weakness, hyporeflexia, and meningeal signs (Table 2). It has been shown that SARS-CoV-2 can dysregulate the immune response and trigger acute disseminated encephalomyelitis, autoimmune encephalitis, Guillain-Barré syndrome, and other neurological complications (Stafstrom 2022; Shoraka et al. 2021; Abdel-Mannan et al. 2020; Moriguchi et al. 2020; Huang et al. 2020; Abu-Rumeileh et al. 2021; Toscano et al. 2020; Panda et al. 2021; Lindan et al. 2021; LaRovere et al. 2021). Molecular mimicry between SARS-CoV-2 and neural antigens is another possible mechanism of post-infection neurological complications, commonly described with other microorganisms triggering Guillain-Barré syndrome (Shoraka et al. 2021). However, there is a lack of studies evaluating the presence of antigen-glycoside antibodies in patients with COVID-19 (Shoraka et al. 2021; Abu-Rumeileh et al. 2021; Toscano et al. 2020).

One fatal case described here was represented by one patient also classified within the neuro-COVID-19 without MIS-C group. This patient presented flu-like symptoms and

seizures, and brain tomography indicated a cerebrovascular event (Table 2). It has been demonstrated that endothelial cells of brain vessels also have receptors for SARS-CoV-2. Once infected, these cells release neutrophils and macrophages and increase thromboembolic factors causing microthrombosis, minor ischemia, and tissue damage related to COVID-19 pathogenesis (Fotuhi et al. 2020; Boldrini et al. 2021; Valderas et al. 2022).

Our study observed no significant differences between patients with neuro-COVID-19 with or without MIS-C, except for seizures that occurred more frequently in the group with neuro-COVID-19 without MIS-C ( $p$ -value = 0.0263). A similar study that evaluated 52 children found a statistical difference between patients who presented recognized para-infectious or post-infectious neurologic disease ( $p$ -value = 0.0003), hallucinations (0.032), headache, or meningism (0.041) (Feldstein et al. 2020).

Although the inflammatory response in children in the group of neuro-COVID-19/MIS-C was more significant than in children with neuro-COVID-19 without the MIS-C group, the neurological manifestations, complications, and death were not statistically different. This corroborates multicenter study results in the UK (Feldstein et al. 2020).

However, the small number of patients evaluated here is a limitation of the study. A larger number of patients should be further evaluated to understand neurological manifestations of COVID-19, assessing the immune and inflammatory response and the presence of autoantibodies with molecular mimicry between SARS-CoV-2 and neuronal antigens.

Adults who have recovered from a severe illness or after being hospitalized for COVID-19 have reported prolonged neurologic symptoms such as headache, cognitive dysfunction, anosmia/dysgeusia, and insomnia; these symptoms are referred to as “long COVID-19” (Taquet et al. 2021; Balcom et al. 2021). If these symptoms persist between 4 and 12 weeks after the initial symptoms, they are considered to be long COVID. In children, although data is still limited, the main neurological manifestations associated with long-term COVID include changes in cognition, such as decreased attention and recent memory, headaches, numbness, dysgeusia, anosmia, dizziness, blurred vision, and tinnitus (Valderas et al. 2022).

A case-control study that evaluated the neurodevelopment at babies exposed to COVID during pregnancy at 6 months of age found no difference compared to the neurodevelopment of unexposed babies. However, there was a significant delay observed between children born during the pandemic and historical cohorts (Shuffrey et al. 2022). Thus, it is essential to conduct prospective studies evaluating the neurodevelopment of infants and children after SARS-CoV-2 infection or exposure to the stressors of the pandemic.

From January 2021 and January 22nd, 9% of children and adolescents admitted to the hospital with confirmed

SARS-CoV-2 infection presented with neurological or psychiatric manifestations. One child died due to a cerebrovascular event, 4 were discharged with neurological symptoms, and 1 patient remained with psychiatric disorders. The results of the study emphasize the importance of investigating the viral cause in children with acute neurological manifestations and conducting clinical follow-up after hospital discharge of pediatric patients to assess persistent neurological and psychiatric complications.

**Acknowledgements** We especially thank the group from the Virology Laboratory (Labvirus) who contributed enormously to this work: Thais Alkifeles Costa, Gabriela Fernanda Garcia Oliveira, Renata Barandas Mendes, and Ana Beatriz Alvim Avelar. We thank the children and their families who participated in this research. We thank colleagues from the Hospital Infantil João Paulo II for helping collect CSF from children with neurological manifestations. We thank all the team of Laboratório de Vírus for their excellent technical support.

**Author Contribution** The authors Aline Almeida Bentes, Walter Rebuite dos Santos Junior, Natalia Lima Pessoa, Lilian Martins Oliveira Diniz, Bruna Ribeiro Torres, and Daniela Caldas Teixeira contributed to the research design, and the acquisition, analysis, and interpretation of data. Thais Alkifeles Costa, Gabriela Fernanda Garcia Oliveira, Renata Barandas Mendes, and Ana Beatriz Alvim Avelar contributed to data collection and laboratory analysis. Aline Almeida Bentes, Marco Antônio Campos, Erna Geessien Kroon, and Betania Paiva Drumond drafted the paper and revised it critically. All the authors have approved the manuscript and agree with its submission and to be responsible for its contents and their accordance that I, as the corresponding author, can act on their behalf regarding any subsequent processing of the paper. The authors warrant that the manuscript has not been previously published nor is not being considered for publication elsewhere.

**Funding** MAC, EGK, and BPD are fellows from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. This work was supported by Beatriz Cerqueira-MG individual state deputy parliamentary amendment through Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, health insurance [2071001135/2020], by PPSUS [APQ-00846-20] from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais and by Finep/RTR/PRPq/Rede COVID-19 (number 0494/20-0120002600).

**Data Availability** All clinical data from this research can be made available upon request from the corresponding author.

## Declarations

**Ethics Approval** This study was performed in line with the principles of the Declaration of Helsinki. This study was approved by the Research Ethics Committee of Hospital Infantil João Paulo II (HJPII) (Belo Horizonte – MG, Brazil) under number 132/2009 and by the Universidade Federal de Minas Gerais: CAE number: 09273012.9.0000.5149.

**Consent to Participate** For all study subjects, legal guardians signed the consent form for research.

**Consent to Publish** Written informed consent was obtained from the parents.

**Competing Interests** The authors have no relevant financial or non-financial interests to disclose.

**Disclaimer** The authors have stated that they had no interests which might be perceived as posing a conflict or bias.

## References

- Abdel-Mannan O, Eyre M, Löbel U, Bamford A, Eltze C, Hameed B, Hemingway C, Hacothen Y (2020) Neurologic and radiographic findings associated with COVID-19 infection in children. *JAMA Neurol* 11:1440–1445. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2020.2687>
- Abu-Rumeileh S, Abdelhak A, Foschi M, Tumani H, Otto M (2021) Guillain-Barré syndrome spectrum associated with COVID-19: an up-to-date systematic review of 73 cases. *J Neurol* 268:1133–1170. <https://doi.org/10.1007/s00415-020-10124-x>
- Balcom EF, Nath A, Power C (2021) Acute and chronic neurological disorders in COVID-19: potential mechanisms of disease. *Brain* 144:3576. <https://doi.org/10.1093/brain/awab302>
- Boldrini M, Canoll PD, Klein RS (2021) How COVID-19 affects the brain. *JAMA Psychiat* 78:682–683. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2021.0500>
- Centers for Disease Control and Prevention (2022) Underlying medical conditions associated with high risk for severe COVID-19: information for healthcare providers. Available at: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/hcp/clinical-care/underlyingconditions.html>. (Accessed on 01 Mar 2022)
- Feldstein LR, Rose EB, Horwitz SM, Collins JP, Newhams MM, Son MBF et al (2020) Overcoming COVID-19 Investigators; CDC COVID-19 Response Team. Multisystem inflammatory syndrome in U.S. children and adolescents. *N Engl J Med* 383:334–346. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2021680>
- Fotuhi M, Mian A, Meysami S, Raji CA (2020) Neurobiology of COVID-19. *J Alzheimers Dis* 76:3–19. <https://doi.org/10.3233/JAD-200581>
- Huang YH, Jiang D, Huang JT (2020) SARS-CoV-2 detected in cerebrospinal fluid by PCR in a case of COVID-19 encephalitis. *Brain Behav Immun* 87:149. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.05.012>
- LaRovere KL, Riggs BJ, Poussaint TY, Young CC, Newhams MM, Maamari M et al (2021) Neurologic involvement in children and adolescents hospitalized in the United States for COVID-19 or multisystem inflammatory syndrome. *JAMA Neurol* 78:536–547. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2021.0504>
- Lindan CE, Mankad K, Ram D, Kociulek LK, Silvera VM, Boddaert N et al (2021) Neuroimaging manifestations in children with SARS-CoV-2 infection: a multinational, multicentre collaborative study. *Lancet Child Adolesc Health* 3:167–177. [https://doi.org/10.1016/S2352-4642\(20\)30362-X](https://doi.org/10.1016/S2352-4642(20)30362-X)
- Ludwikowska KM, Okarska-Napierala M, Dudek N, Tracewski P, Kusa J, Piwoński KP et al (2021) Distinct characteristics of multisystem inflammatory syndrome in children in Poland. *Sci Rep* 11(1):23562. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-02669-2>. PMID :34876594;PMCID:PMC8651720
- Moriguchi T, Harii N, Goto J, Harada D, Sugawara H, Takamino J et al (2020) A first case of meningitis/encephalitis associated with SARS-coronavirus-2. *Int J Infect Dis* 94:55–58. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.03.062>
- Oliveira EA, Colosimo EA, Silva SE, AC, Mak RH, Martelli DB, Silva LR et al (2021) Clinical characteristics and risk factors for death among hospitalized children and adolescents with COVID-19 in Brazil: an analysis of a nationwide database. *Lancet Child Adolesc Health* 8:559–568. [https://doi.org/10.1016/S2352-4642\(21\)00134-6](https://doi.org/10.1016/S2352-4642(21)00134-6)
- Panda PK, Sharawat IK, Panda P, Natarajan V, Bhakat R, Dawman L (2021) Neurological complications of SARS-CoV-2 infection in children: a systematic review and meta-analysis. *J Trop Pediatr* 67:fmaa070. <https://doi.org/10.1093/tropej/fmaa070>
- Ray STJ, Abdel-Mannan O, Sa M, Fuller C, Wood GK, Pysden K et al (2021) Neurological manifestations of SARS-CoV-2 infection in hospitalised children and adolescents in the UK: a prospective national cohort study. *Lancet Child Adolesc Health* 9:631–641. [https://doi.org/10.1016/S2352-4642\(21\)00193-0](https://doi.org/10.1016/S2352-4642(21)00193-0)
- Shoraka S, Ferreira MLB, Mohebbi SR, Ghaemi A (2021) SARS-CoV-2 infection and Guillain-Barré syndrome: a review on potential pathogenic mechanisms. *Front Immunol* 12:674922. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.674922>
- Shuffrey LC, Firestein MR, Kyle MH, Fields A, Alcántara C, Amso D et al (2022) Association of birth during the COVID-19 pandemic with neurodevelopmental status at 6 months in infants with and without in utero exposure to maternal SARS-CoV-2 infection. *JAMA Pediatr* 176(6):e215563. <https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2021.5563>. Epub 2022 Jun 6. PMID:34982107;PMCID:PMC8728661
- Stafstrom CE (2022) Neurological effects of COVID-19 in infants and children. *Dev Med Child Neurol* 00:1–12. <https://doi.org/10.1111/dmcn.15185>
- Taquet M, Dercon Q, Luciano S, Geddes JR, Husain M, Harrison PJ (2021) Incidence, co-occurrence, and evolution of long-COVID features: a 6-month retrospective cohort study of 273,618 survivors of COVID-19. *PLoS Med* 18:e1003773. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1003773>
- Toscano G, Palmerini F, Ravaglia S, Ruiz L, Invernizzi P, Cuzzoni MG et al (2020) Guillain-Barré syndrome associated with SARS-CoV-2. *N Engl J Med* 382:2574–2576. <https://doi.org/10.1056/NEJMc2009191>
- Valderas C, Méndez G, Echeverría A, Suarez N, Julio K, Sandoval F (2022) COVID-19 and neurologic manifestations: a synthesis from the child neurologist's corner. *World J Pediatr* 18(6):373–382. <https://doi.org/10.1007/s12519-022-00550-4>. Epub 2022 Apr 27. PMID:35476245;PMCID:PMC9044375
- WHO (2020) – Multisystem inflammatory syndrome in children and adolescents with COVID-19. Scientific Brief, 15 May 2020. Available at: <https://www.who.int/publications/i/item/multisystem-inflammatory-syndrome-in-children-and-adolescents-with-covid-19>. (Accessed on 20 Feb 22)

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.

## Authors and Affiliations

**Aline Almeida Bentes<sup>1,2</sup>** · **Walter Rebuite dos Santos Junior<sup>3</sup>** · **Natalia Lima Pessoa<sup>3,4</sup>** · **Thais Alkifeles Costa<sup>3</sup>** · **Gabriela Fernanda Garcia Oliveira<sup>3</sup>** · **Lilian Martins Oliveira Diniz<sup>1,2</sup>** · **Bruna Ribeiro Torres<sup>2</sup>** · **Daniela Caldas Teixeira<sup>2</sup>** · **Renata Barandas Mendes<sup>2</sup>** · **Ana Beatriz Alvim Avelar<sup>2</sup>** · **Marco Antônio Campos<sup>4</sup>** · **Erna Geessien Kroon<sup>3</sup>** · **Betania Paiva Drumond<sup>3</sup>**

Walter Rebuite dos Santos Junior  
walterrebuite@gmail.com

Natalia Lima Pessoa  
natalinha\_lima@hotmail.com

Thais Alkifeles Costa  
alkifelescosta@hotmail.com.br

Gabriela Fernanda Garcia Oliveira  
gabrielafernadag@gmail.com

Lilian Martins Oliveira Diniz  
lilianmodiniz@gmail.com

Bruna Ribeiro Torres  
brunatorres.neuroped@gmail.com

Daniela Caldas Teixeira  
caldas.dani@gmail.com

Renata Barandas Mendes  
renatabarandas@gmail.com

Ana Beatriz Alvim Avelar  
anab.aa@icloud.com

Marco Antônio Campos  
marcoantonioscampos@gmail.com

Erna Geessien Kroon  
ernagkroon@gmail.com

Betania Paiva Drumond  
betaniadrmond@gmail.com

<sup>1</sup> Departamento de Pediatria, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Prof. Alfredo Balena, 190 - Santa Efigênia, 30130-100 Belo Horizonte, MG, Brazil

<sup>2</sup> Hospital Infantil João Paulo II, FHEMIG, Minas Gerais, Brazil

<sup>3</sup> Laboratório de Vírus, Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, Brazil

<sup>4</sup> Imunologia de Doenças Virais, Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, MG, Brazil