

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

Ana Gabriella Stoffella Dutra

**PROSPECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE VÍRUS ZONÓTICOS EM
REMANESCENTES FLORESTAIS INSERIDOS EM MATRIZES URBANAS:
IMPLICAÇÕES PARA O CONHECIMENTO DA DINÂMICA ECOLÓGICA E
EVOLUTIVA**

Belo Horizonte
2023

Ana Gabriella Stoffella Dutra

**PROSPECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE VÍRUS ZONÓTICOS EM
REMANESCENTES FLORESTAIS INSERIDOS EM MATRIZES URBANAS:
IMPLICAÇÕES PARA O CONHECIMENTO DA DINÂMICA ECOLÓGICA E
EVOLUTIVA**

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

Orientadora: Profa. Dra. Giliane de Souza Trindade

Belo Horizonte

2023

043

Dutra, Ana Gabriella Stoffella.

Prospecção e caracterização de vírus zoonóticos em remanescentes florestais inseridos em matrizes urbanas: implicações para o conhecimento da dinâmica ecológica e evolutiva [manuscrito] / Ana Gabriella Stoffella Dutra. – 2023. 232 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Giliane de Souza Trindade.

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

1. Microbiologia. 2. Mamíferos. 3. Doenças Transmissíveis Emergentes. 4. Arbovirus. 5. Betacoronavirus. 6. Técnicas de Pesquisa. I. Trindade, Giliane de Souza. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ATA DE DEFESA DE TESE

ATA DA DEFESA DE TESE DE ANA GABRIELLA STOFFELLA DUTRA

Nº REGISTRO: 2019706304

Às 14:00 horas do dia **05 de abril de 2023**, reuniu-se, por via remota, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Betânia Paiva Drumond (Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG), Rodrigo Araújo Lima Rodrigues (Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG), Fernando Rosado Spilki (Universidade Feevale, Instituto de Ciências da Saúde), Helena Lage Ferreira (Universidade de São Paulo - USP) e Profa. Dra. Giliane de Souza Trindade (Orientadora), para julgar o trabalho final **"Prospecção e caracterização de vírus zoonóticos em remanescentes florestais inseridos em matrizes urbanas: implicações para o conhecimento da dinâmica ecológica e evolutiva"** da aluna **Ana Gabriella Stoffella Dutra**, requisito final para a obtenção do Grau de **DOUTORA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profa. Dra. Giliane de Souza Trindade, 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 tese ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da UFMG e requerer seu diploma.

Belo Horizonte, 05 de abril de 2023

Membros da Banca:

Profa. Dra. Betânia Paiva Drumond
Prof. Dr. Rodrigo Araújo Lima Rodrigues
Prof. Dr. Fernando Rosado Spilki
Profa. Dra. Helena Lage Ferreira

De acordo:

Profa. Dra. Giliane de Souza Trindade
(Orientadora)

Profa. Daniele da Glória de Souza
(Coordenadora do Programa de Pós-graduação
em Microbiologia)



Documento assinado eletronicamente por **Fernando Rosado Spilki, Usuário Externo**, em 10/04/2023, às 08:23, 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 **Betania Paiva Drumond, Professora do Magistério Superior**, em 10/04/2023, às 09:04, 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, Professora do Magistério Superior**, em 10/04/2023, às 11:02, 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 **Giliane de Souza Trindade, Professora do Magistério Superior**, em 10/04/2023, às 12:45, 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 **Rodrigo Araújo Lima Rodrigues, Professor do Magistério Superior**, em 11/04/2023, às 09:28, 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 **Helena Lage Ferreira, Usuária Externa**, em 26/04/2023, às 07:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 2099089 e o código CRC AFC5FEFC.

Dedico esta tese aos meus pais Angela e Ronaldo, por todo amor e apoio incomensurável que permitiram a realização desse sonho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sempre guiar meus caminhos e decisões da melhor forma, e por ter me proporcionado saúde, resiliência e equilíbrio para concluir mais esta etapa, mesmo em momentos que não acreditei em mim.

Aos meus pais, Angela e Ronaldo, por serem os melhores exemplos de vida que eu tenho, por todo amor e por todas as renúncias que já fizeram por mim. Por não pouparem esforços para me apoiar em todos os momentos da minha vida, obrigada por sonharem esse doutorado comigo. Amo muito vocês!

À minha querida orientadora Giliane, que foi um dos maiores presentes em minha vida. Muito obrigada por todo carinho, parceria, pela sua forma de ensinar e sempre inspirar. Obrigada por todos os ensinamentos, paciência e confiança. Sou extremamente grata por ter sido formada em virologia por uma mulher maravilhosa como você Gi.

A cada um dos meus professores (as) do mestrado, da especialização e da PUC por todo aprendizado e dedicação.

Aos professores do Laboratório de Vírus, Betânia, Erna, Jônatas, Rodrigo e Cláudio. Obrigada por serem professores incríveis, grandes exemplos para nós e por sempre nos incentivarem a pensar e viver ciência. Em especial à Beta e ao Rodrigo, vocês me inspiram demais e sempre estão dispostos a me ensinar, dar conselhos e ajudar.

Aos parceiros e colaboradores dessa tese, muito obrigada. Cada análise, discussão e contribuição permitiram enriquecer ainda mais os resultados e a minha formação.

Aos queridos colegas do Lab Vírus, pelo convívio, discussões científicas e pelas brincadeiras do dia a dia. Obrigada família Labviridae! Em especial aos meus amigos Ana Lu, Nati Ingrid, Natalinha, Karol, Jaque, Nídia, Walter e Mateus pela amizade e por tornarem meus dias mais alegres. Vocês foram extremamente importantes no decorrer dos anos do mestrado e doutorado.

Aos amigos do ECOVIR (Jaque, Carol, Galileu, Iago, Pedro, Karol, Débora, Larinha, Kamila) obrigada por serem mais do que parceiros de grupo de pesquisa, mas amigos para toda vida. Amo trabalhar com vocês.

Ao Cláudio, que chegou na minha vida no finalzinho desse caminho, trazendo mais alegria e amor, por cuidar tão bem de mim e acreditar no meu potencial.

Às minhas primas/irmãs, Malu e Mariana, vocês são fonte de amor, parceria, risadas e momentos muito especiais em minha vida. Obrigada, estaremos sempre juntas.

Aos meus avós, Belgrado, Marciana, Hélio e Célia (*in memoriam*), sempre lembro de vocês pelo carinho e amor em minha infância, espero deixá-los sempre cheios de orgulho.

À minha família e amigos por todo amor, compreensão e incentivos.

Aos membros da banca pela disponibilidade e dedicação para colaborar com a minha formação nesta etapa final.

À UFMG e as agências de fomento, CNPq, CAPES e FAPEMIG, PRPq-UFMG, MCTI e FINEP, pelo financiamento desse projeto.

A realização de mais sonho chega ao fim, com muito aprendizado, momentos de desafio e também de apreensão, especialmente durante a pandemia. Mas diante de todas pequenas e grandes vitórias, sigo imensamente grata por todos que passaram em meu caminho e me ajudaram a chegar até aqui, pelo meu crescimento não só como profissional, mas também pessoal. Ninguém evolui e vive sozinho, minha enorme gratidão.

Muito obrigada a todos!

“Só quando nosso cérebro inteligente e nosso coração humano trabalham juntos é que nós podemos atingir todo o nosso potencial” – Jane Goodall

RESUMO

As doenças infecciosas emergentes (DIE) são um problema de saúde pública global. Nesse cenário, as zoonoses correspondem a maioria dos eventos de emergência, e os vírus representam a 2ª maior causa de DIE. O Brasil é considerado um “hotspot” para patógenos emergentes, sendo destaque no cenário epidemiológico a ocorrência de viroses com relevante impacto em saúde pública, como as arboviroses, causadas pelos vírus ZIKV, YFV, DENV e CHIKV, bem como a Vaccinia Bovina, além do SARS-CoV-2, causador da pandemia de COVID-19. Nesse contexto, este estudo teve como objetivo investigar e caracterizar vírus zoonóticos circulantes em pequenos mamíferos silvestres presentes em remanescentes de mata inseridos em Belo Horizonte, MG. A investigação molecular desses vírus em órgãos de roedores e marsupiais silvestres demonstrou ausência de circulação de arbovírus nesses animais, para a investigação de VACV foi obtida uma sequência referente ao gene A56R proveniente de uma amostra de roedor (*Cerradomys spp.*), ainda a investigação molecular evidenciou possível circulação viral também em um marsupial (*Marmosops incanus*). Os dados obtidos suscitam indagações sobre a possível atuação desses mamíferos no ciclo de manutenção e transmissão desses vírus em áreas verdes inseridas em ambiente urbano. Os dados aqui apresentados também confirmaram a circulação do SARS-CoV-2 em quatis (*Nasua nasua*), sinalizando para a ocorrência de eventos de *spillback* viral para mamíferos silvestres durante a pandemia. A ocorrência de infecção natural por SARS-CoV-2 em quatis pela variante zeta (P.2) foi confirmada por sequenciamento e inferências filogenéticas de genoma completo. Ainda, a investigação sorológica evidenciou que 50% da população analisada de quatis (n=40) apresentou anticorpos neutralizantes anti-SARS-CoV-2. Com relação à investigação molecular de arbovírus nenhum quati foi positivo. Para VACV, não foi confirmada a detecção em qPCR, e não foram detectados anticorpos anti-OPV nos soros testados. O monitoramento de vírus zoonóticos em pequenos mamíferos inseridos em áreas de interface silvestre-urbana contribui para elucidar a dinâmica de transmissão desses vírus. Além disso, a compreensão dos ciclos enzoóticos virais contribui para ações de controle e prevenção diante de eventos de emergência, e a ocorrência limítrofe com áreas urbanas aponta para o risco de exposição humana às infecções zoonóticas.

Palavras-chave: Doenças infecciosas emergentes; Mamíferos silvestres; Arbovírus; VACV; SARS-CoV-2; Investigação molecular; Investigação sorológica.

ABSTRACT

Emerging infectious diseases (EID) are a public health worldwide problem. In this scenario, zoonoses account for the majority of emergency events, and viruses represent the second largest cause of EID. Brazil is considered a “hotspot” for emerging pathogens, and in the epidemiological scenario has the occurrence of important viruses with a relevant impact on public health, such as arboviral diseases, caused by the ZIKV, YFV, DENV and CHIKV viruses, as well as Bovine Vaccinia (VACV), in addition to the SARS-CoV-2, responsible for the COVID-19 pandemic. In this context, the aim of this study was to investigate and characterize zoonotic viruses circulating in small wild mammals living in forest remnants located in Belo Horizonte, MG. Molecular investigation of these viruses in organs of wild rodents and marsupials demonstrated the absence of arbovirus circulation in these animals. For VACV investigation, a nucleotide sequence of the A56R gene was obtained from a rodent sample (*Cerradomys* spp.), the molecular investigation also showed possible viral circulation in a marsupial (*Marmosops incanus*). Our findings raise questions about the possible role of these mammals in the maintenance and transmission cycles of these viruses in green areas inserted in urban environments. The data presented here also confirmed the circulation of SARS-CoV-2 in coatis (*Nasua nasua*), suggesting the occurrence of viral *spillback* events in local sylvatic mammals during the pandemic. The occurrence of natural SARS-CoV-2 infection in coatis by the zeta variant (P.2) was confirmed by complete genome sequencing and phylogenetic inferences. Furthermore, the serological investigation showed that 50% of the analyzed coatis had anti-SARS-CoV-2 neutralizing antibodies. Considering the molecular investigation of arboviruses, none of the coatis was positive. Detection of VACV was not confirmed by qPCR, and no anti-OPV antibodies were detected in the sera of the tested coatis. The monitoring of zoonotic viruses in small mammals located in urban-sylvatic interface areas contributes to elucidate the transmission dynamics of these viruses. In addition, understanding the enzootic cycles of these viruses helps to support control and prevention measures in the face of emergency events. Furthermore, the borderline occurrence in urban areas indicates the risk of human exposure to zoonotic infections.

Keywords: Emerging infectious diseases; Wild mammals; Arbovirus; VACV; SARS-CoV-2; Molecular investigation; Serological investigation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fatores globais que contribuem para o surgimento de patógenos emergentes e reemergentes.....	21
Figura 2 – Doenças infecciosas emergentes e reemergentes no mundo.....	22
Figura 3 – Distribuição do risco relativo previsto para eventos de DIE zoonóticos no mundo.....	23
Figura 4 – Ciclo de abordagem One Health.....	25
Figura 5 – Cenários evidenciando a transmissão de patógenos entre humanos e animais silvestres.....	26
Figura 6 – Estágios para a emergência de uma zoonose viral na espécie humana...	28
Figura 7 – Diagrama evidenciando a riqueza viral por ordem de mamíferos e família viral.....	31
Figura 8 – Riqueza de espécies de roedores e distribuição das espécies de procionídeos na América do Sul.....	33
Figura 9 – Desmatamento e criação de ecótonos no contexto de emergência de patógenos zoonóticos.....	35
Figura 10 – Ciclos de transmissão dos arbovírus.....	40
Figura 11 – Organização do genoma e estrutura de partícula dos flavivírus.....	42
Figura 12 – Países endêmicos para a Febre Amarela e as regiões com recomendação de vacinação.....	44
Figura 13 – Gráfico com série histórica do número de casos humanos confirmados de FA no Brasil.....	46
Figura 14 – Regiões do planeta com predisposição para transmissão do DENV.....	48
Figura 15 – Número de casos prováveis de Dengue por semana epidemiológica, Minas Gerais.....	50
Figura 16 – Surtos de Zika ao redor do globo.....	51
Figura 17 – Mapa demonstrando as ordens de animais susceptíveis a infecção pelo ZIKV.....	54
Figura 18 – Organização genômica e estrutura de partícula dos <i>Alphavirus</i>	55
Figura 19 – Países onde casos autóctones de CHIKV foram relatados e distribuição geográfica dos vetores <i>Aedes aegypti</i> e <i>Aedes albopictus</i>	57
Figura 20 – Morfologia de partícula e genoma dos Orthopoxvirus.....	60
Figura 21 – Representação da distribuição dos Orthopoxvirus pelo mundo.....	62

Figura 22 – Estrutura de partícula do SARS-CoV-2 e organização do genoma.....	65
Figura 23 – Dados globais sobre os casos e óbitos de COVID-19 relatados semanalmente pela OMS, em 29 de janeiro de 2023.....	67
Figura 24 – Diagrama resumindo os hospedeiros e reservatórios intermediários de HCoV-S emergentes e endêmicos.....	69
Figura 25 – Mapas evidenciando a localização geográfica de Belo Horizonte, e a localização dos parques municipais incluídos no estudo.....	78
Figura 26 – Vista aérea dos parques urbanos, locais de coleta dos roedores e marsupiais e registros das capturas	79
Figura 27 – Transectos de captura dos pequenos mamíferos.....	81
Figura 28 – Gráfico de amplificação da amostra de fígado positiva para YFV.....	95
Figura 29 – Gráficos dos resultados de qPCR para o alvo A56R.....	100
Figura 30 – Eletroforese em Gel de Agarose 1% para as amostras testadas para o gene A56R.....	101
Figura 31 – Alinhamento de sequências do gene A56R da amostra FJC88 com sequências homólogas de VACV brasileiros.....	103
Figura 32 – Mapa evidenciando a localização geográfica de Belo Horizonte, e a localização do Parque das Mangabeiras.....	113
Figura 33 – Gráficos de amplificação das amostras de swab positivas para SARS-CoV-2.....	126
Figura 34 – Árvore filogenética de SARS-CoV-2.....	127
Figura 35 – Gráfico representando os dados de PRNT e a porcentagem de redução das amostras de soro de quatis analisadas.....	129
Figura 36 – Mapa demonstrando o deslocamento do quati 341 pelo Parque das Mangabeiras e registros da população de quatis amostrada.....	131
Figura 37 – Gráfico representando os dados de PRNT-50 para as amostras de soro de quatis.....	136

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Número amostral e distribuição de roedores e marsupiais capturados nos parques Jacques Cousteau e Mangabeiras em Belo Horizonte, MG, Brasil.....	80
Tabela 2 – Especificações dos genes alvo, tamanho dos fragmentos e referências das reações para investigação de flavivírus.....	85
Tabela 3 – Iniciadores e sondas utilizados nos ensaios de RT-qPCR para investigação de DENV-1– 4.....	87
Tabela 4 – Iniciadores utilizados para detecção de VACV com base na hemaglutinina viral, gene A56R.....	89
Tabela 5 – Características ecológicas dos pequenos mamíferos incluídos na coleção analisada.....	92
Tabela 6 – Tabela representativa dos alvos de RT-qPCR analisados e dos resultados obtidos para investigação de arbovírus.....	94
Tabela 7 – Amostras de pequenos mamíferos positivas na prospecção molecular de VACV, referente ao gene alvo A56R.....	99
Tabela 8 – Número amostral, data de coleta e sexo dos quatis incluídos nesse estudo.....	115
Tabela 9 – Iniciadores e sondas utilizados para a detecção por RT-qPCR de SARS-CoV-2.....	118
Tabela 10 – Dados das amostras de quatis positivas e resultados da prospecção molecular de SARS-CoV-2.....	125

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ACE₂** – Enzima conversora de angiotensina 2
- ATCC** – *American Type Culture Collection*
- APP** – Áreas de Preservação Permanente
- CDC** – Centro de Controle e Prevenção de Doenças (*Centers for Disease Control and Prevention*)
- cDNA** – Ácido desoxirribonucleico complementar
- CEUA** – Comissão de Ética no Uso de Animais
- CPXV** – *Cowpox virus*
- CHIKV** – *Chikungunya virus*
- CMC** – Carboximetilcelulose
- CO₂** – Dióxido de carbono
- CoVs** – Coronavírus
- COVID-19** – Coronavirus disease 2019
- Cq** – Quantitative cycle
- DENV** – *Dengue virus*
- DIE** – Doenças infecciosas emergentes
- DNA** – Ácido desoxirribonucleico
- dNTP** – Desoxirribonucleotídeos fosfatados
- dsDNA** – Ácido desoxirribonucleico de fita dupla
- ECOVIR** – Grupo de Ecologia de Víroses Emergentes
- ECP** – Efeito citopático
- EEEV** – *Eastern equine encephalitis virus*
- FA** – Febre Amarela
- FHSR** – Febre Hemorrágica com Síndrome Renal
- GISAID** – Global Initiative on Sharing Avian Influenza Data
- HA** – Hemaglutinina viral
- HCoVs** – Coronavírus humanos
- IBGE** – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- ICMBio** – Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
- ICTV** – Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (*International Committee on Taxonomy of Viruses*)
- ITRs** – Regiões terminais invertidas

kb – Quilobase

MAYV – *Mayaro virus*

MEM – Meio mínimo essencial

MERS-CoV – Síndrome respiratória por coronavírus do Oriente Médio

mL – Mililitro

MPXV – *Monkeypox virus*

NCR – Regiões não codificadoras

NCLDVs – Vírus grandes núcleo-citoplasmáticos de DNA

nm – Nanômetro

NSP – Proteínas não-estruturais

OMS – Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization*)

OPV – *Orthopoxvirus*

ORF – Open Reading Frame

OROV – *Oropouche virus*

pb – Pares de bases

PBS – Tampão salina fosfato

PBH – Prefeitura de Belo Horizonte

PCR – Reação em cadeia da polimerase (*Polimerase chain reaction*)

PNH – Primatas não-humanos

PRNT – Teste de Neutralização por Redução de Placas (*Plaque Reduction Neutralization Test*)

qPCR – Reação em cadeia da polimerase quantitativa

RNA – Ácido ribonucleico

ROX – Referência passiva

RRV – *Ross River virus*

RT-qPCR – Reação em cadeia da polimerase de Transcrição Reversa

SES – Secretaria de Estado de Saúde

SARS – Síndrome respiratória aguda grave

SARS-CoV-2 – *Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2*

SFB – Soro fetal bovino

SISBIO – Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade

SISGEN – Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético

SLEV – *Saint Louis encephalitis virus*

SVS – Secretaria de Vigilância em Saúde

T_m – Temperatura de dissociação

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

UFP – Unidades formadoras de placa

UC – Unidades de conservação

UN – Unidades neutralizantes

USUV – *Usutu virus*

UTRs – Regiões terminais não traduzidas

VACV – *Vaccinia virus*

VACV-WR – *Vaccinia virus Western Reserve*

VARV – *Variola virus*

VB – Vaccínia Bovina

VGF – Fator de crescimento viral

VOI – Variantes de interesse

VOC - Variantes de preocupação

WNV – *West Nile virus*

WOAH – Organização Mundial da Saúde Animal (World Health Organisation for animal health)

YFV – *Yellow fever virus*

ZIKV – *Zika virus*

μL – Microlitro

μM – Micromolar

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
1.1 Doenças infecciosas emergentes (DIE)	20
1.2 Viroses emergentes	27
1.3 Classe Mammalia e vírus zoonóticos	30
1.4 Urbanização, áreas verdes e emergência de patógenos	33
1.5 Arbovírus	39
1.6 Flaviviridae	41
1.6.1 Febre Amarela.....	42
1.6.2 Dengue.....	47
1.6.3 Zika.....	50
1.7 Togaviridae.....	54
1.7.1 Chikungunya	55
1.8 Poxviridae.....	58
1.8.1 Vaccinia Bovina.....	60
1.9 Coronaviridae	63
1.9.1 COVID-19.....	66
2. JUSTIFICATIVA	71
3. OBJETIVOS	75
3.1 Objetivo geral	75
3.2 Objetivos específicos	75
4. FLUXOGRAMA DE TRABALHO	76
5. MATERIAL E MÉTODOS	77
5.1 Coleções de pequenos mamíferos.....	77
5.2 Áreas de estudo	77
5.3 Coletas	79
5.4 Metodologia Laboratorial.....	82
5.4.1 Abordagem Molecular.....	82
5.4.1.1 Extração de DNA.....	82
5.4.1.2 Extração de RNA.....	83
5.4.1.3 Detecção molecular através de RT-qPCR/qPCR.....	84
5.4.1.3.1 β -actina murina.....	84
5.4.1.3.2 Flavivírus	85
5.4.1.3.3 Alphavírus	87

5.4.1.3.4 Orthopoxvirus	88
5.4.1.3.5 Gel de agarose 1%.....	89
5.4.1.3.6 Sequenciamento	90
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	91
6.1 Caracterização ecológica dos pequenos mamíferos	91
6.2 Prospecção molecular de arbovírus em amostras de pequenos mamíferos	94
6.3 Prospecção molecular de VACV em amostras de pequenos mamíferos	99
7. CONCLUSÕES	107
8. PERSPECTIVAS.....	108
9. OBJETIVOS.....	110
9.1 Objetivo geral	110
9.2 Objetivos específicos	110
10. FLUXOGRAMA DE TRABALHO.....	111
11. MATERIAL E MÉTODOS	112
11.1 COLEÇÃO DE QUATIS (<i>Nasua nasua</i>)	112
11.2 Área de estudo	112
11.3 Coletas	114
11.4 Metodologia laboratorial	115
11.4.1 Abordagem molecular	115
11.4.1.1 Extração de RNA.....	115
11.4.1.2 Extração de DNA.....	116
11.4.1.3 β -actina.....	117
11.4.1.4 RT-qPCR para SARS-CoV-2.....	117
11.4.1.5 RT-qPCR para investigação de flavivírus.....	118
11.4.1.6 RT-qPCR para Alphavírus.....	119
11.4.1.7 qPCR para Orthopoxvirus	119
11.4.1.8 Gel de Agarose 1%	120
11.4.1.9 Sequenciamento e inferências filogenéticas	120
11.4.2 Abordagem sorológica.....	121
11.4.2.1 Células Vero.....	122
11.4.2.2 Células BSC-40	122
11.4.2.3 Ensaio de Soroneutralização para SARS-CoV-2	122
11.4.2.4 Ensaio de Soroneutralização para Orthopoxvirus	123
11.4.3 Isolamento viral	124
12. RESULTADOS E DISCUSSÃO	125

12. 1 Prospecção molecular de SARS-CoV-2 e investigação sorológica em amostras de Quatis.....	125
12.2 Prospecção molecular de VACV e investigação sorológica em amostras de quatis.....	134
12. 3 Prospecção molecular de arbovírus em amostras de swabs de quatis	137
13. CONCLUSÕES.....	139
14. PERSPECTIVAS.....	140
15. Produção científica e outras atividades realizadas durante o período de doutorado.....	141
REFERÊNCIAS.....	145
ANEXOS	174

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doenças infecciosas emergentes (DIE)

As doenças infecciosas emergentes (DIE) podem ser caracterizadas como doenças que ocorreram recentemente em uma determinada população ou que já acometeram essa população, mas que demonstram repentino aumento na incidência de casos ou distribuição geográfica (MORSE, 1995; RACANIELLO, 2004). As DIE provocam prejuízos econômicos e sociais e muitas vezes representam ameaças para a saúde pública em níveis globais. A compreensão de todos os fatores que podem originar a emergência dessas doenças ainda é escassa, mas sabe-se que múltiplas causas estão relacionadas, sendo que fatores socioeconômicos, ambientais e ecológicos desempenham importante papel (MORENS *et al.*, 2004; JONES *et al.*, 2008; ALLEN *et al.*, 2017).

De acordo com Destoumieux-Garzón e colaboradores (2018), o aumento populacional, industrialização e problemas geopolíticos são fatores que contribuem para o surgimento das DIE. Esses fatores podem desencadear danos à biodiversidade e ao equilíbrio de ecossistemas, além de contribuir para movimentos migratórios de populações humanas e das espécies animais, sendo que essas mudanças ambientais estariam relacionadas ao surgimento de doenças infecciosas e não infecciosas. Além disso, a elevada densidade populacional em grandes centros urbanos, o saneamento básico precário, a exposição dos seres humanos a vetores e reservatórios de doenças, mudanças nos padrões de uso da terra e mudanças climáticas também são fatores que contribuem para a ocorrência de novas DIE (Figura 1) (RACANIELLO, 2004; JONES *et al.*, 2008; KESSING *et al.*, 2021).

As DIE representam um grande desafio para a saúde pública já que geralmente apresentam características como rápida disseminação (síndrome respiratória aguda grave, SARS) e alta letalidade (Ebola), além dos obstáculos existentes para tornar o desenvolvimento de vacinas e medicamentos mais rápido e menos oneroso para o controle e prevenção dessas doenças. Também é relevante o fato de a maioria dos esforços, recursos e ações de vigilância para combater o surgimento de DIE estarem concentrados em países onde a origem das mesmas é menos provável (JONES *et al.*, 2008; CUNNINGHAM *et al.*, 2017).



Figura 1: Fatores globais que contribuem para o surgimento de patógenos emergentes e re-emergentes. Na figura são evidenciados alguns dos principais fatores relacionados à ação antrópica que podem contribuir para a ocorrência de mudanças nos ecossistemas do planeta e emergência de patógenos. Fonte: Elaborado pela autora, STOFFELLA-DUTRA, A.G.

Em torno de 60% das DIE são causadas por patógenos zoonóticos (Figura 2) (KARESH *et al.*, 2012; BENELLI; DUGGAN, 2018). Quase dois terços das doenças infecciosas humanas provêm de patógenos que podem ser transmitidos entre espécies de animais silvestres e/ou domésticos para os seres humanos. Considerando a grande diversidade animal existente nos ecossistemas do planeta Terra, é possível presumir que os animais sejam a maior fonte das doenças infecciosas humanas. Ainda, vale destacar o contato próximo de seres humanos com espécies animais domesticadas, sendo que esse comportamento é capaz de facilitar a transmissão de patógenos para o homem. Estudos recentes estimam que em torno de 1 bilhão de casos de doenças zoonóticas acometam a espécie humana anualmente (WOLFE, 2007; KARESH *et al.*, 2012; GEBREYES *et al.*, 2014; CDC, 2020A).

Mesmo sabendo que os animais estão relacionados ao surgimento de DIE, sabe-se que a ação antrópica na modificação dos ecossistemas é um dos principais fatores que contribuem para a emergência de zoonoses. Alterações no uso da terra podem influenciar na biodiversidade e nas relações entre hospedeiros animais, homem e patógeno, além de poder desencadear alterações no clima local, nos padrões da vegetação, na dinâmica do vetor com as espécies hospedeiras e na

pandemia podem ser destacados os custos elevados com atendimento hospitalar e suprimentos médicos, a sobrecarga de sistemas de saúde, recessão econômica influenciada por medidas de controle e prevenção como distanciamento social, restrições de circulação e de viagens, impactos em saúde mental e qualidade de vida, além de impactos em vidas humanas e índices de pobreza mais elevados e desiguais (NICOLA *et al.*, 2020; WHO, 2020; MOFIJUR *et al.*, 2021).

Segundo Allen e colaboradores (2017), regiões tropicais que apresentam elevada biodiversidade e riqueza de espécies de mamíferos, além de alterações no uso da terra, possuem elevado risco de ocorrência de DIE zoonóticas. Dentro desse contexto surgiu o termo “hotspots”, o qual se refere às regiões mais prováveis para a origem de DIE (Figura 3). Estudos como o de Jones e colaboradores (2008) e Allen e colaboradores (2017) rastrearam possíveis áreas com potencial para a emergência de DIE, e dentre as regiões mundiais consideradas como hotspots a região sudeste do Brasil merece destaque.

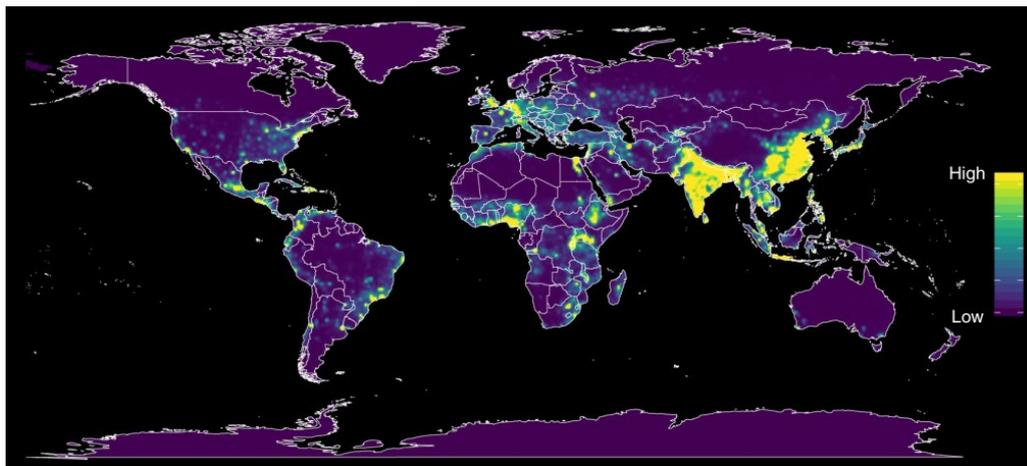


Figura 3: Distribuição do risco relativo previsto para eventos de DIE zoonóticos no mundo. Nas áreas em amarelo e verde estão os países e regiões com maior risco de ocorrência de eventos de emergência de DIE. Esses locais são classificados como hotspots e a maioria está presente em regiões tropicais. Fonte: ALLEN *et al.*, 2017.

A perda de biodiversidade dos ecossistemas tem sido associada com o aumento do risco de transmissão de doenças zoonóticas relacionadas a vários patógenos. Além disso, regiões que apresentam elevada biodiversidade, e principalmente alta riqueza de espécies de mamíferos podem ser locais com maior predisposição para surgimento de novas zoonoses (JONES *et al.*, 2008; KEESING *et al.*, 2010; WHO, 2015). Nesse sentido, essas regiões de alta biodiversidade poderiam ser mais frequentemente fonte de novos patógenos por possuírem mais espécies

hospedeiras para mais patógenos (WHO, 2015). Estudos recentes sobre esse tema são escassos, porém é importante salientar que levando em consideração o conhecimento atual, a preservação dos ecossistemas e da biodiversidade endêmica de cada região é essencial para reduzir a prevalência de DIE (KEESING *et al.*, 2010).

Nesse cenário, o Brasil é o país que possui a maior diversidade de espécies do mundo (UNEP, 2019). Ainda, nas últimas décadas o Brasil apresentou uma crescente urbanização acompanhada por problemas ambientais, sociais e econômicos não resolvidos, além do avanço do desmatamento para dar lugar a atividades agroindustriais e a proximidade de fronteiras agrícolas com ambientes de florestas tropicais. Todos esses fatores e o avanço do contato entre populações humanas e animais contribuem para a emergência de DIE (BARRETO *et al.*, 2011; KARESH *et al.*, 2012; NAVA *et al.*, 2017).

Ademais, esses hotspots de biodiversidade, que se concentram principalmente em latitudes mais baixas, abrangendo locais como África tropical, a América Latina e a Ásia requerem atenção e intensificação dos programas de vigilância epidemiológica. O monitoramento eficiente dessas áreas deve ser capaz de antecipar e controlar a emergência de DIE, assim como alertar para a necessidade de conservação das áreas com alta diversidade de vida selvagem e para a presença de populações inseridas em regiões de risco (JONES *et al.*, 2008; MORSE, 2012; ALLEN *et al.*, 2017).

Diante desse panorama acerca das DIE, é válido destacar o conceito de One Health (Saúde Única), o qual defende que a saúde das pessoas está interligada à saúde dos animais e dos ecossistemas como um todo. Essa iniciativa consiste em uma estratégia global para lidar com doenças, principalmente zoonoses, onde é defendida uma abordagem transdisciplinar que leve em consideração os componentes ambientais e ecológicos, a interface de saúde animal e a saúde humana (CUNNINGHAM *et al.*, 2017; CDC, 2018A; DESTOUMIEUX-GARZÓN *et al.*, 2018).

A iniciativa de Saúde Única visa controlar e prevenir as doenças infecciosas, principalmente no cenário atual em que as doenças são disseminadas rapidamente pelo globo (CDC, 2018A). Dessa forma, objetivando alcançar sucesso nas intervenções de saúde pública, a abordagem de Saúde Única leva em consideração a complexidade da ecologia das doenças zoonóticas e analisa de forma individual e como processos integrados os papéis dos hospedeiros, do patógeno e de possíveis vetores (Figura 4) (KARESH *et al.*, 2012; BENELLI; DUGGAN, 2018; CDC, 2018A).

Considerando esse cenário, Fagre e colaboradores (2022) sugeriram um modelo com dois caminhos de *spillback* principais que podem ser desencadeados a partir da transmissão interespecie entre homens e animais silvestres (Figura 5). Em um primeiro momento, considerando a transmissão de um patógeno com transmissão sustentada em humanos para uma nova espécie animal, é evidenciada a possível ocorrência de morbidade e mortalidade nessa população (Caminho 1), o que pode prejudicar a conservação da nova espécie afetada. Ainda, a transmissão de um patógeno de origem humana para um novo hospedeiro animal que consiga estabelecer a circulação e manutenção enzoótica desse patógeno pode resultar também em impactos para a saúde desses animais quanto para outras populações vulneráveis e susceptíveis que compartilham o mesmo nicho.

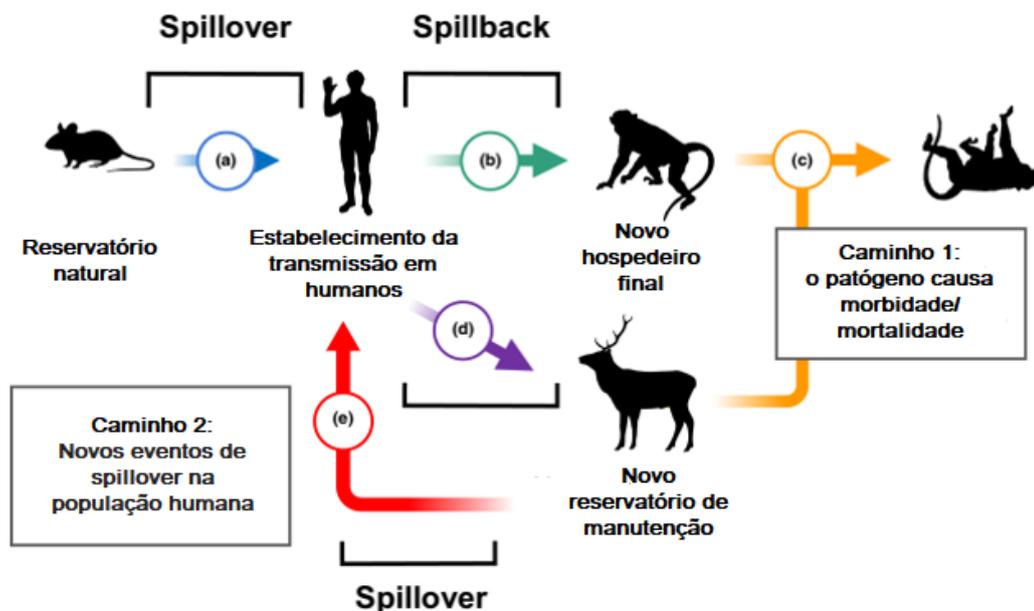


Figura 5: Cenários evidenciando a transmissão de patógenos de humanos para animais silvestres. Em ambos os cenários é demonstrado o sucesso de um *spillover*, com a transmissão sustentada em humanos e a transmissão para novos hospedeiros animais. Os caminhos representados mostram duas implicações principais: o risco para a conservação de espécies pela infecção causada por um novo patógeno e o problema de saúde pública com o retorno de transmissão para as populações humanas. Fonte: FAGRE *et al.*, 2022.

Além disso, nesse panorama, partindo de um novo estabelecimento enzoótico, o caminho 2 evidencia uma significativa ameaça, a qual destaca a possível ocorrência de eventos de *spillover* secundários na população humana a partir dessa nova espécie. Essa nova espécie susceptível pode atuar como fonte de novas epidemias tanto para população humana, como sinalizado no modelo, mas também para

animais. Vale destacar que o modelo indica apenas duas propostas de rotas de transmissão que podem ser muito mais complexas considerando os diferentes ecossistemas e composição de espécies de cada local (FAGRE *et al.*, 2022).

1.2 Viroses emergentes

Dentre as DIE, as doenças virais emergentes merecem destaque. Estudos recentes evidenciam que os patógenos virais emergentes são a segunda maior causa de DIE no mundo, sendo que dentre esses os vírus de RNA são os mais recorrentes (JONES *et al.*, 2008).

Ainda, sabe-se que a maioria das DIE são provenientes da vida silvestre, e diante disso, as zoonoses virais representam relevante ameaça à saúde pública global já que ocasionaram a maioria das recentes pandemias nos seres humanos (MORSE *et al.*, 2012; KARESH *et al.*, 2012). Alguns exemplos importantes são a Influenza aviária H5N1 em 1995, a emergência de SARS em 2003, a epidemia de Ebola na África em 2014 e a pandemia de COVID-19 (Coronavirus disease 2019) em 2020 (BURRELL *et al.*, 2017; WHO, 2023A).

Em primeiro lugar, uma virose emergente é caracterizada como a infecção desencadeada por um determinado vírus que não era reconhecido previamente em uma espécie de hospedeiro, ou uma infecção que já era conhecida, mas que se expandiu geograficamente e para um novo nicho ecológico (FLINT *et al.*, 2015; BURRELL *et al.*, 2017). Porém, para que ocorra a transmissão de um vírus entre diferentes espécies, alguns fatores devem ser levados em consideração, como características ecológicas, características virais e dos hospedeiros (FLINT *et al.*, 2015).

Além disso, também necessitam ser consideradas condições que afetam a emergência viral, como propriedades do vírus, aspectos relacionados a resistência do hospedeiro, proximidade do homem com animais, fatores que alteram a transmissão, como clima, exposição, densidade e crescimento populacional humano, densidade e exposição a vetores, e alterações em ambientes naturais. Esses elementos podem ocorrer simultaneamente ou não para desencadear a emergência da doença (FLINT *et al.*, 2015; BURRELL *et al.*, 2017).

Para que um vírus de origem animal sustente a transmissão entre humanos, alguns estágios evolutivos devem ocorrer. De acordo com Wolfe e colaboradores

(2007) e Burrell e colaboradores (2017) são necessários cinco estágios para a emergência de uma infecção zoonótica em populações humanas. Inicialmente, o vírus circula apenas entre hospedeiros animais. No segundo estágio ocorre a infecção primária do vírus para humanos, mas não ocorre transmissão entre humanos. No terceiro estágio o vírus pode causar alguns ciclos de transmissão secundária entre humanos, mas a transmissão cessa rapidamente. O quarto estágio é caracterizado pela existência de um ciclo natural (silvestre) onde os seres humanos são infectados por transmissão primária do hospedeiro animal, e que também pode desencadear longos surtos de transmissão secundária entre humanos. O quinto e último estágio é definido pela transmissão exclusiva e/ou sustentada do vírus entre humanos. Vale salientar que não são todos os vírus que avançam por todo esse processo e que ao longo dele novas linhagens virais portadoras de mutações que favorecem a infecção nos novos hospedeiros podem ser selecionadas. A figura 6 evidencia esses estágios com exemplos de espécies virais (WOLFE *et al.*, 2007; BURRELL *et al.*, 2017).

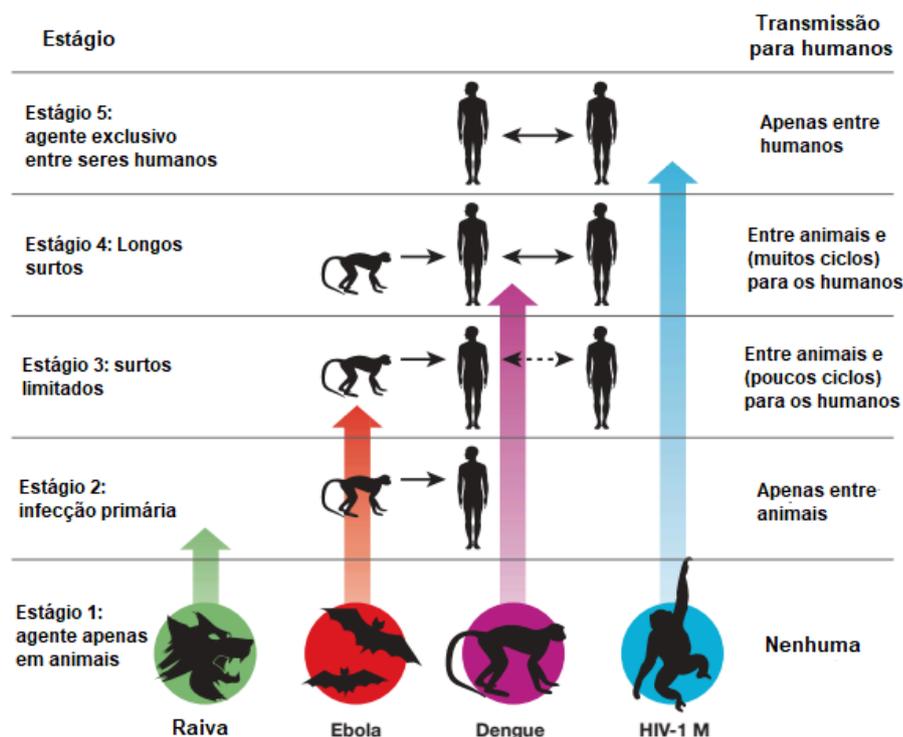


Figura 6: Estágios para a emergência de uma zoonose viral na espécie humana. Modelo que propõe cinco estágios principais para a expansão de um patógeno circulante apenas em animais se estabelecer como causador de doença em humanos. Para cada estágio é demonstrado um vírus, destaque para o vírus da raiva transmitido para humanos apenas por animais e para o HIV com transmissão sustentada humano-humano. Fonte: WOLFE *et al.*, 2007.

Ainda, estudos recentes evidenciaram que vírus que demonstram alta plasticidade de hospedeiros (capazes de infectar uma gama de hospedeiros diversa) apresentam mais chances de se disseminar geograficamente e possuem maior propensão a cruzar a barreira das espécies e ocasionar transmissão entre humanos, sendo que as doenças desencadeadas por esses vírus podem demonstrar então maior potencial pandêmico (JOHNSON *et al.*, 2015).

São exemplos relevantes de viroses emergentes as causadas pelos arbovírus (*arthropod borne viruses*), dentre esses destacam-se quatro importantes vírus capazes de causar epidemias, o vírus da Febre Amarela (YFV), o vírus da Dengue (DENV), o vírus Chikungunya (CHIKV) e o vírus Zika (ZIKV). Esses ainda demonstram grande importância em termos de saúde pública na América Latina e causam preocupação devido ao potencial de disseminação global e pela possível capacidade de se adaptar a novos hospedeiros (HIGUERA e RAMÍREZ, 2019).

No início de 2019, a Organização Mundial da Saúde (OMS) ranqueou dez importantes ameaças à saúde global, e dentre elas estão incluídas doenças infecciosas emergentes causadas por vírus com potencial epidêmico e que geralmente apresentam alta letalidade. Foram incluídos nessa lista os patógenos relacionados ao Ebola, a várias outras febres hemorrágicas, Dengue, Zika, Nipah, Influenza pandêmica, Síndrome respiratória aguda grave (SARS) e Síndrome respiratória por coronavírus do Oriente Médio (MERS-CoV) (WHO, 2019A).

Também podemos citar os hantavírus, os quais apresentam ampla distribuição geográfica e são mantidos na natureza ocasionando infecções crônicas em roedores. As febres hemorrágicas por hantavírus são graves e apresentam alta letalidade (BI *et al.*, 2008; JONSSON *et al.*, 2010).

Além desses exemplos, também podem ser mencionados os ortopoxvírus. Atualmente, após a erradicação da varíola, uma extensa parcela da população não possui imunidade contra essa doença e contra outras infecções desencadeadas por ortopoxvírus zoonóticos. Nesse sentido, esses vírus merecem destaque devido a sua ampla distribuição geográfica e a ocorrência frequente de surtos não só em uma extensa gama de animais silvestres e domésticos, mas nos seres humanos (ESSBAUER *et al.*, 2010; SHCHELKUNOV, 2013; SILVA *et al.*, 2021; WHO, 2022D).

1.3 Classe Mammalia e vírus zoonóticos

A frequente interação do ser humano com o meio ambiente é condição favorável para a transmissão de patógenos interespecies (KARESH *et al.*, 2012; BURRELL *et al.*, 2017). Nesse contexto, destaca-se o papel do contato próximo entre humanos e animais que abrigam agentes patogênicos zoonóticos na possível ocorrência de *spillover* (WHO, 2015; PLOWRIGHT *et al.*, 2017; FAGRE *et al.*, 2022).

Com relação às classes de cordados, a maioria dos patógenos humanos oriundos de animais surgiram dos mamíferos (classe Mammalia) e das aves (classe Aves). E considerando a barreira entre espécies, esse cenário é o esperado devido à maior proximidade filogenética desses grupos com os seres humanos (WOLFE *et al.*, 2007; OLIVAL *et al.*, 2017).

Nesse contexto, um estudo conduzido por Olival e colaboradores (2017) analisou interações de várias espécies virais com mamíferos e evidenciou que animais incluídos nas ordens Chiroptera (morcegos), Primatas (primatas não humanos - PNH) e Rodentia (roedores) tiveram maior proporção de vírus zoonóticos em comparação a outros grupos de mamíferos (Figura 7). Além disso, esses dados sinalizam para a importância desses animais como alvos para vigilância e descoberta de novos vírus (MORSE *et al.*, 2012; OLIVAL *et al.*, 2017). Ainda, em referência ao estudo de Olival e colaboradores (2017), as famílias virais destacadas como as mais presentes em roedores são *Peribunyaviridae*, *Flaviviridae* e *Arenaviridae*, para morcegos *Peribunyaviridae*, *Flaviviridae* e *Rhabdoviridae* e para PNH a família *Herpesviridae*, seguida por *Flaviviridae*.

Entre todos os mamíferos, vale destacar os primatas não humanos, os quais têm relação com cerca de 20% das doenças humanas, mas que representam apenas 0,5% de todas as espécies de vertebrados descritas até o momento (WOLFE *et al.*, 2007). Além desses, os roedores, os quais estão distribuídos em quase todos os habitats do planeta, tem elevada abundância, apresentam alta taxa de fecundidade e interagem com os seres humanos frequentemente, também estão estreitamente relacionados a doenças humanas (WOLFE *et al.*, 2007; BURRELL *et al.*, 2017). Os roedores representam a maior ordem de mamíferos em número de espécies e podem ser descritos como reservatórios zoonóticos e vetores para uma gama de patógenos relacionados à espécie humana. Dentre os patógenos importantes relacionados aos roedores estão incluídos os vírus transmitidos por roedores (*rodent-borne viruses*),

sendo que exemplos de destaque são os vírus membros das famílias *Hantaviridae* e *Arenaviridae* (BURRELL *et al.*, 2017; DREWES *et al.*, 2017; OLIVAL *et al.*, 2017).

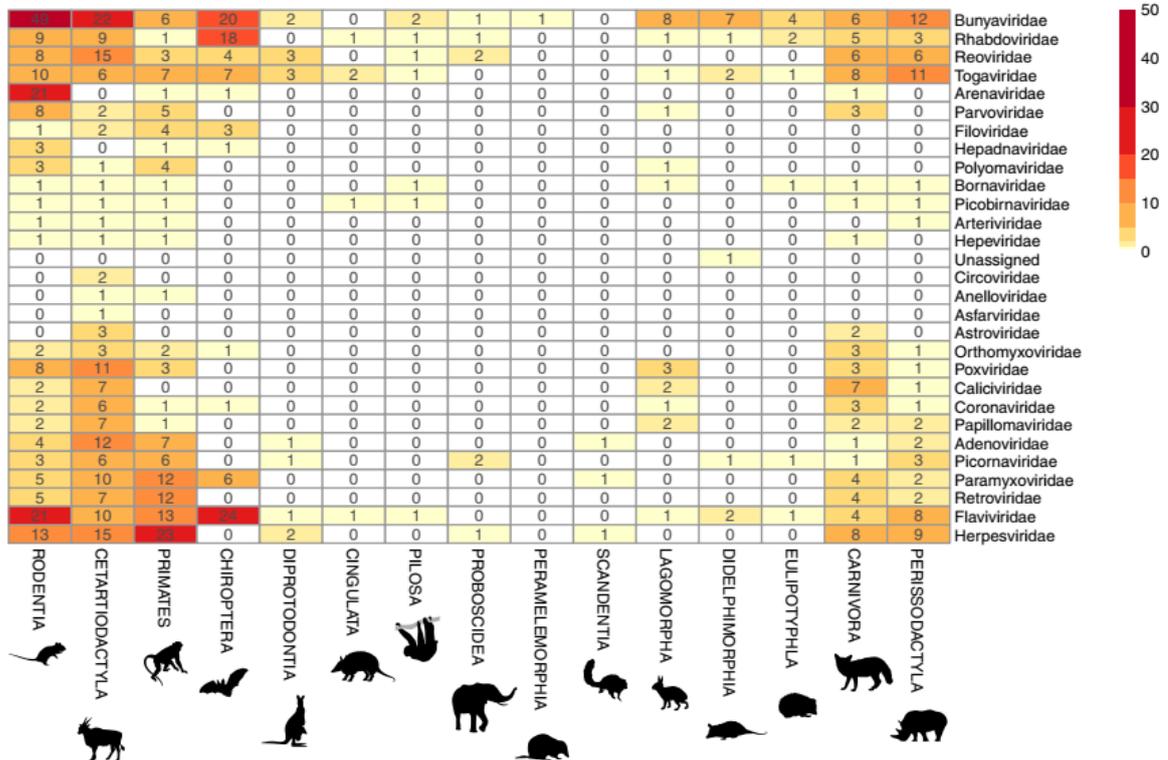


Figura 7: Diagrama evidenciando a riqueza viral por ordem de mamíferos e família viral. Quanto mais vermelho, maior a riqueza viral em determinado grupo de mamífero, com destaque para os roedores, primatas e quirópteros. Esse mapa foi gerado com base em 754 espécies de mamíferos e 586 espécies virais reconhecidas pelo ICTV. Fonte: OLIVAL *et al.*, 2017.

Ainda, estudos recentes demonstraram que a ordem Rodentia é fonte de dois terços dos vírus originários de mamíferos (JOHNSON *et al.*, 2020; KEESING; OSTFELD, 2021). Além disso, é considerável sinalizar a presença desses animais em ambientes peri-domésticos e domésticos, vivendo em contato próximo com humanos e animais domésticos. Esse contato próximo e o fato de muitas espécies de roedores conseguirem prosperar em ambientes antropizados contribuem para esses mamíferos se destacarem como fontes de patógenos zoonóticos para a espécie humana (MEERBURG *et al.*, 2009; KEESING; OSTFELD, 2021; ECKE *et al.*, 2022). Por outro lado, ainda vale salientar hábitos de vida desses mamíferos que também contribuem para espécies de roedores se tornarem reservatórios potenciais de patógenos e serem mais resilientes as alterações antrópicas, dentre eles o oportunismo e sinantropismo, a história de vida mais curta, maturidade sexual precoce, juntamente com períodos de

gestação mais curtos e ninhadas mais frequentes (MEERBURG *et al.*, 2009; HAN *et al.*, 2015; GRAVINATTI *et al.*, 2020; TIRERA *et al.*, 2021).

Com relação à distribuição de espécies de roedores na América do Sul e Brasil (Figura 8), esses mamíferos correspondem a aproximadamente 50% da fauna da América do Sul e são descritas 234 espécies da ordem Rodentia no Brasil, o que corresponde à 34,7% de todas as espécies de mamíferos do país (PAGLIA *et al.*, 2012; MAESTRI; PATTERSON, 2016) (Figura 8). Ainda, no contexto de urbanização e considerando as grandes cidades brasileiras, assim como no cenário global, estão distribuídas espécies sinantrópicas como rato doméstico (*Rattus rattus*), rato marrom (*Rattus norvegicus*) e camundongo doméstico (*Mus musculus*), os quais são roedores sabidamente relacionados ao aumento de risco de transmissão de zoonoses (ECKE *et al.*, 2022).

Além dos roedores, outro grupo da ordem Carnívora que possui representantes que podem apresentar hábitos sinantrópicos, é a família Procyonidae, especialmente os quatis (*Nasua*: Linnaeus, 1766). No Brasil, além dos quatis (*Nasua nasua*) são conhecidas mais três espécies dessa família, Jupará (*Potos flavus*), Gatiara (*Bassaricyon alleni*) e Mão-Pelada (*Procyon cancrivorus*). Esses pequenos mamíferos apresentam ampla distribuição pelos biomas brasileiros e possuem dieta onívora (Figura 8) (PAGLIA *et al.*, 2012; ICMBio, 2022).

Os quatis sul-americanos (*Nasua nasua*) têm uma dieta onívora, hábitos diurnos e terrestres, além de uma complexa estrutura social vivendo em bandos de até 30 indivíduos, com machos adultos juntando-se aos grupos apenas durante a época reprodutiva (PAGLIA *et al.*, 2012; RODRIGUES *et al.*, 2021; PROJETO QUATIS, 2022). Os quatis são animais extremamente sociáveis, sinantrópicos e oportunistas, são bem adaptados a viver perto de ambientes urbanos, interagem facilmente com humanos e são frequentemente avistados forrageando alimentos de origem humana, especialmente no lixo (FERREIRA *et al.*, 2013; RODRIGUES *et al.*, 2021; PROJETO QUATIS, 2022). A detecção de vírus zoonóticos já foi confirmada nesses pequenos mamíferos, como o Vaccinia vírus (VACV), em grupos de *Nasua nasua* habitantes de áreas verdes fragmentadas inseridas em contexto urbano (COSTA *et al.*, 2018), além da detecção de anticorpos anti-OPV nesses animais no México (GALLARDO-ROMERO *et al.*, 2016). Além disso, foi realizada a detecção de anticorpos totais contra arbovírus, *Flavivirus* e *Alphavirus*, em quatis de uma área de Mata Atlântica do Brasil (RODRIGUES *et al.*, 2023) e também a detecção do vírus da

raiva e anticorpos neutralizantes em quatis da espécie *Nasua narica*, no México (ARÉCHIGA-CEBALLOS *et al.*, 2010).

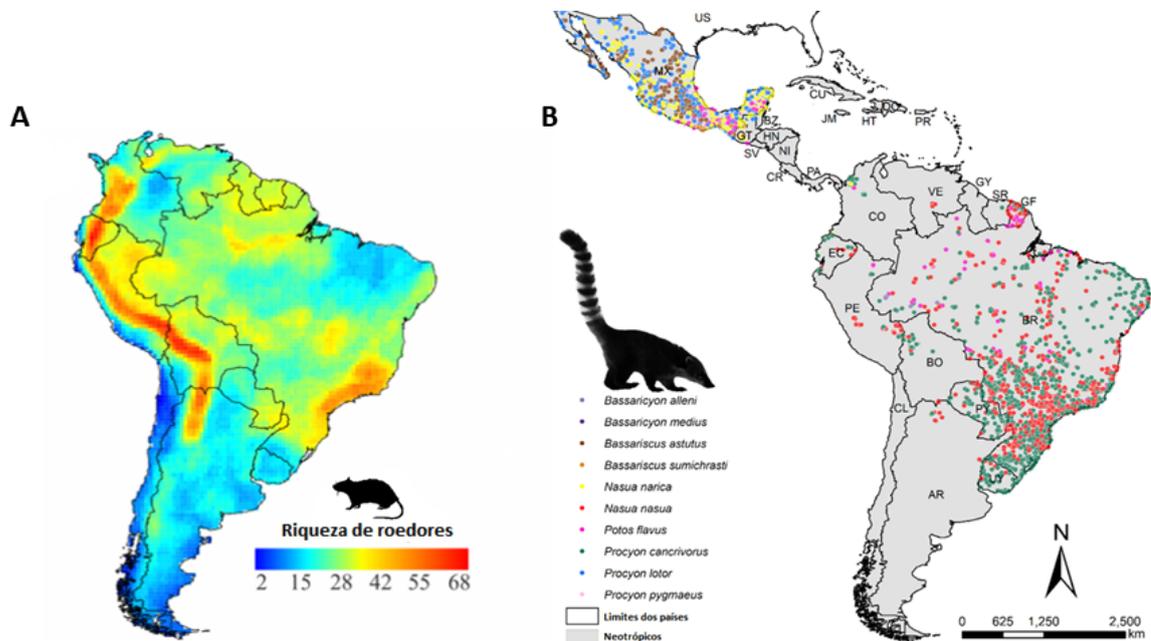


Figura 8: Riqueza de espécies de roedores e distribuição das espécies de procionídeos na América do Sul. (A) Mapa da América do Sul evidenciando a riqueza de espécies de roedores na extensão territorial do continente, as áreas em laranja e vermelho são áreas com maior riqueza. (B) Mapa da América do Sul e central dando destaque para as espécies de procionídeos e sua distribuição pelos países neotropicais desse continente. Destaque para a região sudeste do Brasil (Biomias de Mata Atlântica e Cerrado) que apresenta circulação expressiva tanto de espécies de roedores quanto de procionídeos. Fonte: Adaptado de MAESTRI; PATTERSON, 2016 e NAGY-REIS *et al.*, 2020.

1.4 Urbanização, áreas verdes e emergência de patógenos

Em todo o planeta, a urbanização e alteração de habitats naturais vêm se intensificando. Dados de 2008 mostraram que, pela primeira vez na história, mais de 50% da população humana mundial residia em áreas urbanas (UNFPA, 2007; PATEL; BURKE, 2009; HASSELL *et al.*, 2017). E, ainda, estima-se que no ano de 2030 dois terços da população mundial vai habitar áreas urbanas, sendo destaque as megacidades, grandes centros urbanos com populações com mais de 10 milhões de habitantes (JOWELL *et al.*, 2017; UNESCO, 2021).

As alterações no uso da terra e urbanização rápida e sem precedentes representam uma grande ameaça para o meio ambiente, provocando desmatamento, fragmentação ecológica, declínio e perda de biodiversidade de uma forma global (MACKENSTEDT *et al.*, 2015; HASSELL *et al.*, 2017; OFORI *et al.*, 2018). O

expressivo aumento de áreas urbanas altera radicalmente a estrutura das comunidades de vida silvestre anteriormente existentes na região urbanizada, e além das alterações locais pode provocar também consequências nas regiões naturais do entorno desses grandes centros urbanos (MACKENSTEDT *et al.*, 2015).

Nesse sentido, áreas urbanas com elevada densidade populacional, em sua maioria não planejadas e sem infraestrutura adequada, causam uma série de problemas para os seus habitantes, às populações de espécies nativas e ao ambiente. Alguns dos principais problemas a serem destacados são o aumento de temperaturas, poluição, aumento de áreas com superfície impermeável, fragmentação de habitats, alterações na hidrologia, redução da abundância e diversidade de espécies nativas, aumento de espécies não nativas. Além de outros problemas sociais incontestáveis, como desigualdade e pobreza, bem como o fato de que cidades densamente povoadas e conectadas são locais facilitadores para a transmissão de doenças respiratórias, doenças causadas por vetores, epidemias e pandemias, como observado na pandemia de COVID-19, cenário que ainda é potencializado pela enorme conectividade aérea entre os países (PATEL; BURKE, 2009; MACKENSTEDT *et al.*, 2015; JOHNSON; MUNSHI-SOUTH, 2017; BAKER *et al.*, 2021).

Diante de todo esse cenário de urbanização e alterações de comunidades naturais, a conversão de área com vegetação em superfície construída é o problema mais evidente. E, conseqüentemente, nesse caminho ocorre a redução de espaços naturais e áreas verdes e a formação de fragmentos de mata, desencadeando cada vez mais distúrbios nos ecossistemas e sua estrutura trófica, além de alterar a estrutura e composição da biodiversidade local (GODDARD *et al.*, 2010; MACKENSTEDT *et al.*, 2015; JOHNSON E MUNSHI-SOUTH, 2017; HASSELL *et al.*, 2017). Levando em consideração que a destruição de habitats e as alterações de uso da terra desencadeadas por ações antrópicas desencadeiam alterações na dinâmica dos ecossistemas e ocasionam a formação de fragmentos de mata, é relevante destacar também a formação de áreas de transição, chamadas ecótonos (Figura 9) (WEGNER *et al.*, 2022).

Considerando essa perspectiva, as áreas de floresta que abrigam grande biodiversidade cada vez mais se tornam ameaças devido ao desmatamento, especialmente por estarem mais propensas a se tornarem áreas de transição, com remanescentes de biodiversidade e alterações em sua composição de espécies. Dessa forma, essas áreas de ecótono e as áreas de borda, são relevantes no contexto

da ocorrência de DIE, já que espécies silvestres presentes nesses locais entram em maior contato com humanos, animais domesticados, de criação e sinantrópicos, elevando o risco de transmissão de patógenos zoonóticos (Figura 9) (WEGNER *et al.*, 2022). Como exemplo, observamos áreas limítrofes entre regiões de mata e pequenos povoados e/ou cidades atuando de forma significativa no contexto epidemiológico dos ciclos de transmissão de algumas arboviroses, especialmente da Febre Amarela no continente africano (MARFIN; MONATH, 2008; DOUAM; PLOSS, 2018).

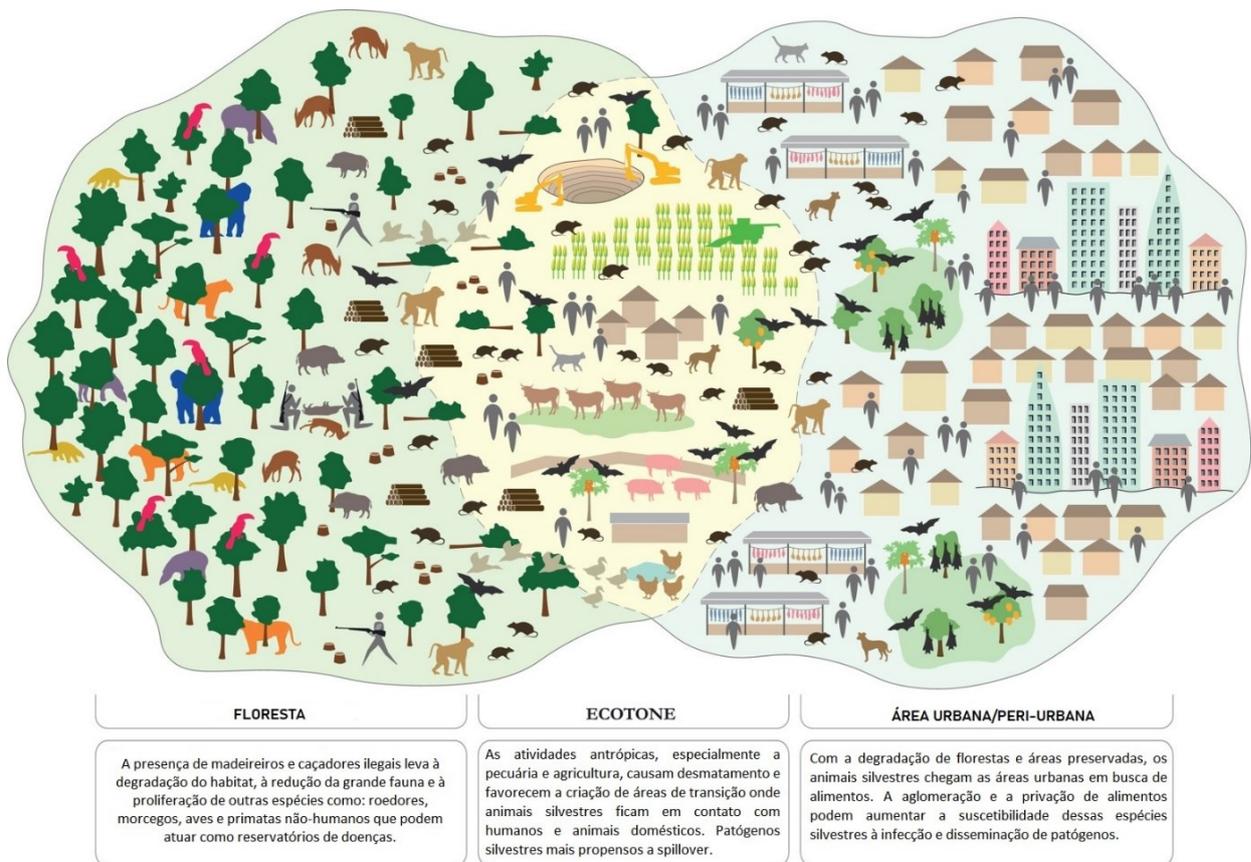


Figura 9: Desmatamento e criação de ecótonos na emergência de patógenos zoonóticos. São destacadas três regiões diferentes, áreas de floresta, ecótonos e áreas urbanas/periurbanas. A interação entre as espécies presentes nesses locais é alterada de acordo com o nível de interferência humana, e a dinâmica entre as espécies pode desencadear a transmissão facilitada de patógenos. Destaque para os remanescentes de mata inseridos dentro da área urbana como fonte interação e contato entre as espécies silvestres e sinantrópicas com a população humana. Fonte: WEGNER *et al.*, 2022.

No ambiente urbano, a definição de espaços verdes pode ser ampla e diversa, sendo incluídos como principais exemplos parques urbanos e reservas, jardins e praças, áreas verdes próximas a rios e nascentes, áreas esportivas e de recreação, áreas privadas, jardins botânicos e zoológicos, alguns tipos de cemitérios e também corredores verdes e áreas de trilhas e vias verdes (WHO, 2016; JOHNSON E

MUNSHI-SOUTH, 2017; MMA, 2021A). A presença dos espaços verdes urbanos compreende importantes benefícios nesse panorama de urbanização e perda de habitats frequente, sendo importantes para trazer benefícios e serviços ecossistêmicos, como bem estar, saúde física e mental, e qualidade de vida para o homem, melhoria de qualidade do ar e água, diminuição de poluição sonora e ilhas de calor, além de promoção, conservação e proteção da biodiversidade das espécies silvestres do local (GODDARD *et al.*, 2010; WOLCH *et al.*, 2014; MACKENSTEDT *et al.*, 2015; WHO, 2016; WHO, 2017). Além disso, de acordo com Johnson e Munshi-South (2017), os parques urbanos em alguns casos podem funcionar como fontes de diversidade genética para as áreas circundantes, contribuindo para o fluxo gênico entre as populações próximas.

Ainda, de acordo com a legislação brasileira, Art. 8º, § 1º, da Resolução CONAMA Nº 369/2006, áreas verdes de domínio público são locais com vegetação e livres de impermeabilização que exercem funções ecológicas, recreativas e paisagísticas, contribuindo para melhoria da cidade e qualidade de vida tanto no que diz respeito à qualidade ambiental, estética e funcional, e para o equilíbrio ambiental (MMA, 2021A). Além disso, de acordo com o Código Florestal (Lei nº 12.651, de 25 de maio de 2012), áreas verdes urbanas também podem ser consideradas áreas de preservação permanente (APP), sendo espaços legalmente protegidos, e unidades de conservação (UC) urbanas, e a manutenção desses locais tem reconhecido valor de conservação e do patrimônio natural, contribuindo também para funções sociais, ecológicas e educativas (BRASIL, 2012; MMA, 2021A; MMA, 2021B).

A contribuição das áreas verdes urbanas é inegável, mas nesse complexo contexto de urbanização sem planejamento e sem precedentes, conservação da biodiversidade e alterações ecológicas, mudanças de uso da terra ocasionam a alteração das interfaces de contato entre homem-vida silvestre, o que pode contribuir para mais oportunidades de emergência de patógenos zoonóticos (HASSELL *et al.*, 2017; PLOWRIGHT *et al.*, 2021). Ambientes antropizados e alterados desencadeiam uma grande interferência humana na biodiversidade e equilíbrio dos ecossistemas, e essa perturbação nas dinâmicas patógeno-hospedeiro e criação de novas interfaces de contato entre as espécies é um facilitador para eventos de emergência de zoonoses (HASSELL *et al.*, 2017; PLOWRIGHT *et al.*, 2021).

Sabe-se que a manutenção da biodiversidade natural tem efeitos benéficos na transmissão de doenças infecciosas, como por exemplo, o efeito diluidor no qual a

elevada biodiversidade pode atuar reduzindo a prevalência de patógenos, diminuindo as chances de contato entre hospedeiros, o que também pode reduzir a exposição humana a patógenos (KESSING *et al.*, 2010; KEESING; OSTFELD, 2021). Entretanto, a distribuição das espécies, densidade e abundância são fatores que atrelados a perda de biodiversidade em um determinado habitat podem afetar a ocorrência e contribuir para o aumento da transmissão de patógenos, além de fatores como probabilidade de encontros e transmissão entre hospedeiros competentes, mortalidade e taxas de recuperação de hospedeiros infectados (KESSING *et al.*, 2010; HASSELL *et al.*, 2017; KEESING; OSTFELD, 2021).

Nessa perspectiva, a preservação de ecossistemas e manutenção de biodiversidade endêmica contribuem para diminuir a prevalência de DIE, contrastando com os ambientes urbanos, com infraestrutura não planejada para áreas verdes, os quais em sua maioria apresentam um declínio de espécies nativas, fragmentação de habitats, prevalência de espécies invasivas, e barreiras para a dispersão de espécies o que conseqüentemente reduz o fluxo gênico entre as populações animais (KESSING *et al.*, 2010; GODDARD *et al.*, 2010; JOHNSON E MUNSHI-SOUTH, 2017).

Nos ambientes urbanos, pequenos mamíferos constituem parte relevante da biodiversidade e podem ser comuns (OFORI *et al.*, 2018). Entretanto, como já descrito, a perturbação das populações animais devido à urbanização pode desencadear a substituição de espécies nativas por espécies invasivas e com hábitos generalistas. Assim, é possível observar que dependendo do nível de urbanização, alteração de habitats e fragmentação, comunidades diversas de pássaros e mamíferos que possuem nichos ecológicos mais específicos e dietas mais restritivas tendem a ser substituídas por indivíduos de espécies com nicho ecológico mais amplo, generalistas, representadas principalmente por roedores, pássaros necrófagos, algumas espécies de pequenos mamíferos e morcegos (HASSELL *et al.*, 2017; HASSELL *et al.*, 2021).

Nessa paisagem urbana antropizada, os animais generalistas constituem a vida selvagem mais adaptada, e essas espécies que predominam e prosperam nesse ambiente são denominadas espécies sinantrópicas (HASSELL *et al.*, 2017; KESSING *et al.*, 2021). Esses animais com hábitos sinantrópicos geralmente são predominantes nos fragmentos de mata urbanos e são capazes de utilizar os recursos proporcionados pela vida antropizada, conseguindo sobreviver às pressões ambientais desses

espaços com alta densidade populacional humana (OFORI *et al.*, 2018; HASSELL *et al.*, 2017; HASSELL *et al.*, 2021).

Dessa maneira, levando em consideração que o contato entre vida silvestre-homem é um fator determinante para eventos de *spillover*, estudos recentes também já demonstraram que muitas espécies sinantrópicas são consideradas fontes de patógenos zoonóticos, entre eles os vírus, podendo atuar como hospedeiros reservatórios para doenças zoonóticas, o que juntamente com a elevada densidade de espécies silvestres e seres humanos favorece oportunidades de contato e possíveis eventos de *spillover* (PLOWRIGHT *et al.*, 2021; HASSELL *et al.*, 2017; UNEP, 2020). A alteração da ecologia de doenças e dinâmica de transmissão de patógenos nesses ambientes também pode colaborar para eventos de transmissão reversa, colocando em risco populações de animais, onde patógenos humanos podem causar surtos em populações de animais silvestres (*spillback*), além de ser necessário destacar que em ambientes urbanos o contato próximo da interface animais silvestres – animais domésticos – seres humanos também é importante fator de risco para desencadear eventos de emergência de zoonoses principalmente em áreas periurbanas (DITCHKOFF *et al.*, 2006; MESSENGER *et al.*, 2014; HASSELL *et al.*, 2017; BORREMANS *et al.*, 2019; PLOWRIGHT *et al.*, 2021; HASSELL *et al.*, 2021; KEESING; OSTFELD, 2021).

Mediante o exposto, e visando mitigar os impactos da urbanização na biodiversidade e reduzir as possibilidades de eventos de emergência de patógenos em áreas urbanas, se faz necessária uma gestão da biodiversidade urbana. Para atender tal gestão em um cenário satisfatório, áreas de grandes centros urbanos devem procurar investir em infraestrutura planejada e manutenção de espaços verdes urbanos naturais, o que reduz as áreas fragmentadas e auxilia na diminuição de perturbações ambientais, contribuindo para ecossistemas mais resilientes e para a manutenção da vida silvestre e biodiversidade nativa (GODDARD *et al.*, 2010; JOHNSON; MUNSHI-SOUTH, 2017; HASSELL *et al.*, 2021; PLOWRIGHT *et al.*, 2021).

Ainda, para atrelar o desenvolvimento urbano com esforços de conservação e integração com áreas verdes se faz necessário compreender as áreas de interface de contato entre as espécies (humano-animal) e priorizar estudos e programas de monitoramento e vigilância epidemiológica da circulação e dinâmica de transmissão de patógenos nas populações animais, reforçando a saúde humana e animal e as

ações para prevenção e controle de possíveis eventos de *spillover* (HASSELL *et al.*, 2017; OFORI *et al.*, 2018; HASSELL *et al.*, 2021; PLOWRIGHT *et al.*, 2021).

1.5 Arbovírus

O termo arbovírus (*arthropod borne viruses*) se refere a um grupo diverso de vírus, onde estes são transmitidos para seus hospedeiros vertebrados por meio de vetores artrópodes hematófagos. Esses vírus estão presentes principalmente nas regiões tropicais e subtropicais do planeta e infectam uma extensa gama de espécies vertebradas (WEAVER, 2013; YOUNG, 2018).

Para se manter na natureza os arbovírus necessitam de hospedeiros e de vetores (WEAVER e BARRETT, 2004). Os arbovírus apresentam caráter zoonótico, sendo que a emergência e reemergência desses vírus é responsável por ocasionar taxas significativas de morbidade e mortalidade nas populações humanas (WEAVER; BARRETT, 2004; YOUNG, 2018).

Os ciclos de transmissão dos arbovírus são complexos e diferem para as diferentes espécies virais. Geralmente os vírus são mantidos na natureza em um ciclo silvestre, sendo que os principais vetores envolvidos nos ciclos de transmissão desses vírus são mosquitos, carrapatos e flebotomíneos. Nos ciclos enzoóticos, os hospedeiros costumam ser principalmente pássaros, pequenos mamíferos e primatas não humanos. Eventos de *spillover* ocorrem quando um vetor infectado pica um homem ou animal doméstico inserido próximo a essas áreas de transmissão silvestre. Ainda, no contexto de transmissão dos arbovírus é importante o estado virêmico dos hospedeiros vertebrados, além da presença de vetores competentes para ocorrência de novos ciclos de transmissão em novos hospedeiros susceptíveis (Figura 10) (WEAVER; BARRETT, 2004; GOULD *et al.*, 2017; YOUNG, 2018). Nesse cenário, os humanos e outros animais como os equídeos são considerados hospedeiros finais não reservatórios (“dead-end-host”) para um grande número de arbovírus, já que estes não apresentam viremia suficiente e assim não seriam eficientes para infectar um vetor (WEAVER; BARRETT, 2004; GUBLER, 2002).

Em contrapartida, vale destacar que para alguns arbovírus são descritas transmissão entre humanos por mosquitos vetores, sendo exemplos os vírus da Dengue, Zika, Febre Amarela e Chikungunya (PAIXÃO *et al.*, 2018; YOUNG, 2018). Também é importante a ocorrência de transmissão vertical para os arbovírus, que

ocorre em algumas espécies de mosquitos vetores de uma fêmea infectada para sua prole (LEQUIME; LAMBRECHTS, 2014).

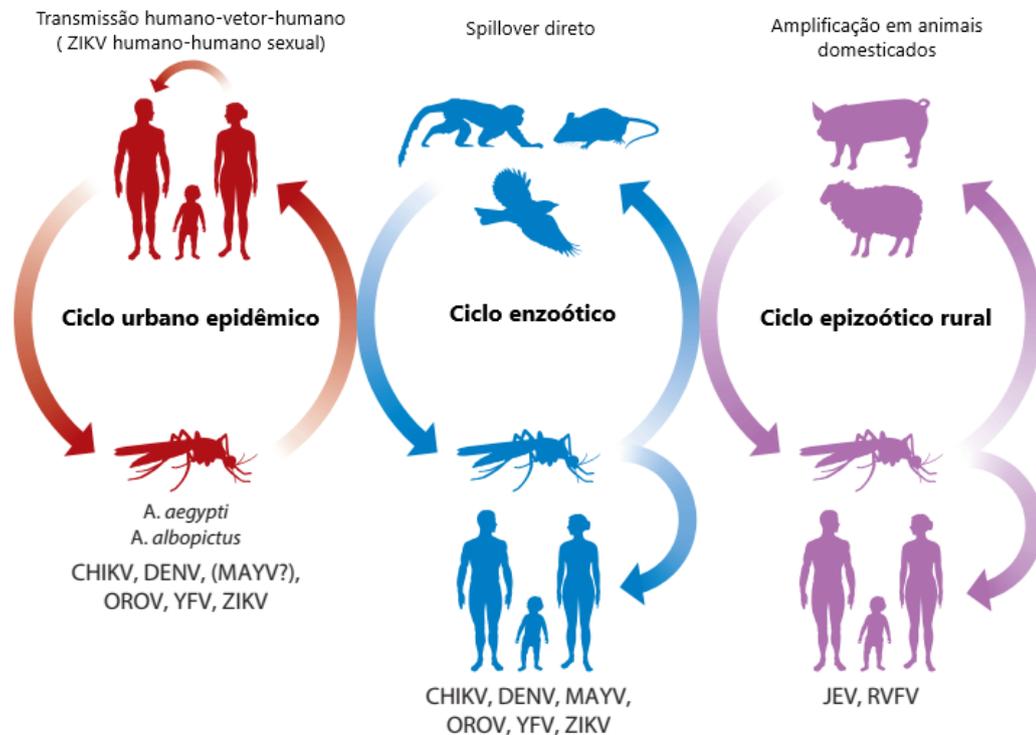


Figura 10: Ciclos de transmissão dos arbovírus. A figura ilustra o caráter zoonótico desses vírus. No ciclo urbano é demonstrada a transmissão entre humanos por meio de mosquitos, *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. No ciclo enzoótico estão envolvidos hospedeiros animais e os vetores artrópodes, sendo que nesse ciclo os humanos se infectam acidentalmente, ao ter contato com esses ambientes. Ainda, alguns arbovírus como o vírus da Encefalite Japonesa, estabelecem um ciclo epizootico rural, favorecendo *spillover* e causando epidemias em ambientes rurais. Fonte: Adaptado de WEAVER *et al.*, 2018.

Com relação à ocorrência de infecções por arbovírus na espécie humana, a maioria delas é relacionada a três famílias virais, *Togaviridae*, *Flaviviridae* e *Peribunyaviridae* (YOUNG, 2018). Diante disso, ressalta-se que os vírus de RNA são o maior número e que para a América do Sul os arbovírus mais relevantes são das famílias *Togaviridae* e *Flaviviridae* (HIGUERA; RAMÍREZ, 2019).

No Brasil, os arbovírus que demonstram mais impacto na saúde pública são o vírus da Dengue (DENV), o vírus da Febre Amarela (YFV), o vírus Zika (ZIKV) e o vírus Chikungunya (CHIKV) (FIGUEIREDO, 2016; PAIXÃO *et al.*, 2018; NAVA *et al.*, 2017). Além de outros que apresentam risco de emergência como o vírus Mayaro (MAYV), o vírus da encefalite *Saint Louis* (SLEV) e o vírus Oropouche (OROV) (FIGUEIREDO, 2007).

1.6 Flaviviridae

Dentre as famílias virais que podem ser correlacionadas a ocorrência de infecções emergentes e reemergentes, a família *Flaviviridae* certamente pode ser citada como uma ameaça devido a importância que apresenta em contextos de saúde pública e saúde animal, além da sua ampla distribuição global (PANDIT *et al.*, 2018; PIERSON; DIAMOND, 2020). Contribuindo para esse potencial epidêmico estão também fatores como a transmissão através de vetores artrópodes e o extenso espectro de hospedeiros, especialmente mamíferos e aves, que esses vírus são capazes de infectar (PANDIT *et al.*, 2018; PIERSON; DIAMOND, 2020).

O termo *Flaviviridae* deriva do latim “flavus” que significa amarelo. Essa família é dividida em quatro gêneros: *Flavivirus*, *Pestivirus*, *Hepacivirus* e *Pegivirus*. Dentre estes, o gênero *Flavivirus* compreende o maior número de espécies, 53 espécies virais, dentre elas o *Yellow fever virus* (YFV), *Dengue virus* (DENV), *West Nile virus* (WNV), *Japanese encephalitis virus* (JEV), *Zika virus* (ZIKV), *Saint. Louis encephalitis virus* (SLEV) e *Usutu virus* (USUV), conhecidas por serem importantes patógenos humanos e animais (LINDENBACH *et al.*, 2013; SIMMONDS *et al.*, 2017; WEAVER *et al.*, 2018; PIERSON; DIAMOND, 2020).

Quanto à morfologia, os vírions são esféricos, possuem capsídeo icosaédrico e as partículas apresentam diâmetro em torno de 40 - 60 nm. São vírus envelopados e apresentam genoma de RNA de fita simples, polaridade positiva (LINDENBACH *et al.*, 2013). As partículas apresentam três proteínas estruturais, a proteína (C) do capsídeo que envolve o genoma, as proteínas do envelope (E) e de membrana (M) (LINDENBACH *et al.*, 2013; SIMMONDS *et al.*, 2017).

O genoma viral apresenta em torno de 11.000 nucleotídeos (11 kb) possuindo apenas uma fase aberta de leitura (ORF – Open Reading Frame), flanqueada por regiões não codificadoras (NCR) em ambas as extremidades, 5' com aproximadamente 100 nucleotídeos e 3' de 400 a 700 nucleotídeos. A tradução do RNA codifica apenas uma poliproteína, que posteriormente é clivada por proteases virais e celulares para a formação das proteínas virais maduras. São codificadas três proteínas estruturais (C – prM – E) próximas a extremidade 5', seguidas por sete proteínas não-estruturais (NS) (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) que estão relacionadas com a replicação do genoma e montagem das novas partículas virais (Figura 11) (LINDENBACH *et al.*, 2013; SIMMONDS *et al.*, 2017).

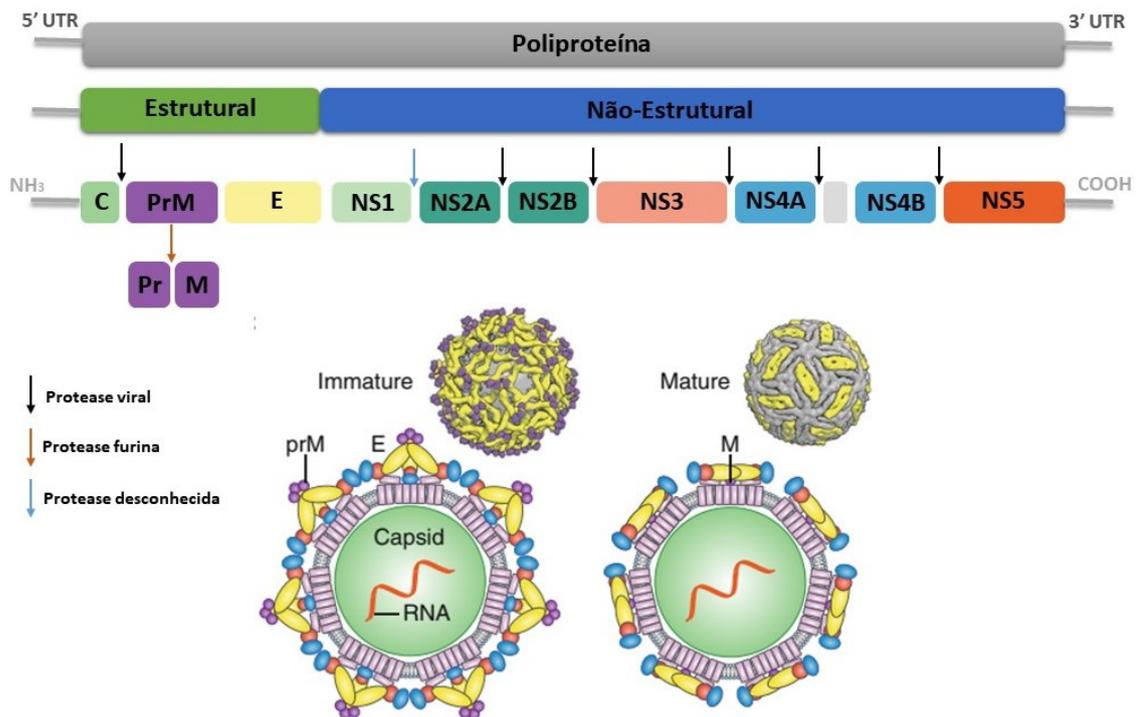


Figura 11: Organização do genoma e estrutura de partícula dos flavivírus. Destaque para a poliproteína que é clivada por proteases celulares e virais para dar origem às proteínas estruturais e não-estruturais do vírus. Nas partículas imaturas a proteína precursora (prM) ainda não foi clivada em proteína (M) para dar origem a partícula madura. Fonte: Adaptado de PIERSON; DIAMOND, 2020.

1.6.1 Febre Amarela

A Febre Amarela (FA) é conhecida como a febre hemorrágica viral original, caracterizando-se como uma doença sistêmica capaz de desencadear quadros hemorrágicos e apresentar alta letalidade (MARFIN; MONATH, 2008; KLITTING *et al.*, 2018). O vírus da Febre Amarela (YFV) é um vírus envelopado, de capsídeo icosaédrico com genoma de RNA fita-simples, polaridade positiva. Assim como os outros flavivírus, o YFV apresenta diâmetro aproximado de 50 nm, sendo um vírus relativamente pequeno quando comparado a outros já identificados na virosfera (BARRETT, 2001; LINDENBACH *et al.*, 2013; GARDNER; RYMAN, 2010).

Até o momento, é descrito um único sorotipo para o YFV e 7 genótipos virais. Dentre os genótipos descritos, 5 são encontrados na África e 2 na América do Sul. Estudos filogenéticos sugerem que o YFV teve sua origem na África e foi introduzido e disseminado para a América do Sul através dos navios de comércio e tráfico negreiro no século XVI (LEPINEIC *et al.*, 1994; MUTEBI *et al.*, 2001; BARRETT; HIGGS, 2007; MARFIN; MONATH, 2008; MONATH; VASCONCELOS, 2015).

A Febre Amarela é endêmica nas regiões tropicais da América do Sul e da África (Figura 12). É considerada uma doença reemergente devido ao aumento do número de casos nos últimos 25 anos, mesmo com a existência de uma vacina efetiva. A cada ano são relatados cerca de 200.000 casos dessa febre hemorrágica viral acompanhados por cerca de 30.000 mortes, porém acredita-se que esses números são subestimados e a incidência real seja de 10-250 vezes maior. De acordo com a Organização Mundial da Saúde, 47 países são considerados áreas endêmicas para a FA, sendo 37 países africanos e 13 pertencentes à América do Sul e Central (MONATH, 2001; BARRETT; HIGGS, 2007; MONATH; VASCONCELOS, 2015; WHO, 2019B; PAHO, 2023A).

O YFV infecta primatas não humanos (PNH) e humanos nas regiões endêmicas. Esse vírus é transmitido para seus hospedeiros por intermédio de um mosquito vetor. Na África, estão envolvidos na transmissão os mosquitos do gênero *Aedes*, enquanto na América do Sul, além deste gênero estão compreendidos também os gêneros *Haemagogus* e *Sabethes* (BARRETT; HIGGS, 2007; GARDNER; RYMAN, 2010).

São descritos três tipos de ciclos para a FA. No ciclo silvestre, o vírus é mantido na natureza pela transmissão entre mosquitos silvestres e PNH em florestas tropicais da África e América do Sul. Na África, este ciclo tem como principal vetor a espécie *Aedes africanus*, e na América os vetores principais neste ciclo são *Haemagogus janthinomys*, *H. leucocelaenus* e *Sabethes chloropterus*. Nos dois continentes os hospedeiros vertebrados divergem, e outro fator a ser considerado é que as espécies de PNH das Américas geralmente sofrem de FA fatal, enquanto no continente Africano os hospedeiros apresentam infecções mais brandas e em muitos casos subclínicas. Neste ciclo silvestre casos humanos podem ocorrer de forma esporádica, quando o homem adentra nessas áreas de mata (BARRET, 2001; BARRETT; HIGGS, 2007; GARDNER; RYMAN, 2010; SILVA *et al.*, 2020; SACCHETTO *et al.*, 2020).

Na África também pode ser caracterizado um ciclo intermediário, ou ciclo de savana. Esse ciclo ocorre em áreas úmidas de savana próximas a áreas de florestas tropicais, com a presença de atividades humanas como aldeias rurais e terras agrícolas. Nesse ciclo, os mosquitos vetores se alimentam tanto em PNH quanto em humanos (MUTEBI; BARRETT, 2002; BARRETT; HIGGS, 2007; MARFIN; MONATH, 2008).

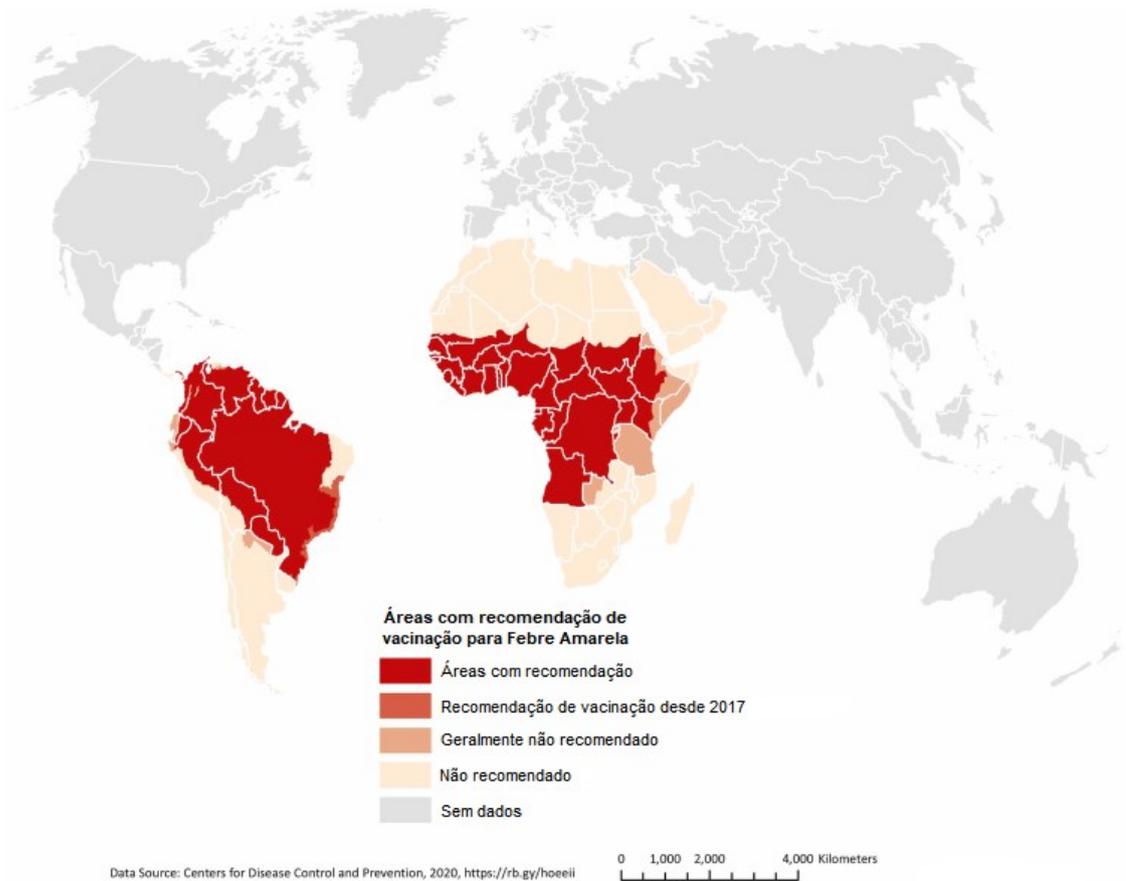


Figura 12: Países endêmicos para a Febre Amarela e as regiões com recomendação de vacinação. Em vermelho, áreas com recomendação de vacinação, áreas com vacinação geralmente não recomendada (laranja claro), locais sem recomendação de vacina (alaranjado mais claro e cinza). Para o Brasil em laranja escuro, área com recomendação de vacinação desde 2017, porém atualmente todo território é considerado área com recomendação de vacina. Fonte: Adaptado de SACCHETTO *et al.*, 2020 e CDC, 2018B.

O ciclo urbano caracteriza-se pela transmissão do YFV entre humanos pelo *Aedes aegypti*. Esse ciclo é motivo de notável preocupação, pois pode facilmente desencadear epidemias. Nesse ciclo, o principal hospedeiro é o homem e a transmissão da doença pode acontecer de forma mais rápida, devido à alta densidade do mosquito vetor e a possível limitada imunização dos indivíduos residentes em áreas urbanas (MUTEBI; BARRET, 2002; BARRETT; HIGGS, 2007; WHO, 2019B). No Brasil, o último caso de FA urbana registrado ocorreu em 1942. Em contraste, na África o ciclo urbano é bem mais frequente, e em 2016 foi registrada uma epidemia sem precedentes de FA urbana na Angola e República Democrática do Congo, com 393 óbitos confirmados pela OMS e registro de disseminação para outros países, incluindo caso fatal para na China (KRAEMER *et al.*, 2017; BRASIL, 2019a; EYE, 2018).

A FA tem caráter zoonótico e normalmente os casos identificados em humanos são precedidos por epizootias (transmissão intensa de um agente patogênico entre os animais hospedeiros naturais) em PNH. A ocorrência de epizootias em PNH é um alerta para a circulação do YFV e possível transmissão para os seres humanos, sendo os PNH considerados animais sentinelas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

Considerado o ciclo silvestre do YFV e a escassez de estudos buscando entender a circulação do vírus em outros hospedeiros e o possível impacto na vida silvestre e transmissão do YFV, é importante destacar o estudo de Thoisy e colaboradores (2004) que realizou um inquérito sorológico para detecção de anticorpos neutralizantes anti-YFV em pequenos mamíferos na Guiana Francesa. Foram encontrados anticorpos neutralizantes em primatas além de outros mamíferos silvestres como: cotia e porco-espinho (Rodentia), porco do mato (Artiodactyla), lrrara (Carnivora) e preguiças e tamanduás (Xenarthra). Esse estudo evidencia que outras espécies de mamíferos, não só humanos e PNH, podem ser hospedeiros potenciais para o YFV (THOISY *et al.*, 2004). Esses dados suportam a hipótese de que o vírus poderia circular em outras espécies de mamíferos em remanescentes florestais próximos a matrizes urbanas e que essas espécies poderiam desempenhar um papel na dinâmica de circulação do YFV em ambientes urbanos e periurbanos das grandes cidades do Brasil.

No Brasil, a última epidemia urbana de FA ocorreu no Rio de Janeiro em 1929, registrando 478 óbitos. Em 1942 foram registrados 3 casos no Acre, e desde esta data não há confirmação de ciclo urbano da doença (BARRETT, 2001; COSTA *et al.*, 2011). Em dezembro de 2016, iniciou-se no país uma das mais significativas epidemias de FA silvestre já reportadas, com casos registrados em regiões que historicamente apresentavam pouca ou nenhuma circulação do YFV. Dados divulgados pelo Ministério da Saúde desde 1980 compõem uma série histórica da doença, e desde então esse último surto foi o maior já registrado (Figura 13) (SACCHETTO *et al.*, 2020). Segundo o Ministério da Saúde, foram registrados nessa epidemia 2.155 casos humanos, acompanhados de 745 óbitos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018A; DOUAM; PLOSS, 2018). A reemergência silvestre de FA no Brasil teve como epicentro a região sudeste do país, a mais densamente povoada, com destaque para maior número de casos registrados em Minas Gerais e São Paulo. Nessa região grande contingente populacional se encontrava susceptível, já que os estados afetados não eram

considerados como áreas de recomendação de vacinação (POSSAS *et al.*, 2018; BRASIL, 2019; STOFFELLA-DUTRA *et al.*, 2020).

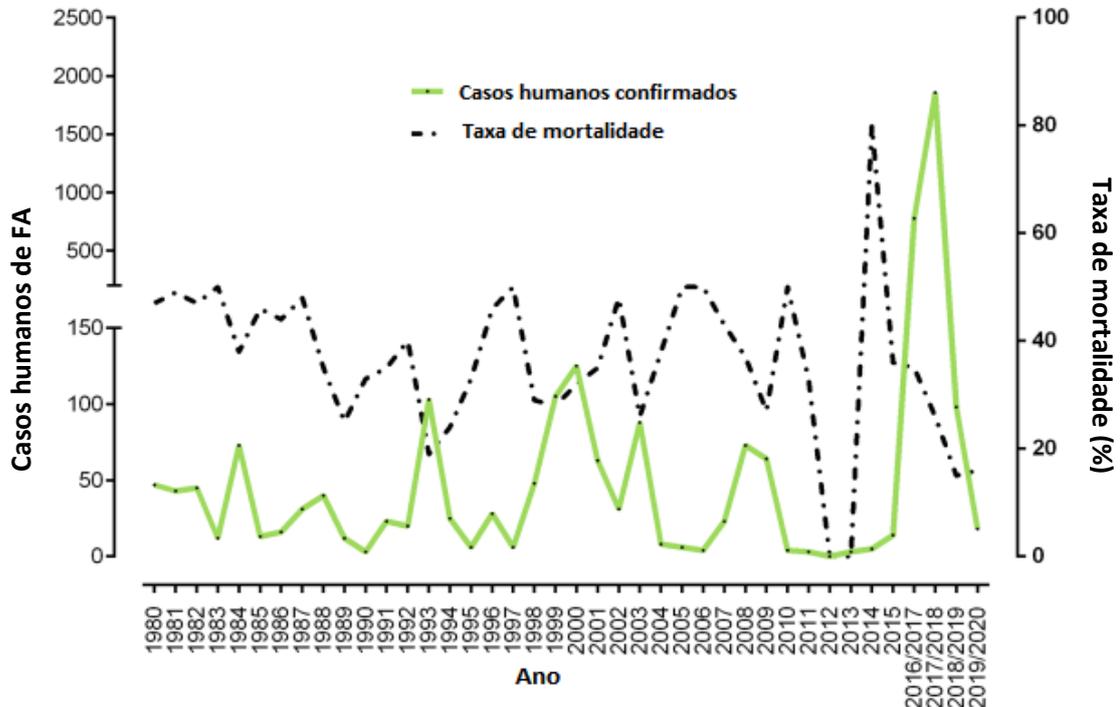


Figura 13 – Gráfico com série histórica do número de casos humanos de FA no Brasil. Casos de FA linha verde e a letalidade pontilhado em cinza. Dados do Ministério da Saúde, de 1980 até o período de monitoramento de 2019/2020, com destaque para a emergência extra-amazônica principalmente a partir dos anos de 2016/2017. Fonte: SACCHETTO *et al.*, 2020.

O grande impacto em saúde pública desencadeou ações de vigilância, prevenção e resposta, onde foram distribuídas em torno de 68,9 milhões de doses de vacinas entre 2017 e 2018 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018B; POSSAS *et al.*, 2018). Estudos de vigilância genômica baseados em inferências filogenéticas de amostras de YFV provenientes da epidemia de FA de 2016-2019 demonstraram que as linhagens de YFV que circulantes apresentavam uma alta identidade com o genótipo Sul-Americano I, linhagem 1E (MIR *et al.*, 2017; FARIA *et al.*, 2018; REZENDE *et al.*, 2018; DELATORRE *et al.*, 2019).

Ainda, no que diz respeito ao cenário epidemiológico no estado de Minas Gerais, merecem destaque a ocorrência de epidemias nos anos de 2001, 2003 e as epidemias dos períodos de monitoramento 2016/2017 e 2017/2018. De 1989 a 2023, foram registrados 1116 casos de Febre Amarela Silvestre em humanos no estado, sendo o período de 2016 a 2018 responsável por 1006 casos (90.1%) desse total.

Ressalta-se a proximidade da epidemia com os grandes centros urbanos do estado, abrigando um grande contingente populacional (SES, 2021; SES, 2022).

Desde 2019 não são registrados casos humanos de Febre Amarela no estado, porém nos períodos de monitoramento de 2021/2022 e 2022/2023 foram confirmadas 22 epizootias em PNH, o que evidencia a manutenção da circulação silvestre do vírus no estado, sendo uma dessas epizootias confirmadas em Belo Horizonte em 2021/2022 (SES, 2021; SES, 2022). Ainda, em Belo Horizonte foram confirmadas quatro epizootias em PNH nos anos de 2016 e 2017, destacando a proximidade dessa circulação enzoótica viral nos anos recentes e próxima a grandes centros urbanos (PBH, 2017A).

1.6.2 Dengue

O *Dengue virus* (DENV) pertence ao gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae* e compreende 4 sorotipos (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4). Esses sorotipos demonstram uma ampla variabilidade genética já que dentro de cada sorotipo são identificados genótipos distintos (PIERSON; DIAMOND, 2013; WHO, 2019C). O DENV é um vírus envelopado de simetria icosaédrica, que apresenta genoma de RNA fita-simples, polaridade positiva com aproximadamente 10.7 kb (KUHN *et al.*, 2002; PIERSON; DIAMOND, 2013).

Acredita-se que o ancestral dos quatro sorotipos de DENV tenha se originado de um ciclo silvestre envolvendo primatas não humanos e mosquitos há cerca de 1000 anos atrás. Ainda, o salto de espécies e a transmissão para os seres humanos dos quatro sorotipos do vírus ocorreram de forma independente provavelmente na África ou no sudeste da Ásia entre 100 e 800 anos atrás (CDC, 2019; HOLMES *et al.*, 2003). As áreas de circulação viral foram expandidas principalmente nos séculos XVIII e XIX através das atividades de transporte comercial, e já no início do século XX a dengue se apresentava como um problema significativo de saúde pública em grande parte dos países tropicais (GUBLER, 1997; GUBLER, 2002).

Atualmente a dengue é a arbovirose que mais afeta os seres humanos em âmbito mundial, sendo que nos últimos 50 anos a incidência da doença aumentou drasticamente (KYLE; HARRIS, 2008; BHATT *et al.*, 2013; MESSINA *et al.*, 2019). A Organização Mundial da Saúde estima que aproximadamente 100-400 milhões de infecções ocorrem anualmente e considera-se que mais de 100 países em todo o

mundo são áreas endêmicas para a doença. Entretanto, países das Américas, Sudeste Asiático e Pacífico Ocidental são os atualmente mais afetados por epidemias de Dengue (CDC, 2019; WHO, 2022A). Não obstante, de acordo com o estudo de Brady e colaboradores (2012), cerca de 4 bilhões de pessoas estão em áreas de risco de infecção pelo DENV principalmente em regiões tropicais e subtropicais (Figura 14), e estima-se que 390 milhões de pessoas são infectadas anualmente (BHATT *et al.*, 2013; WHO, 2022A).

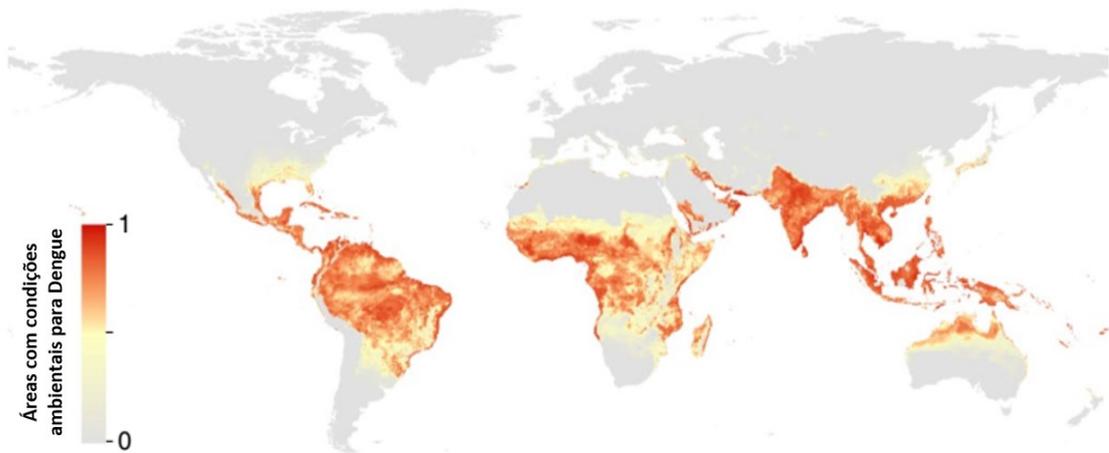


Figura 14: Regiões do planeta com predisposição para transmissão do DENV. Mapa de calor evidenciando uma projeção das principais áreas do mundo que apresentam características ambientais para transmissão do Dengue vírus. Destaque para as regiões tropicais e subtropicais. Fonte: MESSINA *et al.*, 2019.

A Dengue é uma doença febril aguda causada pelos quatro sorotipos do vírus, sendo que a infecção por um sorotipo não gera imunidade contra outros. A infecção por DENV pode causar um amplo espectro de manifestações, sendo a maioria dos casos assintomáticos e casos leves a moderados, de acordo com a OMS os casos de dengue estão categorizados em dengue, com ou sem sinais de alerta, e dengue grave (WHO, 2022A).

A circulação do DENV na natureza é mantida pela ocorrência de dois ciclos, um silvestre ou enzoótico e um ciclo urbano. No ciclo silvestre o vírus é transmitido entre primatas não humanos por mosquitos vetores *Aedes spp.* Esses ciclos silvestres ocorrem nas florestas do sudeste da Ásia e oeste da África (VASILAKIS *et al.*, 2011; HANLEY *et al.*, 2014). O ciclo urbano pode ser encontrado em diversos centros urbanos dos trópicos onde a dengue é endêmica e representa grande impacto na saúde pública. Nesse contexto a transmissão ocorre entre seres humanos através do vetor *Aedes aegypti*, além da possível competência vetorial relacionada a vetores da

espécie *Ae. albopictus* (GUBLER, 2002; DE FIGUEIREDO *et al.*, 2010; SUKHRALIA, *et al.*, 2019; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

Ainda, é relevante sinalizar que o DENV é o único entre os arbovírus que evoluiu e se adaptou a transmissão exclusiva entre seres humanos, eliminando assim a necessidade do ciclo enzoótico para se manter nos ambientes urbanos (GUBLER, 2002). Além disso, na América do Sul o ciclo silvestre não foi reconhecido e os mamíferos silvestres não possuem papel confirmado nesse ciclo embora anticorpos neutralizantes contra o DENV já tenham sido identificados em animais como marsupiais, morcegos e roedores nesse continente (THOISY *et al.*, 2009; GWEE *et al.*, 2021). Os resultados moleculares de Thoisy e colaboradores (2009) evidenciaram que os vírus dos 4 sorotipos de DENV encontrados nas amostras de mamíferos neotropicais eram divergentes daqueles que circulavam em populações humanas das áreas circundantes durante o período analisado, sugerindo uma circulação independente do vírus em ambientes florestais. A detecção do DENV em outras espécies de mamíferos, além de PNH, reforça a possibilidade de circulação desse vírus em outros hospedeiros vertebrados e sinaliza para a possível circulação viral em áreas de mata próximas a ambientes urbanos.

Nos últimos 35 anos todos os quatro sorotipos do vírus da dengue foram introduzidos no Brasil e o vírus foi responsável por ocasionar várias epidemias com mais de 10.000.000 casos e milhares de mortes. Atualmente a dengue é a doença infecciosa mais frequente no Brasil e com a circulação dos quatro sorotipos, essa pode ser considerada hiper endêmica nos centros urbanos do país. Dentre os países da América do Sul, o Brasil está entre os mais afetados pela doença. Somente no ano de 2018 foram confirmados 174.724 casos de dengue no território nacional. De acordo com boletins epidemiológicos, no ano de 2022 o número de casos prováveis da doença pode ter chegado a 1.450.270 casos (taxa de incidência de 679,9 casos por 100 mil hab.) sendo confirmados 1016 óbitos durante o ano no país (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016; VILLABONA-ARENAS *et al.*, 2014; SALLES *et al.*, 2018; SVS, 2019; SVS, 2021; SVS, 2023).

Em Minas Gerais, de acordo com dados oficiais, foram confirmados 71.056 casos de dengue em 2022, acompanhados de 66 óbitos. O gráfico abaixo evidencia que o estado tem demonstrado elevados números de casos prováveis de Dengue nos últimos anos (SES, 2023), inclusive durante os anos de realização desse estudo (Figura 15).

Fatores que podem estar relacionados à emergência de casos de dengue e a ocorrência de epidemias cada vez mais frequentes são o crescimento populacional, a mobilidade humana, a urbanização desenfreada e a dispersão do mosquito vetor (BARRETO; TEIXEIRA, 2008).

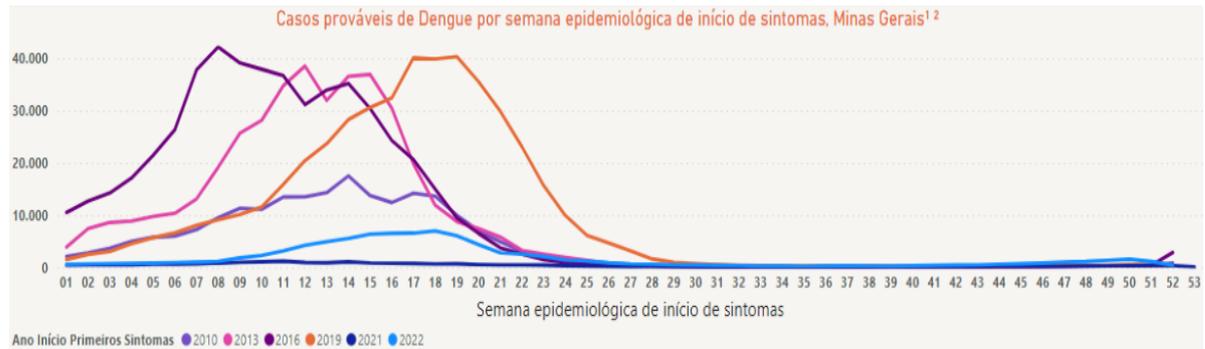


Figura 15: Número de casos prováveis de Dengue por semana epidemiológica, Minas Gerais. Casos prováveis por semana epidemiológica de início dos sintomas, nos anos de 2010 (roxo), 2013 (rosa), 2016 (roxo escuro), 2019 (laranja), 2021 (azul escuro) e 2022 (azul claro). Fonte: SES, 2023.

1.6.3 Zika

O Zika vírus (ZIKV) é um vírus envelopado de RNA fita-simples e sentido positivo, assim como os outros flavivírus, o ZIKV possui um genoma de aproximadamente 11kb (LIU *et al.*, 2019).

O ZIKV tem sua origem na África, sendo que foi identificado pela primeira vez no ano de 1947 em Uganda. Esse primeiro isolado foi proveniente de macacos Rhesus na floresta de Zika, e posteriormente em 1948, também na África, o vírus foi isolado de mosquitos *Aedes africanus* (DICK *et al.*, 1952; SONG *et al.*, 2017; WHO, 2022B).

Após a sua descoberta, o vírus foi responsável por causar infecções esporádicas em humanos na África e na Ásia, sendo que a maioria dos casos eram relacionados a quadros clínicos leves. Porém, em 2007 ocorreu o primeiro grande surto de Zika, fora das regiões da África e Ásia, na Ilha de Yap (Estados Federados da Micronésia), situada no noroeste do Oceano Pacífico. A partir de então o vírus se disseminou para a Polinésia Francesa e outras ilhas do pacífico em 2013 e 2014. Em 2015, o ZIKV ampliou ainda mais sua distribuição geográfica e ocasionou surtos no Brasil e América Latina, alcançando também a América do Norte em 2016 (Figura 16) (KINDHAUSER *et al.*, 2016; SONG *et al.*, 2017; YUN; LEE, 2017).

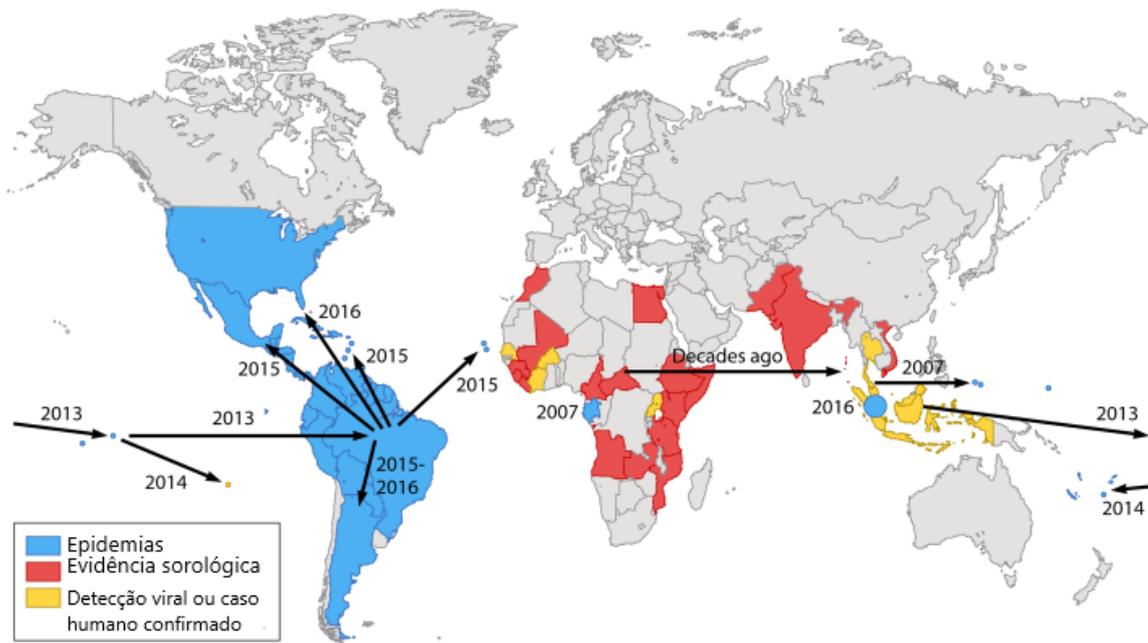


Figura 16: Surtos de Zika ao redor do globo. Desde sua emergência em 1947, o ZIKV estava confinado em países da África e no Sudeste Asiático, mas a partir de 2007 ocorreram surtos fora dessas regiões e o vírus alcançou vários outros países na última década. Fonte: WEAVER, 2017.

No Brasil, a transmissão autóctone do vírus foi confirmada inicialmente no nordeste brasileiro, e logo em novembro de 2015 o Ministério da Saúde declara a emergência do ZIKV como Emergência em Saúde Pública de importância Nacional (BRASIL, 2016; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021). Além da forma clássica de transmissão através da picada de mosquitos vetores, o ZIKV pode ser transmitido também por via sexual e durante a gravidez da mãe para o feto (MUSSO *et al.*, 2015; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019). Nesse cenário, a infecção pelo ZIKV foi correlacionada com a ocorrência de complicações neurológicas graves e irreversíveis, acometendo principalmente fetos e recém-nascidos, como encefalites, microcefalia e a Síndrome de Guillain Barré (MUSSO *et al.*, 2015; MAGALHÃES-BARBOSA *et al.*, 2016; SOUZA *et al.*, 2016; DE OLIVEIRA *et al.*, 2017; WHO, 2022B).

O Ministério da Saúde divulgou que em 2015 o número de casos estimados da doença no país pode ter ficado entre 497.593 e 1.482.701 casos, já que 80% das infecções por ZIKV não manifestam sinais ou sintomas da doença (BRASIL, 2016). A emergência do ZIKV nas Américas, especialmente no Brasil, trouxe impactos a longo prazo, tanto em aspectos de saúde pública e econômicos, como também sociais devido as malformações congênitas do sistema nervoso central em recém-nascidos.

Além de sobrecarregar os sistemas de saúde do país com a circulação de mais uma arbovirose, e representar risco para a saúde pública a nível global devido a possibilidade de disseminação desse vírus internacionalmente (PIERSON; DIAMOND, 2013; MUSSO; GUBLER, 2016; LESSLER *et al.*, 2016; LOWE *et al.*, 2018).

Uma vez que esse arbovírus se disseminou de forma explosiva no Brasil a partir de 2015, logo o vírus também alcançou outras áreas da América Latina e Caribe, e atualmente 89 países e territórios comprovaram a circulação do vírus, todos considerados áreas infestadas pelo mosquito vetor *Aedes aegypti* (KINDHAUSER *et al.*, 2016; FARIA *et al.*, 2017; WHO, 2022B). Entretanto, análises filogenéticas apontam para introdução do ZIKV no Brasil entre maio e dezembro de 2013, mais de um ano antes da detecção oficial (FARIA *et al.*, 2016; GRUBAUGH *et al.*, 2018). O estabelecimento e ocorrência de casos autóctones de Zika nas Américas pode ter sido facilitado por alguns fatores como a ausência de imunidade de grandes contingentes populacionais em risco, o comportamento e elevada densidade do mosquito vetor urbano *Aedes aegypti*, além da transmissão não-vetorial (WEAVER, 2017; GRUBAUGH *et al.*, 2018; LOWE *et al.*, 2018; WHO, 2022B; PAHO, 2022A).

O ZIKV é transmitido por mosquitos vetores em dois ciclos distintos, um ciclo silvestre e outro urbano. No ciclo silvestre o vírus é mantido na natureza através de vetores hematófagos das espécies de *Aedes spp* de hábito arbóreo e primatas não humanos (WEAVER *et al.*, 2016; SONG *et al.*, 2017). Porém, estudos de soroprevalência já identificaram a presença de anticorpos contra o vírus em outros mamíferos, como roedores, morcegos, caprinos, ovinos e orangotangos (ANDRAL *et al.*, 1968; DARWISH *et al.*, 1983). Entretanto esses estudos devem ser avaliados levando em consideração a reatividade cruzada dos flavivírus e ainda, deve-se destacar que a presença de anticorpos anti-ZIKV não garante que esses animais apresentem viremia suficiente para transmitir o vírus a mosquitos vetores (RABE *et al.*, 2016; DOMINGO *et al.*, 2018). No ciclo urbano, a transmissão do ZIKV ocorre entre humanos e mosquitos antropofílicos inseridos nas cidades, especialmente o *Aedes aegypti* (WEAVER *et al.*, 2016; SONG *et al.*, 2017; WHO, 2022B).

Além disso, é importante destacar o estudo de Terzian e colaboradores (2018) que identificou PNH positivos para o ZIKV na região sudeste do Brasil. Bem como, o estudo de Favoretto e colaboradores (2016) que identificaram o RNA viral em espécies de sagui e macacos-prego. A detecção de ZIKV (linhagem americana) em

PNH sugere que os primatas do Novo Mundo podem ser susceptíveis a infecção por ZIKV. Dados que evidenciam a ocorrência de *spillback* e o risco de estabelecimento de um ciclo silvestre no país, indicando um possível papel desses animais no ciclo de transmissão e manutenção do ZIKV em áreas urbanas (FAVORETTO *et al.*, 2016; TERZIAN *et al.*, 2018). Nas Américas, especialmente no Brasil, país mais afetado pela emergência de Zika no continente, o ciclo enzoótico do vírus ainda não é bem elucidado, e evidências de literatura já demonstraram possível atuação de outros vertebrados na manutenção silvestre do ZIKV (Figura 17) (ANDRAL *et al.*, 1968; DARWISH *et al.*, 1983; BUENO *et al.*, 2016; PAUVOLID-CORRÊA *et al.*, 2019; GUTIÉRREZ-BUGALLO *et al.*, 2019.). O possível estabelecimento de um ciclo silvestre do ZIKV no Brasil envolvendo outras espécies de mamíferos além de PNH, representa risco para a saúde pública, e ressalta a necessidade de monitoramento e vigilância da vida silvestre, garantindo melhor controle frente a situações epidêmicas.

Com relação a epidemiologia no estado de Minas Gerais, em dezembro de 2015 foi confirmada a primeira infecção por Zika em Belo Horizonte, e já no ano de 2016 foram confirmados 526 casos da doença no município (PBH, 2016). De acordo com dados de boletins epidemiológicos da Secretaria de Saúde de Minas Gerais, foram estimados 722 casos prováveis de Zika no estado em 2020, e 103 casos no ano de 2021. Considerando os dados referentes à 2022, de acordo com dados do Ministério da Saúde, foi estimado o número de 9204 casos prováveis de Zika no país, sendo que no estado de Minas Gerais foram confirmados 18 casos da infecção por Zika (SVS, 2023; SES, 2023).

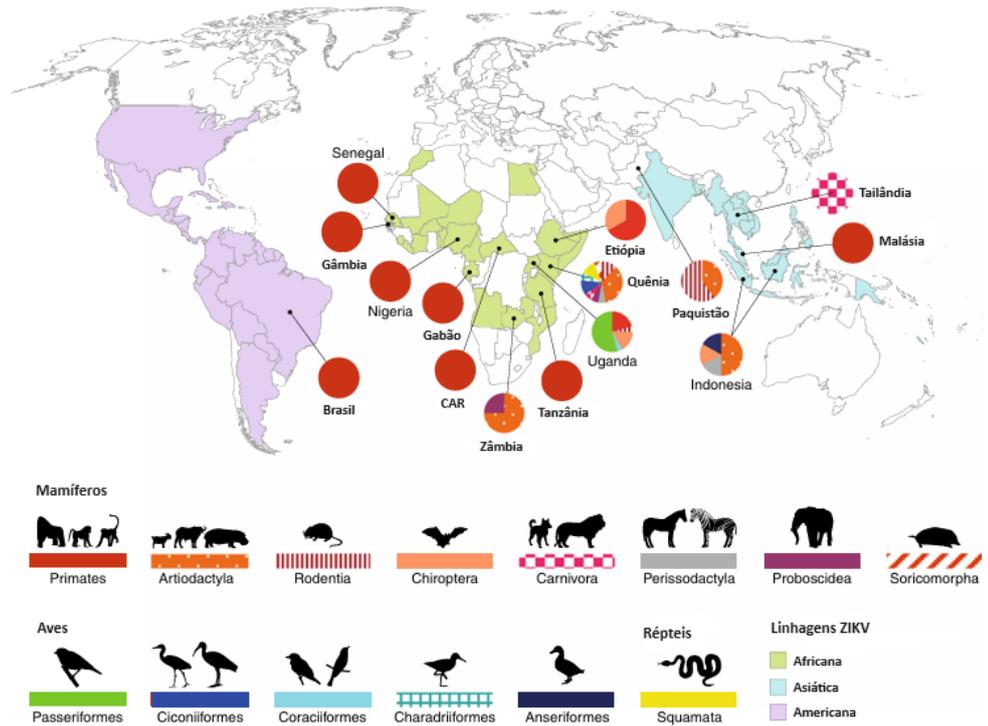


Figura 17: Mapa demonstrando as ordens de animais suscetíveis a infecção pelo ZIKV. As cores dos países representam as linhagens virais do ZIKV responsáveis por epidemias em humanos nesses locais, linhagem africana (verde), linhagem asiática (azul) e linhagem americana (roxo). Dentre as espécies animais confirmados como suscetíveis e/ou naturalmente infectadas pelo ZIKV destacam-se os mamíferos e aves, mas também répteis. A diversidade de hospedeiros do ZIKV pode ser observada pelas ordens demonstradas no mapa. Fonte: GUTIÉRREZ-BUGALLO *et al.*, 2019.

1.7. Togaviridae

Considerando a ameaça relacionada aos arbovírus, é notável destacar a família *Togaviridae*, especialmente com relação à espécie *Chikungunya virus* (CHIKV) que recentemente emergiu em novas regiões geográficas anteriormente não-endêmicas ocasionando epidemias de grandes proporções (WEAVER *et al.*, 2018).

Essa família compreende apenas o gênero *Alphavirus*, reunindo em torno de 30 espécies virais, sendo algumas delas *Mayaro virus* (MAYV), *Ross River virus* (RRV), *Chikungunya virus* (CHIKV) e *Eastern equine encephalitis virus* (EEEV) (CHEN *et al.*, 2018; ICTV, 2019).

Os alfavírus são vírus envelopados, com capsídeo icosaédrico e aproximadamente 70nm de diâmetro. O genoma é constituído de RNA fita simples, polaridade positiva, e apresenta tamanho por volta de 10-12kb (KUHN *et al.*, 2013; CHEN *et al.*, 2018). Estão presentes duas fases de leitura aberta, que codificam para

duas poliproteínas, precursoras de quatro proteínas não estruturais (NSP1-NSP4) e cinco proteínas estruturais, sendo elas proteína do capsídeo (C), subunidades do envelope viral (E2 e E3), proteína transmembrana (6k) e subunidade do envelope (E1) (Figura 18) (STRAUSS; STRAUSS, 1994; KUHN *et al.*, 2013; CHEN *et al.*, 2018).

O genoma possui ainda uma estrutura cap na extremidade 5' e uma cauda poli (A) na extremidade 3', e logo após a liberação do genoma no citoplasma celular o RNA viral é reconhecido pela maquinaria celular e traduzido (STRAUSS; STRAUSS, 1994; KUHN *et al.*, 2013; CHEN *et al.*, 2018).

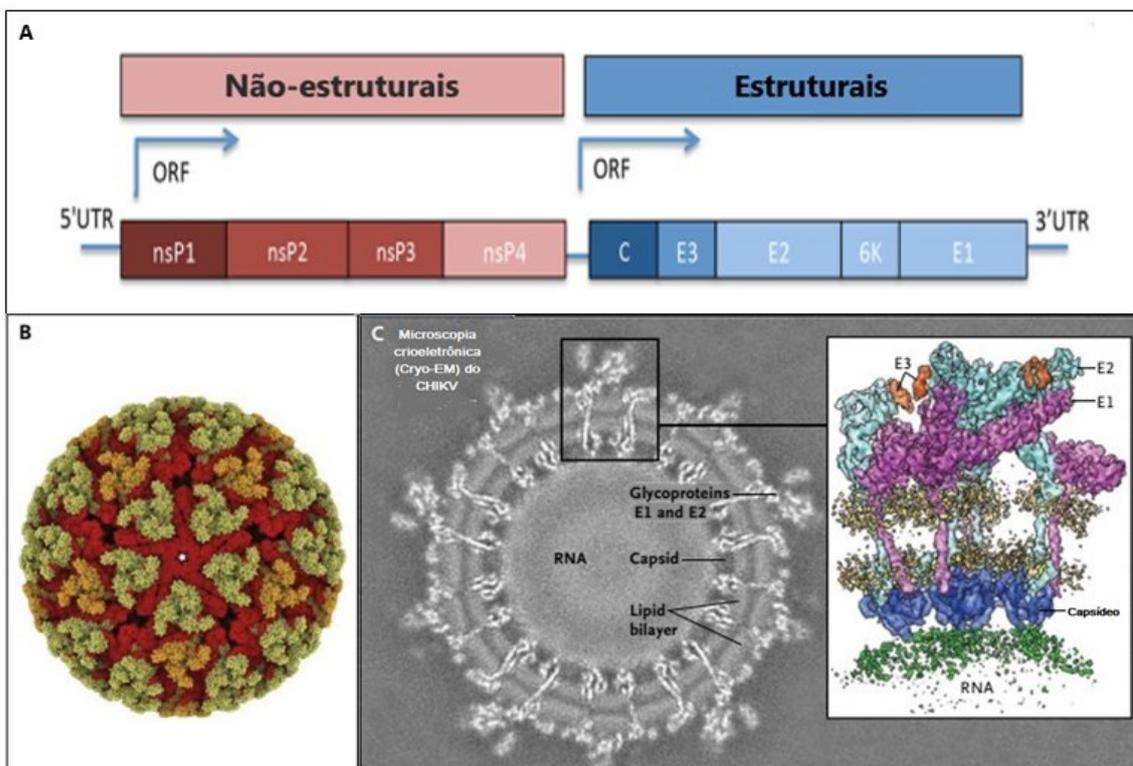


Figura 18: Organização genômica e estrutura de partícula dos *Alphavirus*. (A) Representação gráfica do genoma dos *Alphavirus*, evidenciando as duas ORFs e a disposição das proteínas estruturais e não-estruturais do vírus. (B) Imagem evidenciando a estrutura de partícula do Chikungunya vírus. (C) Crio- microscopia eletrônica (Cryo-EM). Fonte: Adaptado de WEAVER *et al.*, 2015; ZANOTTO; LEITE, 2018.

1.7.1 Chikungunya

A febre Chikungunya é uma arbovirose causada pelo vírus Chikungunya (CHIKV). Esse vírus pertence à família *Togaviridae*, gênero *Alphavirus*, é um vírus

envelopado com genoma de RNA fita-simples, polaridade positiva de aproximadamente 11.8 kb. O CHIKV está inserido no complexo antigênico Semliki Fores, que engloba outros alfavírus denominados artritogênicos como os vírus O'nyong nyong, Mayaro e Ross River (STRAUSS; STRAUSS, 1994; SCHWARTZ; ALBERT, 2010; ROSSINI *et al.*, 2016).

O termo Chikungunya significa “aqueles que dobram” na língua Makonde, falada em várias regiões da África Oriental e faz referência as posições contorcidas das pessoas que adoecem e são afetadas pelo início abrupto e severo de artralgia (MAVALANKAR *et al.*, 2008; VU *et al.*, 2017). O vírus foi isolado pela primeira vez em 1952, do soro de um paciente durante o primeiro surto confirmado da doença em humanos que atingiu uma região que hoje corresponde à Tanzânia (ROSSINI *et al.*, 2016; LUMSDEN, 1955). Assim, a reemergência do CHIKV é observada em regiões tropicais e subtropicais da África, nas ilhas do Oceano Índico e no sul e sudeste da Ásia. A origem provável do CHIKV está no continente Africano, são descritos três genótipos o do Oeste Africano, o genótipo Leste/Centro/Sul-africano (ECSA) e o genótipo Asiático (POWERS; LOGUE, 2007; MADARIAGA *et al.*, 2016; SILVA; DERMODY, 2017).

Historicamente, dois ciclos de transmissão do CHIKV são descritos. O CHIKV é mantido na natureza em um ciclo enzoótico entre mosquitos *Aedes spp.*, principalmente *Ae. furcifer* e *Ae. africanus* e primatas não humanos, sendo que outros animais como roedores, morcegos, aves e esquilos também podem atuar como hospedeiros reservatórios (CHEVILLON *et al.*, 2008; PAHO, 2011; VOUREC'H *et al.*, 2014; MATUSALI *et al.*, 2019). A introdução do vírus em áreas urbanas ocasiona o ciclo urbano, no qual ocorre a transmissão do vírus entre seres humanos através das espécies de vetor *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (CHEVILLON *et al.*, 2008; DIALLO *et al.*, 2012; ROSSINI *et al.*, 2016).

Na África a transmissão viral no ciclo silvestre é bem estabelecida, sendo que periodicamente ocorre a emergência de CHIKV para os seres humanos causando surtos da doença. Entretanto na Ásia, a ocorrência de surtos de Chikungunya é relacionada principalmente a transmissão no ciclo urbano (ROSSINI *et al.*, 2016; VU *et al.*, 2017).

O CHIKV apresenta elevado potencial para causar epidemias e na última década foram reportados casos cada vez mais frequentes e a ocorrência de maior expansão geográfica da circulação viral. De acordo com os órgãos de saúde mundiais

anteriormente ao ano de 2013, os surtos causados pelo CHIKV eram relatados na África, Ásia, Europa e nos oceanos Índico e Pacífico, porém a partir de 2013 foi reportada a primeira transmissão local do CHIKV nas Américas, na ilha caribenha de Saint Martin, sendo que no cenário atual o vírus já foi identificado em mais de 110 países ao redor do mundo (Figura 19) (VU *et al.*, 2017; CDC, 2022A; WHO, 2022C).

A capacidade de disseminação geográfica do vírus Chikungunya pode ser atribuída principalmente a ocorrência de mutações no genoma viral o que permitiu a adaptação do CHIKV ao vetor *Ae. albopictus*, o qual assim como o *Aedes aegypti* está presente em regiões tropicais e temperadas do globo (TSETSARKIN *et al.*, 2007; ROSSINI *et al.*, 2016).

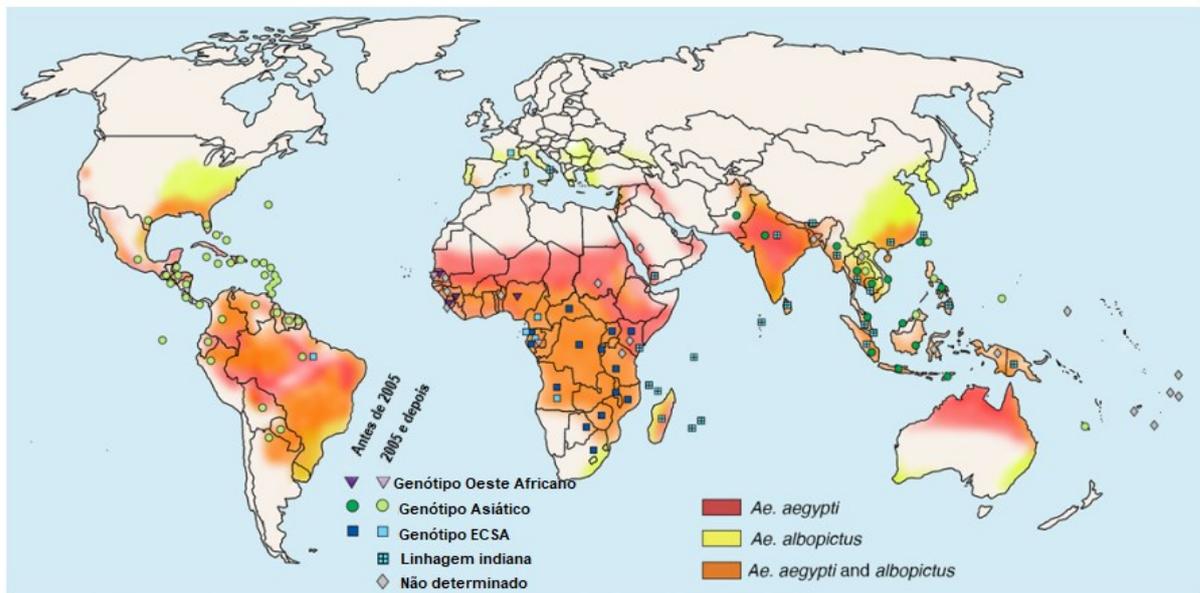


Figura 19: Países onde casos autóctones de CHIKV foram relatados e distribuição geográfica dos vetores *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. Os símbolos coloridos representam os genótipos virais detectados em surtos ocorridos no país. Fonte: Adaptado de SILVA; DERMODY, 2017.

No cenário epidemiológico do Brasil, os primeiros casos autóctones da doença ocorreram no Amapá, em setembro de 2014. Em 2015 foram confirmados 20.598 casos de febre Chikungunya no país. Em 2018, foram confirmados 68.962 casos da doença e atualmente o CHIKV é difundido no país ocorrendo em praticamente todas as regiões (FIGUEIREDO, 2017; SVS, 2019).

Desde os primeiros casos reportados a febre Chikungunya se tornou uma das arboviroses de relevante impacto na saúde pública do Brasil, dados epidemiológicos apontam para o número de 1.276.194 casos de Chikungunya reportados no país no

período de 2014 e 2022. De acordo com dados da Organização Pan-Americana de saúde em 2018 foram registrados 68.962 casos no Brasil, e em 2019 100.963 casos (FRITSCH *et al.*, 2022; PAHO, 2023B).

No ano de 2022, de acordo com o Ministério da Saúde o número de casos prováveis da doença foi próximo a 174.517 casos (incidência de 81,8 casos a cada 100 mil habitantes) (SVS, 2023). No mesmo ano, foram confirmados 6500 casos de Chikungunya no estado de Minas Gerais, sendo que nos anos anteriores de 2020 e 2021 os casos prováveis no estado foram de 3.486 e 5.542 respectivamente (SES, 2023).

Ainda, devido à infestação dos grandes centros urbanos brasileiros pelo *Ae. Aegypti*, a ocorrência de novos grandes surtos é provável. Além disso, é importante salientar que existe o risco de estabelecimento de um ciclo silvestre do CHIKV envolvendo PNH e mosquitos nas Américas e isso representaria uma ameaça à saúde pública impossibilitando a erradicação da doença no continente e no Brasil (FIGUEIREDO, 2017; DONALISIO; FREITAS, 2015; LOURENÇO-OLIVEIRA; FAILLOUX, 2017). No Brasil ainda não se tem registros da detecção deste vírus em ambientes silvestres como na África, porém o cenário epidemiológico atual e a transmissão também por *Ae. albopictus* são fatores que sustentam a hipótese de estabelecimento do CHIKV em ambientes de mata no país.

1.8 Poxviridae

Os poxvírus são vírus de DNA, incluídos na família *Poxviridae*, pertencentes ao filo dos vírus grandes núcleo-citoplasmáticos de DNA (NCLDVs), os quais apresentam partículas grandes se comparadas a grande maioria dos outros grupos virais (FENNER *et al.*, 1988; MOSS *et al.*, 2013; MÖNTTINEN *et al.*, 2021). Esses vírus são conhecidos por infectarem um amplo espectro de hospedeiros, desde insetos e répteis, mas especialmente aves e mamíferos. Os membros dessa família são divididos em duas subfamílias, *Entomopoxvirinae*, infectando invertebrados, e *Chordopoxvirinae*, que inclui vírus que infectam vertebrados (FENER *et al.*, 1988; MOSS *et al.*, 2013; ICTV, 2011).

A subfamília *Chordopoxvirinae* inclui 18 gêneros, sendo que dentre estes, o gênero *Orthopoxvirus* (OPV) merece destaque devido à significativa importância no que diz respeito a eventos de emergência e reemergência viral, ocasionando

epidemias que afetam tanto a saúde humana quanto veterinária em todo o mundo. Estão incluídos nesse gênero espécies virais como o *Variola virus* (VARV), *Vaccinia virus* (VACV), *Monkeypox virus* (MPXV) e *Cowpox virus* (CPXV). Ressaltando ainda o caráter zoonótico desses vírus, nesse gênero apenas o VARV é um patógeno estritamente humano (MOSS *et al.*, 2013; ICTV, 2011).

Até a sua erradicação, em 1977, a varíola foi uma das doenças mais mortais da história, estima-se que o VARV foi responsável pela morte de 400 milhões de pessoas apenas no século XX (HENDERSON *et al.*, 1999; MOSS *et al.*, 2013). A ocorrência de epidemias por OPV zoonóticos também foi e ainda é relatada por todo o mundo, ressaltando os surtos ocasionados pelo VACV no Brasil e América do Sul, a circulação de CPXV principalmente na Europa, além de surtos recorrentes de MPXV na África Central e Oeste (FENER, 1988; MCFADDEN, 2005; SILVA *et al.*, 2021; DIAZ, 2021). Vale destacar a emergência recente de MPXV, que se iniciou em maio de 2022, e desde então são relatados casos de MPXV em países que previamente não apresentavam transmissão da doença (WHO, 2022D). Naturalmente, roedores são considerados hospedeiros enzoóticos do MPXV, mas nessa epidemia atual casos humanos são relatados em 110 países e regiões do mundo, com 84.733 casos humanos confirmados e 80 óbitos até janeiro de 2023 (MCFADDEN, 2005; DIAZ, 2021; WHO, 2023B).

Com relação às partículas virais, os poxvírus possuem partículas complexas que apresentam um tamanho aproximado de 250-270 nm de diâmetro por 350-370 nm de comprimento. São vírus pleomórficos e as partículas podem apresentar forma oval ou semelhante a um tijolo, há a presença de uma membrana externa de natureza lipídica onde estão situadas proteínas de superfície tubulares (CYRKLAFF *et al.*, 2005; MCFADDEN, 2005; MOSS, 2013). No interior da partícula está presente um cerne bicôncavo que envolve o material genético viral, enzimas, além de fatores de transcrição para genes precoces. Ainda, são encontrados corpúsculos laterais ancorados entre as duas concavidades do cerne e a membrana externa, os quais carregam proteínas relacionadas a imunomodulação (Figura 21) (MOSS, 2013; DAMON, 2013; SCHMIDT *et al.*, 2013).

Os poxvírus apresentam genoma de DNA linear de fita dupla (dsDNA) com tamanho aproximado de 140-300 kbp, podendo codificar em torno de 200 genes (MOSS, 2013; DAMON, 2013; BURRELL; HOWARD; MURPHY, 2016). O genoma é composto por uma região central conservada, onde estão presentes genes essenciais para a replicação viral, e por duas regiões variáveis nas extremidades compostas por regiões terminais invertidas (ITRs), contendo genes responsáveis pela interação com hospedeiros, virulência e imunomodulação (Figura 20). Essas regiões ITRs são variáveis entre os poxvírus, e em suas extremidades estão presentes sequências ricas em adenina e timina conectando as duas fitas de DNA e que também apresentam importante função com relação à formação de concatâmeros para a replicação do DNA (MCFADDEN, 2005; MOSS, 2013; DAMON, 2013; BURRELL; HOWARD; MURPHY, 2016).

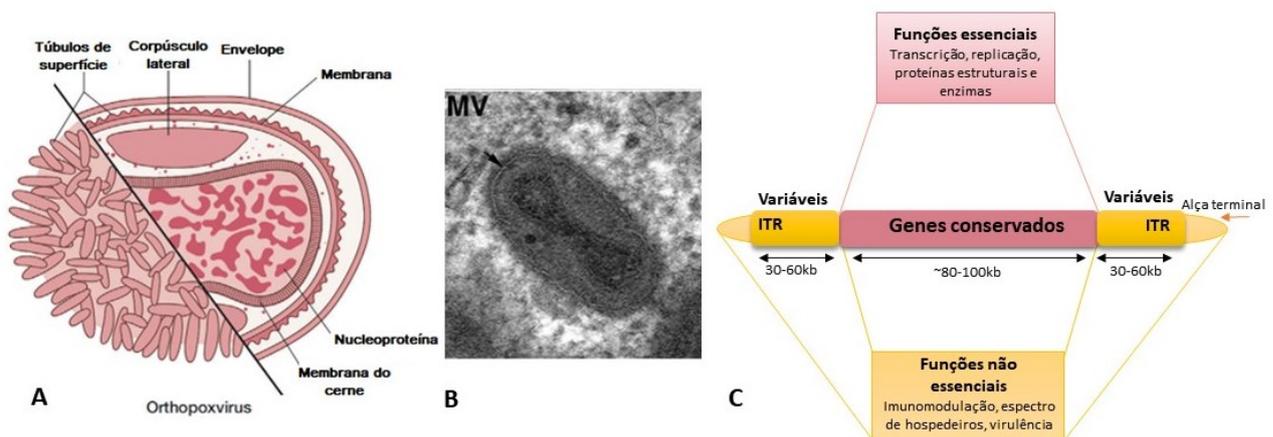


Figura 20: Morfologia de partícula e genoma dos Orthopoxvirus. (A) Representação esquemática dos da partícula viral dos ortopoxvírus. (B) Microscopia crio-eletrônica de uma partícula madura de ortopoxvírus (MV), destacando o cerne em forma de halter, os corpúsculos laterais e a membrana externa. (C) Representação esquemática do genoma dos ortopoxvírus, com destaque para as duas regiões principais, região conservada e ITRs. Fonte: Adaptado de SMITH; MCFADDEN, 2002; MOOS, 2013; BURRELL; HOWARD; MURPHY, 2016.

1.8.1 Vaccínia Bovina

Dentre as espécies virais incluídas no gênero *Orthopoxvirus* (OPV), o *Vaccinia virus* (VACV) é o vírus mais extensamente estudado. Além disso, devido à eficaz proteção cruzada observada entre os ortopoxvírus, o VACV foi utilizado por muitas décadas como vacina contra a varíola (FENNER *et al.*, 1988; JACOBS *et al.*, 2009; DAMON, 2013).

No Brasil e na América do Sul, o VACV é o agente etiológico da Vaccínia Bovina (VB), uma zoonose emergente que é associada principalmente aos ambientes rurais. A VB é uma doença exantemática que acomete principalmente o gado leiteiro e os ordenadores, podendo ser denominada uma zoonose ocupacional onde a transmissão entre humanos e bovinos ocorre por contato direto, principalmente durante a ordenha. A doença é caracterizada pela presença de lesões ulcerativas e crostas na pele e membranas mucosas, sendo que nos bovinos essas lesões estão presentes principalmente nos tetos e úbere (FONSECA *et al.*, 2011; KROON *et al.*, 2011; MATOS *et al.*, 2018).

Mesmo sendo um dos vírus mais estudados, ainda não se sabe a origem e o reservatório do VACV, no entanto estudos recentes indicam que o VACV é uma espécie viral independente de *Orthopoxvirus*, não derivada diretamente do CPXV ou VARV (GUBSER *et al.*, 2004; TRINDADE *et al.*, 2007; DRUMOND *et al.*, 2008). Assim, hipóteses que buscam explicar a origem das linhagens brasileiras de VACV são as de que esses vírus poderiam apresentar ocorrência natural ou que poderiam ter sido derivados de amostras vacinais que conseguiram uma circulação estável em algum reservatório na natureza na época em que ocorria a vacinação contra a varíola (DAMASO *et al.*, 2000; MEDAGLIA *et al.*, 2015; TRINDADE *et al.*, 2016).

Com relação à ocorrência de VB no Brasil, no final da década de 1990 um número cada vez mais frequente de surtos zoonóticos de VACV em várias regiões rurais do país começou a ser relatado (FONSECA *et al.*, 2011). Entretanto, anteriormente ao reconhecimento desses surtos, o VACV foi isolado entre as décadas de 60 e 70 de roedores silvestres e sentinelas, o vírus BeAn 58058 e o SPAn 232 vírus (SAV) (FONSECA *et al.*, 1998; FONSECA *et al.*, 2002). Ainda em 1999, isolados de VACV, os vírus Araçatuba e Cantagalo foram obtidos de bovinos acometidos pela doença na região sudeste do país (DAMASO *et al.*, 2000; TRINDADE *et al.*, 2003).

Nos últimos anos surtos de infecção pelo VACV foram registrados por toda extensão territorial do país, sendo considerados um problema de saúde pública e também econômico, afetando a indústria de laticínios. Além disso, apesar de vários estudos relacionados ao vírus terem sido conduzidos nas duas últimas décadas, muitos aspectos relacionados a circulação do VACV na natureza, seus hospedeiros e rotas alternativas de infecção ainda não são completamente elucidados (OLIVEIRA *et al.*, 2017).

Na literatura científica, diversos trabalhos já demonstraram seja por evidências moleculares ou sorológicas que a circulação do VACV ocorre em outros mamíferos que não só os bovinos e humanos, e entre esses estão incluídos animais domésticos e silvestres (KROON *et al.*, 2011; LIMA *et al.*, 2019). A circulação de VACV já foi demonstrada em roedores silvestres e marsupiais (PERES *et al.*, 2013; MIRANDA *et al.*, 2017), procionídeos (PERES *et al.*, 2013), ratos (ABRAHÃO *et al.*, 2009), em equídeos (BRUM *et al.*, 2010; BORGES *et al.*, 2018), primatas não humanos (ABRAHÃO *et al.*, 2010) e búfalos (FRANCO-LUIZ *et al.*, 2016; LIMA *et al.*, 2019). Além de estudos do nosso grupo de pesquisa que detectaram a circulação do vírus em capivaras, gatos, cães e quatis no estado de Minas Gerais (DUTRA *et al.*, 2017; COSTA *et al.*, 2017; COSTA *et al.*, 2018) (Figura 21).

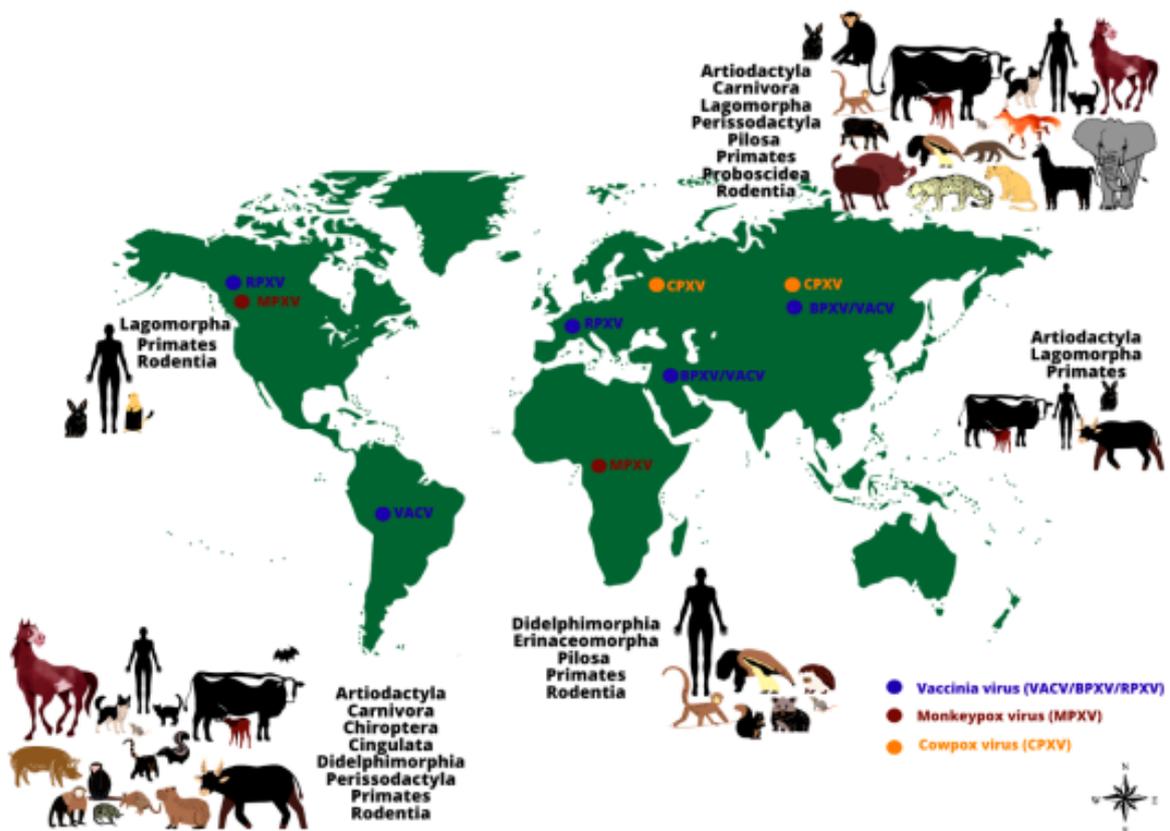


Figura 21: Representação da distribuição dos Orthopoxvirus pelo mundo. Destaque para os vírus VACV, CPXV e MPXV. Para cada OPV zoonótico é evidenciada a ampla gama de hospedeiros animais, e as ordens em que esses vírus foram detectados seja por isolamento, detecção molecular ou sorológica. Fonte: SILVA *et al.*, 2021.

No estudo de Costa e colaboradores (2018) conduzido em ambientes de interseção entre áreas urbanas e silvestres, em Minas Gerais, dados moleculares evidenciaram a exposição e possível infecção por VACV em quatis e cães domésticos.

Os resultados encontrados sugerem que os quatis que estão inseridos em uma área silvestre limítrofe a urbana poderiam ser uma fonte do vírus para os cães, e a interação dessas duas espécies poderia manter a circulação entre os dois ambientes, além de contribuir para exposição de VACV para humanos em áreas urbanas (COSTA *et al.*, 2018).

Nesse contexto, vale destacar que a dinâmica de circulação do VACV pode ser mais complexa do que vem sendo descrito, e nessa dinâmica os roedores podem apresentar potencial para serem considerados reservatórios naturais do vírus. Estudos indicam a eliminação de partículas virais nas fezes e urina de roedores, além de evidências de eliminação de partículas de VACV em camundongos infectados experimentalmente até 20 dias após infecção, dados que podem sinalizar para a atuação desses animais na manutenção e transmissão viral na natureza e entre os ambientes (FERREIRA *et al.*, 2008; ABRAHÃO *et al.*, 2009B; PERES *et al.*, 2018). Segundo Abrahão e colaboradores (2009), estabelecendo um modelo hipotético de transmissão, os roedores poderiam ser infectados em ambientes silvestres e disseminar o vírus para ambientes rurais, e também o contrário, sendo assim roedores peri-domésticos poderiam atuar como ponte entre os dois ambientes. Ainda, considerando os dados de Miranda e colaboradores (2017), foi evidenciado que pequenos mamíferos e roedores poderiam atuar como reservatórios de VACV e da mesma forma foi demonstrado o potencial das espécies de roedores na manutenção da circulação e transmissão viral entre ambientes silvestres e rurais. Igualmente, em áreas urbanas, a dinâmica seria a mesma, onde os roedores seriam os principais responsáveis por facilitar a transmissão do VACV pelos ambientes, esses poderiam interagir com outros mamíferos silvestres e animais domésticos inseridos em parques e áreas verdes próximos a grandes centros urbanos (OLIVEIRA *et al.*, 2017).

1.9 Coronaviridae

Os coronavírus (CoVs) estão inseridos na ordem *Nidovirales*, são membros da família *Coronaviridae*, subfamília *Orthocoronavirinae*, a qual é dividida em 4 gêneros: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* e *Deltacoronavirus* (ICTV, 2021). Essa família viral é motivo de atenção devido a seu amplo espectro de hospedeiros, infectando humanos, outros mamíferos e aves. Entretanto, os gêneros *Alphacoronavirus* e *Betacoronavirus* se destacam no que diz respeito a importância

médica e veterinária, causando infecções respiratórias e gastrointestinais em humanos e outros mamíferos (MASTERS; PERLMAN, 2013; CUI *et al.*, 2019).

Até o momento são conhecidos sete coronavírus capazes de causar doenças em seres humanos (HCoVs), e todos são patógenos zoonóticos que podem ser transmitidos por contato direto. Dentre esses, quatro HCoVs são conhecidos por causarem doença respiratória leve, semelhante a resfriados em seres humanos, sendo eles os vírus HCoV-229E e HCoV-NL63 pertencentes ao gênero *Alphacoronavirus*, e os vírus HCoV-OC43 e HCoV-HKU1 pertencentes ao gênero *Betacoronavirus* (MASTERS; PERLMAN, 2013; CUI *et al.*, 2019; ALANAGREH *et al.*, 2020; HALAWA *et al.*, 2021).

Entretanto, os coronavírus não eram considerados uma ameaça para a espécie humana antes do começo do século XXI. Em 2002, na província de Guangdong, na China, emergiu o primeiro HCoV considerado como altamente virulento para os seres humanos, o SARS-CoV (Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave), responsável por causar casos graves de pneumonia durante uma epidemia nos anos de 2002-2003, apresentando uma taxa de letalidade de 9% (ZHONG *et al.*, 2003; CUI *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2020). O segundo evento de emergência viral de um novo e zoonótico HCoV ocorreu 10 anos depois, com a emergência do MERS-CoV (Coronavírus da síndrome respiratória do Oriente Médio), em 2012 na Arábia Saudita e outros países do Oriente Médio. A infecção respiratória causada pelo MERS-CoV é grave e apresenta taxa de letalidade em torno de 35% (WANG *et al.*, 2020; HALAWA *et al.*, 2021; WHO, 2022E; CHAFEKAR e FIELDING, 2018). Após a emergência desses dois betacoronavírus mortais, em dezembro de 2019 um novo coronavírus emergiu na população humana, na cidade de Wuhan, província de Hubei, na China (WU *et al.*, 2020; HU *et al.*, 2021; WHO, 2021).

Inúmeros casos de uma pneumonia sem etiologia conhecida começaram a ser reportados e desde o primeiro caso constatado em 8 de dezembro, rapidamente a doença se espalhou provocando uma emergência de saúde pública sem precedentes, ultrapassando em muito os números de infectados e dispersão dos outros betacoronavírus, SARS e MERS (HU *et al.*, 2021; WHO, 2021). Com o avanço do número casos e óbitos reportados em mais províncias chinesas, através de sequenciamento genético e isolamento viral de amostras de fluido de lavagem bronco alveolar de pacientes graves, cientistas chineses identificaram o agente causador da pneumonia viral, um novo coronavírus pertencente ao gênero *Betacoronavirus*, o

SARS-CoV-2 (Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2) (ICTV,2020; CHEN *et al.*, 2020; ZHU *et al.*, 2020; HU *et al.*, 2021).

Os coronavírus são vírus envelopados de genoma RNA fita-simples, polaridade positiva (+ssRNA) não segmentado. Apresentam partículas esféricas com aproximadamente 125nm de diâmetro e com genoma entre 26-32kb, o maior genoma entre os vírus de RNA. O RNA viral possui Cap na extremidade 5' e é poliadenilado na extremidade 3, ainda, apresenta regiões terminais não traduzidas (UTRs) nas duas extremidades. O genoma é envolto pelo nucleocapsídeo, o qual apresenta simetria helicoidal (Figura 22). A proteína do nucleocapsídeo (N) é altamente conservada entre os CoVs, e demonstra atividade antigênica, sendo relacionada a várias interações célula-hospedeiro e como alvo da resposta imune (MASTERS; PERLMAN, 2013; BURRELL; HOWARD; MURPHY, 2016; CUI *et al.*, 2019).

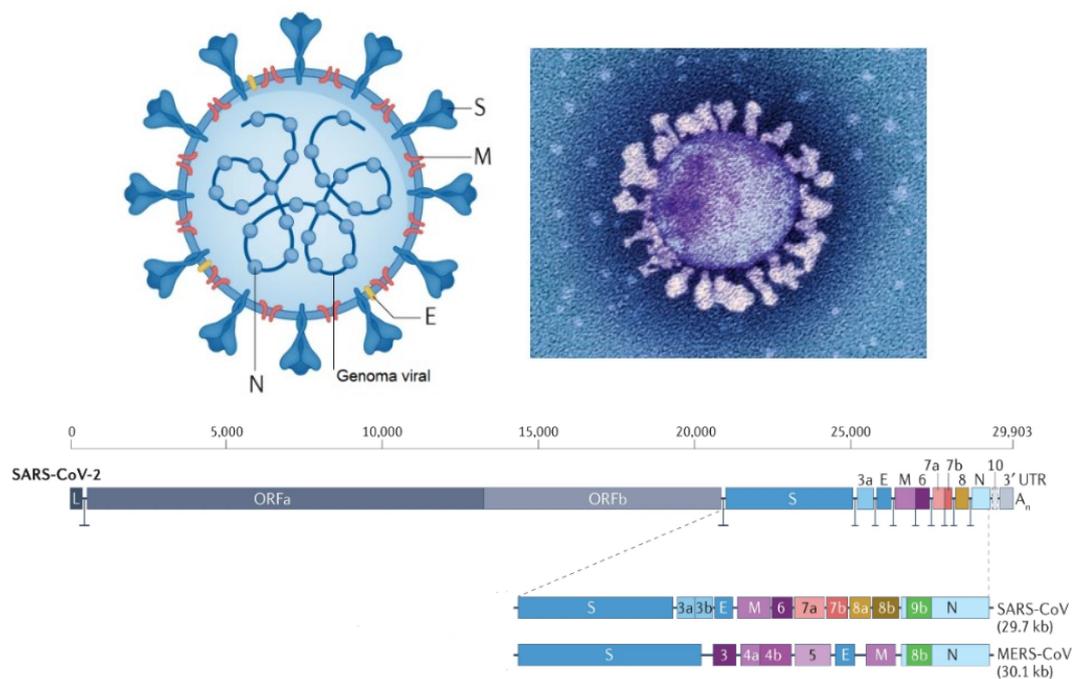


Figura 22: Estrutura de partícula do SARS-CoV-2 e organização do genoma. Representação gráfica da estrutura de partícula do SARS-CoV-2, coronavírus de maior importância no cenário epidemiológico atualmente, estão evidenciadas as principais proteínas estruturais e uma microscopia eletrônica da partícula. A representação do genoma mostra a organização das ORFs e proteínas ao longo do RNA viral, e são evidenciadas as diferenças com os genomas de SARS-CoV e MERS-CoV. Fonte: Adaptado de HALAWA *et al.*, 2021.

As proteínas estruturais que compõe o vírion são a proteína do envelope viral (E), circundada pela glicoproteína de espícula (spike) (S), a qual é alvo da resposta imune do hospedeiro e é responsável pela ligação ao receptor ACE2 (enzima conversora de angiotensina 2) nas células humanas. Também estão presentes, a

proteína de membrana (M), a mais abundante na estrutura viral e a proteína de nucleocapsídeo (N) relacionada a proteção do genoma de RNA (MASTERS; PERLMAN, 2013; CUI *et al.*, 2019; CHEN *et al.*, 2020; HALAWA *et al.*, 2021). O genoma do SARS-CoV-2 apresenta duas grandes fases de leitura aberta (ORFs) ocupando cerca de dois terços do genoma, dispostas no sentido 5'-3', sendo ORF1a e ORF1b as quais codificam duas poliproteínas relacionadas a replicase viral e 16 proteínas não-estruturais (NSP1– NSP16). Além de outras ORFs próximas a extremidade 3' codificando as quatro principais proteínas estruturais: espícula (S), envelope (E), membrana (M) e nucleocapsídeo (N), e outras ORFs codificando proteínas acessórias (Figura 23) (MASTERS; PERLMAN, 2013; ALANAGREH *et al.*, 2020; CHEN *et al.*, 2020; HALAWA *et al.*, 2021; HU *et al.*, 2021).

1.9.1 COVID-19

Em fevereiro de 2020, o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) classificou o novo vírus como SARS-CoV-2 (Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2), agente etiológico da COVID-19 (Coronavirus disease 2019) (ICTV,2020; WHO, 2021). Logo a emergência do SARS-CoV-2 tomou grandes proporções e em poucos meses o vírus já havia atingido vários países. Em 11 de março de 2020 a Organização Mundial da Saúde declara a COVID-19 como uma pandemia (HU *et al.*, 2021; WHO, 2021).

O SARS-CoV-2 é transmitido por via aérea, por meio de gotículas respiratórias durante o contato pessoal próximo, e apresenta alta transmissibilidade entre humanos. Além disso, foi demonstrado significativo potencial de transmissão por indivíduos assintomáticos e pré-sintomáticos, fatores que somados ao cenário de emergência viral e a conectividade aérea do mundo atual contribuíram para facilitar a disseminação rápida e o status de pandemia (HARRISON *et al.*, 2020; MORENS; FAUCI, 2020; WIERSINGA *et al.*, 2020; HALAWA *et al.*, 2021; WHO, 2021).

A COVID-19 apresenta como sintomas mais comuns: febre, tosse seca, fadiga, dispneia, dores musculares, perda de olfato e paladar, cefaleia, náuseas e diarreia; sendo que o início dos sintomas pode ocorrer entre a 2-14 após a exposição inicial ao vírus (CDC, 2022B). Porém a COVID-19 apresenta quadros clínicos variáveis, podendo apresentar quadros mais leves em crianças e adultos jovens, até quadros graves e óbitos, principalmente em indivíduos com comorbidades e idosos. A infecção

causada pelo SARS-CoV-2 tem como principal alvo os pulmões, entretanto a COVID-19 pode evoluir para quadros clínicos com manifestações multissistêmicas, causando hipóxia grave, resposta inflamatória exacerbada, lesão cardíaca, insuficiência renal, complicações trombóticas, disfunção hepática, sepse viral, falência de órgãos e morte (WIERSINGA *et al.*, 2020; HALAWA *et al.*, 2021; HU *et al.*, 2021).

A tempestade perfeita para a emergência do SARS-CoV-2 levou o mundo a uma crise de saúde pública sem precedentes, com mais de 752 milhões de casos e 6,8 milhões de mortes relatadas por todo planeta até janeiro de 2023 (Figura 23) (WHO, 2023A).

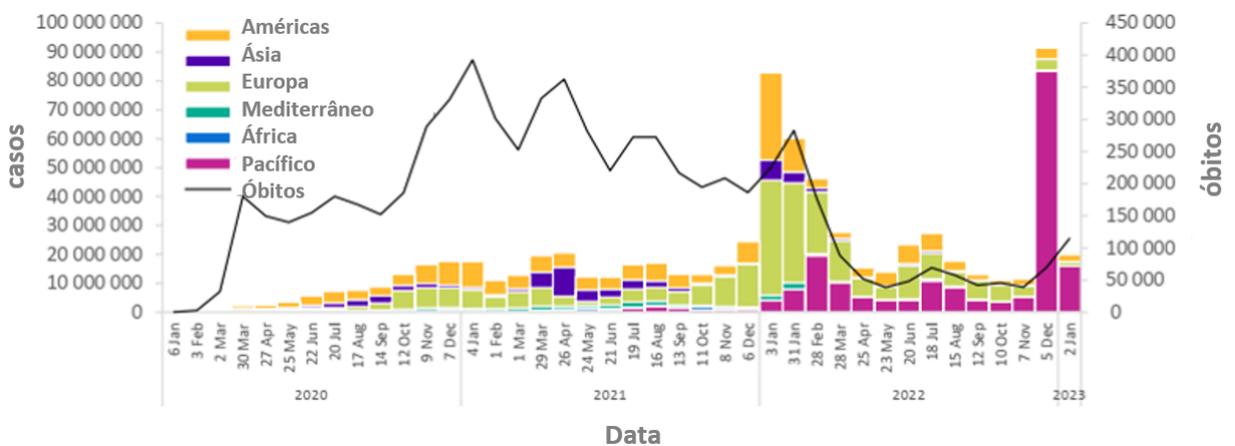


Figura 23: Dados globais sobre os casos e óbitos de COVID-19 relatados semanalmente pela OMS, em 29 de janeiro de 2023. Cada cor representa um continente e o número de casos, em amarelo: Américas, azul escuro: Ásia, verde claro: Europa, verde escuro: Mediterrâneo oriental e azul claro: África. A linha em azul representa Fonte: Atualização Epidemiológica Semanal COVID-19, Organização Mundial da Saúde, WHO, 2023A.

No Brasil, o primeiro caso de COVID-19 foi confirmado em 25 de fevereiro de 2020, de um paciente que chegou da Itália no estado de São Paulo, e desde o começo da pandemia foi observada uma rápida disseminação da doença pelo país, com uma das taxas de crescimento mais altas do mundo, perdendo apenas para países como Estados Unidos e Índia. Até o dia 29 de janeiro de 2023 foram registrados 36.794.261 casos de COVID-19 com um acumulado de 696.759 óbitos (DE SOUZA *et al.*, 2020; JESUS *et al.*, 2020; CONASS, 2022).

A partir da caracterização genômica do SARS-CoV-2, foi observado no decorrer da pandemia o surgimento de variantes genéticas do vírus, fato que colocou o mundo em alerta para a possível ocorrência de variantes virais apresentando comportamentos distintos em relação a virulência, mortalidade, transmissibilidade e

evasão imune. O surgimento de variantes é um evento natural e está relacionado à evolução viral, que acontece através da ocorrência de mutações, mudanças de nucleotídeos que ocorrem naturalmente no genoma viral durante a replicação, no caso das variantes de SARS-CoV-2 mutações principalmente na proteína S viral (SINGH *et al.*, 2021; MISTRY *et al.*, 2022; PAHO, 2022B; WHO, 2022F). As novas linhagens genéticas do SARS-CoV-2 que apresentam risco para a saúde pública a nível global são classificadas pela OMS como Variantes de interesse (VOI) ou Variantes de preocupação (VOC) (WHO, 2022F). Durante a pandemia, algumas VOCs demonstraram alterações genômicas vantajosas que contribuíram para um melhor fitness viral, e com isso apresentaram alta incidência e rapidamente dominaram o cenário epidemiológico se sobrepondo em relação a outras linhagens previamente circulantes. São exemplos as VOCs: Alpha (B.1.1.7), Beta (B.1.351), Gamma (P.1), Delta (B.1.617.2) e a Ômicron (B.1.1.529) (CDC, 2021; MISTRY *et al.*, 2022; WHO, 2022F). Nas variantes de preocupação algumas alterações chave foram observadas e compartilhadas na proteína S, o que pode conferir a essas variantes aumento de transmissibilidade ou alteração no cenário epidemiológico da COVID-19, aumento de virulência ou no desfecho clínico da doença. Todos esses fatores associados a queda na eficácia de ferramentas de controle e prevenção da doença, como vacinas, diagnóstico e alternativas terapêuticas disponíveis podem contribuir para o aumento de casos de COVID-19 (CDC, 2021; SINGH *et al.*, 2021; PAHO, 2022B).

Acrescentando a esse panorama, é importante destacar que os CoVs são capazes de sofrer recombinação e variação genética, se adaptando a novos hospedeiros. E ainda, todos os HCoVs responsáveis por causar emergências de saúde pública na espécie humana são originários de morcegos, porém para todos esses eventos de *spillover* foi observada a transmissão relacionada a um hospedeiro intermediário, reforçando o caráter zoonótico desses vírus. Para o SARS-CoV foi identificado como hospedeiro intermediário as civetas (*Paguma larvata*), e para o MERS-CoV algumas espécies de camelos dromedários (CUI *et al.*, 2019; MAHDY *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2020; WIERSINGA *et al.*, 2020). Até o momento nenhum morcego reservatório ou hospedeiro intermediário foi identificado para o SARS-CoV-2. Entretanto grande diversidade de CoVs relacionados ao SARS-CoV-2 foram encontrados circulando em morcegos em comparação com outros hospedeiros, e estudos filogenéticos sugerem que linhagens ancestrais do SARS-CoV-2 poderiam estar circulando em morcegos há décadas (BONI *et al.*, 2020; HOLMES *et al.*, 2021;

LI *et al.*, 2021; ZHOU *et al.*, 2021; RUIZ-ARAVENA *et al.*, 2022) (Figura 24). Desde sua emergência, a origem zoonótica do SARS-CoV-2 vem sendo suportada, estando relacionada a coronavírus de morcegos-ferradura, gênero *Rhinolophus* (LI *et al.*, 2021; ZHOU *et al.*, 2021; RUIZ-ARAVENA *et al.*, 2022).

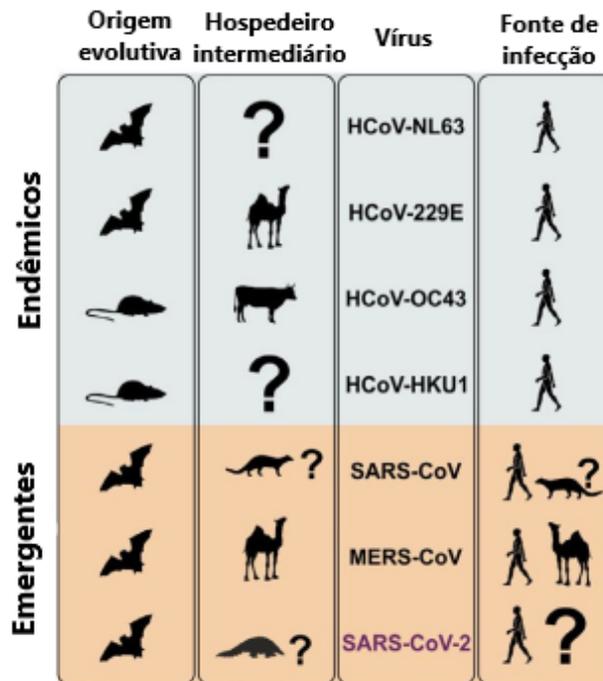


Figura 24: Diagrama resumindo os hospedeiros e reservatórios intermediários de HCoVs emergentes e endêmicos. Para o SARS-CoV-2 o evento de emergência e a possível participação de hospedeiros intermediários como pangolins (*Manis javanica*) ainda não foi elucidada. Fonte: Adaptado de JO *et al.*, 2020.

E ainda, desde o início da pandemia de COVID-19, a infecção por SARS-CoV-2 já foi descrita em inúmeras espécies animais, sinalizando para a possibilidade de estabelecimento de mais reservatórios e/ou hospedeiros para o vírus em animais domésticos, de cativeiro, silvestres e de criação. Estudos recentes mostraram evidência de infecção natural por SARS-CoV-2 e susceptibilidade em vários animais, como: cães e gatos, furões, grandes felinos como tigres e leões, gorilas selvagens e outros primatas não-humanos, lontras, veados selvagens, visons, urso-gato-asiático, quatis, hienas, javalis, raposas e chacais (GAO; WANG, 2021; LARSEN *et al.*, 2021; MURPHY; LY, 2021; SHARUN *et al.*, 2021; CDC, 2022C).

De acordo com a Organização Mundial para a Saúde Animal (WOAH), até dezembro de 2022 foram reportadas infecções por SARS-CoV-2 em 26 espécies animais e em 36 países (WOAH, 2022). Dados que evidenciam o caráter zoonótico do SARS-CoV-2 e sua capacidade de transpor a barreira de espécies, relacionada

principalmente com a ligação ao receptor ACE2, altamente conservado e ubíquo na maioria dos grupos de vertebrados. Em conjunto com esses fatores e considerando o cenário epidemiológico de circulação disseminada e descontrolada do SARS-CoV-2, é considerável o risco de manutenção enzoótica e estabelecimento do vírus em novos hospedeiros (DAMAS *et al.*, 2020; DELAHAY *et al.*, 2021; FISCHHOFF *et al.*, 2021; WEI *et al.*, 2021).

A emergência do SARS-CoV-2 e sua ampla circulação em todo o mundo sinaliza para a complexa dinâmica de circulação desse vírus, e com as evidências cada vez mais sustentadas de infecção pelo vírus em outros mamíferos originadas do homem, infecções zoonóticas reversas, se faz necessário investigar e monitorar as populações de vida silvestre e doméstica. Compreender melhor o papel que outras espécies podem ter na transmissão e manutenção do vírus na natureza é importante para traçar estratégias de prevenção e controle tanto de novos eventos de *spillover* quanto de *spillback* que causam impacto na saúde humana e animal, além de acompanhar a ocorrência de possíveis mutações do SARS-CoV-2 (BASHOR *et al.*, 2021; GAO; WANG, 2021; GORAICHUK *et al.*, 2021; MURPHY; LY, 2021).

2. JUSTIFICATIVA

As doenças emergentes e reemergentes representam uma ameaça significativa à saúde pública global. As DIE podem ocasionar epidemias ao redor do globo causando enorme impacto socioeconômico, principalmente em países pobres ou em desenvolvimento. Ainda em relação ao impacto econômico, bilhões de dólares são gastos para ações de resposta a epidemias, pandemias e tratamento de doentes, além das perdas de cunho social e econômica em diversos setores da sociedade. Estudos recentes estimam que cerca de 25% das 60 milhões de mortes que ocorrem em todo o mundo anualmente são devido às doenças infecciosas.

Os principais agentes infecciosos capazes de causar epidemias que afetam o ser humano são de origem zoonótica, sendo que fatores socioeconômicos, ambientais e ecológicos contribuem para a emergência ou *spillover* de novos patógenos na espécie humana.

O Brasil é considerado um “hotspot” para a emergência de doenças infecciosas emergentes, seja pela elevada biodiversidade ou pelo cenário de alteração ecológica de diversos ecossistemas. Atualmente, no cenário epidemiológico do Brasil, os arbovírus merecem destaque. Entre os flavivírus, apresentam grande ameaça à saúde pública o vírus da Dengue que apresenta ampla circulação no país, o vírus Zika que foi recentemente introduzido, e o vírus da Febre Amarela que ocasionou uma epidemia silvestre de grande magnitude entre 2016 e 2019. Além desses, a emergência do vírus Chikungunya (*Togaviridae*) já foi responsável por ocasionar epidemias em várias regiões do país, e representa uma séria ameaça para a saúde da população. No Brasil ainda são escassos os estudos dedicados a investigar a ecologia desses vírus e o potencial de circulação em outros hospedeiros mamíferos que não o homem ou PNH.

Com relação ao VACV, esse também se destaca como um vírus emergente no país, afetando principalmente o gado leiteiro e os ordenadores que têm contato direto com os animais infectados. A ocorrência de surtos de VACV causa danos à economia leiteira e à saúde pública. A circulação do VACV no ambiente rural é amplamente descrita na literatura, porém sabe-se que esse vírus circula também em pequenos mamíferos silvestres, o que contribui para sua manutenção e circulação. Além disso, já foi detectada a circulação desse vírus em gatos, cães e quatis inseridos em ambientes de interseção entre áreas silvestres e ambiente urbano no estado de Minas

Gerais. Considerando que grande parte da população não apresenta imunidade a esse vírus e que sua circulação natural vem se ampliando no país nos últimos anos, torna-se importante mapear o espectro de hospedeiros e potenciais áreas de ocorrência do VACV em ambientes urbanos ou de interseção entre o ambiente urbano e o silvestre.

Somando a todo esse cenário epidemiológico, a pandemia de COVID-19 expôs a ameaça da emergência de patógenos para a espécie humana e os profundos impactos em saúde pública, sociais e econômicos causados por uma pandemia. Desde a emergência do SARS-CoV-2 em dezembro de 2019, foram registrados 752 milhões casos de COVID-19 em todo o mundo até janeiro de 2023, sendo que o Brasil foi um dos países que pior respondeu e controlou a pandemia, com mais de 36 milhões de casos de COVID-19 confirmados. Em pouco mais de três anos, a pandemia causada pelo SARS-CoV-2 se tornou a maior emergência em saúde pública do século XXI. Mesmo com a disponibilidade de várias vacinas em tempo recorde, a COVID-19 evidenciou a enorme dificuldade de contenção de patógenos à nível global e a falta de coordenação e apoio internacional do mundo moderno. Durante esses dois anos de pandemia, inúmeros eventos de *spillback* do SARS-CoV-2 da população humana para diferentes espécies animais foram descritos, evidenciando o potencial desse vírus de se estabelecer em novas espécies hospedeiras.

Pelo exposto, sabe-se que o risco de eventos de *spillover* tem intrínseca relação com a perda de biodiversidade, destruição de habitats naturais e com a taxa de contato entre homem e hospedeiros animais. No Brasil os grandes centros urbanos sem planejamento e densamente povoados, com áreas verdes fragmentadas e presença de diversas populações de animais sinantrópicos, representam um risco para alterar a dinâmica de transmissão de patógenos já endêmicos no país, mas também para a ocorrência de eventos de *spillover* na população humana, assim como eventos de *spillback*.

Ainda, os mamíferos podem ser considerados reservatórios para a manutenção de vários vírus na natureza, entre eles os CoVs, os vírus ZIKV, YFV, DENV, CHIKV e VACV, os quais representam relevante impacto no cenário epidemiológico brasileiro e no estado de Minas Gerais. Considerando a emergência desses vírus no país, associada à escassez de estudos eco-epidemiológicos acerca da circulação destes e da caracterização de populações de mamíferos que podem atuar como possíveis reservatórios e/ ou hospedeiros para esses vírus, este projeto visa contribuir para

avaliar a circulação e dinâmica ecológica destes vírus em áreas verdes inseridas em grandes centros urbanos.

A hipótese da circulação desses vírus em pequenos mamíferos que compõe a fauna de áreas florestais inseridas em grandes cidades sinaliza para a risco de contato do homem com esses vírus zoonóticos, e para a consequente dispersão e transmissão destes nos ambientes urbanos, periurbanos e áreas limítrofes. Deste modo, é extremamente importante fortalecer o monitoramento e investigação de patógenos virais em animais silvestres e sinantrópicos, visando evitar e minimizar impactos de eventos de emergência e transmissão descontrolada, os quais podem colocar em risco tanto a saúde humana quanto animal.

Além disso, este estudo se propõe a ampliar o conhecimento acerca da ocorrência desses vírus no Brasil, principalmente no que diz respeito aos processos de circulação zoonótica desses e assim contribuir para a construção de processos mais eficazes no que diz respeito a vigilância, prevenção e resposta a possíveis emergências dessas viroses.

CAPÍTULO I

INVESTIGAÇÃO MOLECULAR DE VÍRUS ZONÓTICOS EM ROEDORES E MARSUPIAIS DO PARQUE DAS MANGABEIRAS E PARQUE JACQUES COUSTEAU, MINAS GERAIS, BRASIL.

Belo Horizonte

2023

3. OBJETIVOS

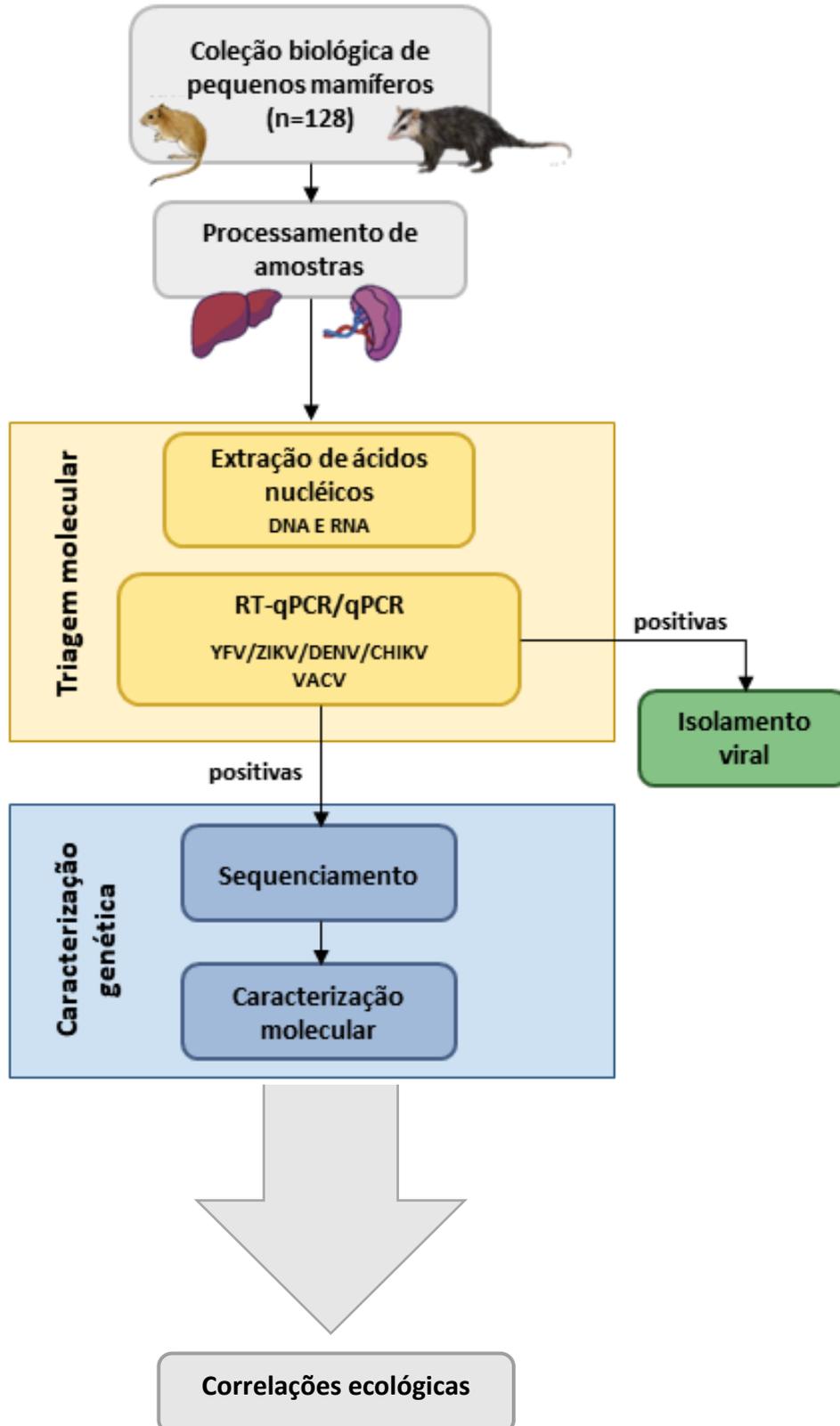
3.1 Objetivo Geral

Prospectar e caracterizar vírus zoonóticos em pequenos mamíferos silvestres e sinantrópicos (roedores e marsupiais) presentes em remanescentes de mata (parques ecológicos) inseridos em uma grande matriz urbana, avaliando a circulação viral e dinâmica ecológica.

3.2 Objetivos Específicos

- Investigar a circulação dos vírus zoonóticos, YFV, DENV, ZIKV CHIKV, VACV, em amostras biológicas de roedores e marsupiais utilizando plataformas de diagnóstico por qPCR e RT-qPCR;
- Caracterizar molecularmente os vírus detectados;
- Estabelecer correlações ecológicas avaliando a circulação dos vírus frente às espécies de animais capturados, transectos de captura, sazonalidade e ecologia da paisagem.

4. FLUXOGRAMA DE TRABALHO



5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Coleções de pequenos mamíferos

Nessa tese foi analisada uma coleção de pequenos mamíferos (roedores e marsupiais) capturados no Parque das Mangabeiras (19° 56' S 43° 54' O) e no Parque Jacques Cousteau (19°58' S 43°59' O), Belo Horizonte, Minas Gerais, durante o período de abril de 2018 a março de 2019. A coleção engloba amostras de vísceras (fígado, rim, baço, pulmão, coração, bexiga, entre outros) de roedores e marsupiais habitantes desses parques (n=128). A coleção pertence ao grupo de pesquisa ECOVIR e foi obtida dentro do projeto ZIKA 440593/2016-6, Emergência de Zika vírus no Brasil: dinâmica evolutiva e ecológica do vírus em diferentes matrizes urbanas.

Todas as amostras foram acondicionadas em freezer -70°C ou em RNA Later® (Invitrogen™) no Laboratório de Vírus do Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

5.2 Áreas de estudo

As áreas escolhidas para a captura dos pequenos mamíferos foram o Parque das Mangabeiras e o Parque Jacques Cousteau, ambos inseridos no município de Belo Horizonte, Minas Gerais (Figura 25). A cidade de Belo Horizonte é a capital do estado de Minas Gerais, possui uma área territorial de 331.354km² e população de 2,5 milhões de habitantes (IBGE, 2021).

O Parque das Mangabeiras, projetado pelo paisagista Roberto Burle Marx e inaugurado em 1982, localiza-se na região centro-sul de Belo Horizonte e está próximo da Serra do Curral, a uma altitude variando de 1000 a 1300 metros. É o maior parque urbano da cidade possuindo cerca de 2,4 milhões de m² de área. Predominam a vegetação de Cerrado nas áreas de maior altitude e a Mata Atlântica está presente nos fundos de vale e encostas adjacentes. O parque recebe cerca de 15 mil visitantes por mês, constituindo uma área verde do município que desempenha significativo papel no lazer e turismo para a população. No parque é observada uma fauna diversificada, composta por aves, répteis, anfíbios e mamíferos, sendo que deste

último grupo já foram identificadas cerca de 30 espécies como quati, mico-estrela, caxinguelê (esquilo), ouriço-cacheiro e tatu-galinha (PBH, 2018A).

O Parque Municipal Jacques Cousteau, foi criado em 1971 e abrange uma área de 335 mil metros quadrados. Está inserido na região Oeste de Belo Horizonte, e apresenta uma cobertura vegetal diversa predominante de porte arbóreo, com espécies de plantas nativas e exóticas. O Parque possui nascentes e cursos d'água perenes e a fauna é composta principalmente por anfíbios, répteis, aves, como sabiás, frangos d'água, saracuras, e mamíferos, como cuíca, mico-estrela, esquilo-caxinguelê e gambás. O Parque também é o maior produtor de mudas de plantas ornamentais da cidade (PBH, 2018B).

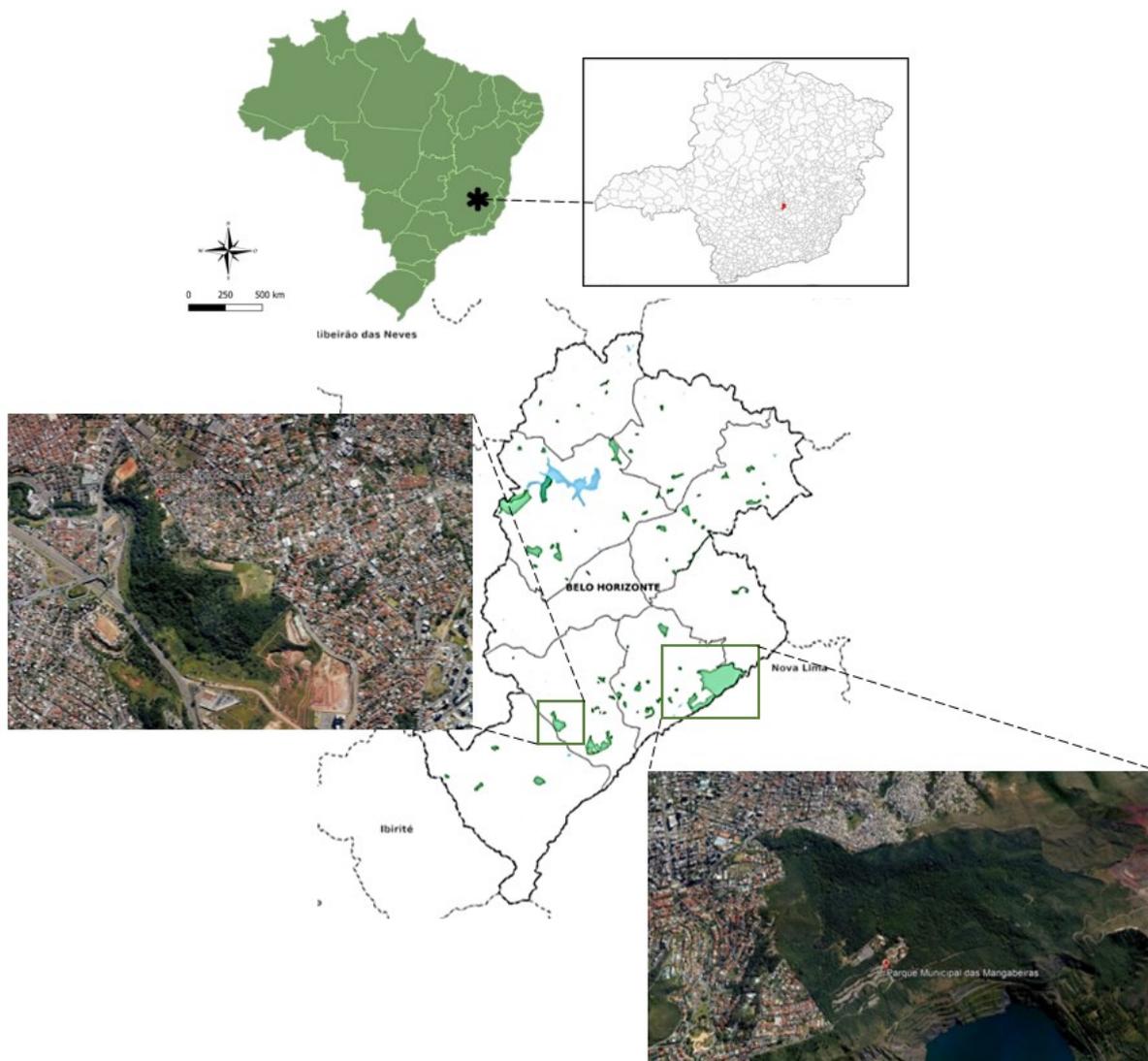


Figura 25: Mapas evidenciando a localização geográfica de Belo Horizonte, e a localização dos parques municipais incluídos no estudo (19° 48' 57" Sul, 43° 57' 15" Oeste). Fonte: Portal Maps BH e Google Earth.

5.3 Coletas

As coletas de pequenos mamíferos foram realizadas nos Parques Jacques Cousteau e Mangabeiras (2018-2019) (Figura 26), sendo que no Parque Jacques Cousteau dois transectos de amostragem de pequenos mamíferos foram estabelecidos e no Parque das Mangabeiras três transectos. Cada transecto apresentou quinze estações de coleta distantes 20 metros uma da outra. Cada estação teve duas armadilhas de coleta, sendo uma do tipo Sherman (dimensões: 8x8x26 cm), específica para a coleta de roedores e marsupiais de pequeno porte e outra do tipo gaiola com isca suspensa, para captura de animais maiores como gambá (*Didelphis* sp.) e cuíca (*Philander frenata*), com um total de trinta armadilhas por transecto.



Figura 26: Vista aérea dos parques urbanos, locais de coleta dos roedores e marsupiais e registros das capturas. (A) Parque Jacques Cousteau, (B) Mangabeiras, (C) Registros fotográficos das capturas, evidenciando armadilhas e espécies de pequenos mamíferos coletados. Fonte: Mapas Google Earth e registros fotográficos realizados durante as coletas do projeto.

Nas áreas próximas de construções, ambas as armadilhas foram colocadas no chão. Na área de mata nativa em cada ponto foi colocada uma armadilha no chão e

outra no extrato médio da mata. Cada transecto foi percorrido uma vez por dia, logo pela manhã (Figura 27). A isca usada foi uma mistura de sardinha, amendoim, banana e farelo de milho. As armadilhas foram iscadas no momento da vistoria, pela manhã, entre 8h00 e 9h00, de cada dia de coleta. Durante cada período de coleta as armadilhas ficaram abertas por 3-5 dias consecutivos. Em cada área as coletas ocorreram por 5 dias consecutivos, a cada 2 meses, totalizando seis campanhas em cada parque no período de 1 ano.

Após cada captura os animais foram pesados. Os pequenos mamíferos foram anestesiados com uma combinação de xilazina a 2% (roedores, 10 mg / kg, IP; marsupiais, 5 mg / kg, IM) e cloridrato de cetamina (roedores, 100 mg / kg, IP; marsupiais, 25 mg / kg, IM). Para a eutanásia dos roedores foi utilizada uma overdose de propofol (10 mg/kg) por via intracardíaca. As amostras biológicas de vísceras de marsupiais presentes na coleção são provenientes de animais que foram à óbito durante as coletas.

A coleção biológica compreende um total de 128 animais, incluindo 125 roedores e três marsupiais (Tabela 1). As capturas de pequenos mamíferos foram realizadas mediante Licença Permanente emitida pelo ICMBio (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade), sob o protocolo 12.989–2, em nome do pesquisador Adriano Paglia, componente da equipe do projeto. Os animais que compreendem a coleção testemunho de cada área foram depositados na Coleção de Mamíferos do Departamento de Zoologia da UFMG. As capturas foram aprovadas pelo CEUA/UFMG sob o número 306/2017.

TABELA 1: Número amostral e distribuição de roedores e marsupiais capturados nos parques Jacques Cousteau e Mangabeiras em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

Mamíferos	Identificação (espécie/gênero)	Mangabeiras	Jacques Cousteau	Total
Roedores	<i>Cerradomys</i> spp.	9	25	125 (97,7%)
	<i>Necromys lasiurus</i>	4	35	
	<i>Rattus rattus</i>	0	36	
	Ordem Rodentia*	4	12	
Marsupiais	<i>Didelphis albiventris</i>	1	0	3 (2,3%)
	<i>Marmosops incanus</i>	2	0	
Total		20 (15,6%)	108 (84,4%)	128 (100%)

* Alguns roedores sem identificação foram caracterizados apenas como membros da ordem Rodentia.

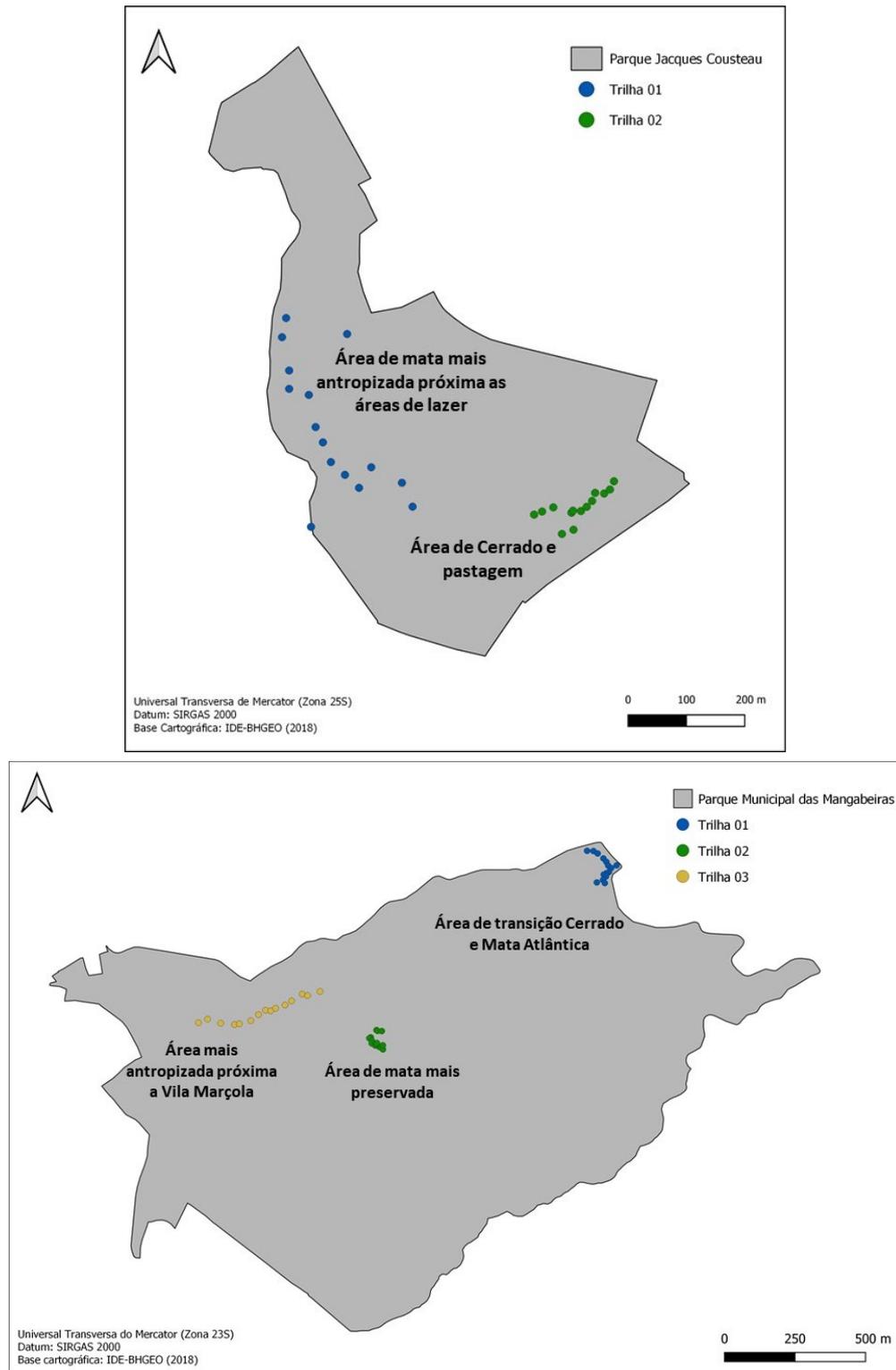


Figura 27: Transectos de captura dos pequenos mamíferos. (A) Parque Jacques Cousteau, Mapa mostrando a localização dos dois transectos de captura: Trilha 1: área mais próxima a região antropizada do parque; Trilha 2: área de Cerrado e pastagem (B) Mangabeiras, mapa evidenciando os três transectos considerados nas capturas: Trilha 1: área de transição Cerrado e Mata Atlântica; Trilha 2: área de mata mais preservada; Trilha 3: área mais antropizada, próxima à Vila Marçola. Fonte: ALMEIDA, 2021.

5.4 Metodologia Laboratorial

As amostras biológicas dos roedores e marsupiais que compõem a coleção foram preservadas em freezer -70°C ou em RNA Later® (Invitrogen™). As amostras armazenadas em RNA Later foram destinadas para abordagem molecular, que compreende a investigação do material genético viral nas amostras, e foi realizada através da Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR). A triagem molecular foi realizada para os vírus YFV, DENV, ZIKV, CHIKV e VACV. Para a triagem as amostras testadas foram os fígados (n=128) e rins (n=128) desses pequenos mamíferos.

5.4.1 Abordagem Molecular

5.4.1.1 Extração de DNA

Amostras de fígado dos pequenos mamíferos (n=128) foram utilizadas para investigação molecular de VACV através de qPCR. Para isso a extração de DNA viral desses fragmentos de tecido foi realizada utilizando o *High Pure Viral Nucleic Acid Kit, Roche*, seguindo as orientações do fabricante.

Inicialmente os fígados dos animais foram processados, sendo pesados 25 µg de cada amostra. Os fragmentos de fígados pesados foram acondicionados em novo microtubo contendo 500 µL de PBS 1X, e o processo de lise tecidual foi realizado através de trituração em *bead beater* (BioSpec, SoniBeast™ Cell Disrupter - modelo 607), usando três esferas por microtubo por 2 minutos.

Após o processamento, 200 µL do material resultante foram ressuspensos em 250 µL de Working Solution, contendo proteinase K, binding buffer e poly(A) (50 µL, 200 µL e 0,4 µL respectivamente). A suspensão foi homogeneizada em vórtex e incubada a 72°C por 10 minutos em bloco térmico (Eppendorf – Thermomixer 5355). Posteriormente foram adicionados 100 µL de binding buffer a cada amostra e os tubos foram vortexados. O produto foi transferido para colunas com filtro devidamente identificadas e centrifugado (centrífuga Eppendorf 5415R) por 1 minuto a 8.000 g. O líquido filtrado foi descartado e foram adicionados 500 µL de Inhibitor Removal Buffer, novamente centrifugado por 1 minuto a 8.000 g. O líquido foi descartado e, em seguida foram adicionados 450 µL de Wash buffer e cada coluna foi centrifugada por 1 minuto

a 8.000 g. A etapa de lavagem foi repetida mais uma vez e os tubos foram submetidos à centrifugação por 1 minuto a 12.000 g. As colunas foram acondicionadas em novos microtubos de 1.5 mL devidamente identificados, e para a etapa de eluição do DNA foram adicionados 50 µL de elution buffer em cada tubo, os tubos foram centrifugados por 1 minuto a 8.000 g. Os DNAs extraídos foram quantificados e analisados quanto à pureza através da utilização de espectrofotômetro Nanodrop® ND-1000 (Thermo Scientific), e foram armazenados em freezer -20°C.

5.4.1.2 Extração de RNA

Para obtenção de RNA viral a partir das amostras biológicas de fígados (n=128) e rins (n=128) dos pequenos mamíferos foram utilizadas as amostras armazenadas em RNA *later*®. A extração de RNA desses órgãos foi realizada utilizando o RNeasy Mini Kit (QIAGEN®, USA). Inicialmente os fígados e rins de cada animal foram processados, sendo pesados entre 20 e 30 µg de cada amostra em novos microtubos livres de nucleasse contendo 600 µL do tampão de lise do Kit de extração. O processo de lise tecidual foi realizado através de trituração em *bead beater* (BioSpec, SoniBeast™ Cell Disrupter - modelo 607), usando três esferas por microtubo durante 2 minutos. Após essa etapa inicial, o material foi centrifugado (centrífuga Eppendorf 5415R) a 15.000 g por 10 segundos. Foram adicionados 600 µL de etanol 70% (MERCK) em cada tubo de amostra, a mistura foi homogeneizada e em torno de 700 µL foram transferidos para as colunas do kit, que foram centrifugadas a 8.000 g por 30 segundos. Os tubos coletores foram descartados e o restante da amostra seguiu o mesmo passo anterior. Em seguida, foi adicionado a cada tubo o volume de 800 µL do tampão RW1, as amostras foram centrifugadas por 30 segundos a 8.000 g. Os tubos coletores foram novamente descartados e foram realizadas duas etapas sequenciais de adição de 500 µL do tampão RPE nas colunas e centrifugação por 30 segundos a 8.000 g. O líquido filtrado foi descartado, e as colunas foram colocadas em novos microtubos de 1.5 mL devidamente identificados, e em seguida para a eluição do RNA foram adicionados 55 µL de água livre de RNAses em cada coluna seguido de centrifugação de 8000 g por 1 minuto. Ao final, os RNAs obtidos foram armazenados em freezer -70°C.

5.4.1.3 Detecção molecular através de RT-qPCR/qPCR

Nesse projeto, os ensaios moleculares para investigação de vírus de RNA foram todos baseados na metodologia de One-step RT-qPCR. Na abordagem One-step, as etapas de transcrição reversa (síntese de DNA complementar – cDNA) e PCR ocorrem conjuntamente e em um único tubo, usando uma enzima transcriptase reversa simultaneamente com uma DNA Polimerase. A transcriptase reversa utilizada foi a enzima GoScript RT do kit de qPCR GoTaq® Probe 1-Step RT-qPCR (PROMEGA).

Os ensaios de RT-qPCR foram utilizados com o objetivo de triar as amostras de órgãos dos pequenos mamíferos para a presença de RNA viral de YFV, ZIKV, DENV e CHIKV. Para a investigação de DNA de Ortopoxvírus, VACV, foram realizados ensaios de qPCR.

A investigação do genoma dos vírus que são alvo de estudo nesse projeto foi realizada com base em protocolos já descritos na literatura e/ou utilizados e padronizados no Laboratório de Vírus (UFMG), sendo que para a detecção molecular de cada vírus foram padronizadas e utilizadas reações distintas, de acordo com os reagentes utilizados.

5.4.1.3.1 β -actina murina

Com o objetivo de assegurar a integridade do processo de extração de ácidos nucleicos, foi realizada a amplificação de um controle interno, o gene β -actina murina, expresso constitutivamente em roedores, mas que também amplifica amostras de marsupiais e outros mamíferos. Dessa forma, inicialmente todas as amostras de órgãos de pequenos mamíferos foram submetidas a qPCR para amplificação de um fragmento de 63pb deste gene.

Nesta metodologia, foram utilizados os iniciadores 5'-AAATCGTGCGTGACATCAAAGA-3' senso e antissenso 5'-GCCATCTCCTGCTCGAAGTC-3'. A reação foi realizada no aparelho StepOne™ (Applied biosystems) com as seguintes concentrações e volume de reagentes: 5 μ L de Master mix, 0,5 μ L de cada iniciador (β -actina) 10 pmol, 2 μ L de amostra e 2 μ L de água de livre de nuclease, para um volume final de 10 μ L. A ciclagem utilizada foi de 94°C por 2 minutos para desnaturação inicial, 40 ciclos de desnaturação a 94°C por

15 segundos e pareamento e extensão a 60°C por um minuto. Seguidos de curva de melt padrão com as etapas de 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto e 95°C por 1 minuto.

5.4.1.3.2 Flavivírus

Para investigação de vírus pertencentes ao gênero *Flavivirus* foram utilizadas reações de RT-qPCR específicas para cada vírus, YFV (DOMINGO *et al.*, 2012), ZIKV (LANCIOTTI *et al.*, 2008) e DENV (SANTIAGO *et al.*, 2013; ALM *et al.*, 2014) (Tabela 2). Todas as reações foram baseadas no sistema de detecção utilizando sondas TaqMan®, sendo que reações de qPCR com sonda fornecem detecção altamente sensível e específica.

Para todas as reações foi utilizado o kit de qPCR GoTaq® Probe 1-Step RT-qPCR (PROMEGA), que contém o GoTaq® Probe qPCR Master Mix, dUTP (2X), a enzima Transcriptase Reversa GoScript™, água livre de nucleases e a referência passiva (ROX).

TABELA 2: Especificações dos genes alvo, tamanho dos fragmentos e referências das reações para investigação de flavivírus.

Vírus	Região alvo	Amplicon(pb)	Técnica	Referência
YFV	região não codificante 5'	88 pb	RT-qPCR (Taqman)	DOMINGO <i>et al.</i> , 2012
ZIKV	gene E	76 pb	RT-qPCR (Taqman)	LANCIOTTI <i>et al.</i> , 2008
DENV	DENV-1	NS5	RT-qPCR (Taqman)	SANTIAGO <i>et al.</i> , 2013
	DENV-2	E		
	DENV-3	pRM		
	DENV-4			
DENV	região não codificante 3' UTR	63 pb	RT-qPCR multiplex (Taqman)	ALM <i>et al.</i> , 2014

Para a reação de detecção de YFV foram utilizados os iniciadores, senso YFallF '5-GCTAATTGAGGTGYATTGGTCTGC-3' e antissenso YFallR '5-CTGCTAATCGCTCAAMGAACG-3' e a sonda YFallP '5-FAM-

ATCGAGTTGCTAGGCAATAAACAC-TMR-3', os quais tem como alvo a região não codificadora (5'-NCR) do genoma do YFV.

Para a investigação de ZIKV foi utilizada a RT-qPCR descrita por Lanciotti e colaboradores (2008), sendo utilizados os iniciadores senso 5'-CCGCTGCCCAACACAAG-3' e antissenso 5'-CCACTAACGTTCTTTTGCAGACAT-3' e a sonda 5'-FAM-AGCCTACCTTGACAAGCAGTCAGACACTCAA-3', que tem como alvo um fragmento de 76 pb do gene do envelope viral. Tanto para a reação de YFV quanto para a de ZIKV foram utilizados os mesmos volumes de reação e ciclagem, 5,0 µL de Master Mix, 0,5 µL de cada iniciador (10 µM), 0,25 µL de sonda (10 µM), 0,25 µL de Transcriptase Reversa, 2,5 µL de RNA e água livre de nucleases q.s.p. 10 µL. As reações foram realizadas no aparelho StepOne™ (Applied biosystems) com as seguintes condições de ciclagem: um ciclo inicial de 45°C por 15 minutos, seguido de 95°C por 2 minutos, e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos com 60°C por 1 minuto.

Para a investigação do vírus da Dengue foram utilizadas duas metodologias, com os alvos descritos na Tabela 1. Para a RT-qPCR multiplex descrita por Alm e colaboradores (2014) foram utilizados os iniciadores senso DENV_F 5'-GCATATTGACGCTGGGARAGAC-3' e antissenso DENV_R1-3 5'-TTCTGTGCCTGGAATGATGCTG-3' e DENV_R4 5'-YTCTGTGCCTGGATWGATGTTG-3' com a sonda DENV_P 5'-6FAM-CAGAGATCCTGCTGTC-MGB(NFQ)-3'. Foram utilizados como volume de reação 12,5 µL de Master Mix, 2,25 µL de cada primer (10 µM), 0,5 µL de sonda (10 µM), 0,5 µL de Transcriptase Reversa, 4,0 µL de RNA e água livre de nucleases q.s.p. 25,0 µL. As condições de ciclagem da reação foram: um ciclo inicial de 50°C por 15 minutos, seguido de 95°C por 2 minutos, e 40 ciclos de 95°C por 03 segundos com 60°C por 30 segundos.

Já para a RT-qPCR descrita por Santiago e colaboradores (2013), os iniciadores e sondas estão descritos na Tabela 3. Foram utilizados como volume de reação e ciclagem, 5,0 µL de Master Mix, 0,5 µL de cada iniciador (10 µM), 0,3 µL de sonda (10 µM), 0,2 µL de Transcriptase Reversa, 2,5 µL de RNA e água livre de nucleases q.s.p. 10,0 µL. As condições de ciclagem da reação foram: um ciclo inicial de 45°C por 15 minutos, seguido de 95°C por 2 minutos, e 45 ciclos de 95°C por 15 segundos com 60°C por 1 minuto.

Todas as reações de RT-qPCR foram realizadas em duplicata. Em cada placa de qPCR foram adicionados controles positivos, RNA viral de cada vírus, sendo RNA do YFV17DD vacinal (lote: 980FPO662), RNA de ZIKV SPH (amostra cedida por Pedro F.C. Vasconcelos – Instituto Evandro Chagas) e de todos os quatro sorotipos de DENV (coleção Laboratório de Vírus). Além de controle negativo com água.

TABELA 3: Iniciadores e sondas utilizados nos ensaios de RT-qPCR para DENV-1–4 (SANTIAGO *et al.*, 2013).

Reagente	Sequência	Gene alvo
D1 primer Foward	CAAAGGAAGTCGTGCAATA	NS5
D1-R	CTGAGTGAATTCTCTACTGAAC	
D1-Sonda	CATGTGGTTGGGAGCACGC	
D2 primer Foward	CAGGTTATGGCACTGTCACGAT	E
D2-R	CCATCTGCAGCAACACCATCTC	
D2-Sonda	CTCTCCGAGAACAGGCCTCGACTTCAA	
D3 primer Foward	GGACTGGACACACGCACTCA	prM
D3-R	CATGTCTCTACCTTCTCGACTTGTCT	
D3-Sonda	ACCTGGATGTCCGGCTGAAGGAGCTTG	
D4 primer Foward	TTGCCTAATGATGCTGGTCCG	prM
D4-R	TCCACCTGAGACTCCTTCCA	
D4-Sonda	TTCCTACTCCTACGCATCGATTCCG	

5.4.1.3.3 Alphavírus

Para investigação de CHIKV foi utilizada uma metodologia de RT-qPCR baseada no estudo de Edwards e colaboradores (2007). A região amplificada corresponde ao gene E1 do genoma viral. Foram utilizados os primers senso 5'-TCGACGCGCCCTCTTTAA -3' e antissenso 5'-ATCGAATGCACCGCACACT-3' e a sonda 5'-ACCAGCCTGCACCCATTCTCAGAC-3'. Foram utilizados como volume de reação 5,0 µL de Master Mix, 0,5 µL de cada primer (10 µM), 0,25 µL de sonda (10 µM), 0,25 µL de Transcriptase Reversa, 2,5 µL de RNA e água livre de nucleases q.s.p. 10,0 µL. As reações foram realizadas no aparelho StepOne™ (Applied biosystems) com as seguintes condições de ciclagem: um ciclo inicial de 45°C por 15 minutos, seguido de 95°C por 2 minutos, e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos com 60°C por 1 minuto.

Todas as reações de RT-qPCR foram realizadas em duplicata. Em cada placa de qPCR foi adicionado o controle positivo, RNA viral de CHIKV genótipo ECSA (BH11762H804917), amostra cedida gentilmente pelo Prof. Dr Maurício Lacerda Nogueira da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), e controle negativo com água.

5.4.1.3.4 Orthopoxvirus

Para a detecção da presença de DNA de VACV nas amostras biológicas de pequenos mamíferos foi utilizada a metodologia de qPCR. Para amplificar o gene A56R, que codifica a hemaglutinina viral (HA), o protocolo foi realizado conforme descrito por Trindade e colaboradores (2008) (Tabela 4). As reações desse protocolo permitem distinguir amostras diferentes da espécie VACV.

A reação de qPCR foi realizada utilizando o kit de qPCR GoTaq® Probe 1-Step RT-qPCR (PROMEGA), com adição de SYBR® Green (Applied biosystems). Todas as amostras foram testadas em duplicata e foram incluídos nas placas o controle positivo, DNA de VACV amostra Western Reserve (WR) (coleção Laboratório de Vírus), e controle negativo (água). Foram adicionados 5,0 µL de Master Mix, dUTP (2X), Sybr, 0,2 µL de cada iniciador (10 µM), 1,0 µL de DNA e 3,6 µL de água livre de nucleases q.s.p. 10,0 µL. As reações foram realizadas no aparelho StepOne™ (Applied biosystems) com as seguintes condições de ciclagem: um ciclo inicial de 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 10 segundos e 58°C por 40 segundos, seguidos de curva de melt padrão à 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto e 95°C por 15 segundos. Para considerar amostras positivas foi avaliada a temperatura de dissociação semelhante à do controle positivo utilizado nas reações. Quando essa temperatura variou abaixo ou acima de 2°C, a amplificação foi considerada inespecífica.

Ainda, foi realizada também qPCR visando a detecção do gene da DNA polimerase (E9L) dos *Orthopoxvirus* (LI *et al.*, 2006). Foram utilizados os iniciadores senso '5-TCA ACT GAA AAG GCC ATC TAT GA-3' e antisenso 5'-GAG TAT AGA GCA CTA TTT CTA AAT CCC A-3' e a sonda 5'- TET- CCA TGC AAT ATA CGT ACA AGA TAG TAG CCA AC-3', os quais amplificam um fragmento de 100pb. A reação de qPCR foi realizada nas seguintes condições: 5,0 µL de Master Mix, 0,4 µL dos

iniciadores (10 μ M), 0,2 μ L de sonda (10 μ M), 1,0 μ L de DNA e água livre de nucleases q.s.p. 10,0 μ L. Nessa reação também foi utilizado o Master Mix do kit de qPCR GoTaq® Probe 1-Step RT-qPCR (PROMEGA) e as reações foram realizadas no aparelho StepOne™ (Applied biosystems) com as seguintes condições de ciclagem: um ciclo inicial de 50°C por 2 minutos, seguido de 95°C por 10 minutos, e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto.

TABELA 4: Iniciadores utilizados para detecção de VACV com base na hemaglutinina viral, gene A56R.

Iniciadores	Sequência	Especificidade
HA-genérico F	5'- CAT CAT CTG GAA TTG TCA CTA CTA AA-3'	Não específico, amplifica todas as amostras de VACV. Amplifica outros OPV.
HA-genérico R	5'- ACG GCC GAC AAT ATA ATT AAT GC-3'	
HA-BVV F	5'-ACC GAT GAT GCG GAT CTT TA-3'	Amplifica todas as linhagens de VACV brasileiros
HA-genérico R	5'- ACG GCC GAC AAT ATA ATT AAT GC-3'	
HA BVV-nDEL F	5'-GCG GAT CTT TAT GAT ACG TAC AAT G-3'	Amplifica amostras de VACV que não apresentam a deleção de 18 nt (BVV Grupo 2). Não amplifica vírus do Grupo 1.
HA-genérico R	5'- ACG GCC GAC AAT ATA ATT AAT GC-3'	

5.4.1.3.5 Gel de Agarose 1%

Para a análise de alguns fragmentos de DNA amplificados para o gene A56R foi realizada eletroforese em Gel de Agarose 1%, a 100 volts (V). Para o preparo do gel foi adicionado 1,0 g de agarose (Sigma) em 100 mL de tampão tris acetado de EDTA (TAE 1X) (Tris 40mM, ácido acético 20 mM e EDTA 1 mM), a agarose foi dissolvida em aquecimento em micro-ondas e posteriormente distribuída em cuba de eletroforese apropriada. Após a solidificação do gel, 10 μ L de produto de DNA amplificado foi adicionado em canaletas específicas juntamente com o corante Blue Orange 6X (Promega) e ladder de 50 pb (Bioron). Após o término da corrida, o gel foi corado pelo período de 30 minutos com o corante de DNA SYBR Safe (Invitrogen) e as bandas foram visualizadas em transiluminador de luz azul (Thermo Scientific).

5.4.1.3.6 Sequenciamento

Para as amostras positivas, de todos os vírus investigados, os *amplicons* das reações de RT-qPCR foram purificados e encaminhados para o Instituto René Rachou (Fiocruz Minas) para tentativa de sequenciamento para confirmação dos resultados. O sequenciamento foi realizado pelo método de Sanger ou dideoxi (SANGER, 1977) em sequenciador automático ABI 3700 (Applied Biosystems).

Os dados brutos do sequenciador foram analisados utilizando os programas SeqTrace (STUCKY, 2012) e Sequence Scanner Software v2.0 (Applied Biosystems). As sequências de nucleotídeos relativas às regiões analisadas dos genomas dos vírus detectados nesta pesquisa foram obtidas do GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) para análises comparativas. Os alinhamentos das sequências de nucleotídeos foram realizados com auxílio dos programas Clustal W e MUSCLE implementados no software MEGA 10.2 (<https://www.megasoftware.net/>) (KUMAR *et al.*, 2018).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Caracterização ecológica dos pequenos mamíferos

A coleção de pequenos mamíferos é composta por 128 animais, e majoritariamente por roedores (n=125) o que corresponde a 97,7% das amostras. Da ordem Rodentia a coleção abrangeu animais do gênero *Cerradomys* spp. (n= 34), *Necromys lasiurus* (n=39), *Rattus rattus* (n=36) e roedores sem identificação de espécie e gênero (n=16). De todas as amostras, apenas 2,3% são referentes aos marsupiais e estão incluídas as espécies *Didelphis albiventris* (n=1) e *Marmosops incanus* (n=2). Na seção de anexos dessa tese foi adicionada uma tabela com dados de todas as amostras e características dos animais incluídos na coleção. A diferença com relação a quantidade de marsupiais se refere ao fato desses animais não terem sido eutanasiados, como foi proposto para os roedores. Os exemplares de marsupiais que foram incluídos nesse projeto foram à óbito durante a coleta e assim tiveram as vísceras coletadas.

Com relação a representatividade por parques 15,6% das amostras são referentes ao Parque das Mangabeiras (n=20) e 84,4% ao Parque Jacques Cousteau (n=108). Com relação à composição de espécies observadas nas coletas, a fauna presente no Parque Jacques Cousteau sofre constante pressão antrópica, já que o parque se encontra rodeado por área urbana, e apresenta uma pequena área de extensão (335 mil metros quadrados). Esses fatores podem ter contribuído para a alta representatividade de roedores coletados nesse local, quando comparado ao Parque das Mangabeiras.

No Parque das Mangabeiras as coletas foram mais frequentes no Transecto 1 (trilha 1) (Figura 27), área de transição de Cerrado e Mata Atlântica e o gênero mais abundante coletado em todo o parque foi de *Cerradomys* sp. (n=9). Já com relação ao Parque Jacques Cousteau, foi possível observar captura mais frequente no Transecto 2 (área de Cerrado e pastagem) e com predominância de espécies silvestres, 35 capturas de *Necromys lasiurus* e 22 capturas de *Cerradomys* sp. Em contrapartida, no Transecto 1 (área mais antropizada) foi observada maior frequência de captura de *Rattus rattus* (n=35), o que evidencia a presença abundante desse roedor cosmopolita em áreas de fragmentos de mata inseridas em regiões antropizadas. Destacando que a captura de *Rattus rattus* só ocorreu no parque

Jacques Cousteau, o que corrobora também com a localização do parque, cercado por todo o perímetro por extensa área urbana.

Os marsupiais incluídos nessa coleção foram provenientes do Parque das Mangabeiras, e esse parque apresentou número amostral menor (15,6%), o que pode ser correlacionado ao fato desse parque apresentar uma extensão territorial significativa (2,4 milhões de m²) com áreas de mata mais preservadas, o que pode contribuir para a maior dispersão das espécies. Ainda, a presença de uma fauna silvestre mais diversa, pode ser relacionada a conexão com outras áreas de mata do entorno do parque, como a Serra do Curral e o Parque Mata da Baleia.

Com relação ao período sazonal de coleta, a maioria dos animais foram coletados durante a estação seca, correspondendo a 65,6% (n=84) do total, enquanto 34,4% (n=44) foram coletados em período que apresenta maior precipitação (outubro – março). Com relação a composição geral da coleção, observou-se uma maior coleta de mamíferos machos, 51,5% (n=66) comparado à 42,2% de fêmeas (n=54), e oito animais sem sexo definido (6,3%).

Na Tabela 5, foram reunidas as principais características das espécies analisadas nesse projeto, destacando que nossa área de estudo compreende fragmentos dos biomas de Cerrado e Mata Atlântica, e todas as espécies coletadas apresentam distribuição nesses biomas. Além disso, é importante destacar que considerando os roedores incluídos no estudo, as famílias Cricetidae e Muridae são as famílias mais diversas de mamíferos do planeta (BURGIN *et al.*, 2018), fator que em conjunto com as características intrínsecas dos roedores contribuem para os hábitos peri-domésticos observados nesses animais e a presença de espécies dessas famílias nos parques estudados. Assim como para os roedores, os animais incluídos na família Didelphidae também são conhecidos por prosperarem em ambiente com ação antrópica (JANSEN *et al.*, 2010; BEZERRA-SANTOS *et al.*, 2021).

TABELA 5: Características ecológicas dos pequenos mamíferos incluídos na coleção

Ordem	Família	Gênero/Espécie	Dieta	Locomoção	Peso	Distribuição
Rodentia	Cricetidea	<i>Cerradomys sp.</i>	Frugívoro/Granívoro	Terrestre	50-140g	MA, CE, CA, PT
	Cricetidea	<i>N. lasiurus</i>	Frugívoro/Onívoro	Terrestre	40-80g	AM, MA, CE, CA, PT, PP
	Muridae	<i>R. rattus</i>	Onívoro	Terrestre/Arborícola	70-300g	Cosmopolita
Didelphimorphia	Didelphidae	<i>D. albiventris</i>	Frugívoro/Onívoro	Escansorial	500-2700g	CE, CA, PT, PP
	Didelphidae	<i>M. incanus</i>	Insetívoro/Onívoro	Escansorial	20-140g	MA, CE, CA

* (MA) Mata Atlântica (CE) Cerrado (CA) Caatinga (PT) Pantanal (AM) Amazônia (PP) Pampa.

Fonte: Gillespie, H. 2004; Paglia *et al.*, 2012; IUCN, 2022; Guia dos Roedores do Brasil, 2008.

As espécies incluídas na nossa coleção são consideradas generalistas, e como demonstrado na Tabela 6, a dieta onívora desses mamíferos pode ser considerada fator determinante para essa adaptação em áreas de borda entre ambientes e para os hábitos sinantrópicos. Nesse cenário, considerando pequenos mamíferos que vivem inseridos em fragmentos de mata urbanos é relevante compreender que devido a ação antrópica alterando as condições ambientais, como por exemplo, através da oferta de alimento, disponibilidade de abrigo e redução de predadores (MILLS, 2006), é observada elevada densidade populacional dessas espécies, que assim conseguem prosperar e se adaptar cada vez mais ao ambiente urbanizado. De fato, no contexto dos dois parques, o sucesso reprodutivo dos roedores, especialmente da espécie *Rattus rattus* no Jacques Cousteau, pode ser correlacionado a presença dessas alterações antrópicas.

Considerando ainda uma das problemáticas relacionadas à elevada densidade populacional de roedores e espécies generalistas em fragmentos florestais, pode-se destacar o exemplo dos hantavírus. Onde estudos eco-epidemiológicos já demonstraram risco aumentado de infecções por esses vírus em ambiente degradado e com composição de espécies alterado, já que roedores generalistas são as principais espécies de roedores reservatórios de hantavírus, e essas espécies são facilmente encontradas em áreas periurbanas e regiões que demonstram alterações de composição vegetal (MILLS, 2006; SANTOS *et al.*, 2018; PRIST *et al.*, 2021).

Não obstante, levando em consideração o efeito diluidor na ocorrência de DIE (KESSING *et al.*, 2010; KEESING E OSTFELD, 2021), onde o risco de transmissão de patógenos pode aumentar com o declínio da biodiversidade, o contexto dos dois parques aqui estudados pode ser correlacionado com esse fator. No que diz respeito a composição de espécies e distribuição de fauna nos dois parques, não temos dados que nos permitem inferir a diversidade e densidade das espécies animais desses locais, mas pelo cenário de pressão antrópica em que se encontram pode-se inferir um predomínio de espécies generalistas em detrimento de espécies especialistas. Sendo que as espécies generalistas, frequentemente correlacionadas à habitats degradados, apresentam risco aumentado para transmissão de patógenos e assim como nos parques aqui estudados estão mais propensas a estabelecer contato com seres humanos e outros animais encontrados no entorno dos parques.

6.2 Prospecção molecular de arbovírus em amostras de pequenos mamíferos

Foram analisados todos os fígados (n=128) e rins (n=128) dos roedores e marsupiais coletados para prospecção dos arbovírus de interesse nesse projeto, YFV, ZIKV, DENV e CHIKV. Após a extração de RNA, todas as 256 amostras de RNA provenientes dos fígados e rins foram submetidas a qPCR para o gene da β -actina murina, e todas foram positivas para esse controle endógeno. Sendo assim foi possível validar o processo de extração de ácidos nucleicos e prosseguir para a triagem por RT-qPCR para os arbovírus investigados.

Dentre todos os órgãos processados e analisados, rins e fígados dos pequenos mamíferos para todos os alvos propostos (Tabela 6), uma amostra de fígado de roedor (FJC94), apresentou amplificação em RT-qPCR para o fragmento correspondente a região 5' não codificante (NCR) do genoma de YFV (Figura 28).

TABELA 6: Tabela representativa dos alvos de RT-qPCR analisados e dos resultados obtidos para investigação de arbovírus.

Vírus	Região alvo	Ensaio molecular	Número de fígados testados	Número de rins testados	Resultados RT-qPCR
YFV	5' NCR	RT-qPCR	n=128	n=128	indetectável *exceto FJC94
ZIKV	Gene E	RT-qPCR	n=128	n=128	indetectável
CHIKV	E1	RT-qPCR	n=128	n=128	indetectável
DENV	DENV-1	RT-qPCR	n=20	n=20	indetectável
	DENV-2				
	DENV-3				
	DENV-4				
	NS5 E pRM				
DENV	Região não codificante 3' UTR	RT-qPCR multiplex	n=108	n=108	indetectável

+ São representados também o número de órgãos testados para cada alvo para concluir a investigação molecular proposta para os arbovírus.

A amostra de fígado positiva para o RNA viral de YFV corresponde a um roedor, da espécie *Necromys lasiurus*, macho, coletado na campanha de novembro de 2018

no Parque Jacques Cousteau. Entretanto, o valor de Ct/Cq (threshold cycle), o qual indica o número de ciclos da reação de qPCR necessários para início da amplificação, foi alto nas duas repetições realizadas (média Ct = 35.9) e isso sinaliza para a baixa carga viral presente na amostra, o que dificultou a continuidade de caracterização e tentativa de sequenciamento e isolamento viral a partir dessa amostra.

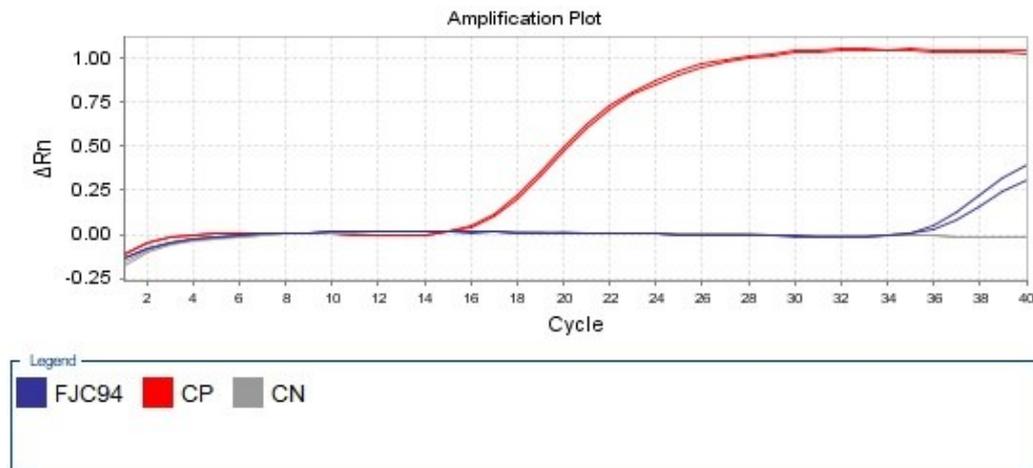


Figura 28: Gráfico de amplificação da amostra de fígado positiva para YFV (FJC94). O gráfico é representativo de duas reações de RT-qPCR positivas, com média de CT de 35.7. (CP) Controle positivo, RNA YFV e (CN) controle negativo da reação.

Foi realizada a tentativa de amplificação de um fragmento maior do genoma de YFV a partir dessa amostra (FJC94) para encaminhar para sequenciamento, porém após a realização de PCR convencional e visualização em gel de poliacrilamida 8%, nenhuma banda foi visualizada. Ainda, foi realizado novo processamento e extração de RNA da mesma amostra de fígado armazenada em freezer -70°C que ainda não havia sido descongelada para tentativa de nova amplificação por RT-qPCR. Além disso, foram realizadas extrações de RNA de outros órgãos desse animal, além de fígado e rim, como baço, gônadas e bexiga. Entretanto, nenhuma das novas tentativas demonstrou amplificação nos ensaios moleculares. Considerando as novas abordagens de investigação molecular tanto por PCR convencional quanto por RT-qPCR, através de alvos maiores do genoma do YFV e em diferentes órgãos, os dados aqui demonstrados não podem ser conclusivos quanto a positividade desse pequeno mamífero para o YFV.

A detecção de YFV em espécies silvestres já foi documentada na literatura, sendo descrita evidências sorológicas em pequenos mamíferos na Guiana Francesa e no México, onde foram detectados anticorpos neutralizantes em várias espécies de

primatas, bem como em outros mamíferos silvestres pertencentes às ordens Rodentia, Artiodactyla, Carnivora e Xenarthra (THOISY *et al.*, 2004; CIGARROA-TOLEDO *et al.*, 2016). Esses achados corroboram com a necessidade de investigação do YFV em animais silvestres, principalmente em áreas endêmicas para FA e que possuem registros recentes de surtos e epidemias em humanos e PNH (FIGUEIREDO *et al.*, 2019; SACCHETTO *et al.*, 2020). Destaca-se também a importância de investigação nos parques inseridos em áreas urbanas densamente povoadas, os quais são refúgios de fauna e no contexto da FA podem contribuir para manutenção da circulação viral e para o risco de emergência de surtos urbanos. De fato, em Belo Horizonte e região metropolitana foi relatada a ocorrência de epizootias recentes, nos anos de 2017, 2018 e 2021 (PBH, 2017A; PBH, 2017B; SACCHETTO *et al.*, 2020; PBH, 2021). Inclusive, com destaque para a ocorrência de epizootias por FA no Parque das Mangabeiras em 2017, e na região oeste da capital onde está inserido o Parque Jacques Cousteau, o qual foi fechado pelo poder público mais de uma vez. Nesse cenário, os dois parques passaram a exigir comprovante de vacinação para visitantes.

As interações complexas entre fatores ambientais e ecológicos acabam por alterar o padrão de distribuição e transmissão de patógenos entre os hospedeiros e regiões geográficas. Assim, considerando a ocorrência de ciclos silvestres dos arbovírus aqui estudados, evidências sorológicas e moleculares já descreveram a exposição e possível papel de pequenos mamíferos na dinâmica de transmissão desses vírus. Um exemplo é o vírus da Dengue, como descrito por Thoisy e colaboradores (2009) que demonstrou por estudos moleculares a detecção dos quatro sorotipos de DENV em animais das ordens Rodentia, Chiroptera e Marsupialia. Além de outros estudos que corroboram esses achados moleculares e também sorológicos em roedores e marsupiais, além de primatas e morcegos (THOISY *et al.*, 2004; LAVERGNE *et al.*, 2009; MORALES *et al.*, 2017; OLIVEIRA-FILHO *et al.*, 2018; GWEE *et al.*, 2021).

Sabe-se que para o ZIKV também existem evidências na literatura acerca da participação de pequenos mamíferos na manutenção de ciclos silvestres, como roedores, morcegos, caprinos, ovinos e orangotangos (ANDRAL *et al.*, 1968; DARWISH *et al.*, 1983; BUENO *et al.*, 2016). E especialmente no Brasil, destaca-se também a detecção viral em PNH, sinalizando para o possível estabelecimento do ciclo silvestre nesses animais no país, o que ainda não é completamente elucidado e

pode desempenhar importante papel na manutenção do ZIKV em áreas urbanas (FAVORETTO *et al.*, 2016; TERZIAN *et al.*, 2018). Para o CHIKV também existe a possibilidade de manutenção viral em ciclos silvestres envolvendo PNH como ocorre na África, e além da detecção em PNH, estudos já mostraram circulação viral em roedores, esquilos, aves e morcegos (CHEVILLON *et al.*, 2008; PAHO, 2011; VOUREC'H *et al.*, 2014; MATUSALI *et al.*, 2019).

A ausência de detecção dos arbovírus investigados nesse estudo pode ser correlacionada a alguns fatores, como a ausência de infecção e viremia no momento da coleta dos animais. E, ainda devido a fatores relacionados ao delineamento do estudo, como ausência de acompanhamento longitudinal da população analisada e ausência de amostras de soro também para realização de análises sorológicas.

Reforçando os dados aqui apresentados, estudos pregressos que utilizaram abordagens semelhantes com a nossa metodologia, também demonstraram ausência de circulação de arbovírus em coleções de mamíferos investigadas (CABRERA-ROMO *et al.*, 2016; SOTOMAYOR-BONILLA *et al.*, 2018; PAUVOLID-CORRÊA *et al.*, 2019; DE OLIVEIRA FIGUEIREDO *et al.*, 2022). Embora esses estudos de vigilância viral em interfaces humano-animal indiquem ausência de circulação de arbovírus em determinadas populações estudadas, não se pode descartar essa possibilidade, visto o caráter zoonótico desses vírus e principalmente levando em consideração o papel expressivo dos roedores como reservatórios de vírus zoonóticos (MEERBURG *et al.*, 2009; KEESING; OSTFELD, 2021).

O risco de estabelecimento e *spillback* de patógenos como os arbovírus para as populações de animais silvestres próximas à grandes centros urbanos no Brasil deve ser considerado, já que esses arbovírus são endêmicos e estão amplamente distribuídos nas regiões urbanas sendo responsáveis por causar epidemias sazonais e frequentes com grande impacto na saúde pública. Destaca-se, ainda, que a situação pode ser agravada no contexto dessas arboviroses pela presença massiva do vetor *Aedes aegypti* nas áreas urbanas brasileiras (KOTSAKIOZ *et al.*, 2017), e no contexto dos parques, também seria relevante a investigação viral entomológica em espécies competentes de mosquitos vetores que podem estar presentes nessas áreas. Estudos focados na cadeia epidemiológica desses arbovírus ainda no ambiente silvestre podem contribuir essencialmente para compreensão da dinâmica de ocorrência dos ciclos enzoóticos desses vírus e sinalizam para a necessidade de uma abordagem de vigilância de longo prazo, visando detectar precocemente a circulação enzoótica, a

disseminação desses vírus por biomas e a possível ocorrência de eventos de emergência.

Ainda, infecções por YFV em modelos animais, como hamsters, camundongos e PNH, já demonstraram comprometimento principalmente de órgãos como fígado, rins e baço, e com viremia média de 2-6 dias (MEIER *et al.*, 2009; JULANDER, 2016). Entretanto modelos utilizando camundongos não são os preferenciais para infecção por flavivírus, já que de forma geral, o sistema imune desses animais consegue conter a infecção. Por outro lado, os hamsters são susceptíveis a infecção por YFV e são modelos animais que reproduzem bem a infecção viral como ocorre em humanos e PNH (TESH *et al.*, 2001; JULANDER, 2016). Fazendo um paralelo com esses dados e com o fato das infecções por arbovírus apresentarem no geral curtos períodos virêmicos (KERKHOF *et al.*, 2019), a detecção molecular de YFV e outros arbovírus em animais saudáveis e que ainda não apresentam papel definido no ciclo de manutenção desse vírus se torna um desafio. Somando-se a isso, os vetores silvestres do YFV são encontrados majoritariamente na altura das copas das árvores, e os roedores de maneira geral, assim como *Necromys lasiurus*, apresentam hábitos terrestres (PAGLIA *et al.*, 2012; ALENCAR *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2020). Vale salientar que a espécie *Necromys lasiurus* é um dos principais reservatórios dos Hantavírus (DE OLIVEIRA *et al.*, 2013; SANTOS *et al.*, 2018) além disso, apresenta hábitos generalistas se adaptando bem em ambientes antropizados com áreas de mata fragmentadas e peridomicílio, fatores que podem ser relacionados com um possível papel na manutenção de outros patógenos virais (DE OLIVEIRA *et al.*, 2018; SANTOS *et al.*, 2018; COSTA *et al.*, 2019).

Nossos dados indicam a ausência de circulação desses arbovírus nos animais investigados, nas áreas e no período do estudo. Vale ressaltar que para compreender melhor a possível exposição desses animais aqui estudados aos vírus investigados, se faz necessária a realização de testes sorológicos que podem evidenciar exposição pregressa a um determinado patógeno, através da detecção de anticorpos. Porém, como não tivemos acesso ao soro desses animais, não podemos inferir sobre possíveis infecções prévias na população de mamíferos analisada. E diante disso, mais esforços são necessários para compreender a possível dinâmica de circulação enzoótica desses vírus no contexto aqui apresentado.

6.3 Prospecção molecular de VACV em amostras de pequenos mamíferos

Inicialmente, assim como realizado para a investigação dos arbovírus, após a extração de DNA, as amostras foram submetidas a qPCR para o gene de β -actina murina e todas foram positivas. Para a investigação molecular de VACV, as amostras de fígados (n=128) dos roedores e marsupiais foram testadas, por qPCR, para amplificação de dois genes sendo o E9L (DNA polimerase viral) e A56R (hemaglutinina viral - HA) (LI *et al.*, 2006; TRINDADE *et al.*, 2008).

Para o gene E9L, testado em qPCR utilizando o sistema TaqMan®, não foi observada positividade para nenhum dos animais coletados nos dois parques urbanos investigados. Já para a prospecção molecular referente ao alvo A56R, três amostras foram positivas, o que representa uma positividade total de 2,3% dos 128 animais analisados. Considerando as análises das reações de qPCR, as três amostras positivas apresentaram curvas de melt no Tm esperado, condizentes com o Tm do controle positivo utilizado (VACV-WR) (Figura 29).

Duas amostras de fígados positivas (FJC26/FJC88) são correspondentes a roedores, ambos do gênero *Cerradomys* spp. coletados no mesmo ano e provenientes do Parque Jacques Cousteau, o que corresponde a 8% dos *Cerradomys* spp. coletados nesse parque (2/25). A terceira amostra positiva é referente ao fígado de um marsupial, da espécie *Marmosops incanus*, coletado no Parque das Mangabeiras, correspondendo a 50% (1/2) dos exemplares de *Marmosops incanus* coletados nesse estudo (Tabela 7).

TABELA 7: Amostras de pequenos mamíferos positivas na prospecção molecular de VACV, referente ao gene alvo A56R.

Espécie	Identificação	qPCR Fígado A56R	Média Ct/Cq	Sexo	Parque	Ano de coleta
<i>Marmosops incanus</i>	FM31	+	29.3	Fêmea	Mangabeiras	2019
<i>Cerradomys</i> spp.	FJC26	+	27.0	Macho	Jacques Cousteau	2018
<i>Cerradomys</i> spp.	FJC88	+	35	Macho	Jacques Cousteau	2018

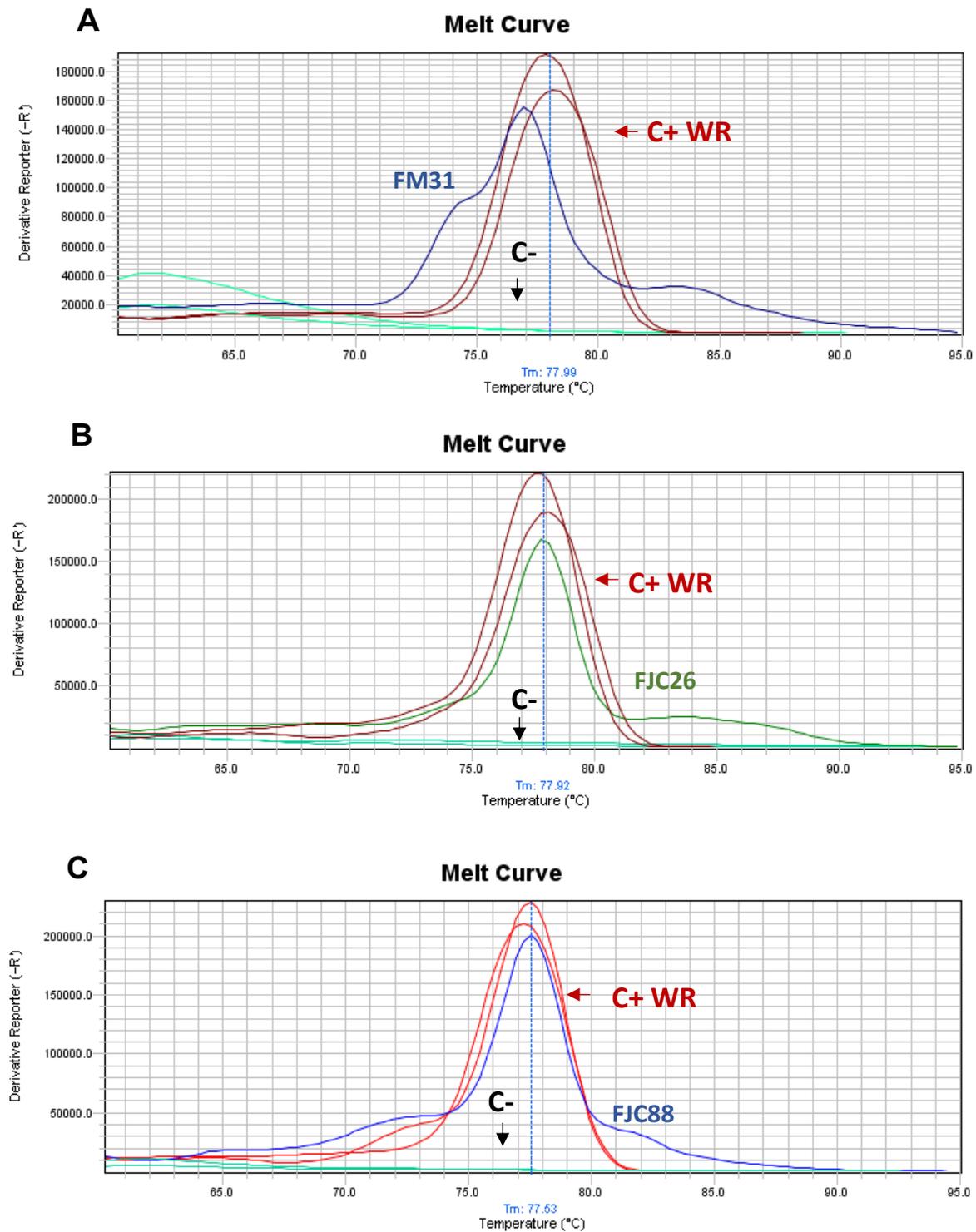


Figura 29: Gráficos dos resultados de qPCR para o alvo A56R (Hemaglutinina viral – HA). Os gráficos mostram a temperatura de dissociação dos controles positivos VACV WR e das amostras consideradas positivas FM31, FJC26 e FJC88 na triagem molecular específica para o gene A56R. As amostras apresentaram amplificação na PCR 2 (HA-BVV F/HA-generic R). Legenda: (C-) controle negativo, (C+ WR) controle positivo.

Ainda, os resultados das reações de qPCR foram visualizados em eletroforese em gel de agarose 1%. A separação do material amplificado, por eletroforese, referente às amostras FM31 e FJC88 mostrou amplicons com tamanhos de banda condizentes com o tamanho do fragmento observado para os controles positivos (Figura 30).

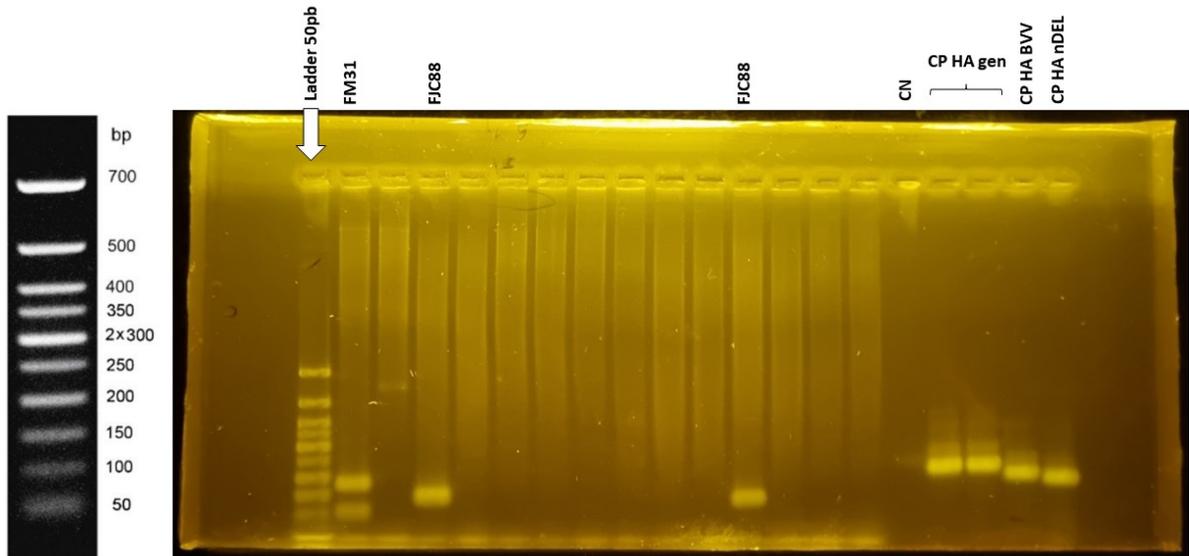


Figura 30: Eletroforese em Gel de Agarose 1%. São observadas bandas para os amplicons provenientes das reações para o gene A56R. Reação TRINDADE *et al.*, 2008 (HA BVV). Acima das canaletas estão indicadas as amostras testadas. Foram dedicadas canaletas ao controle negativo (CN) e positivo (CP) VACV WR. Marcador de tamanho molecular de 50pb (Bioron). As canaletas vazias são referentes a produtos de reação testados, mas que não demonstraram visualização de bandas de fragmentos.

A investigação molecular referente ao gene A56R, foi realizada com o protocolo de Trindade e colaboradores (2008) que é capaz de diferenciar os dois grupos de VACV-Br (Vaccinia vírus brasileiros). Através das análises dos gráficos de amplificação e curva de melt das três amostras consideradas positivas, as três podem ser consideradas amostras de VACV pertencentes ao Grupo 1, levando em consideração que apresentaram amplificação apenas na reação de qPCR 2 (BVV) (desenhada para amplificar todas as linhagens de VACV-Br) e não foi observada amplificação na qPCR BVV nDEL que amplifica amostras de VACV que não possuem a deleção de 18 nucleotídeos no gene A56R (Grupo 2). Entretanto, para confirmar a caracterização das amostras como pertencentes ao Grupo 1 de VACV circulantes no Brasil os amplicons foram encaminhados para tentativa de sequenciamento.

Após a purificação das bandas do gel de agarose, as amostras foram encaminhadas para sequenciamento em ambas as orientações pelo método dideoxi em plataforma ABI3130. Foi obtida uma sequência de nucleotídeos equivalente a amostra de *Cerradomys sp.* (FJC88). O fragmento obtido, referente ao gene A56R, apresentou 127 pb. Foi confirmada a detecção de VACV em amostra de fígado de roedor *Cerradomys sp.* por sequenciamento genético, e a sequência foi alinhada com sequências homólogas de VACV brasileiros. A sequência obtida apresentou similaridade com outras sequências de VACV depositadas no GenBank. Através do alinhamento (Figura 31) é possível observar a deleção de 18nt no gene A56R, agrupando a sequência às amostras de VACV do grupo 1 circulantes no Brasil.

A detecção de VACV em ambiente urbano sem registro preliminar de surto já foi descrita na literatura para outros mamíferos como gatos, cães, capivaras e quatis (COSTA *et al.*, 2017; DUTRA *et al.*, 2017; COSTA *et al.*, 2018). No Brasil, a maioria dos estudos destinados à investigação de VACV é direcionada a áreas com histórico de surtos de VB, envolvendo principalmente humanos e bovinos. Porém, levando em consideração o amplo espectro de hospedeiros que o VACV é capaz de infectar, essa característica pode favorecer a circulação viral também em ambiente urbano.

Desde os primeiros isolados de VACV em roedores silvestres e sentinelas na década de 1960 no Brasil, a circulação de VACV em roedores vem sendo evidenciada na literatura, seja através de detecção molecular ou sorológica (FONSECA *et al.*, 1998; FONSECA *et al.*, 2002; ABRAHÃO *et al.*, 2009; SCHATZMAYR *et al.*, 2011; PERES *et al.*, 2013; BARBOSA *et al.*, 2014; DUTRA *et al.*, 2017; MIRANDA *et al.*, 2017), incluindo pequenos roedores silvestres e sinantrópicos e capivaras, além da detecção também em marsupiais (PERES *et al.*, 2013; PERES *et al.*, 2016; MIRANDA *et al.*, 2017). Dessa forma, os dados aqui apresentados corroboram com as evidências já descritas na literatura científica, onde espécies de roedores e marsupiais podem atuar como reservatórios do VACV e contribuir para a persistência desse vírus na natureza. Torna-se importante ressaltar, também, a positividade para espécies do gênero *Cerradomys* spp. observada neste estudo e, que também foi descrita no estudo de Miranda e colaboradores (2017).

No contexto dos parques das Mangabeiras e Jacques Cousteau, nossos dados reforçam a hipótese de possível atuação desses mamíferos, principalmente os roedores, como pontes de transmissão entre o ambiente natural/silvestre para o urbano, como já descrito em modelos de transmissão do VACV (ABRAHÃO *et al.*, 2009; DE OLIVEIRA *et al.*, 2017). Os hábitos sinantrópicos e generalistas de roedores contribuem para manutenção desses mamíferos no espaço urbano, que fornece recursos e abrigo, condições propícias para reprodução e abundância de populações desses animais, e essa proximidade pode desencadear danos aos ecossistemas urbanos, as populações de animais silvestres e domésticos locais, mas também para a saúde humana. Além disso, considerando a atuação dos roedores como link para transmissão do VACV entre os ambientes, nas áreas de entorno dos parques urbanos o risco de interações entre roedores e animais domésticos é concreto, o que conseqüentemente pode contribuir disseminação e transmissão do VACV também para o homem.

Nesse cenário, a investigação viral em áreas de interface de vida silvestre com grandes centros urbanos é uma oportunidade de compreender não só a dinâmica de circulação do VACV em outros ambientes, mas entender um pouco mais acerca do risco que essa circulação pode representar para a saúde humana e animal. E considerando o âmbito de saúde pública, a ocorrência de infecção grave por VACV em humanos imunocomprometidos é bem descrita na literatura (LAITON-DONATO *et al.*, 2020), e esse contexto de circulação do VACV em áreas de mata próximas a grandes cidades pode colocar a população humana susceptível, não vacinada contra a varíola, em risco para a ocorrência de infecções.

De acordo com os dados de qPCR apresentados, uma amostra de marsupial (*Marmosops incanus*) proveniente do Parque das Mangabeiras, foi positiva para VACV. Esse resultado sinaliza para a possível circulação do vírus também nos roedores silvestres desse parque. Hipótese anteriormente levantada por Costa e colaboradores (2018) que confirmaram por dados moleculares e sorológicos, a exposição ao VACV em quatis e cães do Mangabeiras, mas que também considerou a possível atuação de roedores silvestres na circulação do VACV nesse local. Nesse sentido, a positividade desse marsupial e dos dois roedores *Cerradomys* spp. do Jacques Cousteau, reforça a possível atuação de espécies silvestres na dinâmica de transmissão do VACV nessas duas áreas verdes urbanas. Ressaltamos, também, que no Parque das Mangabeiras são encontrados roedores do gênero *Cerradomys* spp., porém o número reduzido de exemplares desse gênero nessa coleção pode ser um fator relacionado com a ausência de detecção do VACV nos roedores desse parque.

A baixa taxa de positividade observada, 2,3% de todos os pequenos mamíferos investigados para VACV pode ser correlacionada ao número amostral pequeno, ao período de coleta pontual (abril de 2018 a março de 2019), e ao fato de a região não apresentar histórico de surtos de VB e não estar localizada próxima a áreas de criação de bovinos e exploração de economia leiteira. Acrescentando-se a esses fatores, a ausência de dados sorológicos para as amostras incluídas nesse projeto. Considerando estudos semelhantes ao nosso, de investigação de VACV em animais silvestres, Miranda e colaboradores (2008), mostraram uma taxa de positividade de 6.4% (21/325) considerando detecção molecular por qPCR em roedores e marsupiais amostrados em Minas Gerais.

Ainda, levando em conta estudos de vigilância para outros ortopoxvírus e a detecção desses vírus em roedores. No estudo de Kinnunen e colaboradores (2011) foi avaliada a soroprevalência de anticorpos anti-OPV em 15 espécies de roedores, e foram encontradas soroprevalências de 33% na Finlândia e 32% na Alemanha, além do estudo Oldal e colaboradores (2015) que evidenciaram uma taxa de soroprevalência de 18% de anticorpos anti-OPV em roedores coletados na Hungria. Ainda, as taxas mais elevadas observadas na Europa podem ser correlacionadas a circulação do CPXV, que sabidamente apresenta roedores como hospedeiros reservatórios, além de outros mamíferos susceptíveis, como gatos e humanos (ESSBAUER *et al.*, 2010).

Nessa perspectiva, para o MPXV também é observada circulação em pequenos mamíferos e roedores (LI *et al.*, 2023). E diante do evento de emergência de MPXV observado a partir de 2022 (WHO, 2022D), assim como as emergências relacionadas aos outros ortopoxvírus e ao VACV, é importante manter atenção e o monitoramento da dinâmica de transmissão e circulação desses vírus, especialmente devido ao amplo espectro de hospedeiros e a papel zoonótico que representam.

Os resultados aqui descritos são importantes para destacar a ocorrência de ciclos enzoóticos virais em determinadas áreas geográficas, identificando assim possíveis locais de risco para ocorrência de eventos de *spillover*, além de espécies animais susceptíveis, com potencial para albergar vírus zoonóticos. No contexto urbano, esses dados reforçam a necessidade de detecção precoce da circulação de vírus com caráter patogênico, como uma ação preventiva para evitar surtos em populações animais e humanas susceptíveis.

7. CONCLUSÕES

Os dados apresentados indicam a ausência de evidências de circulação dos arbovírus investigados, YFV, ZIKV, DENV e CHIKV, nos pequenos mamíferos inseridos no Parque das Mangabeiras e Jacques Cousteau.

Embora na prospecção molecular o RNA do YFV tenha sido detectado em uma amostra de fígado de *Necromys lasiurus*, essa detecção não pôde ser confirmada por sequenciamento ou isolamento viral. Portanto, esses dados não são conclusivos para afirmar a positividade da amostra ao YFV.

A detecção de DNA do VACV em amostras de pequenos roedores e marsupiais, e o sequenciamento de um fragmento do gene A56R a partir de uma amostra de *Cerradomys* spp, são dados que reforçam a possibilidade de atuação desses mamíferos na manutenção e cadeia de transmissão do VACV também em ambiente urbano.

8. PERSPECTIVAS

- Para as amostras consideradas positivas na investigação molecular para o gene A56R, realizar novos ensaios de PCR para tentativa de amplificação de fragmentos de DNA maiores que possam contribuir para caracterização genética dessas amostras.
- Realizar tentativa de isolamento viral a partir das amostras consideradas positivas para VACV nos ensaios de qPCR;

CAPÍTULO II

PROSPECÇÃO MOLECULAR E SOROLÓGICA DE VÍRUS ZONÓTICOS EM AMOSTRAS DE QUATIS (*Nasua nasua*) DO PARQUE DAS MANGABEIRAS, MINAS GERAIS, BRASIL.

Belo Horizonte

2023

9. OBJETIVOS

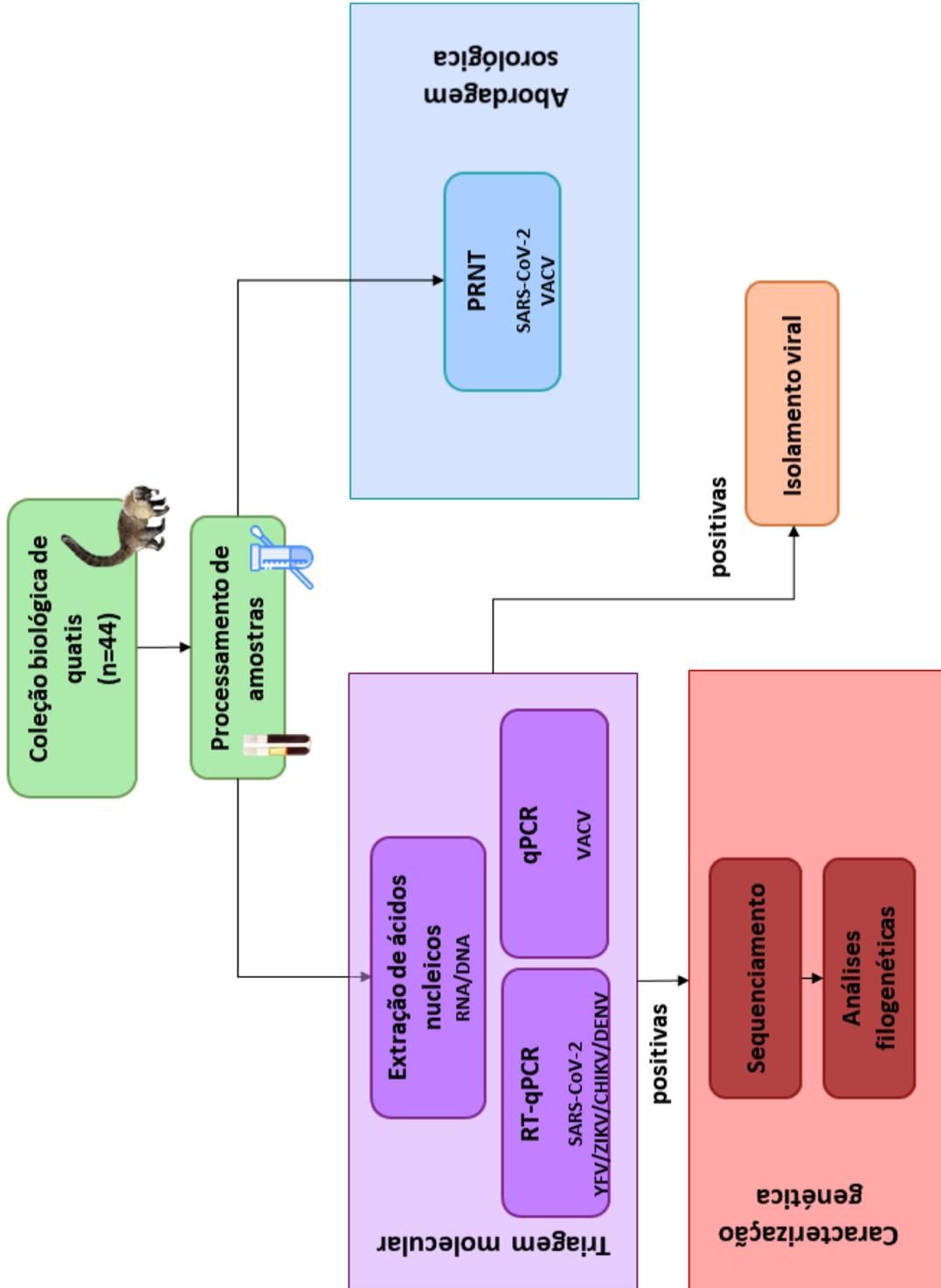
9.1 Objetivo Geral

Prospectar e caracterizar vírus zoonóticos em uma população de *Nasua nasua* presente na mastofauna de um parque urbano inserido em uma grande matriz urbana, Belo Horizonte, Minas Gerais.

9.2 Objetivos Específicos

- Investigar molecularmente através de RT-qPCR a circulação de SARS-CoV-2 em amostras biológicas de *Nasua nasua*;
- Investigar molecularmente através de RT-qPCR a circulação de arbovírus (YFV/DENV/ZIKV/CHIKV) em amostras biológicas de *Nasua nasua*;
- Investigar molecularmente através de qPCR a circulação de VACV em amostras biológicas de *Nasua nasua*;
- Caracterizar molecularmente os vírus detectados;
- Investigar a presença de anticorpos neutralizantes anti-SARS-CoV-2 e anti-Ortopoxvírus em amostras biológicas de *Nasua nasua*.

10. FLUXOGRAMA DE TRABALHO



11. MATERIAL E MÉTODOS

11.1 Coleção de quatis (*Nasua nasua*)

A segunda coleção biológica analisada nesse projeto engloba amostras biológicas de swab oral, swab anal e soro de quatis (*Nasua nasua*) (n=40) coletadas no Parque das Mangabeiras (19° 56' S 43° 54' O), Belo Horizonte, Minas Gerais, no ano de 2021. A realização das capturas de quatis foi concretizada em uma parceria estabelecida entre o Laboratório de Vírus UFMG, o professor Dr. Marcelo Pires do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da Escola de Veterinária UFMG, juntamente com a Fundação de Parques Municipais e Zoobotânica de Belo Horizonte e o Projeto Quatis.

Todas as amostras foram acondicionadas em freezer -70°C ou em RNA Later® (Invitrogen™) no Laboratório de Vírus do Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

11.2 Área de estudo

Esse estudo epidemiológico de corte transversal foi realizado a partir da coleta de amostras biológicas de quatis habitantes do Parque das Mangabeiras (Figura 32), no período de fevereiro a agosto de 2021. Como descrito no Capítulo I, o Parque das Mangabeiras é o maior parque urbano da cidade e está inserido na região centro-sul de Belo Horizonte, contando com cerca de 15 mil visitantes/ mês (PBH, 2018A). Os detalhes acerca da estrutura e características do parque já foram descritos anteriormente neste trabalho, portanto, pontuaremos neste tópico informações importantes com relação a população de quatis inserida nesse parque urbano.

Para o contexto da população de quatis amostrada no Parque das Mangabeiras é relevante destacar o Projeto Quatis. O projeto é fruto de uma parceria entre a Fundação de Parques Municipais e Zoobotânica (FPMZB) e a Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), e atua no monitoramento da população de quatis do parque há pouco mais de 15 anos. As ações do projeto incluem a realização de pesquisas para compreender o comportamento desses procionídeos, fatores relacionados à dieta, área de vida, hábitos, morfologia e relações de interação com os seres humanos visitantes do parque (PROJETO QUATIS, 2022; PBH, 2022).

De acordo com estudos realizados com relação ao levantamento populacional da espécie *Nasua nasua* no parque, a densidade de quatis no ano de 2010 estava acima das condições naturais (30,03 indivíduos/km²), e para o ano de 2021 dados preliminares indicam que a estimativa de densidade seja de 24,63 indivíduos/km². A alta densidade de quatis no parque das Mangabeiras pode ser correlacionado a ausência de predadores naturais e grande disponibilidade e oferta de alimento de origem humana para esses animais (HEMETRIO, 2011; comunicação pessoal).

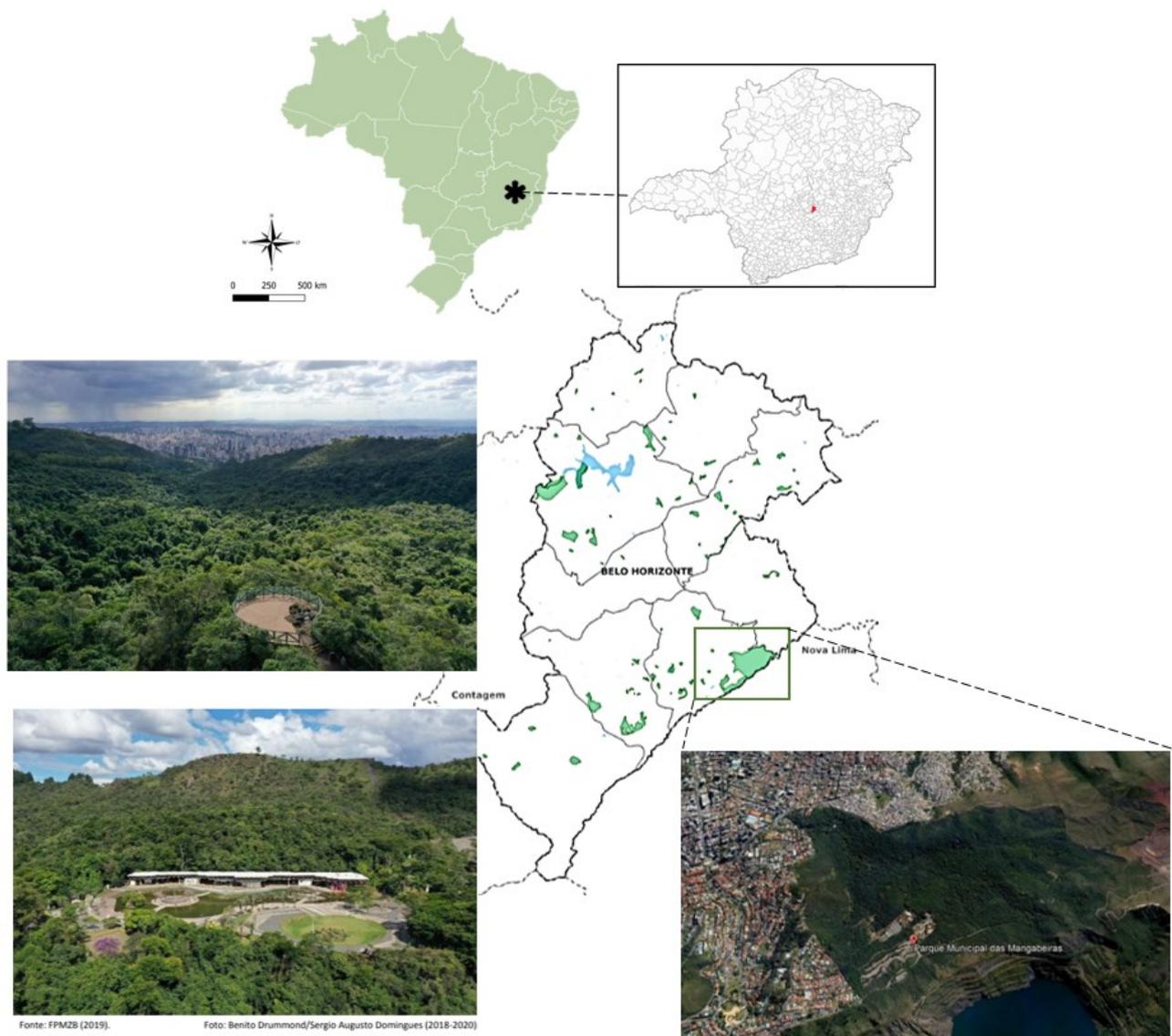


Figura 32: Mapa evidenciando a localização geográfica de Belo Horizonte, e a localização do Parque das Mangabeiras. O Parque das Mangabeiras é o maior parque urbano de Belo Horizonte e está situado na região centro-sul da cidade. Fonte: Adaptado de Portal Maps BH, FPMZB, 2020 e Google Earth.

11.3 Coletas

Para obtenção de amostras biológicas dos quatis foram realizadas duas capturas por estação, compreendendo as estações seca e chuvosa (fevereiro e junho, julho e agosto).

Os animais foram capturados através de armadilhas modelo Tomahawk, montadas em cinco pontos estratégicos de passagem dos animais, sendo utilizadas iscas de banana. Durante a captura as armadilhas de ferro galvanizado foram revisadas diariamente, e possuem as seguintes dimensões: de 70cm x 30cm x 20cm. Os quatis capturados foram identificados, marcados, foi realizada a coleta de amostras, tratamento de eventuais feridas e soltura.

Os animais foram anestesiados com Tiletamina e Zolazepam na dose recomendada de 0,1ml/kg por via intramuscular conforme protocolo anestésico utilizado no Zoológico de Sorocaba, São Paulo entre 1992 e 2011 (TEIXEIRA e AMBROSIO, 2014) e monitorados mediante aferição de frequência cardíaca, frequência respiratória e temperatura retal. Ainda, durante o período de sedação foi realizada a biometria de regiões corporais e dentes visando estimar idade de cada animal. A fim de monitorar esses animais sem necessidade de novas capturas, eles foram marcados com um brinco numerado de polipropileno. Entretanto, alguns animais podem perder essa marcação, e assim eles também foram identificados com implante de microchip na porção subcutânea da região interescapular.

A coleta de sangue dos animais foi realizada através da punção da veia jugular com auxílio de seringas estéreis de 5 mL e o sangue foi acondicionado em tubos de coleta com ativador de coágulo para posterior utilização em investigação sorológica. Também foram coletados swabs orais e anais dos animais, armazenados em RNA later, para investigação molecular de vírus zoonóticos.

Após as capturas e término dos procedimentos de identificação e coleta de amostras, os quatis eram colocados em caixas de transporte para recuperação anestésica, e posteriormente, eram soltos no mesmo local onde foram capturados, minimizando assim impactos e interferência em sua área de vida.

A realização do projeto foi aprovada pelo SISBIO sob a licença de número 75831, pelo CEUA/UFMG sob protocolos números 158/2020 e 100/2021 e a Fundação de Parques Municipais e Zoobotânica de Belo Horizonte sob protocolo FU 004-2020 para execução. A coleção é composta por amostras de swabs e soros de

40 indivíduos da espécie *Nasua nasua* (Tabela 8), quatro indivíduos contabilizados correspondem a re-capturas.

TABELA 8: Número amostral, data de coleta e sexo dos quatis incluídos nesse estudo.

Data de coleta	Sexo	Número amostral	Total
Fevereiro/2021	Machos	3	8
	Fêmeas	5	
Junho/2021	Machos	4	10
	Fêmeas	6	
Julho/2021	Machos	6	15
	Fêmeas	9	
Agosto/2021	Machos	4	11
	Fêmeas	7	
Total			44

11.4 Metodologia laboratorial

Para investigação de infecção e/ou exposição dos quatis aos vírus zoonóticos SARS-CoV-2, arbovírus (YFV/ZIKV/DENV/CHIKV) e VACV as amostras de swab anal e oral foram submetidas à prospecção molecular por meio de Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR). Além da investigação molecular, simultaneamente também foi realizada a investigação sorológica para a busca de anticorpos neutralizantes anti-SARS-CoV-2 e anti-OPV nas amostras de soro desses animais, através da técnica de soroneutralização por redução de placa (PRNT). As amostras positivas na prospecção molecular foram encaminhadas para tentativa de sequenciamento.

11.4.1 Abordagem molecular

11.4.1.1 Extração de RNA

Para obtenção de RNA viral a partir das amostras biológicas dos quatis foi realizada a extração de RNA utilizando o QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN®, Maryland, USA). Para as amostras de swabs 70 µL foram diluídos em 70 µL de meio MEM 0% e homogeneizados, e posteriormente adicionados em 560 µL de solução de AVL, os soros referentes aos swabs positivos também foram analisados por RT-qPCR e para extração 140 µL de soro foram adicionados a 560 µL de solução de AVL

fornecida pelo kit. Os microtubos foram vortexados e incubados à temperatura ambiente por 10 minutos. Após o período de incubação os tubos foram centrifugados (centrífuga Eppendorf 5415R) a 12.000 g por 30 segundos, posteriormente foi adicionado 560 µL de etanol (96–100%) em cada amostra e os microtubos foram submetidos a agitação em agitadores do tipo vórtex por 15 segundos.

Em seguida os tubos foram novamente centrifugados a 12.000 g por 30 segundos e as soluções de amostra, AVL, etanol correspondente a cada amostra foram adicionadas as colunas do kit devidamente identificadas, as colunas foram centrifugadas a 6.000 g por 1 minuto. Os tubos coletores foram descartados e as colunas colocadas em novos tubos coletores, e o passo anterior foi repetido. Após a centrifugação, os tubos coletores foram trocados e foi adicionado a cada coluna o volume de 500 µL de buffer AW1 que foram centrifugadas a 6.000 g por 1 minuto. O líquido filtrado foi descartado e as colunas adicionadas em novos tubos coletores para adição de 500 µL de buffer AW2 e centrifugação por 3 minutos a 12.000 g. Após esse passo, as colunas foram colocadas em novos microtubos de 1.5mL devidamente identificados e foi adicionado 60 µL de AVE em cada tubo para eluição. As colunas foram incubadas por 10 minutos e posteriormente centrifugadas a 6.000 g por 1 minuto, ao final o RNA foi imediatamente armazenado em ultra freezer -70°C.

11.4.1.2 Extração de DNA

Amostras de swabs orais e anais, e soros dos quatis também foram utilizadas para investigação molecular de VACV através de qPCR. Para isso a extração de DNA viral desses fragmentos de tecido foi realizada utilizando o *High Pure Viral Nucleic Acid Kit, Roche*, seguindo as orientações do fabricante.

Após o processamento inicial, 140 µL de cada amostra foram adicionados em 250µL de Working Solution, contendo proteinase K, binding buffer e poly(A) (50uL, 200 µL e 0,4 µL respectivamente). A suspensão foi homogeneizada em vórtex e incubada a 72°C por 10 minutos em bloco térmico (Eppendorf – Thermomixer 5355). Posteriormente foram adicionados 100 µL de binding buffer a cada amostra e os tubos foram vortexados. O produto foi transferido para colunas com filtro devidamente identificadas e centrifugado (centrífuga Eppendorf 5415R) por 1 minuto à 8.000 g. O líquido filtrado foi descartado e foram adicionados 500 µL de Inhibitor Removal Buffer, novamente centrifugado por 1 minuto a 8.000 g. O líquido foi descartado e, em seguida

foram adicionados 450 µL de Wash buffer e cada coluna foi centrifugada por 1 minuto a 8.000 g. A etapa de lavagem foi repetida mais uma vez e os tubos foram submetidos à centrifugação por 1 minuto a 12.000 g. As colunas foram acondicionadas em novos microtubos de 1.5 mL devidamente identificados, e para a etapa de eluição do DNA foram adicionados 50 µL de elution buffer em cada tubo, os tubos foram centrifugados por 1 minuto a 8.000 g. Os DNAs extraídos foram quantificados e analisados quanto à pureza através da utilização de espectrofotômetro Nanodrop® ND-1000 (Thermo Scientific), e foram armazenados em freezer -20°C.

11.4.1.3 β-actina

Assim como proposto na metodologia do Capítulo I, foi realizada a amplificação de um controle interno, o gene β-actina murina, expresso constitutivamente em roedores, mas que também amplifica para amostras de outros pequenos mamíferos. Dessa forma, inicialmente todas as amostras de RNA e DNA extraídos foram submetidas a qPCR para amplificação de um fragmento desse gene. Sendo utilizados os iniciadores 5'-AAATCGTGCGTGACATCAAAGA -3' senso e anti-senso 5'-GCCATCTCCTGCTCGAAGTC-3'. As reações foram realizadas no aparelho StepOne™ (Applied biosystems), sendo utilizadas as concentrações, volume de reagentes e condições de ciclagem como descrito no Capítulo I, tópico 5.4.1.3.1.

11.4.1.4 RT-qPCR para SARS-CoV-2

Para a investigação molecular de SARS-CoV-2 foi utilizada a RT-qPCR descrita pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC, 2020B) que tem como alvo os genes N1 e N2 do nucleocapsídeo (N) viral do SARS-CoV-2 (Tabela 9).

Para todas as reações foi utilizado o kit de iTaq™ Universal Probes One-Step Kit (BIO-RAD) e o conjunto de iniciadores e sondas 2019-nCoV RUO Kit (Integrated DNA Technologies – IDT).

Para o preparo do mix da reação foram utilizados os seguintes reagentes: iTaq universal probes reaction mix (2x) 10 µL, transcriptase reversa 0,5 µL, Iniciadores/Sonda 1,5 µL, água livre de nucleases 3,0 µL e RNA 5 µL, para um volume final de reação de 20 µL. O mix foi preparado separadamente para cada alvo (N1, N2). Após o preparo da reação, as amostras foram submetidas a ciclagem térmica no

equipamento Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR Systems com as seguintes condições: 25°C por 2 minutos, 50°C por 15 minutos, seguidos de 95°C por 2 minutos e 45 ciclos de 95°C por 15 segundos e 55°C por 30 segundos. Em cada reação foram adicionados controle negativo (NTC, água) e controle positivo RNA de SARS-CoV-2 (gentilmente cedido pela Dra. Danielle Durigon e Dr. Edison Durigon, USP, Brasil e Dr. Rafael Elias Marques (Centro Nacional de Biociencias LNBio-CNPEN)).

TABELA 9: Iniciadores e sondas utilizados para a detecção por RT-qPCR de SARS-CoV-2.

Reagente	Sequência 5' - 3'	Concentração
2019-nCoV_N1 Forward Primer	GAC CCC AAA ATC AGC GAA AT	500 nM
2019-nCoV_N1 Primer Reverse	TCT GGT TAC TGC CAG TTG AAT CTG	500 nM
2019-nCoV_N1 Sonda	FAM-ACC CCG CAT TAC GTT TGG TGG ACC-BHQ1	125 nM
2019-nCoV_N2 Primer Forward	TTA CAA ACA TTG GCC GCA AA	500 nM
2019-nCoV_N2 Primer Reverse	GCG CGA CAT TCC GAA GAA	500 nM
2019-nCoV_N2 Sonda	FAM-ACA ATT TGC CCC CAG CGC TTC AG-BHQ1	125 nM

11.4.1.5 RT-qPCR para investigação de Flavivírus

Para investigação de vírus pertencentes ao gênero *Flavivirus* foram utilizadas reações de RT-qPCR específicas para cada vírus, YFV (DOMINGO *et al.*, 2012), ZIKV (LANCIOTTI *et al.*, 2008) e DENV (SANTIAGO *et al.*, 2013). Para todas as reações foi utilizado o kit de qPCR GoTaq® Probe 1-Step RT-qPCR (PROMEGA), sendo que as condições de ciclagem das reações, reagentes, iniciadores e sondas utilizados estão descritos na metodologia do Capítulo I, tópico 5.4.1.3.2. Para a investigação do vírus da Dengue foi utilizada apenas a RT-qPCR descrita por Santiago e colaboradores (2013), com os iniciadores e sondas descritos na Tabela 3 do Capítulo I.

11.4.1.6 RT-qPCR para Alphavírus

Para investigação de CHIKV foi utilizada uma metodologia de RT-qPCR baseada no estudo de Edwards e colaboradores (2007). A região amplificada corresponde ao gene E1 do genoma viral, e os ensaios de RT-qPCR foram baseados nas mesmas condições descritas no Capítulo I, tópico 5.4.1.3.3.

11.4.1.7 qPCR para Orthopoxvirus

Para a investigação da presença de DNA de VACV nas amostras biológicas de quatis foi realizada triagem molecular através de qPCR, com investigação de três alvos. As reações de qPCR, para os genes alvo A56R (hemaglutinina viral - HA) e C11R (VGF/*viral growth factor* – fator de crescimento viral) foram realizadas utilizando o kit de qPCR GoTaq® Probe 1-Step RT-qPCR (PROMEGA), com adição de SYBR® Green (Applied biosystems). Todas as amostras foram testadas em duplicata e foram incluídos nas placas o controle positivo, DNA de VACV amostra Western Reserve (WR), e controle negativo (água).

Para o gene A56R foram utilizados os iniciadores senso '5-CAT CAT CTG GAA TTG TCA CTA CTA AA-3' e antisenso 5'- ACG GCC GAC AAT ATA ATT AAT GC-3' (TRINDADE *et al.*, 2008). Foram adicionados 5,0 µL de Master Mix, dUTP (2X), Sybr, 0,2 µL de cada iniciador (10 µM), 1,0 µL de DNA e 3,6 µL de água livre de nucleases q.s.p. 10,0 µL. Para o gene C11R foram utilizados os iniciadores senso '5-CGCTACAACAGATATTCCAGCTATCAG-3' e antisenso 5'-AGCGTGGATACAGTCACCGTGTA-3' (KROON *et al.*, 2016), sendo adicionados para a reação 5,0 µL de Master Mix, dUTP (2X), Sybr, 0,8 µL de cada iniciador (10µM), 2,0 µL de DNA e 1,4µL de água livre de nucleases q.s.p. 10,0 µL.

Todas as reações foram realizadas no aparelho StepOne™ (Applied biosystems) com as seguintes condições de ciclagem: um ciclo inicial de 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 10 segundos e 58°C por 40 segundos, seguidos de curva de melt padrão à 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto e 95°C por 15 segundos. Para considerar amostras positivas foi avaliada a temperatura de dissociação semelhante à do controle positivo utilizado nas reações. Quando essa

temperatura variou abaixo ou acima de 2°C, a amplificação foi considerada inespecífica.

Foi realizada também qPCR visando a detecção do gene da DNA polimerase (E9L) dos Orthopoxvirus (LI *et al.*, 2006). Foram utilizados os iniciadores senso '5-TCA ACTGAAAAGGCCATCTATGA-3' e antisenso 5'-GAGTATAGAGCACTATTTCTA AATCCCA-3' e a sonda 5'- TET- CCATGCAATATACGTACAAGATAGTAGCCAAC-3', sendo que as condições de ciclagem das reações e reagentes, utilizados estão descritos na metodologia do Capítulo I, tópico 5.4.1.3.4.

11.4.1.8 Gel de Agarose 1%

Visando realizar a análise de alguns fragmentos de DNA amplificados, foi realizada eletroforese em gel de agarose 1%, a 100 volts (V), como descrito no Capítulo I.

11.4.1.9 Sequenciamento e inferências filogenéticas

As análises de sequenciamento e inferências filogenéticas referentes a investigação de SARS-CoV-2 foram realizadas em parceria com o Dr. Luiz Carlos Júnior Alcantara e a Dra. Marta Giovanetti, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

Para as amostras positivas o RNA viral foi encaminhado para sequenciamento para confirmação dos resultados. Inicialmente para a síntese de cDNA foi utilizado o kit SuperScript IV Reverse Transcriptase kit (Invitrogen) seguindo as orientações do fabricante. A partir do cDNA é realizada uma PCR multiplex utilizando a Q5 High Fidelity Hot-Start DNA Polymerase (New England Biolabs) e um conjunto de iniciadores específicos (ARTIC Network (https://github.com/articnetwork/articncov2019/tree/master/primer_schemes/nCoV-2019/V1) para sequenciar o genoma completo do SARS- CoV-2 (QUICK, J., 2020).

Para prosseguir com o sequenciamento os produtos amplificados da PCR foram purificados com beads 1x AMPure XP (Beckman Coulter) e posteriormente foram quantificados usando Qubit® dsDNA HS Assay Kits (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. A preparação das bibliotecas para sequenciamento foi realizada usando um protocolo já publicado e com o Kit de sequenciamento Oxford Nanopore Ligation (SQKLSK109). Para cada amostra foi adicionado um código de

barras usando os kits Native Barcoding Expansion (NBD104 e EXP-NBD114). Depois da etapa de ligação do adaptador de barcode as bibliotecas de sequenciamento foram colocadas em uma célula de fluxo (FLO-MIN106) para sequenciamento MinION subsequente. Os dados das sequências gerados (reads) foram “base calling” usando o software Guppy e a demultiplexação de código de barras foi realizada usando qcat. As sequências consenso foram geradas por montagem *de novo* usando o Genome Detective e a Coronavirus Typing Tool (XAVIER *et al.*, 2020).

A atribuição de linhagem foi realizada usando a ferramenta de software de classificação de linhagem Pangolin (RAMBAUT *et al.*, 2020). Foi utilizada a plataforma GISAID (Global Initiative on Sharing Avian Influenza Data) (<https://gisaid.org/>) para obtenção de sequências de genoma de SARS-CoV-2 de todo o mundo, para posterior realização de análises comparativas. As sequências foram alinhadas usando a ferramenta ViralMSA (LI, 2018; MOSHIRI *et al.*, 2020) e IQ-TREE2 (MINH *et al.*, 2020), sendo usada para análise filogenética a abordagem de máxima verossimilhança. A topologia de árvore de máxima verossimilhança foi então usada para estimar o número de eventos de transmissão viral entre várias regiões brasileiras e o resto do mundo. O TreeTime (SAGULENKO *et al.*, 2018) foi usado para transformar esta topologia de árvore em uma árvore datada usando uma taxa média constante de $8,0 \times 10^4$ substituições de nucleotídeos por sítio por ano, após a exclusão de sequências discrepantes (outlier sequences). O padrão de mutação da VUI (variante sob investigação) foi analisado usando a ferramenta online NextClade (AKSAMENOV *et al.*, 2021).

11.4.2 Abordagem sorológica

Visando avaliar de maneira mais completa a exposição e/ ou infecção dos quatis ao SARS-CoV-2 e ao VACV a abordagem de investigação molecular foi complementada pela abordagem sorológica. O teste escolhido para investigar a presença de anticorpos neutralizantes nas amostras de soro de quatis foi o ensaio de soroneutralização por redução de placa (*Plaque Reduction Neutralizing Test* – PRNT).

11.4.2.1 Células Vero

Células Vero (CCL81) foram utilizadas nos testes de soroneutralização para investigação de anticorpos neutralizantes anti-SARS-CoV-2. Células de linhagem contínua Vero são células derivadas de epitélio do rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiopsis*) e foram obtidas da American Type Culture Collection (ATCC), Maryland, EUA. Essas células foram cultivadas em meio de cultura simples (Meio mínimo de Eagle – MEM) (Gibco, USA), com acréscimo de soro fetal bovino (SFB) a 5% (Cultilab, Brasil) para o crescimento celular, também são adicionados antimicrobianos (penicilina a 100 U/mL e estreptomicina a 0,1 mg/mL) e anfotericina B (2 ug/mL) para inibir o crescimento de bactérias e fungos, em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂. O cultivo foi realizado em garrafas de células com áreas de 25cm², 75cm² e 150cm².

11.4.2.2 Células BSC-40

Células BSC-40 foram utilizadas nos testes de soroneutralização para investigação de anticorpos neutralizantes anti-ortopoxvírus. Células de linhagem contínua BSC-40 são células epiteliais derivadas do rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiopsis*), obtidas da American Type Culture Collection (ATCC), Maryland, EUA. As células foram cultivadas em meio de cultura simples (Meio mínimo de Eagle – MEM) (Gibco, USA), acrescido de soro fetal bovino (SFB) a 5% (Cultilab, Brasil) para o crescimento celular, com adição de antimicrobianos, penicilina a 100 U/mL, estreptomicina a 0,1 mg/mL e anfotericina B (2 ug/mL) para inibir o crescimento de bactérias e fungos, e mantidas em estufa a 37°C suplementada com 5% de CO₂. O cultivo foi realizado em garrafas apropriadas e, posteriormente, as células foram transferidas para placas de 6 poços com fundo chato para a realização do teste de soroneutralização.

11.4.2.3 Ensaio de soroneutralização para SARS-CoV-2

Os ensaios de soroneutralização para investigação de anticorpos neutralizantes anti-SARS-CoV-2 foram realizados em parceria com o Dr. Mauro

Martins Teixeira e o Dr. Leonardo Camilo de Oliveira, em laboratório com nível de biossegurança adequado, no Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO – MG).

Para os ensaios de PRNT, as amostras de soro foram inicialmente aquecidas a 56°C por 20 minutos para a inativação do sistema complemento e testadas, em duplicata, para detecção da presença de anticorpos contra SARS-CoV-2.

Para cada soro testado, foram utilizadas placas de 24 poços, nas quais foram implantadas 1×10^5 células Vero por poço 24 horas anteriormente ao ensaio. A amostra de vírus controle, referência para a contagem do número de placas na ausência de anticorpos, foi diluída seriadamente até a obtenção do número de 100 UFPs em 100µL (1×10^3 UFP/mL). Os soros também foram diluídos seriadamente, nas diluições de 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640.

Para cada diluição de soro, foi preparada uma mistura de 100µL de diluição de soro mais 100 µL de suspensão viral contendo 100 UFP, mantidas sob agitação (200 rpm) à 37°C, por 1 hora e, em seguida, inoculadas nas células. As placas teste foram incubadas a 37°C e após 1 hora de adsorção das partículas virais, foi acrescentado meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 1% SFB, suplementado com 1,5% CMC. As placas foram então incubadas a 37°C pelo período de 72 horas até o aparecimento de ECP. Após esta incubação, as células foram fixadas por 15 minutos em solução tamponada de formaldeído à 10% e em seguida, a monocamada de células foi corada com solução de cristal violeta durante 15 minutos.

Para cada teste realizado, foi utilizado como referência controles com amostras de soro sabidamente positivas, ou seja, com anticorpos neutralizantes contra o SARS-CoV-2. A atividade neutralizante contra as partículas de SARS-CoV-2 foi determinada e expressa como concentração de soro requerida para atingir 50% de redução de unidades formadoras de placa (UFP).

11.4.2.4 Ensaio de soroneutralização para Orthopoxvirus

Para a detecção de anticorpos neutralizantes anti-OPV foi utilizado o protocolo descrito por Newman e colaboradores (2003), e adaptado pelo nosso grupo (COSTA *et al.*, 2013; KROON *et al.*, 2016), sendo que os ensaios de soroneutralização são considerados como método padrão-ouro para a detecção de anticorpos neutralizantes relacionados com proteção a infecções virais.

Inicialmente, os soros foram triados em duplicata na diluição de 1:40. Essa diluição é feita em meio MEM 0% SFB, adicionado de igual volume de MEM contendo entre 30 e 300 unidades formadoras de placa (UFP) de VACV-WR. Inicialmente, as amostras de soro foram incubadas a 56°C por 30 minutos em banho-maria para desnaturação das proteínas do sistema complemento. Para o controle de vírus, fundamental para a revelação da técnica, o mesmo processo foi adotado exceto pela presença da amostra de soro diluído, o qual foi substituído por SFB. As soluções de soro e vírus foram homogeneizadas e incubadas por 16 horas à 37°C em estufa suplementada com 5% CO₂. As soluções soro-vírus foram inoculadas em placas de seis poços com monocamadas de BSC-40, apresentando 90 e 100% de confluência para adsorção. Durante esse processo, a placa foi incubada a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ e homogeneizadas a cada quinze minutos durante uma hora. Após a adsorção, 2 mL de MEM 2% SFB foi adicionado a cada um dos poços, seguindo para o período de incubação de 48 horas a 37°C, 5% de CO₂. Após as 48 horas de incubação, as placas foram fixadas com solução de formalina a 10% (formaldeído 37%) e coradas com solução de cristal violeta a 1%. As placas de lise viral foram visualizadas e contadas. A partir da média do número de placas de cada duplicata, foram consideradas positivas as amostras que apresentaram média de redução $\geq 50\%$ àquelas encontradas no controle de vírus.

11.4.3 Isolamento viral

Após a triagem molecular por RT-qPCR, as amostras positivas para SARS-CoV-2 foram submetidas a tentativa de isolamento viral. Esse ensaio foi realizado em parceria com o Dr. Mauro Martins Teixeira e o Dr. Leonardo Camilo de Oliveira, em laboratório com nível de biossegurança adequado, no Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO – MG).

Para o isolamento de SARS-CoV-2 foram utilizadas células VERO. As amostras foram diluídas em meio DMEM (1:1, 80µL amostra em 80 µL meio) 3X antibiótico Penicilina/Streptomomicina e inoculadas sobre a monocamadas de células VERO em placas de 12 poços. Foi realizada adsorção por 2 horas, com homogeneização padrão de 15 em 15 minutos. Após o período de adsorção o volume final foi completado com 1mL de DMEM 2% SFB e as placas foram incubadas em estufa a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂ por 4 dias, ou até aparecimento de ECP.

12. RESULTADOS E DISCUSSÃO

12. 1 Prospecção molecular de SARS-CoV-2 e investigação sorológica em amostras de Quatis

Para validar o processo de extração de RNA de todas as amostras biológicas de quatis, essas foram submetidas a qPCR para o gene β -actina murina, e todas foram positivas para a presença do controle endógeno.

Considerando todos os quatis incluídos nesse estudo (n=40), todos os swabs orais e anais foram submetidos a RT-qPCR para investigação do material genético de SARS-CoV-2. Dentre todas as amostras, 2 animais foram positivos, o que representa uma positividade de 4,5% do total.

Com relação aos dois quatis positivos, o quati (Q341) foi positivo para a amostra de swab oral, o quati (Q535) foi positivo tanto no swab oral quanto anal. As amostras de soros referentes a esses dois animais também foram submetidas a RT-qPCR para SARS-CoV-2, entretanto nenhum dos dois soros foi positivo, indicando que não havia viremia detectável no momento da captura. Os dois quatis positivos são fêmeas e foram capturadas no mês de fevereiro de 2021 (Tabela 10) (Figura 33).

De acordo com o CDC (2020), as amostras são consideradas positivas quando apresentam amplificação dos dois alvos N1 e N2, considerando um valor de threshold (Ct) ≤ 40 . Todas as amostras analisadas nesse trabalho foram submetidas a repetição de RT-qPCR para confirmação dos resultados.

TABELA 10: Dados das amostras de quatis positivas e resultados da prospecção molecular de SARS-CoV-2.

Quati	Data	Sexo	Amostra	RT-qPCR SARS-CoV-2	Ct	
Q341	17/02/2021	Fêmea	Swab oral	+	33 N1 / 37 N2	
			Swab anal	-		
			Soro	-		
Q535	18/02/2021	Fêmea	Swab oral	+	20 N1 / 24 N2	
			Swab anal	+		30 N1/ 33 N2
			Soro	-		

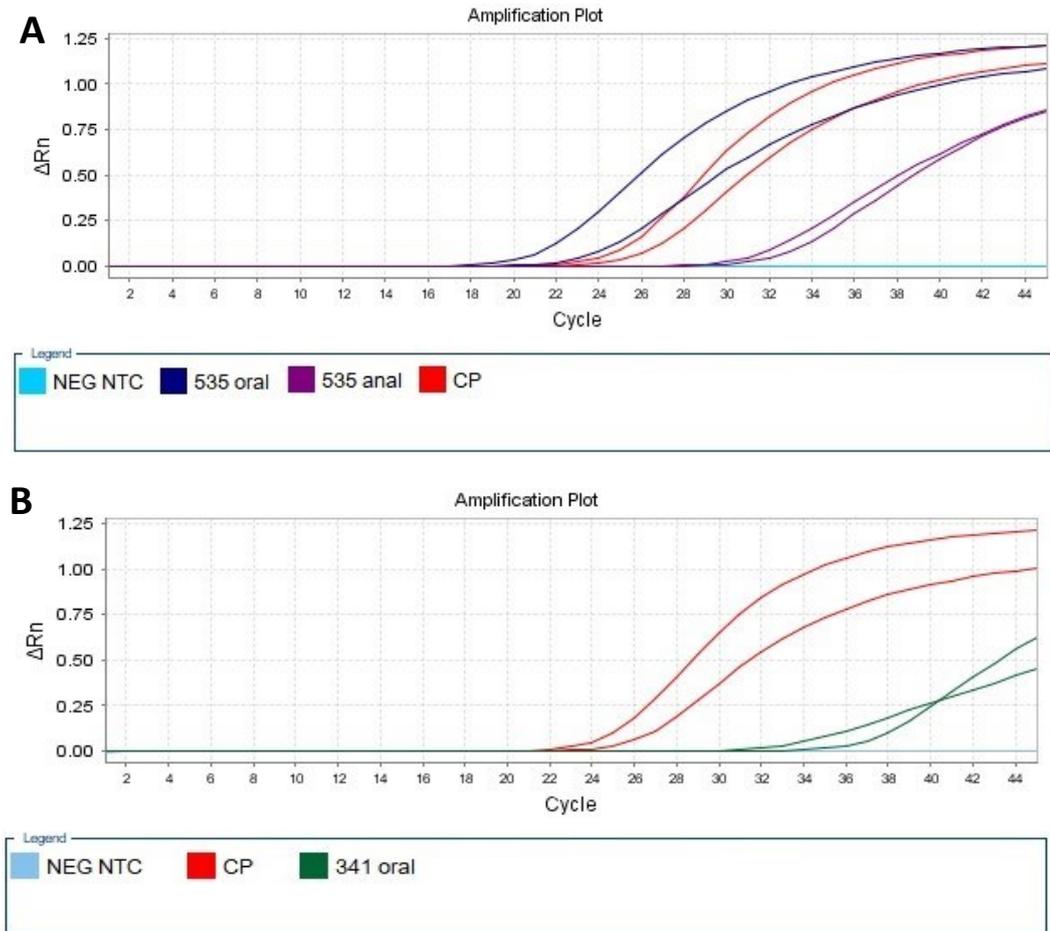


Figura 33: Gráficos de amplificação das amostras de swab positivas para SARS-CoV-2. (A) Gráfico de amplificação Q535. (B) Gráfico de amplificação Q341. Os gráficos são representativos de duas reações de RT-qPCR positivas. (CP) Controle positivo, RNA de SARS-CoV-2 e (NEG NTC) controle negativo da reação.

Visando confirmar a detecção do SARS-CoV-2, as três amostras positivas foram encaminhadas para o processo de sequenciamento utilizando a metodologia MinION, e obtivemos uma sequência de genoma completo a partir da amostra de swab anal do quati 535. Análises filogenéticas inferidas pelo método da Máxima Verossimilhança demonstraram o agrupamento esperado com outras sequências de genoma de SARS-CoV-2 provenientes de todo o mundo, depositadas no GISAID desde outubro de 2021 (n=3,441), e confirmaram que a sequência se agrupa com a variante P.2 (zeta) do SARS-CoV-2, circulante no Brasil (Figura 34).

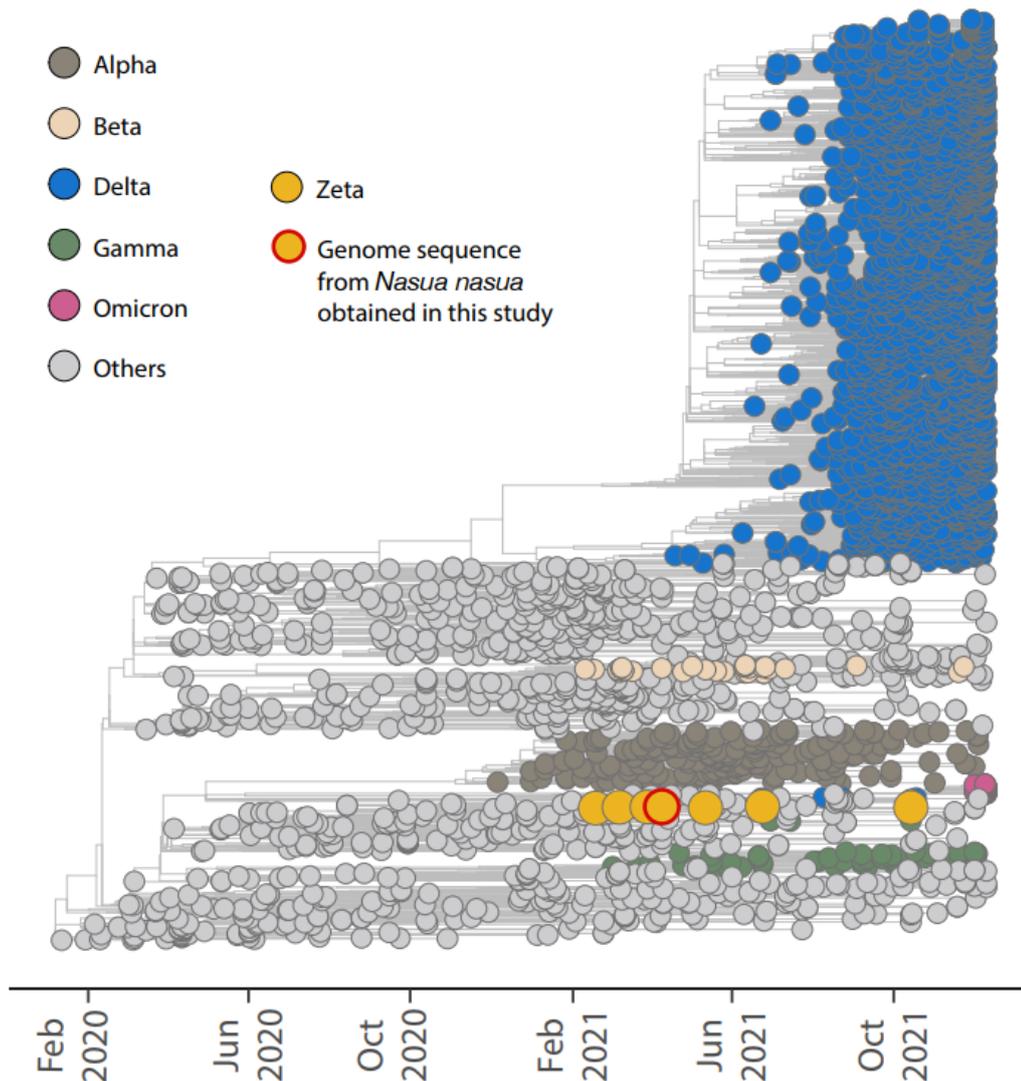


Figura 34: Árvore filogenética de SARS-CoV-2. A análise de Máxima Verossimilhança da sequência de genoma completo de SARS-CoV-2 proveniente de *Nasua nasua* obtida nesse trabalho foi inferida a partir de 3,441 genomas de SARS-CoV-2 de todo o mundo até outubro de 2021. As cores representam os clados correspondentes as diferentes variantes de preocupação de SARS-CoV-2 denominadas pela OMS. Variante alpha (Marrom), variante beta (Marrom claro), variante delta (Azul), variante Gamma (Verde), variante Ômicron (Rosa), outras variantes (cinza). Em amarelo estão destacadas as sequências referentes a variante P.2 (zeta), e destacada de vermelho é representada a sequência de SARS-COV-2 proveniente de *Nasua nasua* desse estudo. A árvore em escala temporal também evidencia a ocorrência dessas variantes através do tempo. A sequência de SARS-CoV-2 recém-gerada foi depositada no banco de dados do GISAID sob o número de acesso EPI_ISL_8800460. A sequência também foi incluída no SISGEN (Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético) número A627307.

A sequência de genoma completo do SARS-CoV-2 obtida do swab anal de um quati mostra a primeira descrição da linhagem zeta (B.1.1.28.2, denominada P.2) em outras espécies, e não apenas em hospedeiros humanos. No Brasil, a variante P.2 foi

detectada inicialmente no estado do Rio de Janeiro, em outubro de 2020, e havia sido considerada uma variante de interesse (VOI). Mutações foram identificadas no gene que codifica a proteína Spike do vírus, incluindo a mutação E484K, que está presente em outras variantes de preocupação em todo o mundo e pode contribuir para a redução da neutralização por anticorpos e escape do sistema imune (LAMARCA *et al.*, 2021; VOLOCH *et al.*, 2021). Nossos dados reiteram a dispersão e circulação da variante zeta pelo Brasil, e no estado de Minas Gerais, na época do estudo (LAMARCA *et al.*, 2021; SABINO *et al.*, 2021; VOLOCH *et al.*, 2021).

Com base nos resultados da técnica de soroneutralização, foram detectados anticorpos neutralizantes anti-SARS-CoV-2 em 20 amostras de soro de quatis, correspondendo a uma porcentagem de 50% dos animais analisados, considerando uma porcentagem de redução de 50% (PRNT-50) em pelo menos uma das diluições testadas (1:20, 1:40, 1:80). Ainda, considerando uma porcentagem de redução maior, de 90% (PRNT-90), 13 amostras (32,5%) apresentaram anticorpos neutralizantes detectáveis em pelo menos uma das três diluições testadas. Por fim, sete quatis (17,5%) apresentaram anticorpos neutralizantes na PRNT-90 em todas as diluições (Figura 35).

Para os quatis positivos na investigação molecular, foi observado para o soro do quati Q535, positivo tanto em swab anal como oral, a presença de anticorpos contra o SARS-CoV-2 nas três diluições considerando uma porcentagem de redução de 50% (Figura 35). Dados que juntamente com a detecção de RNA viral confirmam a exposição/infecção desse animal pelo vírus. Entretanto, o quati Q341 não apresentou anticorpos detectáveis. Considerando os quatro quatis recapturados, três demonstraram soroconversão quando comparadas as amostras de soro coletadas pela primeira vez. Sendo as primeiras capturas dos quatro animais referentes ao mês de fevereiro de 2021 e as recapturas em junho, julho e agosto do mesmo ano.

Os dados sorológicos de 50% dos quatis apresentando anticorpos neutralizantes anti-SARS-CoV-2 podem sugerir um cluster de exposição natural e infecção nessa população de animais no momento do estudo. Reforçando nossos dados, os resultados de soroconversão de três animais recapturados, com níveis de anticorpos superiores aos observados nas amostras de soro da primeira data de coleta, podem sugerir diferentes eventos de exposição ao SARS-CoV-2 ou uma janela de soroconversão para os indivíduos analisados até o período do nosso estudo. Dessa forma, estudos experimentais são uma necessidade urgente para entender melhor a

suscetibilidade da espécie *Nasua nasua* à infecção por SARS-CoV-2, a resposta imune e a possível capacidade de excreção e transmissão viral dos quatis.

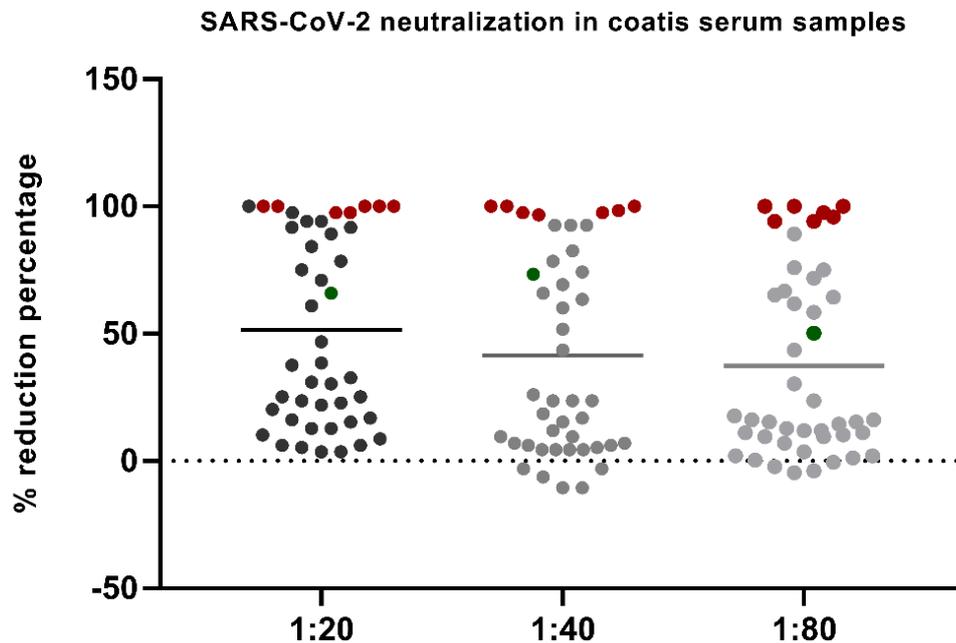


Figura 35: Gráfico representando os dados de PRNT e a porcentagem de redução das amostras de soro de quatis analisadas. Anticorpos neutralizantes de SARS-CoV-2 detectados pelo teste de neutralização por redução de placa. A linha destacada representa uma porcentagem média de redução de todas as amostras testadas. Os círculos representam todas as amostras testadas em diferentes diluições (n=44), os círculos verdes representam o quati 535 e os círculos vermelhos representam os sete quatis com anticorpos neutralizantes considerando PRNT 90% em todas as diluições (1:20, 1:40, 1:80).

Nesse sentido, os dados aqui apresentados confirmam um evento de transmissão reversa do SARS-CoV-2, com ampla circulação na população humana, para uma população de quatis em uma área urbana do Brasil. Esses resultados também chamam a atenção para a possibilidade de transmissão zoonótica em ambientes silvestres e o risco de estabelecimento de ciclos de transmissão enzoótica do SARS-CoV-2, inclusive em áreas verdes fragmentadas próximas a ambientes urbanos. Ainda, esses dados são corroborados pela extensa literatura científica atual, a qual vem reportando a ocorrência de infecções naturais e susceptibilidade ao SARS-CoV-2 em uma ampla gama de hospedeiros animais, considerando espécies de animais domésticos, de cativeiro, de criação e silvestres (SHARUN *et al.*, 2021; CUI *et al.*, 2022; WOA, 2023). A infecção natural por SARS-CoV-2 já foi descrita em espécies animais como: cães, gatos, furões, hamsters, visons, grandes felinos, primatas não humanos, quatis, veados, esquilos, entre outros (MCALLOOSE *et al.*,

2020; FARAG *et al.*, 2021; GAO e WANG, 2021; MURPHY e LY, 2021; SHARUN *et al.*, 2021; CDC, 2022C; WOA, 2022). Enfatizando que animais vivendo em locais com maiores oportunidades de contato com o homem, como casas, zoológicos, parques e fazendas apresentam maior risco de infecção natural pelo SARS-CoV-2 (FARAG *et al.*, 2021; GORAICHUK *et al.*, 2021; MUNNINK *et al.*, 2021).

Os quatis são pequenos mamíferos diurnos e que apresentam uma dieta onívora, são animais muito sociáveis, apresentando locomoção terrestre, mas também são tipicamente encontrados em árvores. Esses animais são considerados sinantrópicos, conseguindo prosperar em áreas próximas a ambientes urbanos, frequentemente são avistados interagindo com o homem e são encontrados ingerindo alimentos de origem antrópica (HEMETRIO, 2011; FERREIRA *et al.*, 2013; RODRIGUES *et al.*, 2021; PROJETO QUATIS, 2021) De acordo com Hemetrio (2011), a densidade de quatis no Parque das Mangabeiras, área de estudo deste projeto, está acima do considerado natural (30,03 indivíduos/km² no ano de 2010), o que pode ser correlacionado a ausência de predadores naturais e grande disponibilidade de alimento.

Levando em consideração essas características da espécie e o cenário do Parque das Mangabeiras, alguns fatores podem ajudar a explicar a possível fonte e vias de transmissão do SARS-CoV-2 na população de quatis amostrada. No contexto ecológico observado, o comportamento dos quatis pode facilitar o contato com visitantes e turistas, com fômites contaminados, lixo e restos de comida em lixeiras e nas áreas urbanas limítrofes ao parque, como residências e estabelecimentos comerciais (Figura 36). Tal fato, corrobora também com a positividade viral encontrada em swabs orais provenientes desses animais. Esse conjunto de fatores pode ainda facilitar a possível ocorrência de transmissão interespecíes de SARS-CoV-2, nessas áreas limítrofes entre ambientes urbano-silvestres, locais que podem propiciar maior interação e oportunidades de contato entre hospedeiros humanos, animais silvestres e domésticos. Estudos pregressos do nosso grupo de pesquisa já demonstraram a possível atuação dos quatis do Parque das Mangabeiras na circulação do VACV em ambiente urbano (COSTA *et al.*, 2018). Dados que também suportam a investigação de outros vírus nesses proconídeos, como proposto por esse projeto.

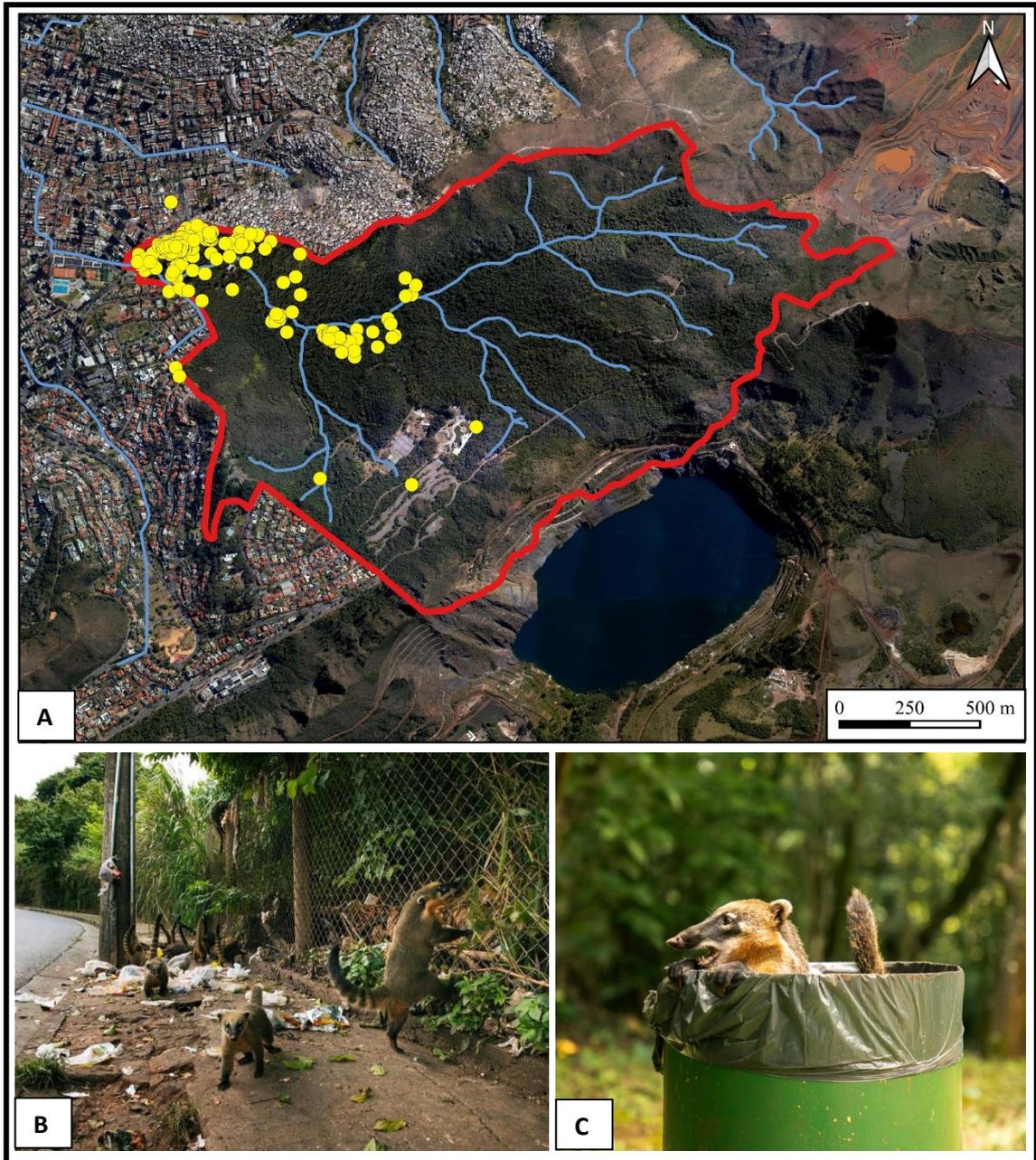


Figura 36: Mapa demonstrando o deslocamento do quati 341 pelo Parque das Mangabeiras e registros da população de quatis amostrada. (A) Vista de satélite do Parque Municipal das Mangabeiras, destacando os cursos d'água em linhas azuis e o deslocamento do Quati 341 através de pontos georreferenciados em círculos amarelos, durante o período de fevereiro a março de 2021. Área do Parque Municipal das Mangabeiras, circundada por uma linha vermelha. (B, C) Fotografias de indivíduos da população de *Nasua nasua* do Parque das Mangabeiras. Fotógrafo: Augusto Gomes. Este mapa foi criado com o Software QGIS 3.24.3, DATUM SIRGAS 2000 (UTM 23S).

Além disso, fortalecendo os dados observados, registros de monitoramento por GPS (Sistema de Posicionamento Global) do quati 341, no período de fevereiro a março de 2021 (Figura 36), mostram, de fato, o deslocamento do animal pelas áreas limítrofes do parque, com residências e ambientes urbanos, além dos registros

fotográficos de indivíduos da população de quatis estudada, em contato com lixo e restos de alimentos de origem humana (Figura 36).

Vale destacar também que a detecção molecular de um quati positivo para SARS-CoV-2 também foi descrita em um zoológico do estado de Illinois, nos Estados Unidos (APHIS, 2021; WOA, 2022). Resultados que assim como os nossos, reafirmam a susceptibilidade desses animais ao SARS-CoV-2, e assim como os quatis do Parque das Mangabeiras, o quati positivo desse zoológico também não apresentava sinais clínicos de infecção.

Com base em nossos resultados, não é possível comprovar como esses quatis foram infectados com o SARS-CoV-2. No entanto, encontramos fortes evidências da transmissão do SARS-CoV-2 a partir de uma origem humana, especialmente devido ao genoma viral obtido, que pertence à variante P.2, que também circulava na população humana naquele local (Rede Genômica Fiocruz, 2022), juntamente com o status sorológico observado na população de quatis. E novamente, considerando o contexto ecológico observado, que sugere contato indireto com lixo humano contaminado ou mesmo contato direto próximo com humanos infectados.

A transmissão direta de SARS-CoV-2 de humanos infectados para outros animais já foi bem documentada (MUNNINK *et al.*, 2021; YEN *et al.*, 2022; CDC, 2022C). Análises de sequenciamento de genoma já mostraram a transmissão humano-animal e animal-humano do SARS-CoV-2 entre visons e trabalhadores em fazendas de visons na Holanda (MUNNINK *et al.*, 2021) e entre hamsters de estimação e humanos em Hong Kong (YEN *et al.*, 2022). Além dos estudos de Pickering e colaboradores (2022), o qual demonstrou a transmissão animal-humano através de veados de cauda branca, no Canadá, e o estudo de Sila e colaboradores (2022), entre gatos e humanos na Tailândia. Esse cenário reforça a ameaça para ocorrência de possíveis novos clusters de transmissão de SARS-CoV-2 nas interfaces animal-humano e a preocupação com o risco de novos eventos de *spillover* em populações humanas. Além disso, a possibilidade de transmissão sustentada entre animais silvestres pode contribuir para a evolução viral e levar à ocorrência de mutações (BASHOR *et al.*, 2021), fato que pode contribuir para o surgimento de novas variantes, alterar a dinâmica da transmissão, e em cenários mais extremos ocasionar escape vacinal.

A detecção de RNA viral no swab oral e no swab anal do quati 535 indica a presença simultânea do vírus em dois sítios corporais diferentes desse animal. Além

disso, a presença de anticorpos neutralizantes anti-SARS-CoV-2 (PRNT-50) em todas as diluições testadas de soro deste animal, juntamente com nossos resultados de RT-qPCR apontam para uma replicação viral neste hospedeiro. Ainda, os baixos valores de Ct do swab oral (Tabela 12), podem indicar elevada carga viral no trato respiratório superior deste mamífero. Resultados que estão de acordo com estudos relacionados à patogênese do SARS-CoV-2 em humanos e outras espécies de mamíferos, em relação a infecções naturais e experimentais, mostrando replicação viral afetando principalmente o trato respiratório superior, mas também o trato intestinal (V'KOVSKI *et al.*, 2021, LAMERS *et al.*, 2022). Analisados em conjunto, esses resultados mostram a suscetibilidade dos quatis ao SARS-CoV-2 e trazem mais evidências sobre a possível excreção e capacidade de transmissão desses hospedeiros, embora não esteja claro se os quatis infectados podem transmitir o vírus para outros animais. Foi realizada a tentativa de isolamento viral das amostras positivas na RT-qPCR, porém nossas amostras foram coletadas no reagente RNeasy TM e esse reagente demonstrou toxicidade para a monocamada celular.

No contexto ecológico observado, para a população de quatis do Parque das Mangabeiras, seria relevante monitorar esses pequenos mamíferos visando compreender melhor o possível papel desses animais como hospedeiros e/ou reservatórios do SARS-CoV-2 em áreas de interface silvestre-urbana. Ainda, com relação à conservação da espécie e possíveis impactos na ecologia desses animais, seria importante ampliar a compreensão acerca da susceptibilidade da espécie frente à infecção pelo SARS-CoV-2, avaliando por exemplo fatores como o curso da infecção, a presença ou não de sintomas, o padrão de resposta imune desses animais e interação da proteína S viral com receptor ACE2, o qual é conservado entre várias espécies de mamíferos (SUN *et al.*, 2020; WEI *et al.*, 2021). A compreensão de aspectos relacionados à infecção pelo SARS-CoV-2 nesses animais pode contribuir para explicar a ausência de viremia e de sinais clínicos observada nos animais no momento de captura.

Dessa forma, diante do evento de *spillback* de SARS-CoV-2 para animais silvestres aqui documentado, é importante orientar os moradores das áreas limítrofes e visitantes do parque para não alimentar os animais e restringir o contato próximo com a população de quatis, buscando minimizar as possíveis fontes de transmissão do SARS-CoV-2 para esses animais. Além disso, visando evitar futuros surtos seria importante a adoção de iniciativas relacionadas à saúde única, como a vigilância de

circulação viral em outros animais do parque, a exigência de comprovante de vacinação e a conscientização dos visitantes.

12.2 Prospecção molecular de VACV e investigação sorológica em amostras de quatis

Após o processo de extração, todos DNAs obtidos, referentes as amostras de swabs orais, anais e soro, foram dosados em Nanodrop e submetidos a qPCR para o gene da β -actina, para posterior prospecção para os genes propostos para investigação de OPV.

Com relação aos resultados referentes a investigação molecular nos quatis analisados, para o alvo E9L nenhuma amostra foi considerada positiva. Com relação à triagem para A56R, três amostras, dois swabs orais (Q354; Q551) e um soro (Q543), foram consideradas indeterminadas por apresentarem ampliações detectáveis na curva de amplificação, mas temperaturas de dissociação divergentes do controle positivo, ou apenas uma duplicata próxima (T_m com temperatura variando abaixo ou acima de 2°C - amplificação considerada inespecífica). Entretanto, quando foram realizadas repetições desses resultados de qPCR, as amostras foram consideradas negativas.

Para a investigação realizada para o gene C11R (VGF), cinco amostras (12.5%) foram consideradas positivas nas análises de qPCR, considerando ampliações observadas nas duas duplicatas e temperaturas de dissociação próximas ao controle positivo da reação. Essas amostras apresentaram valores de C_q variando entre 31.9 e 34.5, e são referentes aos quatis 552 (soro), 542 (soro), 543 (soro), 352 (swab oral) e 535 (swab oral).

Vale destacar também que para nenhum desses cinco animais considerados positivos na investigação molecular para o gene C11R, foi observada positividade nos outros alvos testados. Também, não foi observada amplificação para amostras biológicas diferentes (soro, swab oral e swab anal) referentes ao mesmo animal.

Ainda, os fragmentos de DNA amplificados para o alvo VGF nas reações de qPCR foram fracionados e visualizados em gel de agarose 1%, sendo confirmada a presença de banda no tamanho esperado (semelhante ao controle positivo), entretanto após a purificação e tentativa de sequenciamento por método de Sanger, não foi obtida nenhuma sequência de nucleotídeos com qualidade adequada. As análises dos dados brutos de sequenciamento pelos programas SeqTrace e

Sequence Scanner (como descrito e utilizado no Capítulo I) demonstraram sequências com baixa qualidade, o que inviabilizou a confirmação da positividade das amostras para VACV e a caracterização molecular.

Levando em conta esses dados, é válido destacar que a triagem molecular de OPV através da investigação do gene C11R pode ser considerada mais sensível quando comparada aos outros alvos, já que esse alvo é bem conservado e encontra-se duplicado no genoma dos OPVs (ABRAHÃO *et al.*, 2010), fato que poderia ajudar a explicar o perfil de detecção observado para as amostras de quatis analisadas.

No entanto, a metodologia aqui utilizada para investigação do gene C11R, utiliza iniciadores que amplificam um fragmento de 81 pb desse gene. Nesse sentido, o tamanho do fragmento pode ser considerado pequeno, e esse fato pode ser considerado como uma hipótese para a falta de sucesso do sequenciamento, e a utilização de fragmentos de DNA mais longos e não degradados (amplicon do alvo desejado) é fator determinante para a obtenção de sequências de nucleotídeos confiáveis e de qualidade em sequenciamento Sanger (CROSSLEY *et al.*, 2020).

Considerando os dados apresentados, uma perspectiva com relação a esses resultados é a realização de novos ensaios de PCR para as amostras positivas na investigação para VACV, visando buscar a amplificação de regiões maiores do genoma viral para nova tentativa de sequenciamento.

Com relação os dados referentes à investigação sorológica da população de quatis amostrada, não foram detectados anticorpos neutralizantes anti-OPV nas amostras de soro desses animais, considerando o ponto de corte $\geq 50\%$ (PRNT-50) em relação ao controle de vírus (Figura 37).

Ainda, os ortopoxvírus são imunologicamente reativos, sendo observada imunidade cruzada entre esses vírus, onde a infecção desencadeada por uma espécie viral gera imunidade contra qualquer outra espécie do gênero (FENNER *et al.*, 1988; JACOBS *et al.*, 2009). Nesse sentido os dados de PRNT aqui apresentados são correlacionados à presença de anticorpos anti-OPV, porém a técnica é considerada padrão-ouro para detecção de anticorpos neutralizantes em decorrência de infecções virais (KROON *et al.*, 2016) e é amplamente utilizada em estudos de soroprevalência relacionados a investigação de circulação do VACV no Brasil e outros OPV em todo mundo (ABRAHÃO *et al.*, 2010; COSTA *et al.*, 2018; ABREU *et al.*, 2022; LUCIANI *et al.*, 2022; ZAECK *et al.*, 2023).

VACV neutralization in coatis serum samples

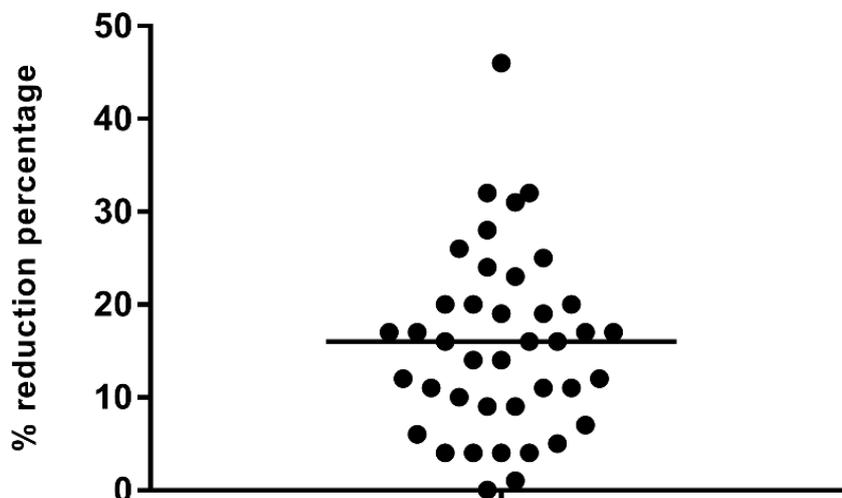


Figura 37: Gráfico representando os dados de PRNT-50 para as amostras de soro de quatis. No gráfico é evidenciada a porcentagem de redução de placas de lise dos soros testados em relação ao controle de vírus (VACV- WR). Todas as amostras foram consideradas negativas e a linha em destaque representa a média dos percentuais de redução de todas as amostras.

A ausência de imunidade anti-OPV observada nesse estudo, em contraste com os dados de Costa e colaboradores (2018), pode estar correlacionada com o número amostral do nosso estudo. Considerando que a população estimada de quatis para os anos de 2010 e 2021, fica em torno de 124 e 101 indivíduos respectivamente (HEMETRIO, 2011; HEMETRIO comunicação pessoal) e não amostramos todos os indivíduos, além da possibilidade de ausência de infecção prévia por ortopoxvírus nos animais aqui analisados.

No contexto ecológico aqui observado, onde a população de quatis do Parque das Mangabeiras transita frequentemente por espaços urbanos limítrofes ao parque, como a Vila Marçola, áreas residenciais e de comércio, e estabelece contato frequente com os visitantes, essa proximidade de animais com seres humanos pode ser um fator relevante para aumentar o risco de transmissão de patógenos zoonóticos como descrevemos para o SARS-CoV-2, mas também para o VACV. Cenário que justifica a investigação desses animais como potenciais hospedeiros e/ou reservatórios virais, e dessa área verde urbana no contexto eco-epidemiológico do VACV.

No Brasil, a cadeia epidemiológica do VACV já é bem explorada no contexto rural, com atuação principal de bovinos e seres humanos (SILVA-FERNANDES *et al.*, 2009; KROON *et al.*, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2017). A avaliação da circulação do VACV

em áreas urbanas tem sido mais explorada, e os dados apresentados nessa tese e em estudos progressos pontuam para a atuação de mamíferos silvestres e domésticos na dinâmica de circulação desse vírus nesses ambientes (DUTRA *et al.*, 2016; COSTA *et al.*, 2017; COSTA *et al.*, 2018; ABREU *et al.*, 2022).

Corroborando os nossos dados e hipótese, Costa e colaboradores (2018) confirmaram a circulação de VACV em quatis do Parque das Mangabeiras, a partir de amostras coletadas nos anos de 2013 a 2015 através de análises moleculares e sorológicas. Em conjunto, os dados moleculares aqui descritos e os resultados de Costa e colaboradores (2018), indicam que o VACV circula nessa população de procionídeos e pode desempenhar um papel na manutenção e disseminação do VACV nesse ambiente urbano, atuando assim como proposto para os roedores nos estudos (ABRAHÃO *et al.*, 2009; DE OLIVEIRA *et al.*, 2017), como links entre o ambiente de mata e as áreas periurbanas do entorno do parque.

Ainda, destacando o possível papel de quatis nesse cenário, o estudo de Gallardo-Romero e colaboradores (2016) mostrou uma prevalência de anticorpos anti-OPV de 16.67% em quatis da espécie *Nasua narica* (quati de nariz branco) no México, além da confirmação da detecção de anticorpos anti-OPV em um quati na região sudoeste do estado de São Paulo (PERES *et al.*, 2013).

12. 3 Prospecção molecular de arbovírus em amostras de swabs de quatis

Para a prospecção molecular para arbovírus foram analisados os swabs orais e retais dos quatis. De todas as amostras de quatis amostradas, não foi observada positividade para os arbovírus testados, YFV, ZIKV, CHIKV e DENV.

Assim como para a investigação realizada para os roedores e marsupiais, incluídos no Capítulo I deste estudo, as hipóteses relacionadas a ausência de detecção dos arbovírus investigados na população de quatis aqui analisada podem ser a ausência de infecção e viremia no momento da coleta, além da não susceptibilidade desses procionídeos a infecção pelos arbovírus investigados. Ainda, uma limitação acerca da investigação de arbovírus nos quatis foi a ausência de realização de investigação sorológica, devido à escassez na quantidade de soro para realização de PRNT, já que essas amostras foram submetidas também a investigação sorológica para SARS-CoV-2 e OPV. E ainda, devido à reatividade cruzada entre

esses vírus, seriam necessários ensaios de soroneutralização direcionados para cada um dos arbovírus investigados.

Considerando o cenário epidemiológico do Brasil, a detecção de arbovírus em espécies de mamíferos silvestres já foi relatada no país, como anticorpos contra DENV-1, DENV-2 e YFV em primatas do estado da Bahia, e anticorpos contra DENV-3 em preguiças (CATENACCI *et al.*, 2018) além da detecção da circulação de ZIKV em PNH (FAVORETTO *et al.*, 2016; TERZIAN *et al.*, 2018).

Para o velho mundo, a ocorrência de ciclos enzoóticos de ZIKV, DENV e CHIKV em PNH e em áreas naturais já é bem descrita, porém nas Américas esse cenário ainda precisa ser elucidado, e espécies com potencial para reservatórios e/ou hospedeiros podem ser identificadas. De fato, Oliveira-Filho e colaboradores (2018) encontraram soroprevalência de anticorpos para ZIKV, DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4, YFV em macacos-prego de Pernambuco. Além do estudo de Moreira-Soto e colaboradores (2018), que investigou a presença de anticorpos anti-arbovírus em PNH, e encontrou evidências sorológicas limitadas (devido à reatividade cruzada) da infecção de PNH por ZIKV e CHIKV, resultados recentes que mostram o risco de manutenção de ciclos silvestres desses vírus no país, assim como o observado para Febre Amarela.

Nesse mesmo sentido, estudos nacionais já evidenciaram a detecção de anticorpos totais contra arbovírus em quatis inseridos no Parque Nacional do Iguaçu, uma área de Mata Atlântica da região Sul do Brasil (RODRIGUES *et al.*, 2023). Diante de todo esse contexto, a investigação da circulação de arbovírus em quatis Sul-Americanos se mostra plausível, especialmente levando em consideração os hábitos sinantrópicos dessa espécie e a elevada densidade de mosquitos vetores relacionados à transmissão dos arbovírus em áreas urbanas do Brasil (KOTSAKIOZ *et al.*, 2017; VARIZA *et al.*, 2022).

13. CONCLUSÕES

Foi confirmada a circulação do SARS-CoV-2 e ocorrência de *spillback* viral em uma população de quatis de uma área de interface silvestre-urbana na cidade de Belo Horizonte, em Minas Gerais.

Através do sequenciamento, foi demonstrada a primeira detecção da variante P.2 do SARS-CoV-2 em uma espécie animal, no Brasil. A detecção de 50% da população de quatis analisada apresentando anticorpos neutralizantes anti-SARS-CoV-2 também confirma a infecção/exposição desses animais ao vírus e sinaliza para o risco de manutenção de ciclos enzoóticos em ambientes silvestres.

A detecção molecular de VACV em amostras biológicas de quatis sinaliza para o possível papel desses procionídeos na dinâmica de transmissão e manutenção do vírus em ambientes urbanos. Entretanto para confirmar os dados apresentados é necessária a realização de sequenciamento ou isolamento viral.

Não foram detectados anticorpos neutralizantes anti-OPV na população de quatis analisada nesse estudo.

No período analisado e na população de quatis amostrada, não foram observadas evidências de circulação dos arbovírus investigados.

Os dados apresentados evidenciam a importância da vigilância de viroses emergentes em animais silvestres e em áreas de interface silvestre-urbana, adotando ferramentas e ações no contexto da saúde única.

14. PERSPECTIVAS

- Realizar novos ensaios de PCR para as amostras consideradas positivas na investigação para VACV, visando amplificar regiões maiores do genoma viral para tentativa de sequenciamento;
- Realizar tentativa de isolamento viral a partir das amostras de quatis consideradas positivas para VACV nos ensaios de qPCR;

15. PRODUÇÃO CIENTÍFICA E OUTRAS ATIVIDADES REALIZADAS DURANTE O PERÍODO DE DOUTORADO (2019-2023)

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

1. STOFFELLA-DUTRA A, DE CAMPOS B, BASTOS E SILVA P, DIAS K, DA SILVA DOMINGOS I, HEMETRIO N, et al. SARS-CoV-2 Spillback to Wild Coatis in Sylvatic–Urban Hotspot, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2023;29(3):664-667. <https://doi.org/10.3201/eid2903.221339>

*2. DE OLIVEIRA FIGUEIREDO, P., STOFFELLA-DUTRA, A.G., COSTA, G.B. *et al.* Absence of yellow fever virus circulation in wildlife rodents from Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, (2022). <https://doi.org/10.1007/s42770-022-00688-3>

*3. DE OLIVEIRA FIGUEIREDO, POLIANA; STOFFELLA-DUTRA, ANA GABRIELLA; BARBOSA COSTA, GALILEU; et al., Re-Emergence of Yellow Fever in Brazil during 2016-2019: Challenges, Lessons Learned, and perspectives. *Viruses-Basel*, v. 12, p. 1233, 2020.

*Primeira autoria com De Oliveira Figueiredo e Barbosa, C, G.

Outros artigos completos publicados em periódicos

4. STOFFELLA-DUTRA, ANA GABRIELLA; SILVA DE OLIVEIRA, JAQUELINE; BARBOSA COSTA, GALILEU; et al., Absence of YF-neutralizing antibodies in vulnerable populations of Brazil: A warning for epidemiological surveillance and the potential risks for future outbreaks. *VACCINE*, v. 38, p. 1-8, 2020.

5. MARTINS DA COSTA, PEDRO STARLING PEREIRA; OLIVEIRA, JAQUELINE SILVA; DA SILVA DOMINGOS, IAGO JOSÉ; E SILVA, PEDRO HENRIQUE BASTOS; **DUTRA, ANA GABRIELLA STOFFELLA**; AMARAL, CAROLINA DOURADO; ABRAHÃO, JÔNATAS SANTOS; RICHINI PEREIRA, VIRGÍNIA BODELÃO; KROON, ERNA GEESIEN; BARBOSA COSTA, GALILEU; TRINDADE, GILIANE DE SOUZA. Circulation of Vaccinia virus in Southern and Southeastern wildlife, Brazil. *Transboundary and Emerging Diseases*, v. 1, p. 1, 2020.

6. BARBOSA COSTA, GALILEU; MARINHO, PAULA EILLANY SILVA; VILELA, ANA PAULA PESSOA; SARAIVA-SILVA, ANA TERESA CRISPIM, ANA PAULA CORREIA ; BORGES, IARA APOLINÁRIO; **DUTRA, ANA GABRIELLA STOFFELLA**; LOBATO, ZÉLIA INÊS PORTELA ; DOS REIS, JENNER KARLISON PIMENTA ; DE OLIVEIRA, DANILO BRETAS ; DRUMOND, BETANIA PAIVA; KROON, ERNA GEESIEN ; TRINDADE, GILIANE DE SOUZA . Silent Circulation of the Saint Louis Encephalitis Virus among Humans and Equids, Southeast Brazil. *Viruses-Basel*, v. 11, p. 1029, 2019.

Artigos em andamento para submissão:

1. Low prevalence of anti-Orthopoxvirus antibodies in an urban population, Brazil

PROJETOS

1. Integrante da equipe do Laboratório de Vírus na Força tarefa de enfrentamento da pandemia de COVID-19, sob coordenação da Pró-reitoria de Pesquisa da UFMG – atuação na realização de testes moleculares dando suporte ao diagnóstico laboratorial de COVID-19. (2021)
2. Integrante da equipe @MicroUFMG. Projeto de extensão do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia (PPGM), no Instituto de Ciências Biológicas. (2020-2021).
3. Integrante da equipe do podcast MicroBios. Podcast do departamento de Microbiologia da UFMG, busca aproximar as pessoas sem conhecimento em microbiologia do vasto mundo microbiano, com linguagem simples e inclusiva. (2020-2021).

PRÊMIOS

1. Menção Honrosa de Extensão do trabalho intitulado “**@microUFMG e ação de impacto positivo no enfrentamento da Pandemia**” no XXIII Encontro da Extensão/PROEX - Semana do Conhecimento 2020, 05 e 06 de outubro de 2020 pelo Instituto de Ciências Biológicas - UFMG.
2. Prêmio Cláudio Bonjardim de 2022: trabalho intitulado “Infecção natural por SARS-CoV-2 em quatis inseridos em uma área de interface silvestre-urbana no Brasil” apresentado de forma oral no “**IX Simpósio de Microbiologia da UFMG – A Microbiologia no Brasil: A ciência de hoje para soluções dos problemas do amanhã**”, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, nos dias 27 a 29 de setembro de 2022.

PARTICIPAÇÃO EM CONGRESSOS

1. 55° Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical e XXVI Congresso da Sociedade Brasileira de Parasitologia Chagas Leish, 2019.
2. VI Simpósio de Microbiologia da UFMG CONECTA SIM 2019. O microbiologista no mercado de trabalho. 2019.
3. 2nd Associated International Laboratory Meeting (LIA 2019) - Bact-Inflam Conference. 2019.
4. I Congresso de Saúde Pública da Fundação Cristiano Varela. 2020.
5. III International Symposium on Biological Sciences. 2020.
6. VII Simpósio de Microbiologia da UFMG - Conecta SIM. 2020.
7. XXXI Congresso Brasileiro de Virologia & XV Encontro de Virologia do Mercosul. 2020.
8. VIII Simpósio de Microbiologia da UFMG, 2021.
9. XXXII Congresso Brasileiro de Virologia - Virologia em Casa, 2021.
10. IX Simpósio de Microbiologia da UFMG. A Microbiologia no Brasil: A ciência de hoje para soluções dos problemas do amanhã. Belo Horizonte, MG. Setembro de 2022.
11. XXXIII Congresso Brasileiro de Virologia. Sociedade Brasileira de Virologia. Porto Seguro, BA. Outubro de 2022.

Dentre outros, e apresentação de resumos de trabalhos em formato de pôster.

ORIENTAÇÕES

INICIAÇÃO CIENTÍFICA

Pedro Henrique Bastos e Silva. Prospecção Molecular de Flavivírus em Mamíferos Silvestres de Remanescentes Florestais Urbanos. 2021. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Abi - Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Minas Gerais. Orientador: Giliane de Souza Trindade Co-orientador: Ana Gabriella Stoffella Dutra.

TREINAMENTOS E CURSOS

1. **Workshop de Comunicação e Divulgação Científica - DivulgaMicro.**
(Carga horária: 8h). American Society for Microbiology, ASM, Brasil. (2019).

2. **IV Curso de Verão em Bioinformática da UFMG**, realizado pelo Programa Interunidades de Pós-Graduação em Bioinformática da Universidade Federal de Minas Gerais, 27/01/2020 a 31/01/2020, 30 horas.
3. **Manejo clínico da COVID-19 na Atenção Especializada**. Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), por meio da Universidade Aberta do SUS (UNA-SUS). Belo Horizonte, 08/12/2020
4. **Introduction to Mice**. AALAS LearningLibrary, ACUP/CDC. 10-27-2020.
5. **Working with the IACUC (CDC-Atlanta version)**. AALAS LearningLibrary, ACUP/CDC. 10-27-2020.
6. **Treinamento biossegurança laboratórios NB2-3** (University of Texas Medical Branch - UTMB) 2021.
7. **Introdução à estrutura, evolução e análise por NGS de genomas virais**. Sociedade Brasileira de Virologia, SBV, 2021.
8. **25th International Bioinformatic Workshop on virus evolution and molecular epidemiology (VEME)**. Organização Pan-Americana de Saúde, Ministério da Saúde, Fiocruz, Belo Horizonte, Minas Gerais, 5 à 10 de setembro de 2021.
9. **Treinamento Remoto QuantStudio 3**, Thermo Fisher Scientific. 20 de Janeiro de 2022, carga horária de 3 horas.
10. **Treinamento teórico/prático Laboratório-NB3-ICB**. (Carga horária: 20h). Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Brasil. (2022).

ORGANIZAÇÃO DE EVENTOS

1. VII Simpósio de Microbiologia da UFMG. CONECTA SIM 2020. 2020.
2. Mediadora e roteirista de lives no canal do instagram @MicroUFMG. (2020/2021)
3. Palestra “Saúde única e vigilância de viroses emergentes” III Congresso Nacional de Microbiologia Clínica Online - 2023

REFERÊNCIAS

- ABRAHÃO, J. S. et al. Long-lasting stability of Vaccinia virus strains in murine feces: implications for virus circulation and environmental maintenance. **Archives of virology**, v. 154, n. 9, p. 1551–1553, 1 set. 2009a.
- ABRAHÃO, J. S. et al. One More Piece in the VACV Ecological Puzzle: Could Peridomestic Rodents Be the Link between Wildlife and Bovine Vaccinia Outbreaks in Brazil? **PLOS ONE**, v. 4, n. 10, p. e7428, 19 out. 2009b.
- ABRAHÃO, J. S. et al. Rapid detection of Orthopoxvirus by semi-nested PCR directly from clinical specimens: a useful alternative for routine laboratories. **Journal of medical virology**, v. 82, n. 4, p. 692–699, 2010a.
- ABRAHÃO, J. S. et al. Vaccinia Virus Infection in Monkeys, Brazilian Amazon. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 6, p. 976, jun. 2010b.
- ABREU, F. V. S. DE et al. Serological Evidence of Orthopoxvirus Infection in Neotropical Primates in Brazil. **Pathogens (Basel, Switzerland)**, v. 11, n. 10, 1 out. 2022.
- AKSAMENOV, I. et al. Nextclade: clade assignment, mutation calling and quality control for viral genomes. Published online October 28, 2021.
- ALANAGREH, L.; ALZOUGHLOO, F.; ATOUM, M. The Human Coronavirus Disease COVID-19: Its Origin, Characteristics, and Insights into Potential Drugs and Its Mechanisms. **Pathogens (Basel, Switzerland)**, v. 9, n. 5, 1 maio 2020.
- ALENCAR, J. et al. Diversity of yellow fever mosquito vectors in the Atlantic Forest of Rio de Janeiro, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n. 3, p. 351–356, 1 maio 2016.
- ALLEN, T. et al. Global hotspots and correlates of emerging zoonotic diseases. **Nature communications**, v. 8, n. 1, 1 dez. 2017.
- ALM, E. et al. Universal Single-Probe RT-PCR Assay for Diagnosis of Dengue Virus Infections. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 12, 18 dez. 2014.
- ANDRAL, L. et al. [Studies on yellow fever in Ethiopia. 3. Serological and virological studies of the woodland fauna]. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 38, n. 6, p. 855–861, 1968.
- APHIS. Confirmation of COVID-19 in a Coatimundi at an Illinois Zoo. **Animal and Plant Health Inspection Service**, 2021. Disponível em: www.aphis.usda.gov/aphis/newsroom/stakeholder-info/sa_by_date/sa-2021/sa-10/covid-coatimundi. Acesso em: 18 janeiro de 2022.
- ARÉCHIGA-CEBALLOS, N. et al. New rabies virus variant found during an epizootic in white-nosed coatis from the Yucatan Peninsula. **Epidemiology and Infection**, v. 138, n. 11, p. 1586–1589, nov. 2010.

BAKER, R. E. et al. Infectious disease in an era of global change. **Nature Reviews Microbiology** 2021 20:4, v. 20, n. 4, p. 193–205, 13 out. 2021.

BARBOSA, A. V. et al. Presence of neutralizing antibodies to Orthopoxvirus in capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) in Brazil. **Journal of infection in developing countries**, v. 8, n. 12, p. 1646–1649, 1 dez. 2014.

BARRETO, M. L. et al. Successes and failures in the control of infectious diseases in Brazil: social and environmental context, policies, interventions, and research needs. **The Lancet**, v. 377, n. 9780, p. 1877–1889, 28 maio 2011.

BARRETO, M. L.; TEIXEIRA, M. G. Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa. **Estudos Avançados**, v. 22, n. 64, p. 53–72, 2008.

BARRETT, A.D.T. Yellow Fever Virus. **Encyclopedia of life sciences**. University of Texas, USA, 2001.

BARRETT, A. D. T.; HIGGS, S. Yellow fever: a disease that has yet to be conquered. **Annual review of entomology**, v. 52, p. 209–229, 2007.

BASHOR, L. et al. SARS-CoV-2 evolution in animals suggests mechanisms for rapid variant selection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 118, n. 44, p. e2105253118, 2 nov. 2021.

BENELLI, G.; DUGGAN, M. F. Management of arthropod vector data - Social and ecological dynamics facing the One Health perspective. **Acta tropica**, v. 182, p. 80–91, 1 jun. 2018.

BEZERRA-SANTOS, M. A. et al. Didelphis spp. opossums and their parasites in the Americas: A One Health perspective. **Parasitology research**, v. 120, n. 12, p. 4091–4111, 1 dez. 2021.

BHATT, S. et al. The global distribution and burden of dengue. **Nature** 2013 496:7446, v. 496, n. 7446, p. 504–507, 7 abr. 2013.

BI, Z.; FORMENTY, P. B. H.; ROTH, C. E. Hantavirus infection: a review and global update. **Journal of infection in developing countries**, v. 2, n. 1, p. 3–23, 2008.

BONI, M. F. et al. Evolutionary origins of the SARS-CoV-2 sarbecovirus lineage responsible for the COVID-19 pandemic. **Nature Microbiology** 2020 5:11, v. 5, n. 11, p. 1408–1417, 28 jul. 2020.

BORGES, I. A. et al. Serological evidence of Orthopoxvirus circulation among equids, southeast Brazil. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. MAR, p. 402, 8 mar. 2018.

BORREMANS, B. et al. Cross-species pathogen spillover across ecosystem boundaries: mechanisms and theory. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 374, n. 1782, 30 set. 2019.

BRADY, O. J. et al. Refining the global spatial limits of dengue virus transmission by evidence-based consensus. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 6, n. 8, 2012.

BRASIL. Febre Amarela. In Guia Para Profissionais da Saúde. Secretaria de atenção à saúde, **Ministério da Saúde**. 1st ed. Brasília, Brasil, 2019.

BRASIL. Estratégia de Resposta ao vírus Zika e o combate ao mosquito transmissor. Ministério da Saúde, Brasília, 10 de maio de 2016. Disponível em: <https://www.gov.br/casacivil/pt-br/arquivos/estrategia-de-resposta-ao-virus-zika.pdf> Acesso em: 15 de fevereiro de 2023.

BRASIL. LEI Nº 12.651, DE 25 DE MAIO DE 2012. **Presidência da República, Casa Civil**. Disponível em: https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2011-2014/2012/lei/l12651.htm Acesso em: 15 de fevereiro de 2022.

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

BUENO, M. G. et al. Animals in the Zika Virus Life Cycle: What to Expect from Megadiverse Latin American Countries. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 12, p. e0005073, 22 dez. 2016.

BURGIN, C. J. et al. How many species of mammals are there? **Journal of Mammalogy**, v. 99, n. 1, p. 1–14, 1 fev. 2018.

BURRELL, C. J.; HOWARD, C. R.; MURPHY, F. A. **Fenner and White's Medical Virology**. Fifth Edition, p. 1–583, 30 nov. 2016.

BURRELL, C. J.; HOWARD, C. R.; MURPHY, F. A. Emerging Virus Diseases. **Fenner and White's Medical Virology**, p. 217, 2017.

CABRERA-ROMO, S. et al. No Evidence of Dengue Virus Infections in Several Species of Bats Captured in Central and Southern Mexico. **Zoonoses and public health**, v. 63, n. 8, p. 579–583, 1 dez. 2016.

CATENACCI, L. S. et al. Surveillance of Arboviruses in Primates and Sloths in the Atlantic Forest, Bahia, Brazil. **EcoHealth**, v. 15, n. 4, p. 777–791, 1 dez. 2018.

CDC, (A) 2020. One Health Office Fact Sheet. Disponível em: <https://www.cdc.gov/onehealth/who-we-are/one-health-office-fact-sheet.html> Acesso em: 08 de março de 2019.

CDC. (B) Centers for Disease Control and Prevention. CDC 2019-novel coronavirus (2019-nCoV) real-time RT-PCR diagnostic panel. (2020) Disponível em: <https://www.fda.gov/media/134922/download> Acesso em: 08 de fevereiro de 2022.

CDC. (A) One Health Basics. **Centers for disease control and prevention, 2018**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/onehealth/basics/index.html>.> Acesso em: 08 de março de 2019.

CDC. (B) Yellow Fever Maps. **National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases, Centers for Disease Control and Prevention**. May, 2018. Disponível em: https://www.cdc.gov/yellowfever/maps/south_america.html. Acesso em: 09 de março de 2019.

CDC. Dengue. **Centers for Disease Control and Prevention**. January, 2019. Disponível em: <https://www.cdc.gov/dengue/>>. Acesso em: 09 de março de 2019.

CDC. (A) Areas at Risk for Chikungunya. February 23, 2022. **Centers for Disease Control and Prevention**. Disponível em: <https://www.cdc.gov/chikungunya/geo/index.html> Acesso em: 14 de março de 2023.

CDC. (B) Symptoms of COVID-19. Centers for Disease Control and Prevention. Oct. 26, 2022. Disponível em: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/symptoms-testing/symptoms.html> Acesso em: 14 de março de 2023.

CDC. (C) Animals and COVID-19. **Centers for disease control and prevention**. Updated July. 5, 2022. Disponível em: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/daily-life-coping/animals.html> Acesso em: 16 de março de 2023.

CDC. SARS-CoV-2 Variant Classifications and Definitions. **Centers for disease control and prevention**, CDC, EUA. Updated Dec. 1, 2021. Disponível em: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/variants/variant-classifications.html>. Acesso em: 05 de fevereiro de 2022.

CECÍLIA, J. et al. Seroprevalence of arboviruses in *Nasua nasua* (Mammalia, Carnivora, Procyonidae) of synanthropic habitats in the Iguaçu National Park, Brazilian Atlantic Forest. **Ciência Rural**, v. 53, n. 2, 2023.

CHAFEKAR, A.; FIELDING, B. C. MERS-CoV: Understanding the Latest Human Coronavirus Threat. **Viruses**, v. 10, n. 2, 24 fev. 2018.

CHEN, N. et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. **The Lancet**, v. 395, n. 10223, p. 507–513, 15 fev. 2020.

CHEN, R. et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Togaviridae. **The Journal of general virology**, v. 99, n. 6, p. 761–762, 1 jan. 2018.

CHEVILLON, C. et al. The Chikungunya threat: an ecological and evolutionary perspective. **Trends in microbiology**, v. 16, n. 2, p. 80–88, fev. 2008.

CIGARROA-TOLEDO, N. et al. Serologic Evidence of Flavivirus Infections in Peridomestic Rodents in Merida, Mexico. **Journal of wildlife diseases**, v. 52, n. 1, p. 168–172, 1 jan. 2016.

CONASS. Painel Nacional: COVID-19. **Conselho Nacional de Secretários de Saúde**. Disponível em: <https://www.conass.org.br/painelconasscovid19/> Acesso em: 05 de janeiro de 2022.

COSTA, Z.G.A. et al. Evolução histórica da vigilância epidemiológica e do controle da Febre amarela no Brasil. *Rev Pan-Amaz Saúde*, vol.2(1):11-26, 2011.

COSTA, G. B. et al. Detection of Vaccinia Virus in Urban Domestic Cats, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 2, p. 360, 1 fev. 2017.

COSTA, G. B. et al. Vaccinia Virus among Domestic Dogs and Wild Coatis, Brazil, 2013-2015. **Emerging infectious diseases**, v. 24, n. 12, p. 2338–2342, 1 dez. 2018.

COSTA, N. A. et al. Metacommunity Structure of Helminths of *Necromys Lasiusus* (Rodentia: Sigmodontinae) in Different Land Use Areas in the Brazilian Cerrado. **Journal of Parasitology**, v. 105, n. 2, p. 271–282, 4 abr. 2019.

CROSSLEY, B. M. et al. Guidelines for Sanger sequencing and molecular assay monitoring. **Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc**, v. 32, n. 6, p. 767–775, 1 nov. 2020.

CUI, J.; LI, F.; SHI, Z. L. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 3, p. 181–192 (2019), 10 dez. 2018.

CUI, S. et al. An Updated Review on SARS-CoV-2 Infection in Animals. **Viruses**, v. 14, n. 7, 1 jul. 2022.

CUNNINGHAM, A. A.; DASZAK, P.; WOOD, J. L. N. One Health, emerging infectious diseases and wildlife: two decades of progress? **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 372, n. 1725, 2017.

CYRKLAFF, M. et al. Cryo-electron tomography of vaccinia virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 8, p. 2772–2777, 22 fev. 2005.

DAMAS, J. et al. Broad host range of SARS-CoV-2 predicted by comparative and structural analysis of ACE2 in vertebrates. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 117, n. 36, p. 22311–22322, 8 set. 2020.

DAMASO, C. R. A. et al. An emergent poxvirus from humans and cattle in Rio de Janeiro State: Cantagalo virus may derive from Brazilian smallpox vaccine. **Virology**, v. 277, n. 2, p. 439–449, 25 nov. 2000.

DAMON, I. K. Poxviruses. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. et al. (Eds). *Virology*. 6.ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 2013. p. 2160-2184.

DARWISH, M. A. et al. A sero-epidemiological survey for certain arboviruses (Togaviridae) in Pakistan. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, n. 4, p. 442–445, 1983.

DE FIGUEIREDO, M.L. et al. Mosquitoes infected with dengue viruses in Brazil. **Virology Journal**, v. 7, n. 152, 2010.

DE OLIVEIRA FIGUEIREDO, P. et al. Absence of yellow fever virus circulation in wildlife rodents from Brazil. **Brazilian journal of microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]**, v. 53, n. 2, p. 647–654, 1 jun. 2022.

DE OLIVEIRA, J. S. et al. Vaccinia Virus Natural Infections in Brazil: The Good, the Bad, and the Ugly. **Viruses**, v. 9, n. 11, 15 nov. 2017.

DE OLIVEIRA, S. V. et al. Potential Geographic Distribution of Hantavirus Reservoirs in Brazil. **PLOS ONE**, v. 8, n. 12, p. e85137, 31 dez. 2013.

DE OLIVEIRA, W. K. et al. Infection-related microcephaly after the 2015 and 2016 Zika virus outbreaks in Brazil: a surveillance-based analysis. **Lancet (London, England)**, v. 390, n. 10097, p. 861–870, 26 ago. 2017b.

DE OLIVEIRA, F.S. et al. Expansion of the range of *Necromys lasiurus* (Lund, 1841) into open areas of the Atlantic Forest biome in Rio de Janeiro state, Brazil, and the role of the species as a host of the hantavirus. **Acta tropica**, v. 188, p. 195–205, 1 dez. 2018.

DE OLIVEIRA-FILHO, E. F. et al. Seroprevalence of selected flaviviruses in free-living and captive capuchin monkeys in the state of Pernambuco, Brazil. **Transboundary and emerging diseases**, v. 65, n. 4, p. 1094–1097, 1 ago. 2018.

DE SOUZA, W. M. et al. Epidemiological and clinical characteristics of the COVID-19 epidemic in Brazil. **Nature Human Behaviour** 2020 4:8, v. 4, n. 8, p. 856–865, 31 jul. 2020.

DELAHAY, R. J. et al. Assessing the risks of SARS-CoV-2 in wildlife. **One Health Outlook**, v. 3, n. 1, p. 1–14, 7 dez. 2021.

DELATORRE, E. et al. Distinct YFV Lineages Co-circulated in the Central-Western and Southeastern Brazilian Regions From 2015 to 2018. **Frontiers in microbiology**, v. 10, n. MAY, 2019.

DESTOUMIEUX-GARZÓN, D. et al. The One Health Concept: 10 Years Old and a Long Road Ahead. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 5, n. FEB, p. 1, 12 fev. 2018.

DIALLO, D. et al. Landscape ecology of sylvatic chikungunya virus and mosquito vectors in southeastern Senegal. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 6, n. 6, jun. 2012.

DIAZ, J. H. The Disease Ecology, Epidemiology, Clinical Manifestations, Management, Prevention, and Control of Increasing Human Infections with Animal Orthopoxviruses. **Wilderness & environmental medicine**, v. 32, n. 4, p. 528–536, 1 dez. 2021.

DICK, G.W., KITCHEN, S.F., HADDOW, A.J. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 46, n. 5, p. 509–520, 1952.

DITCHKOFF, S. S.; SAALFELD, S. T.; GIBSON, C. J. Animal behavior in urban ecosystems: Modifications due to human-induced stress. **Urban Ecosystems**, v. 9, n. 1, p. 5–12, jan. 2006.

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, dez. 2012.

DOMINGO, C. et al. Yellow fever in the diagnostics laboratory. **Emerging Microbes & Infections**, v. 7, n. 1, 1 dez. 2018.

DONALISIO, M.R.; FREITAS, A.R.R. Chikungunya no Brasil: um desafio emergente. **Revista brasileira de epidemiologia**, 18(1): 283-5, jan-mar 2015.

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, 1 nov. 2018.

DREWES, S. et al. Assessing the Diversity of Rodent-Borne Viruses: Exploring of High-Throughput Sequencing and Classical Amplification/Sequencing Approaches. **Advances in virus research**, v. 99, p. 61–108, 1 jan. 2017.

DRUMOND, B. P. et al. Brazilian Vaccinia virus strains are genetically divergent and differ from the Lister vaccine strain. **Microbes and infection**, v. 10, n. 2, p. 185–197, fev. 2008.

DUTRA, L. A. L. et al. Molecular evidence of Orthopoxvirus DNA in capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) stool samples. **Archives of Virology**, v. 162, n. 2, p. 439–448, 1 fev. 2017.

ECKE, F. et al. Population fluctuations and synanthropy explain transmission risk in rodent-borne zoonoses. **Nature Communications 2022 13:1**, v. 13, n. 1, p. 1–10, 7 dez. 2022.

EDWARDS, C. J. et al. Molecular diagnosis and analysis of Chikungunya virus. **Journal of Clinical Virology**, v. 39, n. 4, p. 271-275, 2007.

ESSBAUER, S.; PFEFFER, M.; MEYER, H. Zoonotic poxviruses. **Veterinary microbiology**, v. 140, n. 3–4, p. 229–236, 27 jan. 2010.

EYE. A global strategy to Eliminate Yellow fever Epidemics (EYE) 2017–2026. Geneva: **World Health Organization**; 2018.

FAGRE, A. C. et al. Assessing the risk of human-to-wildlife pathogen transmission for conservation and public health. **Ecology letters**, v. 25, n. 6, p. 1534–1549, 1 jun. 2022.

FARAG, E. A. et al. SARS-CoV-2 at the human-animal interphase: A review. **Heliyon**, v. 7, n. 12, 1 dez. 2021.

FARIA, N. R. et al. Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. **Science** (New York, N.Y.), v. 352, n. 6283, p. 345–349, 15 abr. 2016.

FARIA, N. R. et al. Establishment and cryptic transmission of Zika virus in Brazil and the Americas. **Nature**, 2017 546:7658, v. 546, n. 7658, p. 406–410, 24 maio 2017.

FARIA, N. R. et al. Genomic and epidemiological monitoring of yellow fever virus transmission potential. **Science**, v. 361, n. 6405, p. 894–899, 31 ago. 2018.

FAVORETTO, S. R. et al. Zika Virus in Peridomestic Neotropical Primates, Northeast Brazil. **EcoHealth**, v. 16, n. 1, p. 61–69, 15 mar. 2019.

FAVORETTO, S.R. et al. First detection of Zika virus in neotropical primates in Brazil: a possible new reservoir. n. March, p. 2015–2017, 2016.

FENNER F. Smallpox and Its Eradication. World Health Organization, Geneva, Switzerland, 1988.

FERREIRA, G. A. et al. Diet of the coati *Nasua nasua* (Carnivora: Procyonidae) in an area of woodland inserted in an urban environment in Brazil. **Revista chilena de história natural**, v. 86, n. 1, p. 95–102, mar. 2013.

FERREIRA, J. M. S. et al. Virulence in Murine Model Shows the Existence of Two Distinct Populations of Brazilian Vaccinia virus Strains. **PLOS ONE**, v. 3, n. 8, p. e3043, 26 ago. 2008.

FIGUEIREDO, L. T. M. Emergent arboviruses in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 2, p. 224–229, 2007.

FIGUEIREDO, L. T. M. How are so many foreign arboviruses introduced in Brazil? **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n. 6, p. 665–667, 1 nov. 2016.

FIGUEIREDO, L. T. M. Large outbreaks of Chikungunya virus in Brazil reveal uncommon clinical features and fatalities. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 5, p. 583–584, 1 set. 2017.

FIGUEIREDO, L. T. M. Human Urban Arboviruses Can Infect Wild Animals and Jump to Sylvatic Maintenance Cycles in South America. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 9, n. Jul, 2019.

FISCHHOFF, I. R. et al. Predicting the zoonotic capacity of mammals to transmit SARS-CoV-2. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 288, n. 1963, 24 nov. 2021.

FLINT, J. et al. Principles of Virology. 4th Edition. Vol II, Pathogenesis and Control. ASM PRESS, *American Society for Microbiology*, Washington, DC, 2015.

FONSECA, F. G. et al. Morphological and molecular characterization of the poxvirus BeAn 58058. **Archives of virology**, v. 143, n. 6, p. 1171–1186, 1998.

FONSECA, F. G. et al. Characterization of a vaccinia-like virus isolated in a Brazilian forest. **The Journal of general virology**, v. 83, n. Pt 1, p. 223–228, 2002.

FONSECA, F. G. et al. Zoonotic vaccinia virus outbreaks in Brazil. **Future Virology**, v. 6, n. 6, p. 697–707, 9 jun. 2011.

FRANCO-LUIZ, A. P. M. et al. The detection of Vaccinia virus confirms the high circulation of Orthopoxvirus in buffaloes living in geographical isolation, Marajó Island, Brazilian Amazon. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 46, p. 16–19, 1 jun. 2016.

FRITSCH, H. et al. Retrospective Genomic Surveillance of Chikungunya Transmission in Minas Gerais State, Southeast Brazil. **Microbiology spectrum**, v. 10, n. 5, 26 out. 2022.

GALLARDO-ROMERO, N. F. et al. Endemic orthopoxvirus circulating in procyonids in Mexico. **Journal of wildlife diseases**, v. 52, n. 3, p. 609–615, 1 jul. 2016.

GAO, G. F.; WANG, L. COVID-19 Expands Its Territories from Humans to Animals. **China CDC weekly**, v. 3, n. 41, p. 855–858, 2021.

GARDNER, C. L.; RYMAN, K. D. Yellow fever: a reemerging threat. **Clinics in laboratory medicine**, v. 30, n. 1, p. 237–260, mar. 2010.

GEBREYES, W. A. et al. The global one health paradigm: challenges and opportunities for tackling infectious diseases at the human, animal, and environment interface in low-resource settings. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 11, 2014.

GILLESPIE, H. "Rattus rattus" (On-line), Animal Diversity Web. 2004. Acesso em: 28 de janeiro, 2022 Disponível em: https://animaldiversity.org/accounts/Rattus_rattus/

GODDARD, M. A.; DOUGILL, A. J.; BENTON, T. G. Scaling up from gardens: biodiversity conservation in urban environments. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 25, n. 2, p. 90–98, 1 fev. 2010.

GORAICHUK, I. V. et al. Zoonotic and Reverse Zoonotic Transmissibility of SARS-CoV-2. **Virus Research**, v. 302, p. 198473, 1 set. 2021.

GORBALENYA, A. E. et al. The species severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. **Nature microbiology**, v. 5, n. 4, p. 536–544, 1 abr. 2020.

GOULD, E. et al. Emerging arboviruses: Why today? **One Health**, v. 4, p. 1–13, 1 dez. 2017.

GRAVINATTI, M. L. et al. Synanthropic rodents as virus reservoirs and transmitters. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 53, 2020.

GRUBAUGH, N. D. et al. Genomic Insights into Zika Virus Emergence and Spread. **Cell**, v. 172, n. 6, p. 1160–1162, 8 mar. 2018.

GUBLER, D.J. Dengue and dengue hemorrhagic fever: its history and resurgence as a global public health problem. In: Gubler DJ, Kuno G, editors. Dengue and dengue hemorrhagic fever. London, UK: CAB International, pp. 1–22, 1997.

GUBLER, D. J. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. **Archives of medical research**, v. 33, n. 4, p. 330–342, jul. 2002.

GUBSER, C. et al. Poxvirus genomes: a phylogenetic analysis. **The Journal of general virology**, v. 85, n.1, p. 105–117, jan. 2004.

GUIA DOS ROEDORES DO BRASIL. Guia dos Roedores do Brasil, com chaves para gêneros baseadas em caracteres externos / C. R. Bonvicino, J. A. Oliveira, P. S. D'Andrea. - Rio de Janeiro: **Organização Pan-Americano de Saúde - OPAS/OMS**, 2008.

GUTHID, S. et al. Ecological processes underlying the emergence of novel enzootic cycles: Arboviruses in the neotropics as a case study. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 8, p. e0008338, 1 ago. 2020.

GUTIÉRREZ-BUGALLO, G. et al. Vector-borne transmission and evolution of Zika virus. **Nature Ecology & Evolution** 2019 3:4, v. 3, n. 4, p. 561–569, 18 mar. 2019.

GWEE, S. X. W. et al. Animals as potential reservoirs for dengue transmission: A systematic review. **One Health**, v. 12, p. 100216, 1 jun. 2021.

HALAWA, S. et al. Potential long-term effects of SARS-CoV-2 infection on the pulmonary vasculature: a global perspective. **Nature reviews. Cardiology**, v. 19, n. 5, p. 314–331, 1 maio 2022.

HAN, B. A. et al. Rodent reservoirs of future zoonotic diseases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 22, p. 7039–7044, 2 jun. 2015.

HANLEY, K. A. et al. Infection Dynamics of Sylvatic Dengue Virus in a Natural Primate Host, the African Green Monkey. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 91, n. 4, p. 672, 10 out. 2014.

HARRISON, A. G.; LIN, T.; WANG, P. Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. **Trends in immunology**, v. 41, n. 12, p. 1100–1115, 1 dez. 2020.

HASSELL, J. M. et al. Urbanization and Disease Emergence: Dynamics at the Wildlife-Livestock-Human Interface. **Trends in ecology & evolution**, v. 32, n. 1, p. 55–67, 1 jan. 2017.

HASSELL, J. M. et al. Socio-ecological drivers of vertebrate biodiversity and human-animal interfaces across an urban landscape. **Global change biology**, v. 27, n. 4, p. 781–792, 1 fev. 2021.

HEMETRIO. Levantamento Populacional e Manejo de Quatis (PROCYONIDAE: *Nasua nasua*) no Parque das Mangabeiras, Belo Horizonte, MG. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Programa de Pós-Graduação em Ecologia conservação e Manejo da Vida Silvestre, 2011.

HENDERSON, D. A. et al. Smallpox as a biological weapon: medical and public health management. Working Group on Civilian Biodefense. **JAMA**, v. 281, n. 22, p. 2127–2137, 9 jun. 1999.

HIGUERA, A.; RAMÍREZ, J. D. Molecular epidemiology of dengue, yellow fever, Zika and Chikungunya arboviruses: An update. **Acta tropica**, v. 190, p. 99–111, 1 fev. 2019.

HOLMES, E. C. et al. The origins of SARS-CoV-2: A critical review. **Cell**, v. 184, n. 19, p. 4848–4856, 16 set. 2021.

HOLMES, E. C.; TWIDDY, S. S. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 3, n. 1, p. 19–28, maio 2003.

HU, B. et al. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. **Nature reviews. Microbiology**, v. 19, n. 3, p. 141–154, 1 mar. 2021.

IBGE. Cidades e Estados. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**, 2021. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/cidades-e-estados/mg/belo-horizonte.html>. Acesso em: 05 de janeiro de 2022.

ICMBio. Carnívoros Brasileiros, Procyonidae. **Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade**, 2022. Disponível em: <https://www.icmbio.gov.br/cenap/carnivoros-brasileiros.html> Acesso em: 05 de janeiro de 2022.

ICTV. Family: Poxviridae. Chapter Version: ICTV Ninth Report; 2009 Taxonomy Release. International Committee on Taxonomy of Viruses. 9th Report, 2011. Disponível em: https://ictv.global/report_9th/dsDNA/poxviridae Acesso em: 15 de fevereiro de 2022.

ICTV. Family: Togaviridae. International Committee on Taxonomy of Viruses, 2019. Disponível em: <https://ictv.global/report/chapter/togaviridae/togaviridae> Acesso em: 15 de fevereiro de 2022.

ICTV. Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. **Nat. Microbiol.** 5, 536–544, 2020.

ICTV. Virus Taxonomy: 2021. International Committee on Taxonomy of Viruses. Release, Online, July 2021. Disponível em: <https://ictv.global/taxonomy>

IUCN 2022. **The IUCN Red List of Threatened Species**. Version 2021-3. Disponível em: <https://www.iucnredlist.org>> Acesso em: 28 de janeiro de 2022.

JACOBS, B. L. et al. Vaccinia Virus Vaccines: Past, Present and future. **Antiviral research**, v. 84, n. 1, p. 1, out. 2009.

JANSEN, A. M.; ROQUE, A.L.R. Domestic and Wild Mammalian Reservoirs. *American Trypanosomiasis*, 249–276, 2010.

JESUS, J. G. et al. Importation and early local transmission of COVID-19 in Brazil, 2020. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 62, 2020.

JO, W. K. et al. Potential zoonotic sources of SARS-CoV-2 infections. **Transboundary and emerging diseases**, v. 68, n. 4, p. 1824–1834, 1 jul. 2021.

JOHNSON, C. K. et al. Global shifts in mammalian population trends reveal key predictors of virus spillover risk. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 287, n. 1924, 8 abr. 2020.

JOHNSON, M. T. J.; MUNSHI-SOUTH, J. Evolution of life in urban environments. **Science** (New York, N.Y.), v. 358, n. 6363, 3 nov. 2017.

JONES, K. E. et al. Global trends in emerging infectious diseases. **Nature**, v. 451, n. 7181, p. 990–993, fev. 2008.

JONSSON, C. B.; FIGUEIREDO, L. T. M.; VAPALAHTI, O. A global perspective on hantavirus ecology, epidemiology, and disease. **Clinical microbiology reviews**, v. 23, n. 2, p. 412–441, abr. 2010.

JOWELL, A.; ZHOU, B.; BARRY, M. The impact of megacities on health: preparing for a resilient future. **The Lancet Planetary Health**, v. 1, n. 5, p. e176–e178, 1 ago. 2017.

JULANDER, J. G. Animal models of yellow fever and their application in clinical research. **Current opinion in virology**, v. 18, p. 64–69, 1 jun. 2016.

KARESH, W. B. et al. Ecology of zoonoses: natural and unnatural histories. **Lancet (London, England)**, v. 380, n. 9857, p. 1936–1945, 2012.

KEESING, F. et al. Impacts of biodiversity on the emergence and transmission of infectious diseases. **Nature**, v. 468, n. 7324, p. 647–652, 2 dez. 2010.

KEESING, F.; OSTFELD, R. S. Impacts of biodiversity and biodiversity loss on zoonotic diseases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 118, n. 17, 1 abr. 2021.

KERKHOF, K. et al. Reliable Serological Diagnostic Tests for Arboviruses: Feasible or Utopia? **Trends in microbiology**, v. 28, n. 4, p. 276–292, 1 abr. 2020.

KINDHAUSER, M. K. et al. Zika: the origin and spread of a mosquito-borne virus. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 94, n. 9, p. 675, 9 set. 2016.

KINNUNEN, P. M. et al. Orthopox virus infections in Eurasian wild rodents. **Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)**, v. 11, n. 8, p. 1133–1140, 1 ago. 2011.

KLITTING, R. et al. What Does the Future Hold for Yellow Fever Virus? (II). **Genes**, v. 9, n. 9, 1 set. 2018.

KOTSAKIOZI, P. et al. Tracking the return of *Aedes aegypti* to Brazil, the major vector of the dengue, chikungunya and Zika viruses. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 7, p. e0005653, 25 jul. 2017.

KRAEMER, M. U. G. et al. Spread of yellow fever virus outbreak in Angola and the Democratic Republic of the Congo 2015–16: a modelling study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 3, p. 330–338, 1 mar. 2017.

KREUDER JOHNSON, C. et al. Spillover and pandemic properties of zoonotic viruses with high host plasticity. **Scientific reports**, v. 5, 7 out. 2015.

KROON, E. G. et al. Zoonotic Brazilian Vaccinia virus: from field to therapy. **Antiviral research**, v. 92, n. 2, p. 150–163, nov. 2011.

KROON, E. G. et al. Natural Vaccinia Virus Infection: Diagnosis, Isolation, and Characterization. **Current protocols in microbiology**, v. 42, p. 14A.5.1-14A.5.43, 2016.

KUHN, R. J. et al. Structure of dengue virus: Implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. **Cell**, v. 108, n. 5, p. 717–725, 8 mar. 2002.

KYLE, J. L.; HARRIS, E. Global spread and persistence of dengue. **Annual review of microbiology**, v. 62, n. 1, p. 71–92, 1 out. 2008.

LAITON-DONATO, K. et al. Progressive Vaccinia Acquired through Zoonotic Transmission in a Patient with HIV/AIDS, Colombia. **Emerging Infectious Diseases**, v. 26, n. 3, p. 601, 2020.

LAMARCA, A. P. et al. Genomic surveillance of SARS-CoV-2 tracks early interstate transmission of P.1 lineage and diversification within P.2 clade in Brazil. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 15, n. 10, 1 out. 2021.

LAMERS, M. M.; HAAGMANS, B. L. SARS-CoV-2 pathogenesis. **Nature reviews. Microbiology**, v. 20, n. 5, p. 270–284, 1 maio 2022.

LANCIOTTI, R. S. et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. **Emerging infectious diseases**, v. 14, n. 8, p. 1232–1239, ago. 2008.

LARSEN, H. D. et al. Preliminary report of an outbreak of SARS-CoV-2 in mink and mink farmers associated with community spread, Denmark, June to November 2020. **Euro surveillance: bulletin Europeen sur les maladies transmissibles**, v. 26, n. 5, 4 fev. 2021.

LAVERGNE, A. et al. Infection par le virus de la dengue de mammifères sauvages en région néotropicale: hôtes accidentels ou réservoirs potentiels? [Dengue virus infection in neotropical forest mammals: incidental hosts or potential reservoirs?]. **Med Trop (Mars)**. 2009 Aug;69(4):345-50.

LEPINIEC, L. et al. Geographic distribution and evolution of yellow fever viruses based on direct sequencing of genomic cDNA fragments. **The Journal of general virology**, v. 75 (Pt 2), n. 2, p. 417–423, 1994.

LEQUIME, S.; LAMBRECHTS, L. Vertical transmission of arboviruses in mosquitoes: a historical perspective. **Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, v. 28, p. 681–690, 1 dez. 2014.

LESSLER, J. et al. Assessing the global threat from Zika virus. **Science (New York, N.Y.)**, v. 353, n. 6300, 12 ago. 2016.

LI, Y. et al. Detection of monkeypox virus with real-time PCR assays. **Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology**, v. 36, n. 3, p. 194–203, jul. 2006.

LI, K. et al. Animal host range of mpox virus. **Journal of medical virology**, v. 95, n. 2, 20 fev. 2023.

LI, H. Minimap2: pairwise alignment for nucleotide sequences. **Bioinformatics**, v. 34, n. 18, p. 3094–3100, 15 set. 2018.

LI, L. LI et al. A novel SARS-CoV-2 related coronavirus with complex recombination isolated from bats in Yunnan province, China. **Emerging microbes & infections**, v. 10, n. 1, p. 1683–1690, 2021.

LIMA, M. T. et al. An update on the known host range of the brazilian vaccinia virus: An outbreak in Buffalo Calves. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. JAN, p. 3327, 22 jan. 2019.

LINDENBACH, B.D. et al. Flaviviridae. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY P.M.; COHEN, J.I.; GRIFFIN D.E.; LAMB R.A.; MARTIN, M.A.; RACANIELLO, V.R.; ROIZMAN, B. editors. *Fields Virology*. 6th ed. Volume 1, Lippincott Williams & Wilkins; Philadelphia, USA, 2013.

LIU, Z. Y.; SHI, W. F.; QIN, C. F. The evolution of Zika virus from Asia to the Americas. **Nature Reviews Microbiology** 2018 17:3, v. 17, n. 3, p. 131–139, 7 jan. 2019.

LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; FAILLOUX, A. B. High risk for chikungunya virus to initiate an enzootic sylvatic cycle in the tropical Americas. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 6, p. e0005698, 29 jun. 2017.

LOWE, R. et al. The Zika Virus Epidemic in Brazil: From Discovery to Future Implications. **International journal of environmental research and public health**, v. 15, n. 1, 9 jan. 2018.

LUCIANI, L. et al. Orthopoxvirus Seroprevalence and Infection Susceptibility in France, Bolivia, Laos, and Mali. **Emerging infectious diseases**, v. 28, n. 12, p. 2463–2471, 1 dez. 2022.

LUMSDEN, W.H. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952–53. II. General description and epidemiology. **Trans R Soc Trop Med Hyg**. v.49(1):33–57, 1955.

MACKENSTEDT, U.; JENKINS, D.; ROMIG, T. The role of wildlife in the transmission of parasitic zoonoses in peri-urban and urban areas. **International journal for parasitology. Parasites and wildlife**, v. 4, n. 1, p. 71–79, 1 abr. 2015.

MADARIAGA, M.; TICONA, E.; RESURRECCION, C. Chikungunya: bending over the Americas and the rest of the world. **The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases**, v. 20, n. 1, p. 91–98, 1 jan. 2016.

MAESTRI, R.; PATTERSON, B. D. Patterns of Species Richness and Turnover for the South American Rodent Fauna. **PloS one**, v. 11, n. 3, 1 mar. 2016.

MAGALHÃES-BARBOSA, M. C. DE et al. Trends of the microcephaly and Zika virus outbreak in Brazil, January-July 2016. **Travel medicine and infectious disease**, v. 14, n. 5, p. 458–463, 1 set. 2016.

MAHDY, M. A. A.; YOUNIS, W.; EWALIDA, Z. An Overview of SARS-CoV-2 and Animal Infection. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 7, p. 596391, 11 dez. 2020.

MARFIN, A. A.; MONATH, T.P. Yellow Fever Virus. In: MAHY, B.W.J.; REGENMORTEL, M.H.V.V. Desk Encyclopedia of human and medical virology. Academic Press, Elsevier, 2008.

MASTERS, P; PERLMAN, S. In: **FIELDS**, B. N., et al. (Eds). Virology. 6.ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 2013. p.2129-2159.

MATOS, A. C. D. et al. Bovine Vaccinia: Insights into the Disease in Cattle. **Viruses**, v. 10, n. 3, 9 mar. 2018.

MATUSALI, G. et al. Tropism of the Chikungunya Virus. **Viruses**, v. 11, n. 2, 1 fev. 2019.

MAVALANKAR, D. et al. Increased mortality rate associated with chikungunya epidemic, Ahmedabad, India. **Emerging infectious diseases**, v. 14, n. 3, p. 412–415, 2008.

MCALOOSE, D. et al. From People to Panthera: Natural SARS-CoV-2 Infection in Tigers and Lions at the Bronx Zoo. **mBio**, v. 11, n. 5, p. 1–13, 1 set. 2020.

MCFADDEN, G. Poxvirus tropism. **Nature reviews. Microbiology**, v. 3, n. 3, p. 201–213, mar. 2005.

MEDAGLIA, M. L. G. et al. Genomic Analysis, Phenotype, and Virulence of the Historical Brazilian Smallpox Vaccine Strain IOC: Implications for the Origins and Evolutionary Relationships of Vaccinia Virus. **Journal of virology**, v. 89, n. 23, p. 11909–11925, dez. 2015.

MEERBURG, B. G.; SINGLETON, G. R.; KIJLSTRA, A. Rodent-borne diseases and their risks for public health. **Critical reviews in microbiology**, v. 35, n. 3, p. 221–270, 2009.

MEIER, K. C. et al. A mouse model for studying viscerotropic disease caused by yellow fever virus infection. **PLoS pathogens**, v. 5, n. 10, out. 2009.

MESSENGER, A. M.; BARNES, A. N.; GRAY, G. C. Reverse zoonotic disease transmission (zooanthroponosis): a systematic review of seldom-documented human biological threats to animals. **PloS one**, v. 9, n. 2, 28 fev. 2014.

MESSINA, J. P. et al. The current and future global distribution and population at risk of dengue. **Nature Microbiology** 2019 4:9, v. 4, n. 9, p. 1508–1515, 10 jun. 2019.

MILLS, J. N. Biodiversity loss and emerging infectious disease: An example from the rodent-borne hemorrhagic fevers. **Biodiversity**, v. 7, n. 1, p. 9–17, 2011.

MINH, B. Q. et al. IQ-TREE 2: New Models and Efficient Methods for Phylogenetic Inference in the Genomic Era. **Molecular Biology and Evolution**, v. 37, n. 5, p. 1530–1534, 1 maio 2020.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Dengue, Chikungunya e Zika: 2000 a 2010. Informes epidemiológicos. Brasília: Ministério da Saúde; 2016.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. (A) Monitoramento do período sazonal da febre amarela Brasil, 2017/2018. Informe nº 27, Ministério da Saúde. CGDT/DEVIT/SVS/MS. Atualização 04/10/2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. (B) Vacina de febre amarela será ampliada para todo o Brasil. 20/03/2018 Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2018/marco/vacina-de-febre-amarela-sera-ampliada-para-todo-o-brasil> Acesso em: 11 de março de 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Zika Vírus: o que é, causas, sintomas, tratamento, diagnóstico e prevenção. Ministério da Saúde, Brasil, 2019. Disponível em: <<http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/zika-virus>>. Acesso em: 11 de março de 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Guia de Vigilância em Saúde. 5ed. 2021. Brasília, Secretaria de Vigilância em Saúde. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/publicacoes-svs/vigilancia/guia-de-vigilancia-em-saude_5ed_21nov21_isbn5.pdf/view Acesso em: 12 de fevereiro de 2023.

MIR, D. et al. Phylodynamics of Yellow Fever Virus in the Americas: new insights into the origin of the 2017 Brazilian outbreak. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, 1 dez. 2017.

MIRANDA, J. B. et al. Serologic and Molecular Evidence of Vaccinia Virus Circulation among Small Mammals from Different Biomes, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 6, p. 931, 1 jun. 2017.

MISTRY, P. et al. SARS-CoV-2 Variants, Vaccines, and Host Immunity. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 5400, 3 jan. 2022.

MMA, 2021. (A) Parques e Áreas verdes. **Ministério do Meio Ambiente**. Disponível em: <https://antigo.mma.gov.br/cidades-sustentaveis/areas-verdes-urbanas/parques-e-%C3%A1reas-verdes.html> Acesso em: 16 de fevereiro de 2022.

MMA, 2021. (B) Áreas de Preservação Permanente Urbanas. **Ministério do Meio Ambiente**. Disponível em: <https://antigo.mma.gov.br/cidades-sustentaveis/areas-verdes-urbanas/%C3%A1reas-de-prote%C3%A7%C3%A3o-permanente.html> Acesso em: 16 de fevereiro de 2022.

MOFIJUR, M. et al. Impact of COVID-19 on the social, economic, environmental and energy domains: Lessons learnt from a global pandemic. **Sustainable Production and Consumption**, v. 26, p. 343, 1 abr. 2021.

MONATH, T. P. Yellow fever: an update. **The Lancet. Infectious diseases**, v. 1, n. 1, p. 11–20, 1 ago. 2001.

MONATH, T. P.; VASCONCELOS, P. F. C. Yellow fever. **Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology**, v. 64, p. 160–173, 1 mar. 2015.

MÖNTTINEN, H. A. M. et al. The genomes of nucleocytoplasmic large DNA viruses: viral evolution writ large. **Microbial genomics**, v. 7, n. 9, 2021.

MORALES, M. A. et al. Detection of the mosquito-borne flaviviruses, West Nile, Dengue, Saint Louis Encephalitis, Ilheus, Bussuquara, and Yellow Fever in free-ranging black howlers (*Alouatta caraya*) of Northeastern Argentina. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 2, 10 fev. 2017.

MOREIRA-SOTO, A. et al. Limited Evidence for Infection of Urban and Peri-urban Nonhuman Primates with Zika and Chikungunya Viruses in Brazil. **mSphere**, v. 3, n. 1, 28 fev. 2018.

MORENS, D. M.; FAUCI, A. S. Emerging Pandemic Diseases: How We Got to COVID-19. **Cell**, v. 182, n. 5, p. 1077–1092, 3 set. 2020.

MORENS, D. M.; FOLKERS, G. K.; FAUCI, A. S. The challenge of emerging and re-emerging infectious diseases. **Nature**, v. 430, n. 6996, p. 242–249, 8 jul. 2004.

MORSE, S. S. Factors in the Emergence of Infectious Diseases. **Emerging Infectious Diseases**, v. 1, n. 1, p. 7–15, mar. 1995.

MORSE, S. S. et al. Prediction and prevention of the next pandemic zoonosis. **Lancet (London, England)**, v. 380, n. 9857, p. 1956–1965, 2012.

MOSHIRI, N. ViralMSA: massively scalable reference-guided multiple sequence alignment of viral genomes. **Bioinformatics**. 37(5):714-716, 2021.

MOSS, B. Poxviridae: The Viruses and Their Replication. *In*: **FIELDS**, B. N., et al. (Eds). *Virology*. 6.ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, p. 2129-2159, 2013.

MUNNINK, B. B. O. et al. Transmission of SARS-CoV-2 on mink farms between humans and mink and back to humans. **Science (New York, N.Y.)**, v. 371, n. 6525, p. 172–177, 8 jan. 2021.

MURPHY, H. L.; LY, H. Understanding the prevalence of SARS-CoV-2 (COVID-19) exposure in companion, captive, wild, and farmed animals. **Virulence**, v. 12, n. 1, p. 2777–2786, 2021.

MUSSO, D. et al. Potential sexual transmission of Zika virus. **Emerging infectious diseases**, v. 21, n. 2, p. 359–361, 2015.

MUSSO, D.; GUBLER, D. J. Zika Virus. **Clinical microbiology reviews**, v. 29, n. 3, p. 487–524, 1 jul. 2016.

MUTEBI, J.-P. et al. Phylogenetic and evolutionary relationships among yellow fever virus isolates in Africa. **Journal of virology**, v. 75, n. 15, p. 6999–7008, ago. 2001.

MUTEBI, J. P.; BARRETT, A. D. T. The epidemiology of yellow fever in Africa. **Microbes and Infection**, v. 4, n. 14, p. 1459–1468, 1 nov. 2002.

NAGY-REIS, M. et al. NEOTROPICAL CARNIVORES: a data set on carnivore distribution in the Neotropics. **Ecology**, v. 101, n. 11, p. e03128, 1 nov. 2020.

NAVA, A. et al. The Impact of Global Environmental Changes on Infectious Disease Emergence with a Focus on Risks for Brazil. **ILAR journal**, v. 58, n. 3, p. 393–400, 15 dez. 2017.

NEWMAN, F. K. et al. Improved Assay To Detect Neutralizing Antibody following Vaccination with Diluted or Undiluted Vaccinia (Dryvax) Vaccine. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 7, p. 3154, 1 jul. 2003.

NICOLA, M. et al. The socio-economic implications of the coronavirus pandemic (COVID-19): A review. **International Journal of Surgery (London, England)**, v. 78, p. 185, 1 jun. 2020.

OLDAL, M. et al. Serologic survey of orthopoxvirus infection among rodents in Hungary. **Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)**, v. 15, n. 5, p. 317–322, 1 maio 2015.

OFORI, B. Y. et al. Urban green area provides refuge for native small mammal biodiversity in a rapidly expanding city in Ghana. **Environmental monitoring and assessment**, v. 190, n. 8, 1 ago. 2018.

OLIVAL, K. J. et al. Host and viral traits predict zoonotic spillover from mammals. **Nature** 2017 **546:7660**, v. 546, n. 7660, p. 646–650, 21 jun. 2017.

PAGLIA, A.P., et al. Lista Anotada dos Mamíferos do Brasil / Annotated Checklist of Brazilian Mammals. 2nd Edition. Occasional Papers in Conservation Biology, No. 6. **Conservation International**, Arlington, VA. 76pp, 2012.

PAHO. Preparedness and response for Chikungunya Virus Introduction in the Americas. **Pan American Health Organization**, 2011. Disponível em: <https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/4009/chikungunyavirus.pdf?sequence=1>. Acesso em: 24 de janeiro de 2022.

PAHO. (A) Zika. Pan American Health Organization, 2022. Disponível em: <https://www.paho.org/en/topics/zika> Acesso em: 29 de janeiro de 2022.

PAHO. (B) Rede Regional de Vigilância Genômica de COVID-19. Pan American Health Organization, novembro, 2022. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/node/4951/rede-regional-vigilancia-genomica-covid-19> Acesso em: 14 de fevereiro de 2023.

PAHO. (A) Yellow fever. 2023. Pan American Health Organization. Disponível em: <https://www.paho.org/en/topics/yellow-fever> Acesso em: 29 de janeiro de 2022.

PAHO. (B) Cases of Chikungunya virus disease. Pan American Health Organization, 2023. Disponível em: <https://www3.paho.org/data/index.php/en/mnu-topics/chikv-en/550-chikv-weekly-en.html> Acesso em: 10 de fevereiro de 2023.

PAIXÃO, E. S.; TEIXEIRA, M. G.; RODRIGUES, L. C. Zika, chikungunya and dengue: the causes and threats of new and re-emerging arboviral diseases. **BMJ Global Health**, v. 3, n. Suppl 1, p. e000530, 1 jan. 2018.

PANDIT, P. S. et al. Predicting wildlife reservoirs and global vulnerability to zoonotic Flaviviruses. **Nature Communications** 2018 **9:1**, v. 9, n. 1, p. 1–10, 21 dez. 2018.

PATEL, R. B.; BURKE, T. F. Urbanization — An Emerging Humanitarian Disaster. <https://doi.org/10.1056/NEJMp0810878>, v. 361, n. 8, p. 741–743, 20 ago. 2009.

PAUVOLID-CORRÊA, A. et al. Zika Virus Surveillance at the Human-Animal Interface in West-Central Brazil, 2017-2018. **Viruses**, v. 11, n. 12, 16 dez. 2019.

PBH. (A) Febre amarela: A experiência de Belo Horizonte no enfrentamento da doença. Boletim de vigilância em saúde. **Prefeitura de Belo Horizonte**. Ano VII, Edição nº 2, agosto de 2017.

PBH. A experiência de Belo Horizonte no enfrentamento às arboviroses: Dengue, Zika e Chikungunya. Boletim de Vigilância em Saúde. **Prefeitura de Belo Horizonte**, 2016. <https://prefeitura.pbh.gov.br/sites/default/files/estrutura-de-governo/saude/2018/documentos/boletim-gvsil-arboviroses-13-1-2017.pdf> Acesso em: 15 de fevereiro de 2023.

PBH. (A) Parque Municipal das Mangabeiras. **Prefeitura de Belo Horizonte**. Fundação de Parques e Zoobotânica, 2018. Disponível em: <<https://prefeitura.pbh.gov.br/fundacao-de-parques-e-zoobotanica/informacoes/parques/parque-das-mangabeiras>>. Acesso em: 10 de março de 2019.

PBH. (B) Parque Municipal Jacques Cousteau. **Prefeitura de Belo Horizonte**. Fundação de Parques e Zoobotânica, 2018. Disponível em: <<https://prefeitura.pbh.gov.br/fundacao-de-parques-e-zoobotanica/informacoes/parques/parque-jacques-cousteau>>. Acesso em: 10 de março de 2019.

PBH. (B) PBH confirmada a terceira morte de macaco por febre amarela, 20/03/2017. **Prefeitura de Belo Horizonte**. Disponível em: <https://prefeitura.pbh.gov.br/noticias/pbh-confirmada-terceira-morte-de-macaco-por-febre-amarela>. Acesso em: 10 de março de 2019.

PBH. PBH amplia a exigência de imunização contra Febre Amarela em parques municipais, 04/11/2021. **Prefeitura de Belo Horizonte**. Disponível em <https://prefeitura.pbh.gov.br/noticias/pbh-amplia-exigencia-de-imunizacao-contrafebre-amarela-em-parques-municipais>. Acesso em: 05 de março de 2022.

PBH. Projeto Quatis, parceria da Prefeitura com a UFMG, completa 15 anos. **Prefeitura de Belo Horizonte**, 09/02/2022. Disponível em: <https://prefeitura.pbh.gov.br/noticias/projeto-quatis-parceria-da-prefeitura-com-ufmg-completa-15-anos> Acesso em: 10 de março de 2023.

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

PERES, M. G. et al. Dogs and Opossums Positive for Vaccinia Virus during Outbreak Affecting Cattle and Humans, São Paulo State, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 2, p. 271, 1 fev. 2016.

PERES, M. G. et al. Vaccinia virus in Feces and Urine of Wild Rodents from São Paulo State, Brazil. **Viruses**, v. 10, n. 2, 1 fev. 2018.

PIERSON, T. C.; DIAMOND, M. S. The continued threat of emerging flaviviruses. **Nature microbiology**, v. 5, n. 6, p. 796–812, 1 jun. 2020.

PLOWRIGHT, R. K. et al. Pathways to zoonotic spillover. **Nature Reviews Microbiology** 2017 15:8, v. 15, n. 8, p. 502–510, 30 maio 2017.

PLOWRIGHT, R. K. et al. Land use-induced spillover: a call to action to safeguard environmental, animal, and human health. **The Lancet. Planetary health**, v. 5, n. 4, p. e237–e245, 1 abr. 2021.

PICKERING, B. et al. Divergent SARS-CoV-2 variant emerges in white-tailed deer with deer-to-human transmission. **Nature Microbiology** 2022 7:12, v. 7, n. 12, p. 2011–2024, 10 nov. 2022.

POSSAS, C. et al. Yellow fever outbreak in Brazil: the puzzle of rapid viral spread and challenges for immunisation. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 10, p. 1–12, 2018.

POWERS, A. M.; LOGUE, C. H. Changing patterns of chikungunya virus: re-emergence of a zoonotic arbovirus. **The Journal of general virology**, v. 88, n. Pt 9, p. 2363–2377, set. 2007.

PRIST, P. R. et al. Moving to healthier landscapes: Forest restoration decreases the abundance of Hantavirus reservoir rodents in tropical forests. **Science of The Total Environment**, v. 752, p. 141967, 15 jan. 2021.

PROJETO QUATIS. O quati. Projeto Quatis, Parque das Mangabeiras. Disponível online: <https://sites.google.com/site/projetoquatis/parque-das-mangabeiras> Acesso em: 29 de janeiro de 2022.

QUICK J. nCoV-2019 sequencing protocol. protocols.io; 2020.

RABE, I. B. et al. Interim Guidance for Interpretation of Zika Virus Antibody Test Results. **MMWR. Morbidity and mortality weekly report**, v. 65, n. 21, p. 543–546, 3 jun. 2016.

RACANIELLO, V. R. Emerging infectious diseases. **Journal of Clinical Investigation**, v. 113, n. 6, p. 796–798, 15 mar. 2004.

RAMBAUT, A. et al. A dynamic nomenclature proposal for SARS-CoV-2 lineages to assist genomic epidemiology. **Nature Microbiology** 2020 5:11, v. 5, n. 11, p. 1403–1407, 15 jul. 2020.

REDE GENÔMICA FIOCRUZ. Filodinâmica do SARS-CoV-2 no Brasil, GISAID: linhagens do SARS-CoV-2 em Circulação, 2022. Disponível em: <https://www.genomahcov.fiocruz.br/gisaid/> Acesso em: 16 de setembro de 2022.

REZENDE, I. M. DE et al. Persistence of Yellow fever virus outside the Amazon Basin, causing epidemics in Southeast Brazil, from 2016 to 2018. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 12, n. 6, 1 jun. 2018.

RICHARD J. KUHN. Togaviridae. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY P.M.; COHEN, J.I.; GRIFFIN D.E.; LAMB R.A.; MARTIN, M.A.; RACANIELLO, V.R.; ROIZMAN, B. editors. *Fields Virology*. 6th ed. Volume 1, Lippincott Williams & Wilkins; Philadelphia, USA, 2013.

RODRIGUES, D. H. et al. Feeding Ecology of Wild Brown-Nosed Coatis and Garbage Exploration: A Study in Two Ecological Parks. **Animals: an open access journal from MDPI**, v. 11, n. 8, 1 ago. 2021.

RODRIGUES, J. C. P. et al. Seroprevalence of arboviruses in *Nasua nasua* (Mammalia, Carnivora, Procyonidae) of synanthropic habitats in the Iguazu National Park, Brazilian Atlantic Forest. **Ciênc. rural (Online)**, v. 53, n. 2, p. e20210713–e20210713, 2023.

ROSSINI, G.; LANDINI, M. P.; SAMBRI, V. Evolution and epidemiology of chikungunya virus. **Methods in Molecular Biology**, v. 1426, p. 3–10, 2016.

RUIZ-ARAVENA, M. et al. Ecology, evolution and spillover of coronaviruses from bats. **Nature Reviews Microbiology** 2021 20:5, v. 20, n. 5, p. 299–314, 19 nov. 2021.

SABINO, E. C. et al. Resurgence of COVID-19 in Manaus, Brazil, despite high seroprevalence. **Lancet (London, England)**, v. 397, n. 10273, p. 452–455, 6 fev. 2021.

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, 1 dez. 2020.

SALLES, T. S. et al. History, epidemiology and diagnostics of dengue in the American and Brazilian contexts: a review. **Parasites & vectors**, v. 11, n. 1, 24 abr. 2018.

SAGULENKO, P.; PULLER, V.; NEHER, R. A. TreeTime: Maximum-likelihood phylodynamic analysis. **Virus Evolution**, v. 4, n. 1, 1 jan. 2018.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc Natl Acad Sci, USA** 74, 5463–5467, 1977.

SANTIAGO, G. A. et al. Analytical and clinical performance of the CDC real time RT-PCR assay for detection and typing of dengue virus. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 7, n. 7, 2013.

SANTOS, F. O. Ocorrência de *Necromys lasiurus* (Lund, 1841), em Áreas Abertas da Mata Atlântica e Seu Papel Como Potencial Hospedeiro de Hantavírus no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. 2018. 126 f. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade e Saúde) -Instituto Oswaldo Cruz, **Fundação Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 2018.

SCHATZMAYR, H. G. et al. Human and animal infections by vaccinia-like viruses in the state of Rio de Janeiro: A novel expanding zoonosis. **Vaccine**, v. 29, n. SUPPL. 4, p. D65–D69, 30 dez. 2011.

SCHMIDT, F. I. et al. Vaccinia virus entry is followed by core activation and proteasome-mediated release of the immunomodulatory effector VH1 from lateral bodies. **Cell reports**, v. 4, n. 3, p. 464–476, 2013.

SCHWARTZ, O.; ALBERT, M. L. Biology and pathogenesis of chikungunya virus. **Nature Reviews Microbiology**. v. 8, n. 7, p. 491–500, jun. 2010.

SES. Alerta - Cenário epidemiológico Febre Amarela, 2021. **Secretaria do Estado de Saúde de Minas Gerais**. Nota informativa nº SES/SUBVS-SVE-DVAT-CEVARB 1877/2021. Disponível em :

https://www.saude.mg.gov.br/images/noticias_e_eventos/000_2021/SEI_1320.01.00_38355_2021_82%20NI%20SES%201877-2021%20-%20ALERTA%20FA.pdf Acesso em: 12 de fevereiro de 2023.

SES. Atualização epidemiológica Febre Amarela Minas Gerais. **Secretaria do Estado de Saúde de Minas Gerais**, Belo Horizonte, janeiro de 2023. Disponível em: <https://www.saude.mg.gov.br/images/2023/Atualiza%C3%A7%C3%A3o%20Epidemiol%C3%B3gica%20da%20Febre%20Amarela%20em%20MG%20-%20Consolidado%20de%2009.01.2023.pdf>. Acesso em: 12 de fevereiro de 2023.

SES. Boletim Epidemiológico de Monitoramento dos casos de Dengue, Chikungunya e Zika (03/01), Nº 265 – Semana Epidemiológica 52/2022, janeiro de 2023. **Secretaria do Estado de Saúde de Minas Gerais**. Disponível em: https://www.saude.mg.gov.br/images/1_noticias/06_2023/4-jan-fev-marc/03-01-BO_ARBO265.pdf Acesso em: 12 de fevereiro de 2023.

SHARUN, K. et al. SARS-CoV-2 in animals: potential for unknown reservoir hosts and public health implications. **The veterinary quarterly**, v. 41, n. 1, p. 181–201, 2021.

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

SILA, T. et al. Suspected Cat-to-Human Transmission of SARS-CoV-2, Thailand, July–September 2021. **Emerging Infectious Diseases**, v. 28, n. 7, p. 1485, 1 jul. 2022.

SILVA, L. A.; DERMODY, T. S. Chikungunya virus: epidemiology, replication, disease mechanisms, and prospective intervention strategies. **The Journal of clinical investigation**, v. 127, n. 3, p. 737–749, 1 mar. 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, 23 jan. 2020.

SILVA, N. I. O. et al. Here, There, and Everywhere: The Wide Host Range and Geographic Distribution of Zoonotic Orthopoxviruses. **Viruses**, v. 13, n. 1, 1 jan. 2021.

SILVA-FERNANDES, A. T. et al. Natural human infections with Vaccinia virus during bovine vaccinia outbreaks. **Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology**, v. 44, n. 4, p. 308–313, abr. 2009.

SMITH, G. L.; MCFADDEN, G. Smallpox: anything to declare? **Nature reviews. Immunology**, v. 2, n. 7, p. 521–527, 2002.

SIMMONDS, P. et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Flaviviridae. **The Journal of general virology**, v. 98, n. 1, p. 2–3, 1 jan. 2017.

SINGH, D. D.; PARVEEN, A.; YADAV, D. K. SARS-CoV-2: Emergence of New Variants and Effectiveness of Vaccines. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, 14 dez. 2021.

SONG, B. H. et al. Zika virus: History, epidemiology, transmission, and clinical presentation. **Journal of neuroimmunology**, v. 308, p. 50–64, 15 jul. 2017.

SOTOMAYOR-BONILLA, J. et al. Survey of mosquito-borne flaviviruses in the Cuitzmala River Basin, Mexico: Do they circulate in rodents and bats? **Tropical Medicine and Health**, v. 46, n. 1, p. 1–5, 24 out. 2018.

SOUZA, W. V. et al. Microcephaly in Pernambuco State, Brazil: epidemiological characteristics and evaluation of the diagnostic accuracy of cutoff points for reporting suspected cases. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 32, n. 4, p. e00017216, 29 abr. 2016.

STOFFELLA-DUTRA, A. G. et al. Absence of YF-neutralizing antibodies in vulnerable populations of Brazil: A warning for epidemiological surveillance and the potential risks for future outbreaks. **Vaccine**, v. 38, n. 42, p. 6592–6599, 29 set. 2020.

STRAUSS, J.H.; STRAUSS, E.G. The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. **Microbiol Rev**, 58(3):491–562, 1994.

STUCKY, B.J. SeqTrace: A Graphical Tool for Rapidly Processing DNA Sequencing Chromatograms. **Journal of Biomolecular Techniques**, 23:90–93, 2012.

SUKHRALIA, S. et al. From dengue to Zika: the wide spread of mosquito-borne arboviruses. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 38, n. 1, p. 3–14, 22 jan. 2019.

SUN, J. et al. COVID-19: Epidemiology, Evolution, and Cross-Disciplinary Perspectives. **Trends in molecular medicine**, v. 26, n. 5, p. 483–495, 1 maio 2020.

SUN, K. et al. Atlas of ACE2 gene expression reveals novel insights into transmission of SARS-CoV-2. **Heliyon**, v. 7, n. 1, 1 jan. 2021.

SVS. Boletim epidemiológico. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e doença aguda pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52 de 2018. Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, vol. 50, jan. 2019.

SVS. Boletim epidemiológico. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas causados por vírus transmitidos pelo mosquito Aedes (dengue, chikungunya e zika), semanas epidemiológicas 1 a 48, 2021. Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. Volume 52, dezembro de 2021. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/boletins-epidemiologicos/edicoes/2021/boletim_epidemiologico_svs_45.pdf Acesso em: 28 de janeiro de 2022.

SVS. Monitoramento dos casos de arboviroses até a semana epidemiológica 52 de 2022. Volume 54, Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, janeiro 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/edicoes/2023/boletim-epidemiologico-volume-54-no-01/#:~:text=Situa%C3%A7%C3%A3o%20epidemiol%C3%B3gica%20de%202022&t>

ext=At%C3%A9%20a%20SE%2052%20de,para%20o%20mesmo%20per%C3%ADodo%20analisado. Acesso em: 16 de fevereiro de 2023.

KUMAR S. et al MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*. 35:1547-1549, 2018.

TEIXEIRA, R. H. F.; AMBROSIO, S. R. Carnivora – Procyonidae (quati, mão-pelada e jupará). In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. Tratado de animais selvagens: medicina veterinária. 2.ed. São Paulo: Roca, cap. 40, p. 961-979, 2014.

TERZIAN, A. C. B. et al. Evidence of natural Zika virus infection in neotropical non-human primates in Brazil. **Scientific Reports**, 2018 8:1, v. 8, n. 1, p. 1–15, 30 out. 2018.

TESH, R. B. et al. Experimental yellow fever virus infection in the Golden Hamster (*Mesocricetus auratus*). I. Virologic, biochemical, and immunologic studies. **The Journal of infectious diseases**, v. 183, n. 10, p. 1431–1436, 15 maio 2001.

THOISY, B.; DUSSART, P.; KAZANJI, M. Wild terrestrial rainforest mammals as potential reservoirs for flaviviruses (yellow fever, dengue 2 and St Louis encephalitis viruses in French Guiana. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, n. 7, p. 409–412, jul. 2004.

THOISY, B. DE et al. Dengue infection in neotropical forest mammals. **Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)**, v. 9, n. 2, p. 157–169, 1 abr. 2009.

TIRERA, S. et al. The influence of habitat on viral diversity in neotropical rodent hosts. **Viruses**, v. 13, n. 9, 1 set. 2021.

TRINDADE, G. S. et al. Araçatuba Virus: A Vaccinialike Virus Associated with Infection in Humans and Cattle. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 2, p. 155, 1 fev. 2003.

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

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

TRINDADE, G. S. et al. Serro 2 Virus Highlights the Fundamental Genomic and Biological Features of a Natural Vaccinia Virus Infecting Humans. **Viruses**, v. 8, n. 12, 10 dez. 2016.

TSETSARKIN, K. A. et al. A single mutation in chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. **PLoS pathogens**, v. 3, n. 12, p. 1895–1906, dez. 2007.

UNESCO. Megacities Alliance for Water and Climate. **United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization**. 2021. Disponível em: <https://en.unesco.org/mawac> Acesso em: 27 de janeiro de 2022.

UNEP. Megadiverse Brazil: giving biodiversity an online boost. **United Nations Environment Programme**, 2019. Disponível em: <https://www.unep.org/news-and-stories/story/megadiverse-brazil-giving-biodiversity-online-boost> Acesso em: 27 de janeiro de 2022.

UNEP. Preventing the Next Pandemic: Zoonotic diseases and how to break the chain of transmission. **United Nations Environment Programme and International Livestock Research Institute**. Nairobi, Kenya, 2020.

UNFPA. United Nations Population Fund. State of world population 2007. Unleashing the Potential of Urban Growth. 01 Jan 2007, pages 108. Disponível em: <https://www.unfpa.org/publications/state-world-population-2007> Acesso em: 27 de janeiro de 2022.

VARIZA, P. F. et al. Updated spatio-temporal distribution of *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* in Brazil. **Acta tropica**, v. 232, 1 ago. 2022.

VASILAKIS, N. et al. Fever from the forest: prospects for the continued emergence of sylvatic dengue virus and its impact on public health. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 9, n. 7, p. 532, maio 2011.

VILLABONA-ARENAS, C. J. et al. Detection Of Four Dengue Serotypes Suggests Rise In Hyperendemicity In Urban Centers Of Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 2, p. e2620, 2014.

V'KOVSKI, P. et al. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. **Nature Reviews Microbiology** **2020** **19:3**, v. 19, n. 3, p. 155–170, 28 out. 2020.

VOLOCH, C. M. et al. Genomic Characterization of a Novel SARS-CoV-2 Lineage from Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Virology**, v. 95, n. 10, 26 abr. 2021.

VOURC'H, G. et al. Chikungunya antibodies detected in non-human primates and rats in three Indian Ocean islands after the 2006 ChikV outbreak. **Veterinary Research**, v. 45, n. 1, p. 52, 1 maio 2014.

VU, D. M.; JUNGKIND, D.; LABEAUD, A. D. Chikungunya Virus. **Clinics in laboratory medicine**, v. 37, n. 2, p. 371–382, 1 jun. 2017.

WANG, Y.; GRUNEWALD, M.; PERLMAN, S. Coronaviruses: An Updated Overview of Their Replication and Pathogenesis. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 2203, p. 1–29, 2020.

WEAVER, S. C.; BARRETT, A. D. T. Transmission cycles, host range, evolution and emergence of arboviral disease. **Nature reviews. Microbiology**, v. 2, n. 10, p. 789–801, out. 2004.

WEAVER, S. C. Urbanization and geographic expansion of zoonotic arboviral diseases: mechanisms and potential strategies for prevention. **Trends in microbiology**, v. 21, n. 8, p. 360, ago. 2013.

WEAVER, S. C.; LECUIT, M. Chikungunya virus and the global spread of a mosquito-borne disease. **The New England journal of medicine**, v. 372, n. 13, p. 1231–1239, 26 mar. 2015.

WEAVER, S. C. et al. Zika virus: History, emergence, biology, and prospects for control. **Antiviral research**, v. 130, p. 69–80, 1 jun. 2016.

WEAVER, S. C. Emergence of epidemic zika virus transmission and congenital zika syndrome: Are recently evolved traits to blame? **mBio**, v. 8, n. 1, 1 jan. 2017.

WEAVER, S. C. et al. Zika, Chikungunya, and Other Emerging Vector-Borne Viral Diseases. **Annual review of medicine**, v. 69, p. 395–408, 29 jan. 2018.

WEGNER, G. I. et al. Averting wildlife-borne infectious disease epidemics requires a focus on socio-ecological drivers and a redesign of the global food system. **eClinicalMedicine**, v. 47, p. 101386, 1 maio 2022.

WEI, Y. et al. Predicting mammalian species at risk of being infected by SARS-CoV-2 from an ACE2 perspective. **Scientific Reports 2021**, v. 11, n. 1, p. 1–10, 18 jan. 2021.

WHO (A). WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard, 2023. **World Health Organization**. Disponível em: <https://covid19.who.int/> Acesso em: 29 de janeiro de 2023.

WHO. (B) Multi-country outbreak of mpox External Situation Report 14, published 19 January 2023. **World Health Organization**, 2023. Disponível em: <https://www.who.int/publications/m/item/multi-country-outbreak-of-mpox--external-situation-report-14--19-january-2023>. Acesso em: 22 de janeiro de 2023.

WHO. Listings of WHO's response to COVID-19. **World Health Organization**, 29 January 2021. Disponível em: <https://www.who.int/news/item/29-06-2020-covidtimeline> Acesso em: 05 de fevereiro de 2022.

WHO. Impact of COVID-19 on people's livelihoods, their health and our food systems. **World Health Organization**. 13 October 2020. Disponível em: <https://www.who.int/news/item/13-10-2020-impact-of-covid-19-on-people's-livelihoods-their-health-and-our-food-systems> Acesso em: 07 de fevereiro de 2022.

WHO. Connecting Global Priorities: Biodiversity and Human Health. *A State of Knowledge Review*. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. **World Health Organization and Secretariat of the Convention on Biological Diversity**, 2015.

WHO. (A) Ten threats to global health in 2019. **World Health Organization**, 2019. Disponível em: <https://www.who.int/emergencies/ten-threats-to-global-health-in-2019>. Acesso em: 18 de fevereiro de 2019.

WHO. (B) Yellow fever – Key facts. 7 may 2019. **World Health Organization**, Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/yellow-fever> Acesso em: 05 de março de 2023.

WHO. (C) What is dengue? **World Health Organization**. 2019. Disponível em: <https://www.who.int/denguecontrol/disease/en/>>. Acesso em: 10 de março de 2020.

WHO. *Urban green spaces and health*. **World Health Organization**, Copenhagen: WHO Regional Office for Europe, 2016.

WHO. Urban green spaces: a brief for action. **World Health Organization**, Regional Office for Europe, 2017.

WHO. (A) Dengue and severe dengue – Key Facts. 10 January 2022. **World Health Organization**. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue> Acesso em: 05 de março de 2023.

WHO. (B) Zika virus. Key Facts, 8 December 2022. **World Health Organization**, 2022. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/zika-virus> Acesso em: 05 de março de 2023.

WHO. (C) Chikungunya. Key Facts, 8 December 2022. **World Health Organization**, 2022. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chikungunya> Acesso em: 05 de março de 2023.

WHO. (D) Monkeypox. 19 de maio de 2022. **World Health Organization**, 2022. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/monkeypox> Acesso em: 24 de fevereiro de 2023.

WHO. (E) Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV), 2022. **World Health Organization**. Disponível em: https://www.who.int/health-topics/middle-east-respiratory-syndrome-coronavirus-mers#tab=tab_1 Acesso em: 05 de fevereiro de 2022.

WHO. (F) Tracking SARS-CoV-2 variants. **World Health Organization**, 3 February 2022. Disponível em: <https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/> Acesso em: 05 de fevereiro de 2022.

WOAH. SARS-CoV-2 in animals, situation report 20, 2022. **World Organisation for Animal Health**. Disponível em: <https://www.woah.org/app/uploads/2023/01/sars-cov-2-situation-report-20.pdf>

WIERSINGA, W. J. et al. Pathophysiology, Transmission, Diagnosis, and Treatment of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Review. **JAMA**, v. 324, n. 8, p. 782–793, 25 ago. 2020.

WOLCH, J. R.; BYRNE, J.; NEWELL, J. P. Urban green space, public health, and environmental justice: The challenge of making cities 'just green enough'. **Landscape and Urban Planning**, v. 125, p. 234–244, 1 maio 2014.

WOLFE, N. D.; DUNAVAN, C. P.; DIAMOND, J. Origins of major human infectious diseases. **Nature**, v. 447, n. 7142, p. 279–283, 17 maio 2007.

WU, F. et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. **Nature** 2020 **579:7798**, v. 579, n. 7798, p. 265–269, 3 fev. 2020.

XAVIER, J. et al. The ongoing COVID-19 epidemic in Minas Gerais, Brazil: insights from epidemiological data and SARS-CoV-2 whole genome sequencing. **Emerging microbes & infections**, v. 9, n. 1, p. 1824–1834, 1 jan. 2020.

YEN, H. L. et al. Transmission of SARS-CoV-2 delta variant (AY.127) from pet hamsters to humans, leading to onward human-to-human transmission: a case study. **The Lancet**, v. 399, n. 10329, p. 1070–1078, 12 mar. 2022.

YOUNG, P.R. Arboviruses: A Family on the Move. In: Hilgenfeld R., Vasudevan S. (eds) Dengue and Zika: Control and Antiviral Treatment Strategies. Advances in Experimental Medicine and Biology, vol 1062. Springer, Singapore, 2018.

YUN, S. I.; LEE, Y. M. Zika virus: An emerging flavivirus. **Journal of microbiology (Seoul, Korea)**, v. 55, n. 3, p. 204–219, 1 mar. 2017.

ZAECK, L. M. et al. Low levels of monkeypox virus-neutralizing antibodies after MVA-BN vaccination in healthy individuals. **Nature Medicine** 2022 **29:1**, v. 29, n. 1, p. 270–278, 18 out. 2022.

ZANOTTO, P. M. DE A.; LEITE, L. C. DE C. The Challenges Imposed by Dengue, Zika, and Chikungunya to Brazil. **Frontiers in immunology**, v. 9, 28 ago. 2018.

ZHONG, N. S. et al. Epidemiology and cause of severe acute respiratory syndrome (SARS) in Guangdong, People's Republic of China, in February, 2003. **Lancet**, v. 362, n. 9393, p. 1353–1358, 25 out. 2003.

ZHOU, H. et al. Identification of novel bat coronaviruses sheds light on the evolutionary origins of SARS-CoV-2 and related viruses. **Cell**, v. 184, n. 17, p. 4380- 4391.e14, 19 ago. 2021.

ZHU, N. et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. **The New England journal of medicine**, v. 382, n. 8, p. 727–733, 20 fev. 2020.

ZUCCA, P. et al. What Do Adolescents Know About One-Health and Zoonotic Risks? A School-Based Survey in Italy, Austria, Germany, Slovenia, Mauritius, and Japan. **Frontiers in Public Health**, v. 9, p. 230, 30 mar. 2021.

ANEXOS

ANEXO A

Tabela Suplementar 1: Dados da coleção biológica de roedores e marsupiais analisados nesse projeto.

IDENTIFICAÇÃO	PARQUE	ORDEM/GÊNERO/ESPÉCIE	SEXO	PESO	DATA	TRANSCECTO	ESTAÇÃO
PMAG01	Mangabeiras	<i>Didelphis albiventris</i>	Fêmea	366g	14/04/2018	T3P2	Seca
PMAG03	Mangabeiras	<i>Necromys lasiurus</i>	Fêmea	72g	15/04/2018	T1P2	Seca
PMAG04	Mangabeiras	<i>Cerradomys</i> sp.	Macho	80g	15/04/2018	T1P1	Seca
PMAG05	Mangabeiras	<i>Necromys lasiurus</i>	Macho	73g	16/04/2018	T1P1	Seca
PMAG09	Mangabeiras	<i>Cerradomys</i> sp.	Macho	100g	19/06/2018	T1P1	Seca
PMAG11	Mangabeiras	<i>Necromys lasiurus</i>	Fêmea	40g	21/06/2018	T1P3	Seca
PMAG14	Mangabeiras	<i>Cerradomys</i> sp.	Macho	102g	21/08/2018	T1P3	Seca
PMAG16	Mangabeiras	<i>Cerradomys</i> sp.	-	70g	23/08/2018	T1P11	Seca
PMAG17	Mangabeiras	<i>Necromys lasiurus</i>	Macho	46g	23/08/2018	T1P15	Seca
PMAG18	Mangabeiras	<i>Cerradomys</i> sp.	-	59g	24/08/2018	T1P2	Seca
PMAG20	Mangabeiras	<i>Cerradomys</i> sp.	Macho	84g	16/10/2018	T1P12	Chuvosa
PMAG21	Mangabeiras	Rodentia	Fêmea	34g	17/10/2018	T1P10	Chuvosa
PMAG23	Mangabeiras	<i>Cerradomys</i> sp.	Macho	54g	19/10/2018	T1P1	Chuvosa
PMAG25	Mangabeiras	Rodentia	Fêmea	53g	08/01/2019	T1P5	Chuvosa
PMAG28	Mangabeiras	Rodentia	Macho	44g	10/01/2019	T1P2	Chuvosa
PMAG29	Mangabeiras	Rodentia	Fêmea	24g	11/01/2019	T1P4	Chuvosa
PMAG31	Mangabeiras	<i>Marmosops incanus</i>	Fêmea	26g	19/02/2019	T2P9	Chuvosa
PMAG32	Mangabeiras	<i>Marmosops incanus</i>	Macho	32g	20/02/2019	T2P15	Chuvosa
PMAG34	Mangabeiras	<i>Cerradomys</i> sp.	Fêmea	28g	21/02/2019	T3P2	Chuvosa
PMAG38	Mangabeiras	<i>Cerradomys</i> sp.	-	44g	22/02/2019	T1P11	Chuvosa
JC01	Jacques Cousteau	Rodentia	Macho	100g	16/05/2018	T1P6	Seca
JC02	Jacques Cousteau	<i>Rattus rattus</i>	Macho	74g	16/05/2018	T1P9	Seca
JC04	Jacques Cousteau	<i>Rattus rattus</i>	Macho	120g	16/05/2018	T1P8	Seca

JC05	Jacques Cousteau	Rodentia	Fêmea	120g	16/05/2018	T1P10	Seca
JC06	Jacques Cousteau	<i>Rattus rattus</i>	Macho	220g	16/05/2018	T1P5	Seca
JC07	Jacques Cousteau	<i>Rattus rattus</i>	Macho	134g	17/05/2018	T1P5	Seca
JC08	Jacques Cousteau	<i>Rattus rattus</i>	Macho	114g	17/05/2018	T1P14	Seca
JC09	Jacques Cousteau	<i>Rattus rattus</i>	Macho	64g	17/05/2018	T1P10	Seca
JC10	Jacques Cousteau	<i>Rattus rattus</i>	Fêmea	114g	17/05/2018	T2P2	Seca
JC11	Jacques Cousteau	<i>Rattus rattus</i>	Macho	74g	17/05/2018	T1P3S	Seca
JC12	Jacques Cousteau	<i>Rattus rattus</i>	Fêmea	144g	17/05/2018	T1P3G	Seca
JC13	Jacques Cousteau	<i>Rattus rattus</i>	Macho	64g	17/05/2018	T1P12	Seca
JC14	Jacques Cousteau	Rodentia	Macho	74g	17/05/2018	T2P9	Seca
JC15	Jacques Cousteau	Rodentia	Fêmea	100g	17/05/2018	T2P12	Seca
JC17	Jacques Cousteau	Rodentia	Macho	74g	18/05/2018	T2P13	Seca
JC18	Jacques Cousteau	Rodentia	Macho	144g	18/05/2018	T1P3	Seca
JC19	Jacques Cousteau	Rodentia	Macho	84g	18/05/2018	T2P2	Seca
JC20	Jacques Cousteau	Rodentia	Macho	64g	18/05/2018	T2P9	Seca
JC21	Jacques Cousteau	Rodentia	Fêmea	124g	19/05/2018	T1P3	Seca
JC22	Jacques Cousteau	Rodentia	-	54g	19/05/2018	T2P14	Seca
JC23	Jacques Cousteau	Rodentia	Macho	134g	19/05/2018	T2P15	Seca
JC26	Jacques Cousteau	<i>Cerradomys sp.</i>	Macho	42g	10/07/2018	T2P8	Seca
JC27	Jacques Cousteau	<i>Cerradomys sp.</i>	Fêmea	54g	10/07/2018	T1P13	Seca
JC28	Jacques Cousteau	<i>Necomys lasiurus</i>	Macho	44g	10/07/2018	T2P9	Seca
JC29	Jacques Cousteau	<i>Cerradomys sp.</i>	Fêmea	53g	10/07/2018	T2P2	Seca
JC30	Jacques Cousteau	<i>Cerradomys sp.</i>	Macho	79g	10/07/2018	T2P5	Seca
JC31	Jacques Cousteau	<i>Necomys lasiurus</i>	Fêmea	39g	10/07/2018	T2P9	Seca
JC32	Jacques Cousteau	<i>Necomys lasiurus</i>	Fêmea	29g	10/07/2018	T2P10	Seca
JC33	Jacques Cousteau	<i>Cerradomys sp.</i>	Macho	39g	10/07/2018	T2P11	Seca
JC34	Jacques Cousteau	<i>Necomys lasiurus</i>	-	29g	10/07/2018	T2P10	Seca
JC35	Jacques Cousteau	<i>Cerradomys sp.</i>	-	29g	10/07/2018	T2P11	Seca
JC36	Jacques Cousteau	<i>Necomys lasiurus</i>	Macho	39g	10/07/2018	T2P15	Seca
JC37	Jacques Cousteau	<i>Necomys lasiurus</i>	Fêmea	26g	10/07/2018	T2P12	Seca

JC39	Jacques Cousteau	<i>Necromys lasiurus</i>	Macho	54g	11/07/2018	T2P11	Seca
JC40	Jacques Cousteau	<i>Cerradomys</i> sp.	Macho	89g	11/07/2018	T2P3	Seca
JC41	Jacques Cousteau	<i>Cerradomys</i> sp.	Macho	64g	11/07/2018	T2P6	Seca
JC42	Jacques Cousteau	<i>Cerradomys</i> sp.	Macho	72g	11/07/2018	T2P2	Seca
JC43	Jacques Cousteau	<i>Necromys lasiurus</i>	Fêmea	49g	11/07/2018	T2P11	Seca
JC44	Jacques Cousteau	<i>Cerradomys</i> sp.	Fêmea	54g	11/07/2018	T2P5	Seca
JC45	Jacques Cousteau	<i>Necromys lasiurus</i>	Macho	17g	11/07/2018	T2P12	Seca
JC46	Jacques Cousteau	<i>Rattus rattus</i>	Fêmea	124g	12/07/2018	T1P3	Seca
JC49	Jacques Cousteau	<i>Rattus rattus</i>	Fêmea	114g	12/07/2018	T1P2	Seca
JC50	Jacques Cousteau	<i>Necromys lasiurus</i>	-	39g	12/07/2018	T2P12	Seca
JC51	Jacques Cousteau	<i>Necromys lasiurus</i>	Fêmea	54g	13/07/2018	T2P9	Seca
JC52	Jacques Cousteau	<i>Cerradomys</i> sp.	Fêmea	84g	13/07/2018	T1P15	Seca
JC54	Jacques Cousteau	<i>Necromys lasiurus</i>	-	34g	13/07/2018	T2P10	Seca
JC55	Jacques Cousteau	<i>Rattus rattus</i>	Fêmea	89g	13/07/2018	T1P11	Seca
JC56	Jacques Cousteau	<i>Rattus rattus</i>	Fêmea	144g	13/07/2018	T1P5	Seca
JC57	Jacques Cousteau	<i>Rattus rattus</i>	Macho	124g	13/07/2018	T1P7	Seca
JC58	Jacques Cousteau	<i>Rattus rattus</i>	Macho	224g	13/07/2018	T1P4	Seca
JC59	Jacques Cousteau	<i>Necromys lasiurus</i>	Macho	20g	25/09/2019	T2P11	Seca
JC60	Jacques Cousteau	<i>Necromys lasiurus</i>	Macho	25g	25/09/2019	T2P10	Seca
JC61	Jacques Cousteau	<i>Necromys lasiurus</i>	Fêmea	-	25/09/2019	T2P11	Seca
JC62	Jacques Cousteau	<i>Cerradomys</i> sp.	Fêmea	112g	25/09/2019	T2P14	Seca
JC63	Jacques Cousteau	<i>Rattus rattus</i>	Fêmea	173g	25/09/2019	T1P2	Seca
JC64	Jacques Cousteau	<i>Necromys lasiurus</i>	Macho	54g	25/09/2019	T2P11	Seca
JC65	Jacques Cousteau	<i>Necromys lasiurus</i>	Macho	42g	25/09/2019	T2P9	Seca
JC66	Jacques Cousteau	<i>Rattus rattus</i>	Fêmea	108g	25/09/2019	T1P3	Seca
JC67	Jacques Cousteau	<i>Rattus rattus</i>	Macho	198g	25/09/2019	T1P12	Seca
JC68	Jacques Cousteau	<i>Necromys lasiurus</i>	Macho	38g	26/09/2019	T2P10	Seca
JC69	Jacques Cousteau	<i>Cerradomys</i> sp.	Macho	65g	26/09/2019	T2P14	Seca
JC70	Jacques Cousteau	<i>Rattus rattus</i>	Fêmea	163g	26/09/2019	T1P12	Seca
JC71	Jacques Cousteau	<i>Necromys lasiurus</i>	Macho	39g	26/09/2019	T2P11	Seca

JC73	Jacques Cousteau	<i>Cerradomys sp.</i>	Fêmea	43g	26/09/2019	T2P2	Seca
JC74	Jacques Cousteau	<i>Rattus rattus</i>	Macho	163g	26/09/2019	T1P2	Seca
JC75	Jacques Cousteau	<i>Necomys lasiurus</i>	Macho	34g	26/09/2019	T2P9	Seca
JC76	Jacques Cousteau	<i>Cerradomys sp.</i>	Macho	122g	27/09/2019	T1P4	Seca
JC77	Jacques Cousteau	<i>Rattus rattus</i>	Macho	172g	27/09/2019	T1P3	Seca
JC78	Jacques Cousteau	<i>Necomys lasiurus</i>	Macho	39g	27/09/2019	T2P11	Seca
JC79	Jacques Cousteau	<i>Rattus rattus</i>	Fêmea	154g	27/09/2019	T1P1	Seca
JC80	Jacques Cousteau	<i>Necomys lasiurus</i>	Macho	35g	28/09/2019	T2P8	Seca
JC81	Jacques Cousteau	<i>Necomys lasiurus</i>	Macho	34g	28/09/2019	T2P14	Seca
JC82	Jacques Cousteau	<i>Rattus rattus</i>	Fêmea	56g	28/09/2019	T1P1	Seca
JC83	Jacques Cousteau	<i>Cerradomys sp.</i>	Macho	60g	28/09/2019	T2P7	Seca
JC85	Jacques Cousteau	<i>Rattus rattus</i>	Fêmea	66g	20/11/2019	T1P8	Chuvosa
JC86	Jacques Cousteau	<i>Rattus rattus</i>	Fêmea	174g	20/11/2019	T1P12	Chuvosa
JC87	Jacques Cousteau	<i>Necomys lasiurus</i>	Macho	54g	20/11/2019	T2P9	Chuvosa
JC88	Jacques Cousteau	<i>Cerradomys sp.</i>	Macho	124g	20/11/2019	T2P3	Chuvosa
JC89	Jacques Cousteau	<i>Necomys lasiurus</i>	Macho	56g	20/11/2019	T2P10	Chuvosa
JC90	Jacques Cousteau	<i>Necomys lasiurus</i>	Fêmea	62g	20/11/2019	T2P5	Chuvosa
JC91	Jacques Cousteau	Rodentia	Fêmea	128g	20/11/2019	T2P13	Chuvosa
JC92	Jacques Cousteau	<i>Necomys lasiurus</i>	Fêmea	56g	21/11/2019	T2P15	Chuvosa
JC93	Jacques Cousteau	<i>Necomys lasiurus</i>	Fêmea	54g	21/11/2019	T2P8	Chuvosa
JC94	Jacques Cousteau	<i>Necomys lasiurus</i>	Macho	80g	21/11/2019	T2P1	Chuvosa
JC95	Jacques Cousteau	<i>Necomys lasiurus</i>	Macho	52g	22/11/2019	T2P7	Chuvosa
JC96	Jacques Cousteau	<i>Cerradomys sp.</i>	Fêmea	44g	22/11/2019	T2P7	Chuvosa
JC97	Jacques Cousteau	<i>Necomys lasiurus</i>	Fêmea	46g	22/11/2019	T2P9	Chuvosa
JC98	Jacques Cousteau	<i>Necomys lasiurus</i>	Fêmea	44g	22/11/2019	T2P15	Chuvosa
JC99	Jacques Cousteau	<i>Necomys lasiurus</i>	Macho	52g	22/11/2019	T2P12	Chuvosa
JC100	Jacques Cousteau	<i>Cerradomys sp.</i>	Macho	28g	22/11/2019	T2P4	Chuvosa
JC101	Jacques Cousteau	<i>Cerradomys sp.</i>	Fêmea	76g	22/11/2019	T2P1	Chuvosa
JC102	Jacques Cousteau	<i>Necomys lasiurus</i>	Fêmea	26g	22/11/2019	T2P1	Chuvosa
JC103	Jacques Cousteau	<i>Necomys lasiurus</i>	Macho	65g	23/11/2019	T2P15	Chuvosa

JC104	Jacques Cousteau	<i>Cerradomys</i> sp.	Fêmea	62g	01/02/2019	T2P10	Chuvosa
JC105	Jacques Cousteau	<i>Rattus rattus</i>	Fêmea	159g	31/01/2019	T1P5	Chuvosa
JC106	Jacques Cousteau	<i>Cerradomys</i> sp.	Macho	86g	02/01/2019	T2P10	Chuvosa
JC107	Jacques Cousteau	<i>Rattus rattus</i>	Fêmea	80g	26/03/2019	T1P6	Chuvosa
JC108	Jacques Cousteau	<i>Cerradomys</i> sp.	Macho	80g	26/03/2019	T2P3	Chuvosa
JC110	Jacques Cousteau	<i>Cerradomys</i> sp.	Macho	90g	26/03/2019	T2P15	Chuvosa
JC111	Jacques Cousteau	<i>Rattus rattus</i>	Fêmea	60g	27/03/2019	T1P10	Chuvosa
JC113	Jacques Cousteau	<i>Rattus rattus</i>	Fêmea	70g	27/03/2019	T1P12	Chuvosa
JC114	Jacques Cousteau	<i>Rattus rattus</i>	Macho	150g	27/03/2019	T1P8	Chuvosa
JC115	Jacques Cousteau	<i>Rattus rattus</i>	Fêmea	175g	27/03/2019	T1P12	Chuvosa
JC116	Jacques Cousteau	<i>Rattus rattus</i>	Fêmea	100g	27/03/2019	T1P3	Chuvosa
JC117	Jacques Cousteau	<i>Rattus rattus</i>	Macho	190g	26/03/2019	T1P9	Chuvosa
JC118	Jacques Cousteau	<i>Rattus rattus</i>	Fêmea	150g	28/03/2019	T1P12	Chuvosa
JC119	Jacques Cousteau	<i>Cerradomys</i> sp.	Macho	70g	28/03/2019	T2P8	Chuvosa
JC120	Jacques Cousteau	<i>Rattus rattus</i>	Fêmea	100g	29/03/2019	T1P5	Chuvosa
TOTAL: 128							

ANEXO B - ARTIGOS CIÊNTÍFICOS PUBLICADOS

RESEARCH LETTERS

SARS-CoV-2 Spillback to Wild Coatis in Sylvatic–Urban Hotspot, Brazil

Ana Gabriella Stoffella-Dutra, Bruna Hermine de Campos, Pedro Henrique Bastos e Silva, Karolina Lopes Dias, Iago José da Silva Domingos, Nadja Simbera Hemetrio, Joilson Xavier, Felipe Iani, Vagner Fonseca, Marta Giovanetti, Leonardo Camilo de Oliveira, Mauro Martins Teixeira, Zelia Ines Portela Lobato, Helena Lage Ferreira, Clarice Weis Arns, Edison Durigon, Betânia Paiva Drumond, Luiz Carlos Junior Alcantara Marcelo Pires Nogueira de Carvalho, Giliane de Souza Trindade

Author affiliations: Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil (A.G. Stoffella-Dutra, B.H. de Campos, P.H.B. e Silva, K.L. Dias, I.J.S. Domingos, J. Xavier, L.C. de Oliveira, M.M. Teixeira, Z.I.P. Lobato, B.P. Drumond, M.P.N. de Carvalho, G. de Souza Trindade); Fundação de Parques Municipais e Zootônica de Belo Horizonte, Belo Horizonte (N.S. Hemetrio); Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte (F. Iani); Organização Pan-Americana da Saúde, Brasília, Brazil (V. Fonseca); University of Campus Bio-Medico di Roma, Rome, Italy (M. Giovanetti); Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil (M. Giovanetti, L.C.J. Alcantara); Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil (H.L. Ferreira, E. Durigon); Universidade de Campinas, Campinas, Brazil (C.W. Arns)

DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2903.221339>

We tested coatis (*Nasua nasua*) living in an urban park near a densely populated area of Brazil and found natural SARS-CoV-2 Zeta variant infections by using quantitative reverse transcription PCR, genomic sequencing, and serologic surveillance. We recommend a One Health strategy to improve surveillance of and response to COVID-19.

By November 2022, the COVID-19 pandemic had resulted in >630 million cases of disease worldwide (1). During the outbreak, natural occurrence of SARS-CoV-2 infections in animals was a hallmark; infections have been reported mainly in companion, domestic, captive, and farmed animals but also in wildlife (2,3). As of September 2022, the World Organisation for Animal Health had recorded 26 animal species infected with SARS-CoV-2 in 36 countries (2), indicating that the virus is able to cross the species barrier, thereby increasing risk of new transmission cycles and animal reservoirs (2,3).

Coatis (*Nasua nasua*) from South America are small diurnal mammals (family Procyonidae) that are omnivorous, terrestrial, synanthropic, and opportunistic. Coatis interact easily with humans and are often seen foraging for human food, especially from trash (4,5). We investigated the transmission of SARS-CoV-2 to a coati population living in an urban park near a large anthropized area of Brazil.

We collected serum and anal and oral swab samples during February–August 2021 from 40 free-living coatis inhabiting Mangabeiras Municipal Park in Belo Horizonte, Brazil (Appendix Table, Figure 1, <https://wwwnc.cdc.gov/EID/article/29/3/22-1339-App1.pdf>). Trained professionals captured coatis during 4 periods (February, June, July, and August), using appropriate personal protective equipment (laboratory coats, gloves, N95 face masks, and face shields) in accordance with all biosafety guidelines. Ethics approval was obtained for this study (Appendix).

Coatis were captured in Tomahawk Live Traps (<https://www.livetrapp.com/index.php>) (70 cm × 35 cm × 40 cm) baited with banana pieces. Animals were anesthetized with Zoletil 100 (Virbac, <https://vet-uk.virbac.com>) by intramuscular injection (7–10 mg/kg body weight), clinically evaluated, identified, and marked with polypropylene earrings and microchips. After anesthesia recovery, each coati was released at their capture site.

We stored anal and oral swab specimens by using RNAlater (ThermoFisher Scientific, <https://www.thermofisher.com>) and extracted RNA by using QIAmp Viral RNA Mini Kits (QIAGEN, <https://www.qiagen.com>). We performed quantitative reverse transcription PCR targeting the nucleocapsid N1 and N2 regions (6) and sequenced PCR positive samples by using nanopore technology. We performed phylogenetic analysis by using IQ-TREE2 (7) and maximum-likelihood reconstruction.

We detected SARS-CoV-2 RNA in 2 (5%) female coatis that had no clinical signs of infection (Table). We obtained a complete genomic sequence from the anal swab specimen from coati 535 (99% average coverage). The genomic sequence of SARS-CoV-2 obtained from the anal swab specimen from coati 535 indicated this variant belonged to the Zeta lineage (B.1.1.28.2, P.2) (Figure). The P.2 variant was initially detected in the state of Rio de Janeiro, Brazil, in July 2020 and was considered a variant of interest (9).

We performed plaque reduction neutralization tests (PRNT) on serum samples from all captured coatis to detect SARS-CoV-2 neutralizing antibodies (8). We serially diluted serum samples to obtain 1:20,

RESEARCH LETTERS

Table. Specimens from 2 SARS-CoV-2 RNA–positive coatis in study of SARS-CoV-2 spillback to wild coatis in sylvatic–urban hotspot, Brazil*

Coati ID	Collection date	Sex	Sample	SARS-CoV-2†	N1 Count‡	N2 Count‡
C341	2021 Feb 17	F	Oral swab	Positive	33	37
			Anal swab	Negative	NA	NA
			Serum	Negative	NA	NA
C535	2021 Feb 18	F	Oral swab	Positive	20	24
			Anal swab	Positive	30	33
			Serum	Negative	NA	NA

*Oral and anal swab and serum samples were collected from 40 wild coatis inhabiting Mangabeiras Municipal Park in Belo Horizonte, Brazil. We performed quantitative reverse transcription PCR targeting the nucleocapsid N1 and N2 regions of SARS-CoV-2 RNA for each sample. ID, identification, NA, not applicable.

†Specimens positive or negative for SARS-CoV-2 RNA by PCR.

‡PCR cycle threshold count.

1:40, and 1:80 dilutions and measured 50% and 90% neutralizing activity against SARS-CoV-2. Twenty (50%) coatis had SARS-CoV-2 neutralizing antibodies in ≥ 1 dilution at the 50% level; at the 90% level, 13 (32.5%) coatis had detectable neutralizing antibodies in ≥ 1 dilutions and 7 (17.5%) coatis had SARS-CoV-2 neutralizing antibodies in all 3 dilutions. We observed neutralizing antibodies in all 3 serum dilutions for coati 535 (Appendix Figure 2).

We were unable to confirm the mode of SARS-CoV-2 transmission to the coati population. However, we found evidence for human-to-animal transmission; the P.2 genomic sequence from coati 535 was the same variant circulating in humans within the area during the study period. Furthermore, 50% of the coati population had antibodies against SARS-CoV-2, suggesting a cluster of natural exposure and infections within this population. Our results support indirect

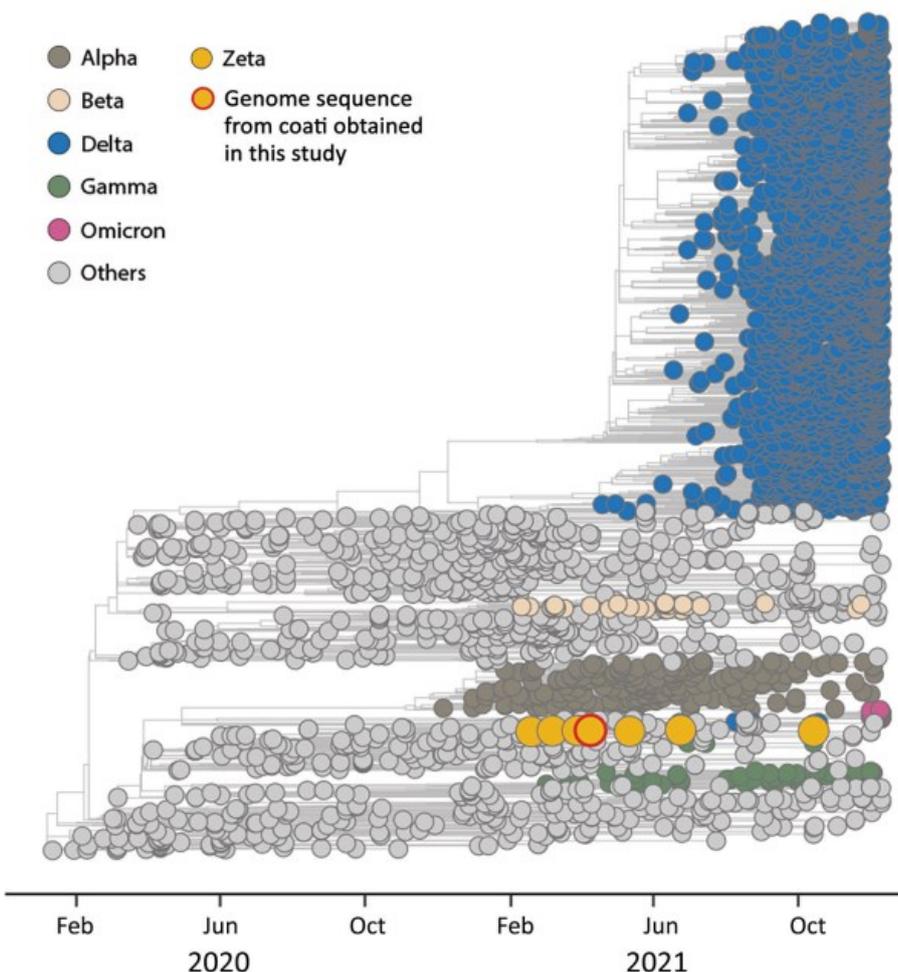


Figure. Time-scaled phylogenetic analysis of SARS-CoV-2 sequences, by variant type, in study of SARS-CoV-2 spillback to wild coatis in sylvatic–urban hotspot, Brazil. Maximum-likelihood method was used to compare the complete genomic sequence of SARS-CoV-2 obtained from coati (*Nasua nasua*) 535 (red-outlined yellow circle) and 3,441 SARS-CoV-2 reference genomic sequences (GISAID, <https://www.gisaid.org>) from around the world collected through October 2021. Colors represent clades corresponding to different SARS-CoV-2 variants of concern described by the World Health Organization; yellow indicates Zeta variant sequences. The SARS-CoV-2 sequence generated in this study was deposited in the GISAID database (accession no. EPI_ISL_8800460) and SisGen (Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético, <https://www.sisgen.gov.br>; no. A627307).

RESEARCH LETTERS

contact of coatis with contaminated human trash and food scraps in dumpsters and in the bordering urban areas of the park or potential direct close contact with infected human visitors (Appendix Figure 1).

Our findings agree with results from a zoo in Illinois, USA, that also confirmed SARS-CoV-2 in a coati by using molecular methods (2,10). Those results reinforce the susceptibility of coatis to SARS-CoV-2 infection and suggest possible virus shedding and transmission capacity of coatis. Viral RNA detection in both oral and anal swab specimens from coati 535 (Table) and presence of neutralizing antibodies indicate viral replication occurred in this host. Therefore, our findings highlight possible SARS-CoV-2 enzootic maintenance in nature, including in fragmented green areas close to urban settings. Because of the potential for SARS-CoV-2 interspecies transmission, we recommend establishing a One Health strategy to improve surveillance and ability to respond to COVID-19 emergency health events.

Acknowledgments

We thank colleagues from the Laboratório de Vírus Instituto de Ciências Biológicas for their excellent technical support; Andrea Garcia de Oliveira, Marcelo Camargos, Kelly Nascimento, and Laboratório Federal de Defesa Agropecuária, Ministry of Agriculture Livestock and Food Supply (MAPA), for supporting our activities in the Biosafety Level Office International des Epizooties laboratory; Fundação de Parques Municipais e Zootônica of Belo Horizonte and Sérgio Augusto Domingues for allowing the field work; Augusto Gomes for coati photographs; Brazilian Post and Telegraph Company (Correios) for transporting our samples; and Jônatas Abrahão for excellent scientific discussions.

This study was funded by National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) (grant nos. 440593/2016-6 and 403761/2020-4); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), process no. 88882.348380/2010-1; DECIT (Departamento de Ciência e Tecnologia)/MS (Brazilian Ministry of Health) no. 14/2016, Prevenção e Combate ao vírus Zika, FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais); PRPq-UFMG (Pró Reitoria de Pesquisa) and Finep/RTR/PRPq/Rede (Financiadora de Estudos e Projetos) COVID-19 (no. 0494/20-0120002600). This work was partially funded by the Ministry of Science, Technology, and Innovation (MCTI-Brazil); US National Institutes of Health (grant no. U01 AI151698) for the United World Antiviral Research Network; CRP- ICGB RESEARCH GRANT 2020 (project no. CRP/BRA20-03,

contract no. CRP/20/03); Oswaldo Cruz Foundation (no. VPGDI-027-FIO-20-2-2-30); and Brazilian Ministry of Health (no. SCON2021-00180). L.C.D.O. and M.M.T. were supported by a grant from MCTI/CNPQ/CAPES and FAPEMIG (project no. 465425/2014-3, Dengue and host-microbial interactions), M.G. and L.C.J.A. were supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), and M.G. was funded by PON “Ricerca e Innovazione” 2014–2020. Findings reported herein are the sole deduction, view, and responsibility of the researchers and do not reflect the official positions and sentiments of the funders.

G.S.T., B.P.D., M.G., M.M.T., H.L.F., C.W.A., and L.C.J.A. are CNPq researchers; M.M.T., C.W.A., and E.L.D. are members of the RedeVirus-MCTI; and H.L.F., Z.I.P.L., B.P.D., C.W.A., and E.L.D. are members of the PreVir-MCTI.

About the Author

Ms. Stoffella-Dutra is a PhD student in microbiology at the Federal University of Minas Gerais. Her primary research interests focus on virology, viral zoonoses, epidemiology, and wildlife disease ecology.

References

1. World Health Organization. WHO coronavirus (COVID-19) dashboard, 2022 [cited 2022 Nov 1]. <https://covid19.who.int>
2. World Organisation for Animal Health. SARS-CoV-2 in animals—situation report 17, 2022 [cited 2022 Nov 1]. <https://www.woah.org/app/uploads/2022/10/sars-cov-2-situation-report-17.pdf>
3. Delahay RJ, de la Fuente J, Smith GC, Sharun K, Snary EL, Flores Girón L, et al. Assessing the risks of SARS-CoV-2 in wildlife. *One Health Outlook*. 2021;3:7. <https://doi.org/10.1186/s42522-021-00039-6>
4. Rodrigues DH, Calixto E, Cesario CS, Repoles RB, de Paula Lopes W, Oliveira VS, et al. Feeding ecology of wild brown-nosed coatis and garbage exploration: a study in two ecological parks. *Animals (Basel)*. 2021;11:2412. <https://doi.org/10.3390/ani11082412>
5. Projeto Quatis. Parque das Mangabeiras [cited 2022 Jun 6]. <https://sites.google.com/site/projetoquatis/parque-das-mangabeiras>
6. Centers for Disease Control and Prevention. CDC 2019-novel coronavirus (2019-nCoV) real-time RT-PCR diagnostic panel [cited 2022 Jun 8]. <https://www.fda.gov/media/134922/download>
7. Minh BQ, Schmidt HA, Chernomor O, Schrempf D, Woodhams MD, von Haeseler A, et al. IQ-TREE 2: new models and efficient methods for phylogenetic inference in the genomic era. *Mol Biol Evol*. 2020;37:1530–4. <https://doi.org/10.1093/molbev/msaa015>
8. Chaves DG, de Oliveira LC, da Silva Malta MCF, de Oliveira IR, Barbosa-Stancioli EF, Teixeira MM, et al. Pro-inflammatory immune profile mediated by TNF and IFN- γ and regulated by IL-10 is associated to IgG anti-SARS-CoV-2 in asymptomatic blood donors. *Cytokine*. 2022;154:155874. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2022.155874>
9. Voloch CM, da Silva Francisco R Jr, de Almeida LGP,

Cardoso CC, Brustolini OJ, Gerber AL, et al.; Covid19-UFRJ Workgroup, LNCC Workgroup, Adriana Cony Cavalcanti. Genomic characterization of a novel SARS-CoV-2 lineage from Rio de Janeiro, Brazil. *J Virol*. 2021;95:e00119-21. <https://doi.org/10.1128/JVI.00119-21>

10. US Department of Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Service. Confirmation of COVID-19 in a coatimundi at an Illinois zoo, 2021 [cited 2022 Jun 6]. https://www.aphis.usda.gov/aphis/newsroom/stakeholder-info/sa_by_date/sa-2021/sa-10/covid-coatimundi

Address for correspondence: Giliane de Souza Trindade, Universidade Federal de Minas Gerais, Av Antônio Carlos, 6627, Campus Pampulha, Belo Horizonte, 31270-901, Minas Gerais, Brazil; email: giliane@icb.ufmg.br

***Babesia microti* Causing Intravascular Hemolysis in Immunocompetent Child, China**

Jiafeng Yao,¹ Guoging Liu,¹ Yang Zou, Jin Jiang, Shaogang Li, Heng Wang, Xiaoling Cheng, Rui Zhang, Kaige Zhang, Chunyang Wei, Runhui Wu

Author affiliations: Beijing Children's Hospital, Beijing, China (J. Yao, G. Liu, J. Jiang, X. Cheng, R. Zhang, K. Zhang, R. Wu); Capital Medical University, Beijing (Y. Zou, S. Li); Peking Union Medical College School of Medicine, Beijing (H. Wang, C. Wei)

DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2903.220888>

We report a case of *Babesia microti* infection in an immunocompetent child <5 years of age that caused fever and severe intravascular hemolysis. Physicians in China should be aware of babesiosis, especially in the differential diagnosis of immune hemolytic anemia with negative results for antiglobulin tests.

Babesiosis, caused by tickborne zoonotic protozoa of the genus *Babesia*, is an emerging health risk to humans. Among the known *Babesia* species infecting humans, *B. microti* is the most common cause of

human babesiosis (1). In China, *B. microti* has caused >100 human cases of babesiosis (2), but nearly all have been reported in adults, particularly the elderly.

B. microti babesiosis has rarely been reported in immunocompetent children in China. We reported a case of severe intravascular hemolysis caused by *B. microti* infection in an immunocompetent preschooler from Shandong Province, China.

The patient, girl 4 years and 9 months of age, had fever develop (highest temperature 39°C) on September 30, 2021. Antimicrobial drug treatment was not effective. Four days later, her urine became dark, and she had abdominal pain. On October 9, 2021, she was admitted to the hospital because of severe anemia and abnormal laboratory test results (Table). She had shock after a discharge of dark brown urine.

To stabilize her vital signs, we began repeated blood transfusion for supportive treatment. Azithromycin and immune regulatory treatment (high-dose methylprednisolone, 10 mg/kg/d for 3 days, and intravenous immunoglobulin, 1 g/kg/d for 2 d) were not effective. Her symptoms worsened, and her hemoglobin level remained at <60 g/L (Appendix Figure, panel A, <https://wwwnc.cdc.gov/EID/article/29/2/22-0888-App1.pdf>). On the basis of those findings, we excluded congenital hemolytic anemia and autoimmune hemolytic anemia.

We examined her blood smear and observed parasites in the erythrocytes (Appendix Figure, panel B). We used a genus-specific 18S rRNA PCR described previously (3) to confirm *Babesia* infection by amplification of a 515-bp fragment (Appendix Figure, panel C). Test results for malaria infection was negative. Subsequent sequencing of the fragment and BLAST analysis (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) of the nucleotide sequence showed 100% similarity with *B. microti* RI strain. Those results confirmed the diagnosis as a *B. microti* infection causing severe intravascular hemolytic anemia.

The girl's parents recalled that the child had been in a wild chestnut forest in a suburb of Zaozhuang City, Shandong Province, on September 14, 2021. They found ≈20 red papules and an itching sensation on the trunk and limbs. The papules subsided within 3 days. There were no other complications of babesiosis, such as splenic infarction, acute respiratory distress syndrome, or disseminated intravascular coagulation.

The child was given atovaquone and azithromycin (4) for 21 days, and the urine color became clear within 24 hours. The frequency of erythrocyte transfusion was reduced gradually, and the hemolysis was controlled (Appendix Figure, panel A). On the 10th day after the treatment began, molecular detection

¹These authors contributed equally to this article.

Article DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2903.221339>

EID cannot ensure accessibility for supplementary materials supplied by authors. Readers who have difficulty accessing supplementary content should contact the authors for assistance.

SARS-CoV-2 Spillback to Wild Coatis in Sylvatic–Urban Hotspot, Brazil

Appendix

Ethics Approval

The study was approved by SISBIO (Sistema de Autorização e informação em Biodiversidade, license no. 75831), Ethical Committee on Animal Use (CEUA) of Universidade Federal de Minas Gerais (protocol nos. 158/2020 and 100/2021), SisGen (Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético, no. A627307), and Fundação de Parques Municipais e Zoológica de Belo Horizonte (protocol no. FU 004–2020).

Appendix Table. Numbers of captured coatis categorized by collection date, sex, and age in study of SARS-CoV-2 spillback to wild coatis in sylvatic–urban hotspot, Brazil*

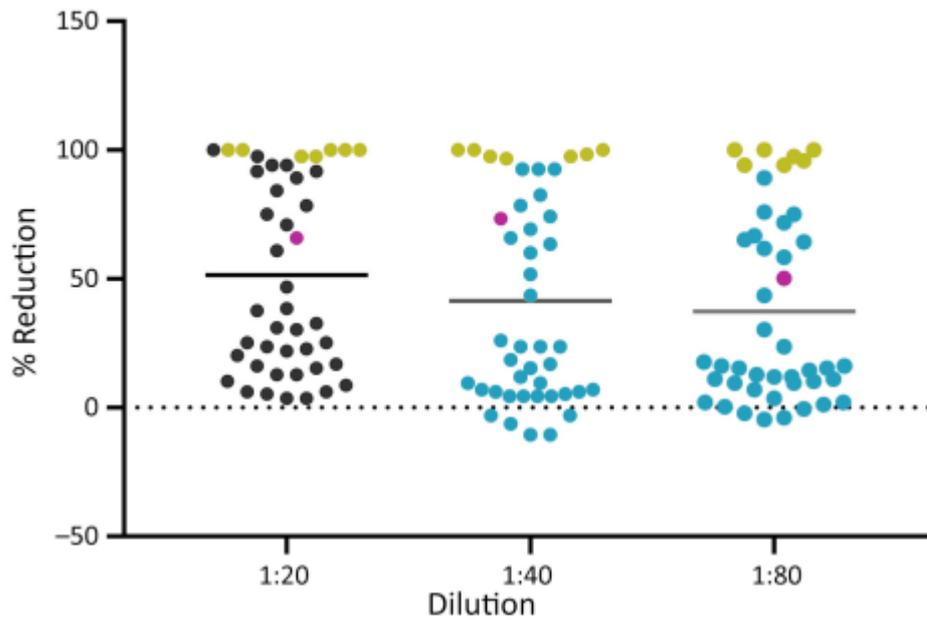
Capture month	Sex		Young	Age†		Total
	M	F		Immature adult	Adult	
February	3	5	3	3	2	8
June	4	6	3	3	4	10
July	6	9	3	1	11	15
August	4	7	1	2	8	11
Total no. animals	17	27	10	9	25	44

*Collection comprised 40 coatis (*Nasua nasua*) (62.5% female and 37.5% male) and 4 additional recaptures. Live traps (n = 25) were placed at 5 strategic points of passage for coatis (5 traps set per point) in Mangabeiras Municipal Park in Belo Horizonte, Brazil. The 5 capture points were: Caraça (n = 19 captured coatis), Casa de bonecas (n = 6), Mirante (n = 3), Praça das águas (n = 6), and Trilha 12 (n = 10).

†Biometric analyses were performed to estimate age.



Appendix Figure 1. Overview of Mangabeiras Park in southeastern Brazil in study of SARS-CoV-2 spillback to wild coatis in sylvatic–urban hotspot, Brazil. A) Map of Brazil subdivided by its biomes and neighboring countries of South America, and municipal parks (dark green). Mangabeiras Municipal Park ($19^{\circ}56' S$ and $43^{\circ}54' W$) is surrounded by a red line. B) A satellite view of Mangabeiras Municipal Park (encircled by red line) in the city of Belo Horizonte highlighting the water courses (blue lines) and 341 coati displacements by georeferenced spots (global positioning system) (yellow circles) during February and March of 2021. Animal monitoring showed displacement throughout the park border areas that had residences and urban settings. C, D) Coatis in Mangabeiras Park in contact with human trash and food remnants. Photographer: Augusto Gomes. Maps were created with QGIS 3.24.3 software (https://www.qgis.org/pt_BR/site), using the coordinate reference system DATUM SIRGAS 2000 (UTM 23S).



Appendix Figure 2. Scatter plot of plaque reduction neutralization tests of serum samples from coatis. SARS-CoV-2 neutralizing antibodies were measured in serum samples by using the plaque reduction neutralization test. Samples were serially diluted to 1:20, 1:40, and 1:80. Solid lines represent the average reduction percentage of all tested samples and dotted line is 0% reduction. Solid circles represent all samples tested at each dilution ($n = 44$) (4 additional samples were from recaptures; 3 of those showed seroconversion when compared with the previous collection date). Magenta circles represent coati 535, which was positive for SARS-CoV-2 RNA by PCR. Green circles represent 7 coatis that had 90% plaque reduction (neutralizing activity) in all 3 dilutions.



Review

Re-Emergence of Yellow Fever in Brazil during 2016–2019: Challenges, Lessons Learned, and Perspectives

Poliana de Oliveira Figueiredo ^{1,†}, Ana Gabriella Stoffella-Dutra ^{1,*},
Galileu Barbosa Costa ^{2,*}, Jaqueline Silva de Oliveira ¹, Carolina Dourado Amaral ¹,
Juliana Duarte Santos ³, Kamila Lorene Soares Rocha ³, João Pessoa Araújo Júnior ⁴,
Maurício Lacerda Nogueira ⁵, Magno Augusto Zazá Borges ⁶, Adriano Pereira Paglia ⁷,
Angelle Desiree LaBeaud ⁸, Jônatas Santos Abrahão ¹, Erna Geessien Kroon ¹,
Danilo Bretas de Oliveira ³, Betânia Paiva Drumond ¹ and Giliane de Souza Trindade ^{1,*}

¹ Laboratório de Vírus, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais 31270-901, Brazil; polianaofigueiredo@yahoo.com.br (P.d.O.F.); jaquelinebmedica@hotmail.com (J.S.d.O.); carolinadamaral@gmail.com (C.D.A.); jonatas.abrahao@gmail.com (J.S.A.); ernagkroon@gmail.com (E.G.K.); betaniadrmond@gmail.com (B.P.D.)

² Laboratório de Patologia e Biologia Molecular, Instituto Gonçalo Moniz, Oswaldo Cruz Foundation, Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal, Salvador Bahia 40296-710, Brazil

³ Centro Integrado de Pesquisa em Saúde, Faculdade de Medicina, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri Campus JK, Diamantina, Minas Gerais, Rodovia MGT 367, Km 583, nº 5.000 Alto da Jacuba 39100-000, Brazil; julianeduartesantos@gmail.com (J.D.S.); kamilalsr@yahoo.com.br (K.L.S.R.); danilo.bretas@ufvjm.edu.br (D.B.d.O.)

⁴ Departamento de Microbiologia e Imunologia, Institute of Biotechnology, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro, São Paulo Avenida 24A, 1515, Bela Vista 13506-900, Brazil; joao.pessoa@unesp.br

⁵ Laboratório de Pesquisas em Virologia, Departamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, São Paulo 15090-000, Brazil; mnogueira@famerp.br
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual de Montes Claros, Montes Claros, Minas Gerais, Avenida Prof. Rui Braga, s/n, Vila Mauriceia 39408-354, Brazil; magno.borges@unimontes.br

⁷ Laboratório de Ecologia e Conservação, Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais 31270-901, Brazil; apaglia@icb.ufmg.br

⁸ Department of Pediatrics, Division of Infectious Diseases, Stanford University School of Medicine, 300 Pasteur Dr Rm G312 MC 5208, Stanford, CA 94305, USA; dlabeaud@stanford.edu

* Correspondence: anagstoffella@gmail.com (A.G.S.-D.); galileuk1@gmail.com (G.B.C.); gittrindade@yahoo.com.br (G.d.S.T.); Tel.: +55-31-3409-2747 (G.d.S.T.) † These authors contributed equally to this work.



Received: 16 September 2020; Accepted: 23 October 2020; Published: 30 October 2020

Abstract: Yellow fever (YF) is a re-emerging viral zoonosis caused by the *Yellow Fever virus* (YFV), affecting humans and non-human primates (NHP). YF is endemic in South America and Africa, being considered a burden for public health worldwide despite the availability of an effective vaccine. Acute infectious disease can progress to severe hemorrhagic conditions and has high rates of morbidity and mortality in endemic countries. In 2016, Brazil started experiencing one of the most significant YF epidemics in its history, with lots of deaths being reported in regions that were previously considered free of the disease. Here, we reviewed the historical aspects of YF in Brazil, the epidemiology of the disease, the challenges that remain in Brazil's public health context, the main lessons learned from the recent outbreaks, and our perspective for facing future YF epidemics.

Keywords: yellow fever; epidemic; epidemiology; ecology; public health; Brazil

1. Introduction

Yellow fever virus (YFV) is a positive-strand RNA virus that is the prototype of *Flavivirus* genus (*Flaviviridae* family) and is recognized as the etiological agent of Yellow Fever (YF) [1,2]. YF disease is characterized by an acute, febrile, hemorrhagic infectious disease, transmitted by mosquito vectors to human populations and non-human primates (NHP) in South America and Africa [2,3]. In Brazil, YF is considered a disease of compulsory notification, where all suspected cases must be immediately reported to the health authorities [2,4].

YF was responsible for hundreds of thousands of deaths between the 18th century and the beginning of the 20th century, and for recurrent epidemics in endemic regions of Africa and South America [2,5]. YF still remains a public health threat, leading to significant morbidity and mortality rates in the human populations of Africa and South America. A high case fatality rate (CFR) is observed, especially in South America, ranging from 40% to 60% [3,5,6]. The occurrence of rural (savannah cycles) and urban cycles is frequently reported in the old world, in addition to sylvatic cycles [7]. Large YF outbreaks occurred in Angola and the Democratic Republic of Congo during 2015–2016 [5,8], which placed YFV on the top list of arboviral threats by the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) Global Disease Detection Operations Center [9]. According to the Pan American Health Organization (PAHO), the South American countries that reported the highest numbers of cases of YF during 1960–2019 were Brazil (3829 cases), Peru (3189 cases), Bolivia (1546 cases) and Colombia (701 cases) [10].

In Brazil, YFV is maintained in nature through enzootic/sylvatic cycles involving non-human primates (NHP) and mosquitoes of the genera *Haemagogus* and *Sabethes* [2,11]. YF has a seasonal pattern of occurrence, with most cases recorded from December to May. However, the occurrence of outbreaks is irregular, and viral transmission can change according to factors such as temperature, rainfall, high density of vectors, amplifying hosts, and low vaccination coverage of the human population [2]. Some factors have contributed to the elimination of the YF urban cycle, transmitted by urban vector *Aedes aegypti*, which include the introduction of vaccination since 1937, the mass immunization in the following decade, along with intense campaigns to eradicate the vector [2]. In this scenario, the last registered urban YF case in the country occurred in 1942, followed by epidemic records related to sylvatic cycles, especially in the Amazon basin [2,11].

However, in 2016, one of the most significant epidemics of sylvatic YF occurred in Brazil, with most cases reported in regions considered free of the disease, or with little YFV circulation [5,11,12]. The YF cases exponentially increased during the 2016–2019 epidemic, highlighting concerns about the risks of YF reurbanization once the YFV outbreak reached the southeast region, the most populous region in the country [5,11]. The risk of reurbanization is sustained by vector plasticity in the Brazilian territory and by large susceptible populations that had no routine vaccination until the recent re-emergence [11,13–15].

In this review, we revisited the history of YF in Brazil and the substantial impact for public health since its introduction during the colonization period until the emergence observed in the 2016–2019 epidemic. Eco-epidemiological aspects of the disease, as well as the lessons and challenges from last epidemic period, are also discussed.

2. A Brief History of Yellow Fever in Brazil

The YFV and its urban vector *Aedes aegypti* arrived in the Americas, including Brazil, through the slave-trading ships from West Africa during the period of colonization [5,8,16,17]. The first YF epidemic in Brazil was recorded in 1685, in the Northeast region, specifically in Recife and Pernambuco states [16,18] (Figure 1).

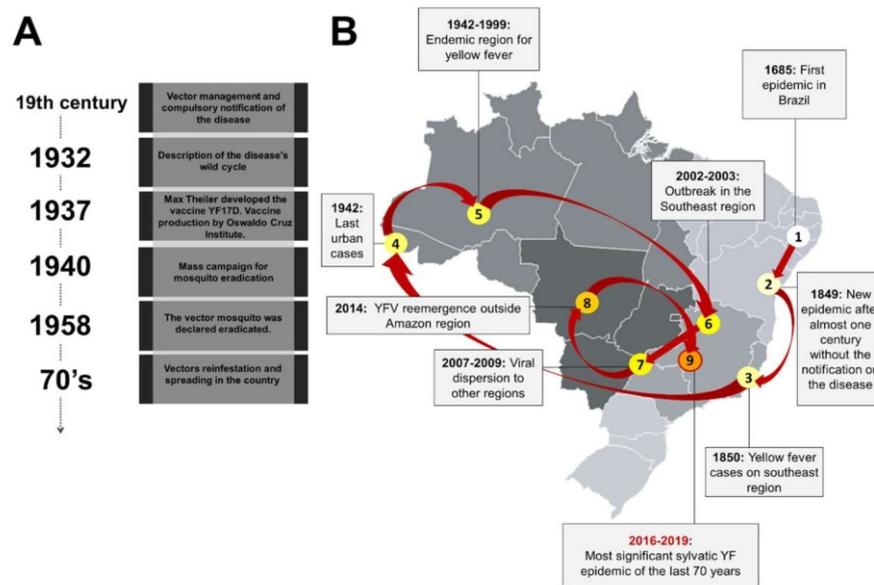


Figure 1. Map of the natural history of Yellow Fever in Brazil. **(A)** The timeline highlights sanitary measures adopted to fight against Yellow Fever in Brazil. **(B)** A map of Brazil showing the detection and distribution of *Yellow Fever virus* (YFV). The red lines connect the events of viral emergence in different regions of the country. The grey scale indicates the regions of Brazil from the lightest to the darkest as follows South, Northeast, Southeast, North, and Midwest.

In the subsequent years, YFV would hit other port cities in the Northeastern region, causing outbreaks. In the middle of 1850, after almost a century without notifications, YFV reached Rio de Janeiro (Southeastern region), causing more than 4000 deaths. Although the etiology of YF was still unknown and there was no proof of any transmission form, at the beginning of the 19th century several surveillance measures were adopted to fight against YF, including the mandatory notification of the disease and the hygienic and sanitary measures that indirectly contributed to the reduction in *Aedes* populations [16,19] (Figure 1). At the end of the 19th century, Carlos Finlay, a Cuban epidemiologist, proposed that YF was transmitted through mosquito bites [20–22]. However, it was not until 1900 that Walter Reed, a pathologist and bacteriologist, and his colleagues proved that YF was caused by a filterable agent and transmitted by the vector *Aedes aegypti* [23–26].

In the following years, because of a decrease in YF cases, the resources to fight against the disease were decreased, contributing to an urban YF epidemic in Rio de Janeiro in 1928–1929 [19]. In addition, in the 1930s, the sylvatic cycle was documented in the country [23–25] together with the discovery of the importance of NHP in the viral maintenance cycle [27].

Max Theiler, a South African doctor, developed a mouse model of YF infection to demonstrate the potential of protection of serum antibodies against YFV. In the subsequent years, other research groups investigated the possibility of attenuating a wild type YFV, aiming to induce protective immunity in humans without causing any disease. As a result, the used wild type YFV was attenuated due to the development of an immunogenic and safe Yellow Fever-17D (YF-17D) vaccine strain [28]. In 1937, the vaccine against YF was produced by the Oswaldo Cruz Institute, today called Bio Manguinhos/Fiocruz [16–19,25,29]. In addition, by 1940 mass campaigns to eradicate the urban vector *Aedes aegypti* had begun; however, sporadic cases still occurred in several states, with the last urban case reported in Acre in 1942 [16,25]. In 1958, the PAHO officially declared that *A. aegypti* was eradicated in Brazil [16]; nevertheless, in the 1970s, the collapse of the continental program to combat vector mosquitoes led by PAHO culminated with the urban reinfestation of *A. aegypti*, and its spread to several Brazilian regions by the end of this decade [30–33].

The last two decades have witnessed the expansion of YFV circulation area in the country, where human cases and NHP epizootics were registered beyond the endemic Amazon region [34]. YFV spread to the East and

South regions could be seen during 2002–2003, with cases registered in Minas Gerais and Rio Grande do Sul, and between 2007 and 2009, with confirmed cases in the North and Midwest regions, in addition to São Paulo, Paraná, and Rio Grande do Sul states [34–36]. The change in the spatial distribution of YF cases was even more evident during 2007–2009, with the confirmation of more than 100 YF cases in the South and Southeast regions, with a lethality rate of 51% [32,34,35] (Figure 1).

In 2014, YFV re-emerged in the Midwest region, in areas of Cerrado biome [11,34,37]. In the monitoring period of 2014–2015, based on the seasonality pattern, the occurrence of cases was mainly concentrated in Goiás and Mato Grosso do Sul states, and during 2015–2016 the cases were mostly concentrated in the Midwest region [12,37]. In a historical analysis, from 1980 to 2015, the period that precedes the most recent sylvatic epidemics, 789 YF human cases were registered in Brazil. In this 36-year interval, the outbreaks had an irregular pattern of annual incidence, with some periods of viral re-emergence [37]. At the end of 2016, the most significant sylvatic YF epidemic of the last 70 years began, affecting mainly the Southeastern region of Brazil [11,12,34,38].

3. Challenges and Lessons Learned

The extensive re-emergence of YF in Brazil started in late 2016, and, according to data from the Ministry of Health, 2237 human cases of YF and 759 deaths were recorded between December 2016 and June 2019 [12,39] (Figure 2).

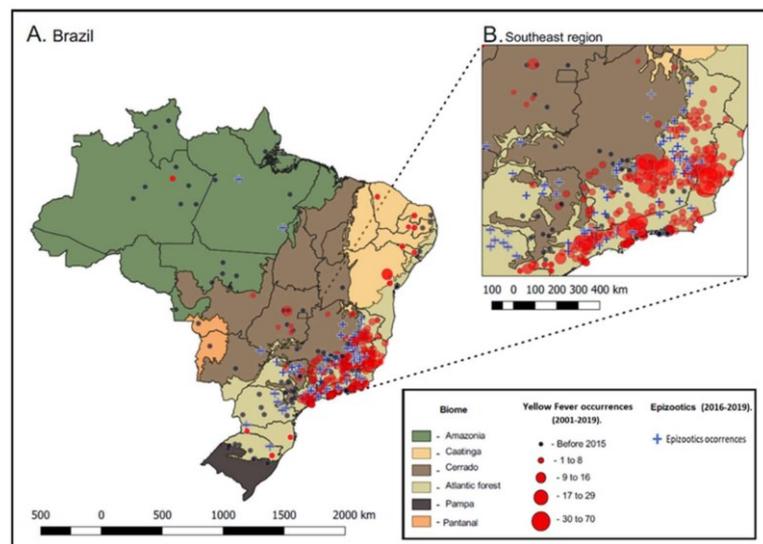


Figure 2. Spatial distribution of Yellow Fever (YF) cases in Brazil during 2001–2019. The map shows a correlation between human confirmed cases of YF and biomes (A), and confirmed epizootics in the Southeast region (B) during the 2016–2019 outbreak. The map was created using the Quantum GIS (QGIS) software.

The epicenter of epidemic was the Southeastern region of Brazil, specifically Minas Gerais and São Paulo states [11,12,40–42]. This outbreak was 2.8 times greater than what was recorded in the past 36 years [12,38]. In contrast to previous outbreaks concentrated in the Amazon and Central West regions, this outbreak was centered in the Southeastern region of Brazil, covering the Cerrado biome towards the region originally covered by the Atlantic Forest [11].

The recent re-emergence of YFV showed that the majority of the population affected by YF (82.8% during 2017–2018) were male. This population is in an economically active age range [12] and is composed of residents of rural areas, probably due to work activities and proximity to forest sites, factors that contribute to the exposure of these individuals to YFV vectors [3,40,41]. Considering the data from Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), an increase in the number of YF cases affecting male individuals has been observed since 2001 (Figure 3). The higher prevalence in males brings economic losses to their families and the region, as men are more likely to perform most of the activities in the field. Moreover, it is important to highlight

that deforestation is a factor that can increase the risk of YFV spread to urban environments, raising opportunities for human exposure to fragmented forest areas with the occurrence of YFV sylvatic cycles [11,43].

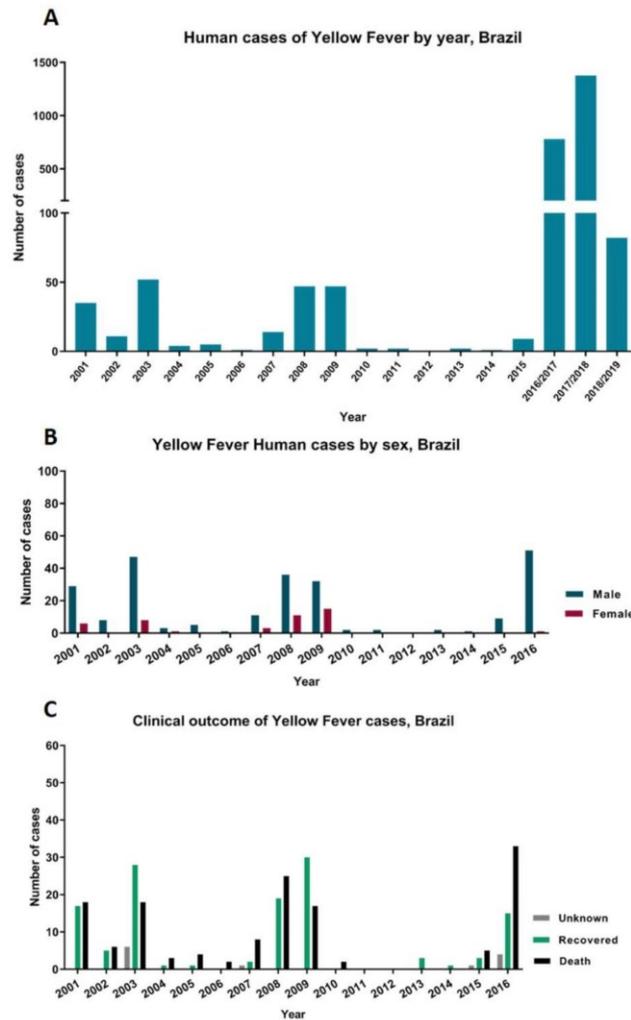


Figure 3. Distribution of human cases of YF in Brazil. **(A)** Distribution of confirmed human cases per year in Brazil for the monitoring period of (July to June) 2001–2019. **(B)** Distribution of YF human cases according to gender in Brazil during 2001–2016. **(C)** Clinical outcome of human cases of YF in Brazil during 2001–2016. All data was obtained from Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), and epidemiological reports of the Brazilian Ministry of Health.

The 2016–2019 YF epidemic also brought additional economic impacts for health authorities and for the public health in general. It is already known that the emerging infectious diseases (EID) cause significant impacts such as high costs associated with response plans, surveillance, and preventive actions [44]. Certainly, the re-emergence of YFV in Brazil caused a great burden for the public health services, since hundreds of Intensive Care Unit (ICU) beds were needed, in addition to expenses related to the monitoring of patients in the different clinical stages of the disease, and the laboratory diagnosis of human and epizootics cases.

In this sense, one of the major challenges faced during the 2016–2019 epidemic was the establishment of standard protocols for clinical management of patients, which culminated in the implementation of the national catastrophe plan implemented by the government for the 2014 World Cup, at least by Minas Gerais state (the epicenter of outbreaks). In many hospitals, there was a change in patient management areas, an increase in the number of ICU beds and the hiring of healthcare professionals to serve the affected population. In addition, there was a need to create a transportation system for patients from rural areas to large urban centers, where reference hospitals and higher acuity care were located (Serviço de Infectologia do Hospital Eduardo de

Menezes, reference of Minas Gerais state for Yellow Fever, personal communication). This decision was taken on an urgent basis, taking into account the rapid spread of YF and the worsening of the patients' clinical conditions. In fact, YF can present a broad clinical spectrum in humans, including asymptomatic infection, mild illness and severe disease; however, much is still unknown about the pathogenesis of this disease [3,5]. Considering this last outbreak in Brazil, a great advance in the disease's understanding has been reported and new clinical findings and outcomes have been described in the literature. Recent studies have reported the occurrence of late-relapsing and persistent hepatitis after YF [45,46] and other clinical findings were the occurrence of pancreatitis and progressive severe metabolic acidosis in severe cases of YF and manifestations in the central nervous system [47,48].

Certainly, the clinical management of severe forms constituted a major challenge since YF leads to liver failure with rapid evolution, compromises other vital organs and leads to a cytokine storm that culminates in plasma leakage and shock, which implies the need for intensive supportive therapies and treatments. Regarding the clinical management of patients with severe YF, Ho and colleagues showed that some measures such as the use of anticonvulsant drugs, routine use of intravenous proton pump inhibitors, aggressive early haemodialysis and plasma exchange were beneficial during YF treatment [47]. Additionally, studies related to understanding the predictors of mortality in patients with severe forms of YF affected during previous epidemic periods have been shown to be valuable. Hence, factors such as increasing age, male gender, higher neutrophil and leukocyte count, higher aspartate transaminase (AST) and alanine aminotransferase (ALT), bilirubin, and creatinine, prolonged prothrombin time, and higher viral load are significantly used as predictors of mortality of YF disease [49].

Furthermore, the recent YF epidemic also raised possibilities for increasing the knowledge related to the clinical field and antiviral research, with recent studies showing that the repurposing of clinically approved drugs can represent a quick alternative to discover new antivirals for public health emergencies. Freitas et al. [50] demonstrated that YFV is susceptible, *in vitro* and *in vivo*, to sofosbuvir, a clinically approved drug against Hepatitis C virus (HCV). In addition, Mendes et al. [51] demonstrated a reduction in blood viremia and an improvement in clinical course with sofosbuvir treatment.

The management of vaccination in the affected population can also be considered a complex challenge in the YF epidemic scenario. In order to protect the largest possible portion of population against the disease, the Sistema Único de Saúde (SUS) distributed 45.1 million doses of the YFV vaccine in 2017 and 23.8 million doses in 2018 [52]. Currently, the North, Midwest, Southeast, and South regions of Brazil are considered areas with vaccination recommendation (ACRV), however, in the Northeast region, the vaccination has been recommended only for Bahia and Maranhão states, and in some municipalities of Piauí, Sergipe, and Alagoas states [39]. Vaccination campaigns against YF also aim to prevent expansion of viral circulation, which is also associated with the movement of people [40]. The 17DD vaccine produced by the Institute of Technology in Immunobiologicals (Bio-Manguinhos) of the Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz) leads to 98% protection [2,11].

The target public for which the vaccine is indicated are individuals from 9 months to 59 years of age who reside or travel to areas with vaccination recommendation [2,34]. In the current campaign, the vaccine is being used in a standard dose (0.5 mL), but during the YF epidemic period, the dose fractionation strategy was adopted for some states, with the fractional dose (0.1 mL) corresponding to a fifth (1/5) of a standard dose [11,34,52,53]. This type of strategy is approved during emergency situations and has already been recommended by the World Health Organization (WHO) and used in outbreaks such as during the one that occurred in 2015–2016 in the African continent [52–56]. As the viral dissemination was favored by the vaccine shortage, with insufficient doses for the entire population, the vaccine fractionation strategy was an effective tool. In addition, strategies to control the *Ae aegypti* vector, which contribute to preventing viral spread and the resurgence of YFV, have little emphasis on the continent [57]. However, after emergency situations it is necessary to re-vaccinate the population with the full dose; the long-term protection provided by fractional doses in varied populations and epidemiological contexts is unknown [58]. In this sense, the study by Costa-Rocha and colleagues which evaluated the duration of humoral and cellular immunity after administration of reduced doses of the 17DD-Yellow Fever vaccine provided evidence to support the regular use of dose sparing strategies for YF vaccine in adults [59].

Currently, the WHO recommends one life-time dose of the YF vaccine; however, this is controversial for two reasons: the level of neutralizing antibodies drops years after vaccination and cases of YF infection have occurred in previously vaccinated individuals [40,60–63]. Even though YF vaccine is highly immunogenic and able to induce a robust antibody response and a strong and polyfunctional cellular immune response, recent studies demonstrated the importance of booster doses to ensure a long-term persistence of memory components in response to 17DD YF vaccine [60–62,64]. These recent findings suggest that in YF endemic areas, at least an additional dose of the vaccine should be administered after the first immunization, in order to avoid the reduction in neutralizing antibodies titers below the protective levels [60–62]. During the recent epidemic in Brazil, the priority was to vaccinate the largest portion of the population possible; however, it is recommended that after this emergency period the population receives a full dose of 17DD vaccine, reinforcing the idea that at least two doses are necessary [58,60,62,65].

With the re-emergence of YFV significantly affecting the Southeastern region of Brazil, and the consequent concern about the beginning of an urban cycle, there was an intensification of vaccination campaigns mainly in large urban centers [34,52]. The dislocation of cases, previously restricted to rural areas, to metropolitan regions, as recorded mostly in 2018, was of great concern and alert to epidemiological surveillance systems. However, the low vaccination coverage against YF in Brazil is a problem that has persisted for decades [66]. In view of this, the current challenge is to achieve vaccination coverage of at least 95% in all Brazilian territory.

A recent study conducted by Stoffella-Dutra and colleagues revealed that, respectively, 25.8% and 26.5% of the rural and urban populations living in Serro region (state of Minas Gerais) did not present neutralizing antibodies against YFV [67]. Furthermore, 10 individuals from the same area that presented their vaccination card with proven vaccination against YFV tested negative for the presence of neutralizing antibodies. Considering the recent epidemic and the risks of YF re-urbanization, this finding raises questions about the real burden of YFV infections, in which the disease could be underestimated. Although the vaccination coverage in that region has improved [68], there are still a high number of individuals lacking any neutralizing antibodies response against YFV, which can increase the vulnerability of the populations, as well as the occurrence of new outbreaks or even epidemics [67].

Other studies performed in Brazil also highlighted the absence of neutralizing antibodies against YFV in individuals from rural and urban areas [69,70]. However, different from the results reported by Stoffella-Dutra and colleagues, few individuals tested negative. These findings draw attention to the fact that some areas in the state of Minas Gerais can present a high proportion of individuals with absence of neutralizing antibodies against YFV, which could potentially be a factor related to the recent 2016–2019 YF epidemic, reinforcing this state as the epicenter of the outbreaks [40].

The presence of individuals lacking a neutralizing antibodies response against YFV in endemic areas for YF disease also reinforces the importance of active epidemiological surveillance and continued vaccination campaigns aiming to reach at least $\geq 95\%$ coverage. This coverage is necessary because according to the WHO, a vaccine coverage of at least 80% would be important to prevent and control new outbreaks [71]. Indeed, learning about the current seroprevalence in regions under risk of YF disease can add valuable information that could help to assist national and international health authorities in the development of future vaccination strategies.

The 2016–2019 YF epidemic in Brazil was the most impactful in the past decades and several factors, including the failure of entomological and epizootic surveillance systems, low vaccination coverage in several regions of the country, and population migration, have potentially contributed to the recent epidemic scenario. In this context, issues related to vector control and NHP surveillance are also challenges to be covered.

Effective surveillance of the vector population is essential for implementing control strategies, as well as contributing to highlighting potential sources of transmission and potential new outbreaks, not only for YF, but also of other recurrent arboviruses in Brazil such as Zika, Dengue and Chikungunya [72]. Considering the plasticity of vectors involved in the YF transmission cycle and the existence of an urban vector widely domesticated in the country, it would be important that the PAHO Entomology and Vector Control Action Plan [73] become implemented, maintaining an active surveillance not only in Brazil but for all affected countries in America.

Similar to vector control strategies, NHP epizootics surveillance still need to be better established and optimized in all regions of Brazil for a greater control effectiveness, especially in those areas with higher risks of enzootic cycles. Hence, epizootics surveillance needs to be carried out in a sufficient time frame, capable of

providing effective control for viral dispersion. Furthermore, information about illness and death in the NHP, obtained by the Epizootics Surveillance Program of Brazil and local health authorities, also fails to report and disseminate data.

The effective diagnosis of YF human cases is also another critical point. The delay in reporting the laboratory test results slowed down the processes of clinical intervention and surveillance. Apart from this, another issue that compromises better understanding of epidemics is the classification of cases into “cases under investigation”, which makes it difficult to understand the true dimension of the epidemic event due to the delay observed for resolution in cases discarded or confirmed as YFV infection or YF disease. This delay directly influences the possible actions to control and fight against the disease.

Considering the old classification of yellow fever’s endemic area in the country, the Brazilian coast and the Southeastern region were considered YF free areas, however, with the re-emergence of YFV in 2016, this scenario can no longer be considered (Figure 2). There are factors that may be related to viral dislocation for the East and South regions of the country, among them the ecological changes (fragmentation of habitats, climate changes) and the patterns of human behavior, which may have contributed to the increased densities of vectors and NHP, and their consequent proximity to humans [5,11]. Political and social factors are also relevant in the complex recent re-emergence scenario of YF in Brazil, such as failure of political commitment and strategies to achieve satisfactory vaccine coverage and monitor population immunity in areas at risk for YF transmission. Besides poor basic sanitation in several regions of the country, which can contribute to the proliferation of vectors, anthropic environmental changes, such as the advancement of agriculture and peri-urban growth and insufficient health and surveillance policies, can contribute to the poor detection and control of outbreak situations [11,71]. Furthermore, Faria and colleagues estimated that virus lineages moved, on average, 4.25 km/day during the last outbreak. This velocity on vectors movement also reflected YFV lineage movement within the enzootic cycle and not the movement of asymptomatic infected humans. These findings also corroborate the fact that NHPs are not likely to carry the virus over long distances [11,40], different from infected humans and vector species that can help with viral dislocation, reaching greater distances [11,35,74].

Recent phylogenetic studies have shown that YFV strains circulating during the 2016–2019 epidemic presented a high identity with the South American genotype I, previously described circulating in the Amazon region [40,41,74–76]. Further analysis revealed that the strain 1E were responsible for the recent epidemic, which was not associated with previous outbreaks already described in the Southeast region in 2000 and in 2008 [40,74–80]. Genomic analyses of YFV samples from this latest epidemic showed that the YFV lineage responsible for the 2016–2019 outbreak originated from Midwest region, spreading to Minas Gerais state at least two times, and reaching two distinct routes in the Southeastern region of Brazil [80]. The most affected states until 2018 were Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro and Espírito Santo. During 2019, São Paulo continued to report cases, with others being also reported in the states of Paraná and Santa Catarina [12,39].

4. Progress and Perspectives

The surveillance and control of vector populations are actions that must be constant in the YF context, especially in outbreak situations. The prevalence and distribution of vectors species are important key indicators of the risk of the occurrence of an urban cycle in certain regions and the necessity of direct control measures towards areas that need to be prioritized [71,81]. In this sense, it is important to think about a combination of mosquito control strategies that should include policies to improve basic sanitation in large cities and other strategies for direct control of the mosquito population, in addition to strategies such as the introduction of genetically modified or biologically manipulated mosquitoes. An example of this is the global initiative World Mosquito Program (WMP), which uses the symbiotic bacterium *Wolbachia* as a biocontrol tool to reduce the transmission of mosquito-borne diseases [82]. In Brazil, the *Wolbachia* method is coordinated by the Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), under the guidance of the Ministry of Health, and the first releases of *Aedes aegypti* mosquitoes carrying

Wolbachia began in 2014 in Rio de Janeiro, and the project is expected to reach 2.38 million people by 2023 [82]. Scientific evidence has demonstrated the ability of *Wolbachia* to reduce the transmission of Dengue, Zika, Chikungunya, and Yellow Fever viruses by the *Aedes aegypti* mosquitoes [83–86]. For YF control, this approach helps to prevent the onset of urban cycles of the disease [86]. In addition to all the challenges here

exposed, Figure 4 represents an overview in terms of progress and remaining challenges related to the latest YF outbreak in Brazil.

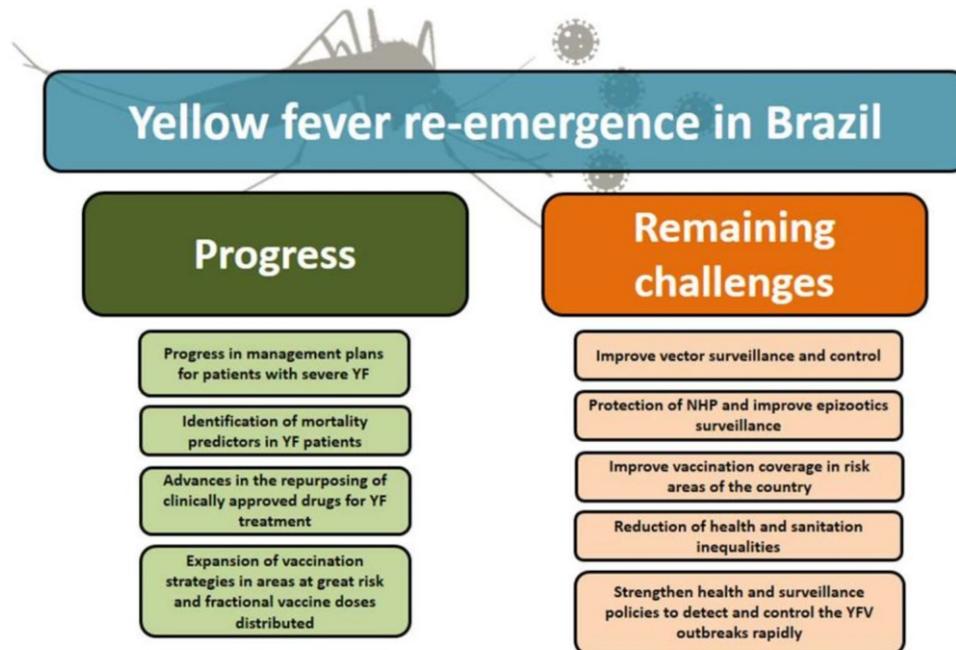


Figure 4. An overview of the YF re-emergence in Brazil. The flowchart highlights some progress that can be recognized during the 2016–2019 epidemic, and the challenges that still need to be covered to contribute to the surveillance and control of YF in Brazil.

Finally, and equally important is to know that the identification of epizootics provides an early warning of viral circulation and helps prevent YF human cases. Thus, the adoption of strategies for the protection of NHPs is fundamental not only for the conservation of species, but also due to the importance of these animals as sentinel hosts of the disease. In the context of sylvatic YF re-emergence experienced in Brazil, all confirmed human cases had as a probable site of infection (LPI) areas with previous occurrence of epizootics in NHP (Figure 2) [12,40,87].

Furthermore, it is important to note that the vector species distribution is related to YFV epidemiology, and, in this context, even more expressive epidemics can be caused when infected individuals are inserted in densely populated areas with the urban vector *A. aegypti* [9,14]. This species is the main vector for many flaviviruses, and it is widely distributed in the urban centers of the Southeastern region, and, due to the active circulation of YFV in this region, the threat of an urban cycle has proved to be concrete [13,15,74].

Vector competence analyses showed that the anthropophilic mosquitoes *A. aegypti* and *A. albopictus* are highly susceptible to be infected and transmit YFV, in addition to the wild vectors *Haemagogus leucocelaenus* and *Sabethes albiprivus* [13]. It is important to highlight the presence of *A. albopictus* in Brazil, as it has spread throughout the country since 1980. Experimental studies suggested that YFV has the potential to adapt to *A. albopictus*, which is an opportunistic species, since it can move between urban and peri-urban habitats [13,88]. In addition, little is known about other vectors (especially the *Culicidae*) and their potential role in YFV transmission. Most of the work related to vector competence to sylvatic virus was performed a long time ago, and their results may not reflect the real-world data since the strain of virus and mosquitoes have been evolving and changing over the years. Taking into account the proximity of YFV circulation to the Atlantic coast and to large urban centers, it is worth noting that even poorly competent vectors can pose a threat in the transmission of pathogens if some factors such as high vector density, high human-biting rate and high survival rates are present. Thus, factors that may have favored the re-emergence of YFV in Brazil such as the presence of susceptible human populations, favorable climatic conditions, and the circulation of infected humans and NHPs are undeniable [11,13,35].

5. Conclusions

The emergence of zoonotic viruses is an important challenge for global public health, now more than ever in our connected world due of international travel and trade in which highly contagious diseases can quickly spread. Understanding the ecological gaps related to the EID and the impact of social changes on the control and prevention of possible epidemics is a challenge that requires international cooperation. The complex YF eco-epidemiology in Brazil is a case study to demonstrate the challenge for public health agencies and policy makers to effectively control and monitor disease. The fact that YF is a zoonosis and cannot be eradicated is an aggravating factor, especially considering the increased proximity of human populations to viral circulation areas. However, for a disease that presents high mortality in severe cases, the large population of unvaccinated and susceptible individuals may favor viral spread and re-emergence events in densely populated areas.

Moreover, with viral circulation now present in the Atlantic Forest, close to large metropolitan areas in the Southeastern region, the risk of YF re-urbanization is highly concerning for human health and potential international viral spread. The occurrence of enzootic cycles makes arboviruses, especially YFV, a recurrent issue. From this point of view, it is important to emphasize the need to use efficient tools to prevent introductions of YFV into the urban cycle, such as the combination of efficient vector control strategies and large-scale vaccination campaigns. Hence, there is an urgent need to strengthen the Brazilian health systems in order to improve decision-making for control, response and prevention of future YF and other EID outbreaks.

Author Contributions: Conceptualization: G.d.S.T.; Formal analysis: P.d.O.F.; A.G.S.-D.; G.B.C.; J.S.d.O.; C.D.A.; J.D.S.; K.L.S.R.; Investigation: P.d.O.F.; A.G.S.-D.; G.B.C.; J.S.d.O.; C.D.A.; J.D.S.; K.L.S.R.; Resources: J.P.A.J.; M.L.N.; M.A.Z.B.; A.P.P.; A.D.L.; J.S.A.; E.G.K.; D.B.d.O.; B.P.D.; G.d.S.T.; Data curation: P.d.O.F.; A.G.S.-D.; G.B.C.; J.S.d.O.; C.D.A.; J.D.S.; K.L.S.R.; Writing—original draft preparation: P.d.O.F.; A.G.S.-D.; G.B.C.; J.S.d.O.; C.D.A.; J.D.S.; K.L.S.R.; Writing—review and editing: P.d.O.F.; A.G.S.-D.; G.B.C.; J.S.d.O.; C.D.A.; J.D.S.; K.L.S.R.; J.P.A.J.; M.L.N.; M.A.Z.B.; A.P.P.; A.D.L.; J.S.A.; E.G.K.; D.B.d.O.; B.P.D.; G.d.S.T.; Supervision: J.P.A.J.; M.L.N.; M.A.Z.B.; A.P.P.; A.D.L.; J.S.A.; E.G.K.; D.B.d.O.; B.P.D.; G.d.S.T.; Project administration: G.d.S.T.; Funding acquisition: G.d.S.T. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/MCTI), grant number 440593/2016-6, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) Yellow Fever grant 2018, National Institutes of Health (NIH) grant number NIH R01AI149614, US BRAZIL COLLABORATIVE BIOMEDICAL RESEARCH PROGRAM—CNPq/MS/NIH, grant number 404192/2019-0, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/MEC), Departamento de Ciência e Tecnologia (DECIT), Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde (SCTIE), Ministério da Saúde and Pró-Reitoria de Pesquisa/UFMG (PRPq-UFMG). BP Drumond, JS Abrahão, EG Kroon, ML Nogueira, JPA Junior, AP Paglia, and GS Trindade are researchers from CNPq.

Acknowledgments: We thank colleagues from the Laboratório de Vírus (ICB-UFMG) for their excellent technical support. We are also thankful to Dario Brock Ramalho from the Infectious Diseases Services, Eduardo de Menezes Hospital in Belo Horizonte, for the technical support regarding the management of patients affected during the YF epidemic and implemented preventive measures.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Lindenbach, B.D.; Murray, C.L.; Thiel, H.J.; Rice, C.M. Flaviviridae. In *Fields Virology*; Knipe, D.M., Howley, P.M., Eds.; Lippincott-Raven: Philadelphia, PA, USA, 2013; Volume 6, pp. 747–794.
2. Brasil, Secretaria de atenção à saúde, Ministério da Saúde. Febre Amarela. In *Guia Para Profissionais da Saúde*, 1st ed.; Ministry of Health of Brazil: Brasília, Brazil, 2019.
3. Vasconcelos, P.F.C. Yellow fever. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **2003**, *36*, 275–293. [CrossRef]
4. Pan American Health Organization. Control of Yellow Fever: Field Guide. Washington, DC. Available online: <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2013/PAHO-fieldguide-yellowfever-2005.pdf> (accessed on 15 October 2020).
5. Douam, F.; Ploss, A. Yellow Fever Virus: Knowledge Gaps Impeding the Fight against an Old Foe. *Trends Microbiol.* **2018**, *26*, 913–928. [CrossRef]
6. Monath, T.P.; Vasconcelos, P.F. Yellow fever. *J. Clin. Virol.* **2015**, *64*, 160–173. [CrossRef]

7. Barrett, D.T.; Higgs, S. Yellow Fever: A Disease that has yet to be conquered. *Annu. Rev. Entomol.* **2007**, *52*, 209–229. [CrossRef]
8. Klitting, R.; Gould, E.A.; Paupy, C.; De Lamballerie, X. What Does the Future Hold for Yellow Fever Virus? (I). *Genes* **2018**, *9*, 291. [CrossRef]
9. Christian, K.A.; Iuliano, A.D.; Uyeki, T.M.; Mintz, E.D.; Nichol, S.T.; Rollin, P.; Staples, J.E.; Arthur, R.R. What We are Watching—Top Global Infectious Disease Threats, 2013–2016: An Update from CDC’s Global Disease Detection Operations Center. *Health Secur.* **2017**, *15*, 453–462. [CrossRef]
10. Pan American Health Organization. Yellow Fever: Number of Confirmed Cases and Deaths by Country in the Americas, 1960–Health Emergencies Department (PHE). Available online: https://ais.paho.org/phil/viz/ed_yellowfever.asp (accessed on 12 August 2020).
11. Possas, C.; Lourenço-de-Oliveira, R.; Tauil, P.L.; Pinheiro, F.P.; Pissinatti, A.; Cunha, R.V.; Freire, M.; Martins, R.M.; Homma, A. Yellow fever outbreak in Brazil: The puzzle of rapid viral spread and challenges for immunisation. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **2018**, *113*, e180278. [CrossRef]
12. Ministério da Saúde. *Monitoramento do Período Sazonal da Febre Amarela Brasil, 2017/2018*; Informe nº27, Ministério da Saúde, CGDT/DEVIT/SVS/MS: Brasília, Brazil, 2018.
13. Couto-Lima, D.; Madec, Y.; Bersot, M.I.; Campos, S.S.; Mota, M.A.; Santos, F.B.; Vazeille, M.; Vasconcelos, P.F.C.; Lourenço-de-Oliveira, R.; Failloux, A.B. Potential risk of re-emergence of urban transmission of Yellow Fever virus in Brazil facilitated by competent Aedes populations. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 4848. [CrossRef]
14. Pierson, T.C.; Diamond, M.S. The continued threat of emerging flaviviruses. *Nat. Microbiol.* **2020**, *5*, 796–812. [CrossRef]
15. Massad, E.; Amaku, M.; Coutinho, F.; Struchiner, C.J.; Lopez, L.F.; Coelho, G.; Wilder-Smith, A.; Burattini, M.N. The risk of urban yellow fever resurgence in Aedes-infested American cities. *Epidemiol. Infect.* **2018**, *146*, 1219–1225. [CrossRef]
16. Franco, O. *História da Febre Amarela no Brasil*; Ministério da Saúde, Departamento de Endemias Rurais: Rio de Janeiro, Brazil, 1969.
17. Chippaux, J.P.; Chippaux, A. Yellow fever in Africa and the Americas: A historical and epidemiological perspective. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* **2018**, *24*, 20. [CrossRef] [PubMed]
18. Teixeira, L. Da transmissão hídrica a culicidiana: A febre amarela na sociedade de medicina e cirurgia de São Paulo. *Rev. Bras. História* **2001**, *21*, 217–242. [CrossRef] [PubMed]
19. Benchimol, J. *Febre Amarela: A Doença e a Vacina, Uma História Inacabada*; Fiocruz: Rio de Janeiro, Brazil, 2001; p. 469.
20. Finlay, C.J. El mosquito hipotéticamente considerado como agente de transmisión de la fiebre amarilla. *An. Real Acad. Cienc. Médicas Físicas Nat. Habana* **1881**, *18*, 147–169.
21. Finlay, C.J.; Matas, R. The mosquito hypothetically considered as an agent in the transmission of yellow fever poison. *Yale J. Biol. Med.* **1881**, *9*, 589–604.
22. Faerstein, E.; Winkelstein, W., Jr. Carlos Juan Finlay: Rejected, respected, and right. *Epidemiology* **2010**, *21*, 158. [CrossRef]
23. Soper, F.L.; Penna, H.; Cardoso, E.; Serafim, J., Jr.; Frobisher, M., Jr.; Pinheiro, J. Yellow fever without *Aedes aegypti*. Study of a rural epidemic in the Valle do Chanaan, Espírito Santo, Brazil. *Am. J. Epidemiol.* **1933**, *18*, 555–587. [CrossRef]
24. Soper, F.L. Jungle yellow fever. A new epidemiological entity in South America. *Rev. Hyg. Saude Publica* **1936**, *10*, 107–144.
25. Costa, Z.G.A.; Romano, A.P.M.; Elkhoury, A.N.M.; Flannery, B. Evolução histórica da vigilância epidemiológica e do controle da febre amarela no Brasil. *Rev. Pan-Amaz. Saude* **2011**, *2*, 11–26. [CrossRef]
26. Cope, S. Yellow Jack—How Yellow Fever Ravaged America and Walter Reed Discovered Its Deadly Secrets. *Emerg. Infect. Dis.* **2005**, *11*, 1652. [CrossRef]
27. Soper, F.L. Recent extensions of knowledge of yellow fever. *Quart. Bull. Health Organ. Leag. Nation* **1935**, *5*, 1–50.
28. Roukens, A.H.; Visser, L.G. Yellow fever vaccine: Past, present and future. *Expert Opin. Biol. Ther.* **2008**, *8*, 1787–1795. [CrossRef] [PubMed]
29. Soper, F.L.; Smith, H.H. Vaccination with virus 17D in control of jungle yellow fever in Brazil. In *Acta Conventus Tertii de Tropicis Atque Malariae Morbis*; Reprinted from the Transactions of the Third International Congress of Tropical Medicine and Malaria; C.A. Spin & Zoon N.V.: Holland, The Netherlands, 1938; Volume 1, pp. 295–313.

30. Rigau-Pérez, J.G.; Clark, G.G.; Gubler, D.J.; Reiter, P.; Sanders, E.J.; Vorndam, A.V. Dengue and dengue haemorrhagic fever. *Lancet* **1998**, *352*, 971–977. [CrossRef]
31. Gubler, D.J. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Trends Microbiol.* **2002**, *10*, 100–103. [CrossRef]
32. Mackenzie, J.S.; Gubler, D.J.; Petersen, L.R. Emerging flaviviruses: The spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. *Nat. Med.* **2004**, *10*, S98–S109. [CrossRef]
33. Carrington, C.V.; Foster, J.E.; Pybus, O.G.; Bennett, S.N.; Holmes, E.C. Invasion and maintenance of dengue virus type 2 and type 4 in the Americas. *J. Virol.* **2005**, *79*, 14680–14687. [CrossRef]
34. Brasil, Ministério da Saúde. Febre amarela: Sintomas, Tratamento, Diagnóstico e Prevenção. 2013/2020. Available online: <https://saude.gov.br/saude-de-a-z/febre-amarela-sintomas-transmissao-e-prevencao> (accessed on 12 August 2020).
35. Vasconcelos, P.F.C. Yellow fever in Brazil: Thoughts and hypotheses on the emergence in previously free areas. *Rev. Saude Publica* **2010**, *44*, 1144–1149. [CrossRef] [PubMed]
36. Pessanha, J.E.M. Yellow Fever: A vision of the current scenario. *Rev. Med. Minas Gerais* **2009**, *19*, 97–102.
37. Brasil, Ministério da Saúde. Reemergência da febre amarela silvestre no Brasil, 2014/2015: Situação epidemiológica e a importância da vacinação preventiva e da vigilância intensificada no período sazonal. *Bol. Epidemiológico* **2015**, *46*. Available online: <http://portalquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2015/outubro/19/2015-032---FA-ok.pdf> (accessed on 12 August 2020).
38. Silva, N.I.O.; Sacchetto, L.; Rezende, I.M.; Trindade, G.S.; LaBeaud, A.D.; Thoisy, B.; Drumond, B.P. Recent sylvatic yellow fever virus transmission in Brazil: The news from an old disease. *Virol. J.* **2020**, *17*, 9. [CrossRef]
39. Brasil, Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento de Febre Amarela, Informe nº18, 9 Junho. Available online: <https://www.saude.gov.br/images/pdf/2019/junho/13/Informe-de-Monitoramento-de-Febre-AmarelaBrasil--n-18.pdf> (accessed on 12 August 2020).
40. Faria, N.R.; Kraemer, M.U.G.; Hill, S.C.; Jesus, J.G.; Aguiar, R.S.; Iani, F.C.M.; Xavier, J.; Quick, J.; du Plessis, L.; Dellicour, S.; et al. Genomic and epidemiological monitoring of yellow fever virus transmission potential. *Science* **2018**, *361*, 894–899. [CrossRef]
41. Giovanetti, M.; Mendonça, M.C.L.; Fonseca, V.; Mares-Guia, M.A.; Fabri, A.; Xavier, J.; Jesus, J.G.; Gräf, T.; Rodrigues, C.D.S.; Santos, C.C.; et al. Yellow Fever Virus Reemergence and Spread in Southeast Brazil, 2016. *J. Virol.* **2019**, *94*, e01623. [CrossRef]
42. Vasconcelos, P.F.C.; Costa, Z.G.; Travassos da Rosa, E.S.; Luna, E.; Rodrigues, S.G.; Barros, V.L.R.S.; Dias, J.P.; Monteiro, H.A.; Oliva, O.F.; Vasconcelos, H.B.; et al. Epidemic of jungle yellow fever in Brazil, 2000: Implications of climatic alterations in disease spread. *J. Med. Virol.* **2001**, *65*, 598–604. [CrossRef] [PubMed]
43. Weaver, S.C. Urbanization and geographic expansion of zoonotic arboviral diseases: Mechanisms and potential strategies for prevention. *Trends Microbiol.* **2013**, *21*, 360–363. [CrossRef] [PubMed]
44. Morens, D.M.; Folkers, G.K.; Fauci, A.S. The challenge of emerging and reemerging infectious diseases. *Nature* **2004**, *430*, 242–249. [CrossRef]
45. Rezende, I.M.; Pereira, L.S.; Fradico, J.R.B.; Xavier, M.A.P.; Alves, P.A.; Campi-Azevedo, A.C.; Speziali, E.; Dos Santos, L.Z.M.; Albuquerque, N.S.; Penido, I.; et al. Late-Relapsing Hepatitis after Yellow Fever. *Viruses* **2020**, *12*, 222. [CrossRef] [PubMed]
46. Denis, B.; Chirio, D.; Ponscarne, D.; Brichtler, S.; Verdière, N.C.; Simon, F.; Molina, J.M. Hepatitis Rebound after Infection with Yellow Fever Virus. *Emerg. Infect. Dis.* **2019**, *25*, 1248–1249. [CrossRef] [PubMed]
47. Ho, Y.L.; Joelsons, D.; Leite, G.F.C.; Malbouisson, L.M.S.; Song, A.T.W.; Perodini, B.; Andrade, L.C.; Pinto, L.F.; D’Albuquerque, L.A.C.; Segurado, A.A.C.; et al. Severe yellow fever in Brazil: Clinical characteristics and management. *J. Travel. Med.* **2019**, *26*, taz040. [CrossRef] [PubMed]
48. Marinho, P.E.S.; Alvarenga, P.P.M.; Crispim, A.P.C.; Candiani, T.M.S.; Alvarenga, A.M.; Bechler, I.M.; Alves, P.A.; Dornas, F.P.; Oliveira, D.B.; Bentes, A.A.; et al. Wild-Type Yellow Fever Virus RNA in Cerebrospinal Fluid of Child. *Emerg. Infect. Dis.* **2019**, *25*, 1567. [CrossRef]
49. Kallas, E.G.; Zanella, L.G.F.A.B.D.; Moreira, C.H.V.; Buccheri, R.; Diniz, G.B.F.; Castiñeiras, A.C.P.; Costa, P.R.; Dias, J.Z.C.; Marmorato, M.P.; Song, A.T.W.; et al. Predictors of mortality in patients with yellow fever: An observational cohort study. *Lancet Infect. Dis.* **2019**, *19*, 750–758. [CrossRef]

50. De Freitas, C.S.; Higa, L.M.; Sacramento, C.Q.; Ferreira, A.C.; Reis, P.A.; Delvecchio, R.; Monteiro, F.L.; Barbosa-Lima, G.; Westgarth, H.J.; Vieira, Y.R.; et al. Yellow fever virus is susceptible to sofosbuvir both in vitro and in vivo. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2019**, *13*, e0007072. [CrossRef]
51. Mendes, E.A.; Pilger, D.R.B.; Nastri, A.C.S.S.; Malta, F.M.; Pascoalino, B.S.; D'Albuquerque, L.A.C.; Balan, A.; de Freitas Jr, L.H.G.; Durigon, E.L.; Carrilho, F.J.; et al. Sofosbuvir inhibits yellow fever virus in vitro and in patients with acute liver failure. *Ann. Hepatol.* **2019**, *18*, 816–824. [CrossRef]
52. Brasil, Ministério da Saúde. Vacina de Febre Amarela Será Ampliada Para Todo o Brasil.
Available online: <https://www.saude.gov.br/noticias/agencia-saude/42849-vacina-de-febre-amarela-seraampliada-para-todo-o-brasil> (accessed on 20 March 2020).
53. Nnaji, C.A.; Shey, M.S.; Adetokunboh, O.O.; Wiysonge, C.S. Immunogenicity and safety of fractional dose yellow fever vaccination: A systematic review and meta-analysis. *Vaccine* **2020**, *38*, 1291–1301. [CrossRef] [PubMed]
54. Casey, R.M.; Harris, J.B.; Ahuka-Mundeke, S.; Dixon, M.G.; Kizito, G.M.; Nsele, P.M.; Umutesi, G.; Laven, J.; Kosoy, O.; Paluku, G.; et al. Immunogenicity of fractional-dose vaccine during a yellow fever outbreak—Final report. *N. Engl. J. Med.* **2019**, *381*, 444–454. [CrossRef] [PubMed]
55. Wu, J.T.; Peak, C.M.; Leung, G.M.; Lipsitch, M. Fractional dosing of yellow fever vaccine to extend supply: A modelling study. *Lancet* **2016**, *388*, 2904–2911. [CrossRef]
56. Pan American Health Organization. Brazil Launches World's Largest Campaign with Fractional-Dose Yellow Fever Vaccine. Available online: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=14065&Itemid=135&lang=en (accessed on 12 August 2020).
57. Boëte, C. Yellow Fever Outbreak: O Vector Control, Where Art Thou? *J. Med. Entomol.* **2016**, *53*, 1048–1049. [CrossRef]
58. Estofotele, C.F.; Nogueira, M.L. Is a dose of 17D vaccine in the current context of Yellow Fever enough? *Braz. J. Microbiol.* **2018**, *49*, 683–684. [CrossRef] [PubMed]
59. Costa-Rocha, I.A.; Campi-Azevedo, A.C.; Peruhype-Magalhães, V.; Coelho-dos-Reis, J.G.; Fradico, J.R.B.; Souza-Lopes, T.; Reis, L.R.; Freire, L.C.; Costa-Pereira, C.; Mambri, J.V.M.; et al. Duration of Humoral and Cellular Immunity 8 Years after Administration of Reduced Doses of the 17DD-Yellow Fever Vaccine. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 1211. [CrossRef] [PubMed]
60. Campi-Azevedo, A.C.; Peruhype-Magalhães, V.; Coelho-dos-Reis, J.G.; Antonelli, L.R.; Costa-Pereira, C.; Speziali, E.; Reis, L.R.; Lemos, J.A.; Ribeiro, J.G.L.; Camacho, L.A.B.; et al. 17DD Yellow Fever Revaccination and Heightened Long-Term Immunity in Populations of Disease-Endemic Areas, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* **2019**, *25*, 1511–1521. [CrossRef] [PubMed]
61. Collaborative group for studies on yellow fever vaccines. Duration of post-vaccination immunity against yellow fever in adults. *Vaccine* **2014**, *32*, 4977–4984. [CrossRef]
62. Campi-Azevedo, A.C.; Costa-Pereira, C.; Antonelli, L.R.; Fonseca, C.T.; Teixeira-Carvalho, A.; Villela-Rezende, G.; Santos, R.A.; Batista, M.A.; Campos, F.M.; Pacheco-Porto, L.; et al. Booster dose after 10 years is recommended following 17DD-YF primary vaccination. *Hum. Vaccine Immunother.* **2016**, *12*, 491–502. [CrossRef]
63. World Health Organization. Vaccines and vaccination against yellow fever. *Wkly. Epidemiol. Rec.* **2013**, *88*, 269–284. Available online: <https://www.who.int/wer/2013/wer8827.pdf?ua=1> (accessed on 12 August 2020).
64. Ferreira, C.d.; Campi-Azevedo, A.C.; Peruhype-Magalhaes, V.; Costa-Pereira, C.; de Albuquerque, C.P.; Muniz, L.F.; de Souza, T.Y.; Oliveira, A.C.V.; Martins-Filho, O.A.; da Mota, L.M.H. The 17D–204 and 17DD yellow fever vaccines: An overview of major similarities and subtle differences. *Expert Rev. Vaccines* **2018**, *17*, 79–90. [CrossRef]
65. Vasconcelos, P.F.C. Single shot of 17D vaccine may not confer life-long protection against yellow fever. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **2018**, *113*, 135–136. [CrossRef]
66. Ortiz-Martínez, Y.; Patiño-Barbosa, A.M.; Rodríguez-Morales, A.J. Yellow fever in the Americas: The growing concern about new epidemics. *F1000Research* **2017**, *6*, 398. [CrossRef]
67. Stoffella-Dutra, A.G.; de Oliveira, J.S.; Costa, G.B.; Kroon, E.G.; Abrahão, J.S.; LaBeaud, A.D.; Drumond, B.P.; Trindade, G.S. Absence of YF-neutralizing antibodies in vulnerable populations of Brazil: A warning for epidemiological surveillance and potential risks for future outbreaks. *Vaccine* **2020**, *38*, 6592–6599. [CrossRef]
68. Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais. Dados de Cobertura Vacinal em Minas Gerais. Available online: <http://www.saude.mg.gov.br/febreamarela> (accessed on 12 August 2020).

69. Machado, V.W.; Vasconcelos, P.F.C.; Silva, E.V.P.; Santos, J.B. Serologic assessment of yellow fever immunity in the rural population of a yellow fever-endemic area in Central Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **2013**, *46*, 166–171. [CrossRef] [PubMed]
70. Miyaji, K.T.; Avelino-Silva, V.I.; Simões, M.; Freire, M.S.; Medeiros, C.R.; Braga, P.E.; Neves, M.A.A.; Lopes, M.H.; Kallas, E.G.; Sartori, A.M.C. Prevalence and titers of yellow fever virus neutralizing antibodies in previously vaccinated adults. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* **2017**, *59*, e2. [CrossRef]
71. World Health Organization. *A Global Strategy to Eliminate Yellow Fever Epidemics (EYE) 2017–2026*; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2017.
72. Vasconcelos, P.F.C.; Calisher, C.H. Emergence of Human Arboviral Diseases in the Americas, 2000–2016. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **2016**, *16*, 295–301. [CrossRef]
73. Pan-American Health Organization. Plano de Ação sobre Entomologia e Controle de Vetores. 56º Conselho Diretor, 70ª Sessão do Comitê Regional da OMS para as Américas Washington, D.C.; EUA, 23 a 27 de setembro de. Available online: <https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/49612/CD56-11-p.pdf> (accessed on 12 August 2020).
74. Mir, D.; Delatorre, E.; Bonaldo, M.; Lourenço-de-Oliveira, R.; Vicente, A.C.; Bello, G. Phylodynamics of Yellow Fever Virus in the Americas: New insights into the origin of the 2017 Brazilian outbreak. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 7385. [CrossRef]
75. Bonaldo, M.C.; Gómez, M.M.; Santos, A.A.C.; Abreu, F.V.S.; Ferreira-de-Brito, A.; Miranda, R.M.; Castro, M.G.; Lourenço-de-Oliveira, R. Genome analysis of yellow fever virus of the ongoing outbreak in Brazil reveals polymorphisms. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **2017**, *112*, 447–451. [CrossRef]
76. Rezende, I.M.; Sacchetto, L.; Mello, E.M.; Alves, P.A.; Iani, F.C.M.; Adelino, T.E.R.; Duarte, M.M.; Cury, A.L.F.; Bernardes, A.F.L.; Santos, T.A.; et al. Persistence of Yellow fever virus outside the Amazon Basin, causing epidemics in Southeast Brazil, from 2016 to 2018. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2018**, *12*, e0006538. [CrossRef]
77. Barbosa, C.M.; Di Paola, N.; Cunha, M.P.; Jesus, M.J.R.; Araújo, D.B.; Silveira, D.B.; Leal, F.B.; Mesquita, F.S.; Botosso, V.F.; Zanotto, P.M.A.; et al. Yellow Fever Virus in Urine and Semen of Convalescent Patient, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* **2018**, *24*, 176–178. [CrossRef] [PubMed]
78. Moreira-Soto, A.; Torres, M.C.; Mendonça, M.C.L.; Mares-Guia, M.A.; Rodrigues, C.D.S.; Fabri, A.A.; Dos Santos, C.C.; Machado Araújo, E.S.; Fischer, C.; Ribeiro Nogueira, R.M.; et al. Evidence for multiple sylvatic transmission cycles during the 2016–2017 yellow fever virus outbreak, Brazil. *Clin. Microbiol. Infect.* **2018**, *24*, 1019. [CrossRef] [PubMed]
79. Figueiredo, P.O.; Silva, A.T.S.; Oliveira, J.S.; Marinho, P.E.; Rocha, F.T.; Domingos, G.P.; Poblete, P.C.P.; Oliveira, L.B.S.; Duarte, D.C.; Bonjardim, C.A.; et al. Detection and Molecular Characterization of *Yellow Fever Virus*, 2017, Brazil. *EcoHealth* **2018**, *15*, 864. [CrossRef] [PubMed]
80. Delatorre, E.; Abreu, F.V.S.; Ribeiro, I.P.; Gómez, M.M.; dos Santos, A.A.C.; Ferreira-de-Brito, A.; Neves, M.S.A.S.; Bonelly, I.; de Miranda, R.M.; Furtado, N.D.; et al. Distinct YFV Lineages Co-circulated in the Central-Western and Southeastern Brazilian Regions from 2015 to 2018. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 1079. [CrossRef]
81. Carvalho, R.G.; Lourenço-de-Oliveira, R.; Braga, I.A. Updating the geographical distribution and frequency of *Aedes albopictus* in Brazil with remarks regarding its range in the Americas. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **2014**, *109*, 787–796. [CrossRef]
82. World Mosquito Program. 2020. Available online: <https://www.worldmosquitoprogram.org/> (accessed on 15 October 2020).
83. Dutra, H.L.C.; Dos Santos, L.M.B.; Caragata, E.P.; Silva, J.B.L.; Villela, D.A.M.; Maciel-de-Freitas, R.; Moreira, L.A. From Lab to Field: The Influence of Urban Landscapes on the Invasive Potential of *Wolbachia* in Brazilian *Aedes aegypti* Mosquitoes. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2015**, *9*, e0003689. [CrossRef]
84. Dutra, H.L.C.; Rocha, M.N.; Dias, F.B.S.; Mansur, S.B.; Caragata, E.P.; Moreira, L.A. *Wolbachia* Blocks Currently Circulating Zika Virus Isolates in Brazilian *Aedes aegypti* Mosquitoes. *Cell Host Microbe* **2016**, *19*, 771–774. [CrossRef]
85. Flores, H.A.; de Bruyne, J.T.; O'Donnell, T.B.; Nhu, V.T.; Giang, N.T.; Trang, H.T.X.; Van, H.T.T.; Long, V.T.; Dui, L.; Huy, H.L.; et al. Multiple *Wolbachia* strains provide comparative levels of protection against dengue virus infection in *Aedes aegypti*. *PLoS Pathog.* **2020**, *16*, e1008433. [CrossRef]
86. Rocha, M.N.; Duarte, M.M.; Mansur, S.B.; Silva, B.D.M.E.; Pereira, T.N.; Adelino, T.É.R.; Giovanetti, M.; Alcantara, L.C.J.; Santos, F.M.; Costa, V.R.M.; et al. Pluripotency of *Wolbachia* against Arboviruses: The case of yellow fever. *Gates Open Res.* **2019**, *3*, 161. [CrossRef]

87. Bicca-Marques, J.C.; Freitas, D.S. The role of monkeys, mosquitoes, and humans in the occurrence of a yellow fever outbreak in a fragmented landscape in south Brazil: Protecting howler monkeys is a matter of public health. *Trop. Conserv. Sci.* **2010**, *3*, 78–89. [[CrossRef](#)]
88. Amraoui, F.; Pain, A.; Piorkowski, G.; Vazeille, M.; Couto-Lima, D.; Lamballerie, X.; Lourenço-de-Oliveira, R.; Failloux, A.B. Experimental Adaptation of the Yellow Fever Virus to the Mosquito *Aedes albopictus* and Potential risk of urban epidemics in Brazil, South America. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 14337. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

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



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



Absence of yellow fever virus circulation in wildlife rodents from Brazil

Poliana de Oliveira Figueiredo¹ · Ana Gabriella Stoffella-Dutra¹ · Galileu Barbosa Costa² ·
 Jaqueline Silva de Oliveira¹ · Carolina Dourado Amaral¹ · Pedro Augusto Alves³ · José Dilermando Andrade Filho⁴ ·
 Gustavo Fontes Paz⁴ · Gabriel Barbosa Tonelli⁴ · Erna Geessien Kroon¹ · Betânia Paiva Drumond¹ ·
 Adriano Pereira Paglia⁵ · Danilo Bretas de Oliveira⁶ · Giliane de Souza Trindade¹

Received: 27 April 2021 / Accepted: 28 January 2022

© The Author(s) under exclusive licence to Sociedade Brasileira de Microbiologia 2022

Abstract

Yellow fever (YF), caused by the yellow fever virus (YFV), is an emerging viral zoonosis that affects humans and non-human primates (NHP). In South America, YF is naturally maintained through enzootic/sylvatic cycles involving NHPs and mosquitoes (*Haemagogus* and *Sabethes*). In this study, we retrospectively analyzed wildlife rodents to better understand their role in a potential alternative YF sylvatic cycle. The plaque reduction neutralization test was performed to detect anti-YFV antibodies, while qPCR targeting the NS5 region of flaviviruses and standard PCR targeting the CprM region were applied to detect YFV RNA in tissue and blood samples. YFV was not evidenced in any of the tested samples. These findings provide additional information regarding sylvatic YFV and emphasize the importance of YFV surveillance in wild animals as potential reservoirs/hosts given the well-established enzootic cycle in the studied areas, mainly in the Atlantic Forest.

Keywords Flavivirus · Yellow fever · Small mammals · Rodents · Capybaras · Ecology

Yellow fever virus (YFV), the etiological agent of yellow fever (YF), is a positive-strand RNA virus that belongs to the *Flaviviridae* family (*Flavivirus* genus) [1, 2]. Yellow fever disease is characterized by an acute, febrile, hemorrhagic infectious illness transmitted by infected mosquito vectors to human populations and non-human primates (NHP) in South America and Africa [2–5]. In these endemic continents,

YFV is maintained in distinct cycles, involving different species of NHP and arboreal mosquito vectors. In Africa, three transmission cycles are well described: (1) the sylvatic cycle, occurring in forests between NHP and the sylvatic vector *Aedes* (*Stegomyia*) *africanus*; (2) the savannah or intermediate cycle, which occurs in rural and peri-urban areas, involving anthropophilic *Aedes* spp., and both human and NHP; and (3) an urban cycle, involving *Ae. aegypti* and humans [3, 5, 6]. On the other hand, in South America, YFV is naturally maintained through enzootic/sylvatic cycles involving NHP and mosquitoes of the genera *Haemagogus* and *Sabethes*

Poliana de Oliveira Figueiredo, Ana Gabriella Stoffella-Dutra and Galileu Barbosa Costa contributed equally to this work.

Responsible Editor: Mauricio Nogueira

✉ Ana Gabriella Stoffella-Dutra
 anagstoffella@gmail.com

✉ Galileu Barbosa Costa
 galileuk1@gmail.com

✉ Giliane de Souza Trindade
 giliane@icb.ufmg.br; gitrindade@yahoo.com.br

¹ Laboratório de Vírus, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, Campus Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais 31270-901, Brazil

² Departamento de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Santa Cruz, Campus Soane Nazaré de Andrade, Rodovia

Jorge Amado, Km 16, Salobrinho, Ilhéus, BA 45662-900, Brazil

³ Grupo de Imunologia de Doenças Virais, Instituto René Rachou, Fiocruz-Minas, Belo Horizonte, MG, Brazil

⁴ Grupo de Estudos em Leishmanioses, Instituto René Rachou, Fiocruz-Minas, Belo Horizonte, MG, Brazil

⁵ Laboratório de Ecologia e Conservação, Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

⁶ Centro Integrado de Pesquisa em Saúde, Faculdade de Medicina, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, Brazil

[3–5, 7–9]. An urban cycle characterized by YFV transmission to humans by the *Ae. aegypti* vector is also described, which raises concern about the risk of reurbanization of YF [2–4]. However, since 1942, no YF urban cycles have been reported in Brazil mainly due to vaccination campaigns [5, 9–11]. Another contrast is that neotropical NHP species from the Americas are considered highly susceptible to YFV infection and generally suffer from fatal YF disease, unlike the old world NHP. Due to the YFV maintenance in enzootic cycles, YF is a re-emerging disease in endemic areas and cannot be easily eradicated [6, 12].

In endemic areas, YF follows a seasonal pattern of occurrence (most cases are recorded during December–May in Brazil) due to the rainfall period, which contributes to increasing densities of vector species [9–11]. Although viral circulation and transmission can change according to temperature and climate conditions, factors such as the vector distribution and vector competence, viral fitness, and increased proximity between urban and wild areas due to increased urbanization along with deforestation can also play a role in the complex transmission dynamics of YFV [3, 9, 11, 13]. In addition to presence of susceptible hosts, low vaccine coverage in the human population and even the introduction of new viral strains can also contribute to the YF occurrence [11, 13].

In 2014, YFV re-emerged in Brazil mainly in areas of Cerrado biome [10, 12], but it was in 2016 that Brazil experienced an impactful epidemic of sylvatic YF, where most cases were concentrated in regions considered free of the disease, or with low YFV circulation [2, 4, 5, 9, 13]. The 2016–2019 sylvatic YF epidemic reached the Southeast region of Brazil causing an expressive number of epizootics and human cases, affecting mainly the states of Minas Gerais

and São Paulo [4, 9, 14]. This fact could be aligned with the expansion of YFV circulation in the country, as well as associated with ecological factors that include the characteristics of vectors, hosts, and human populations [15]. Although YF sylvatic cycle is characterized by the participation of NHP as the main hosts, the knowledge regarding other mammals that could also be involved is essential for understanding the origin of outbreaks and viral dynamics [9, 13, 16].

Given that Flaviviruses has a broad host range and that wild rodents (such as *Oecomys* sp., *Oligoryzomys nigripes*, *Praomys* sp., *Proechimys cuvieri*, *Proechimys guyannensis*, and *Zygodontomys brevicauda*) could potentially be implicated in YFV transmission chain [6, 17, 18], we decided to search for evidence of YFV circulation in wildlife rodents captured in regions of Cerrado and Atlantic Forest biomes in Brazil that have suffered with anthropogenic impacts and that are closer to major urban centers with large unvaccinated human populations. Furthermore, studies have already shown that the Atlantic Forest region has favorable ecological and climatic conditions for the maintenance and persistence of YFV during the epidemic and non-epidemic periods [4, 6, 19, 20].

We retrospectively analyzed a total of 150 small rodents captured between 2011 and 2015 (Table 1) in different locations of the southeastern region of Brazil (Fig. 1). The wildlife rodents were captured in the following locations: Serro, Ouro Preto, Serra do Caraça, Sabará, and Contagem (these last two cities are located in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, the capital of Minas Gerais State). We also included 10 capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) captured during 2016 in Caldas Novas city, State of Goiás (Fig. 1). All captures were authorized by the Ministry of the Environment/SISBIO, license number 20807–2. The animals

Table 1 List of wildlife rodents analyzed for the presence of yellow fever virus in Brazil, 2011–2016

Species	Total (n = 150)	Location				
		Serro	Ouro Preto	Serra do Caraça	Sabará	Contagem
<i>Akodon cursor</i>	33	1	0	31	1	0
<i>Calomys expulsos</i>	2	2	0	0	0	0
<i>Calomys tener</i>	2	2	0	0	0	0
<i>Cerradomys subflavus</i>	18	1	0	6	11	0
<i>Guerlinguetus ingrani</i>	5	1	0	3	1	0
<i>Mus musculus</i>	17	3	7	0	2	5
<i>Necomys lasiurus</i>	41	2	0	1	39	0
<i>Nectomys squamipes</i>	2	1	0	1	0	0
<i>Oecomys catharinae</i>	1	1	0	0	0	0
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	13	3	0	6	4	0
<i>Oxymycterus dasytrichus</i>	3	0	0	3	0	0
<i>Rattus rattus</i>	3	3	0	0	0	0
<i>Trinomys setosus</i>	10	10	0	0	0	0

Capybaras (*H. hydrochaeris*) were not included in this table

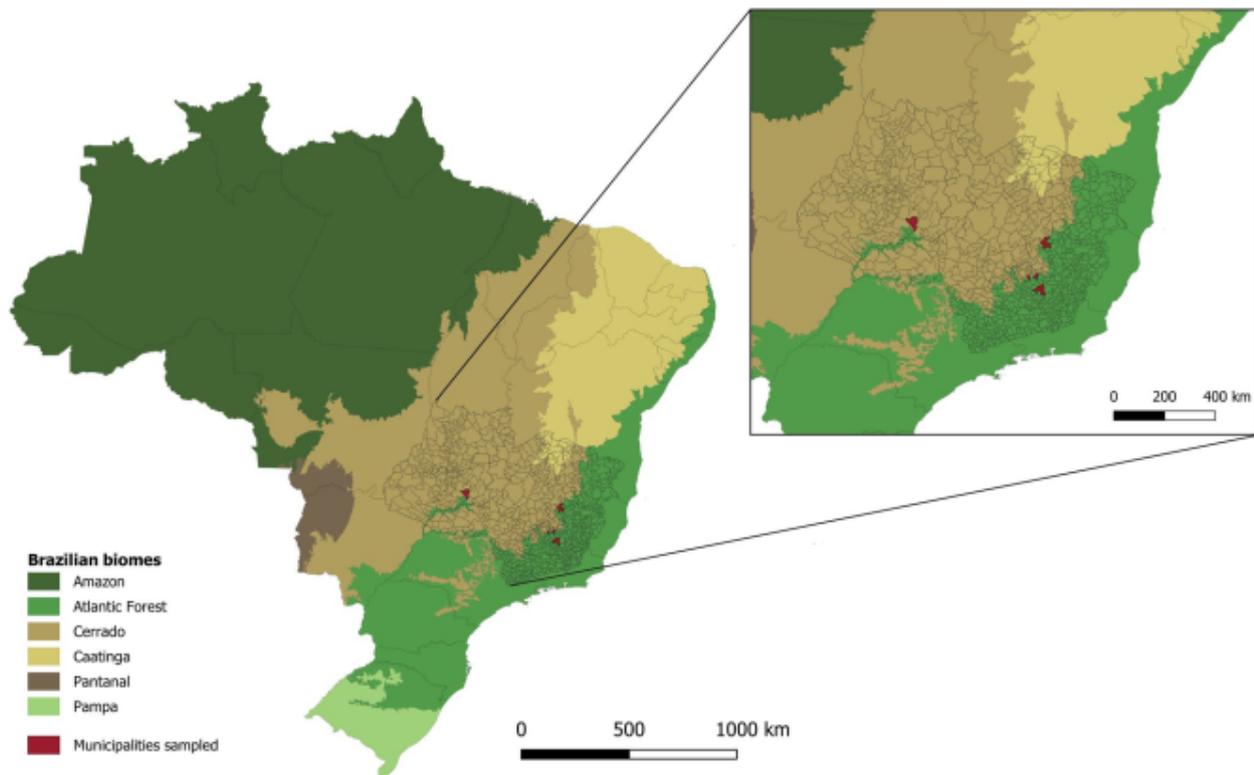


Fig. 1 Spatial distribution of the studied wildlife mammals. The map of Brazil shows each location where wildlife mammals were captured, including Serro, Sabará, Ouro Preto, Serra do Caraça, and Con-

tagem in the Metropolitan Region of Belo Horizonte (State of Minas Gerais, Southeastern region) and Caldas Novas city (State of Goiás, Central-Western region)

were captured in peri-urban, rural, and forest environments (Fig. 2) during periods without reports of YF [11, 21]. Sera and liver samples were collected from small rodents, while sera, blood, anal and oral swabs, feces, and ticks were collected from capybaras (Fig. 3).

All collections were performed by trained professionals either veterinarians or biologists following CDC recommendations [22]. During animal manipulation, the following Personal Protective Equipment was used: disposable coveralls, surgical gloves, goggles, and N98 masks.

To determine the presence of neutralizing antibodies in sera of mammals, we used the plaque reduction neutralization test (PRNT) [23–25]. Sera were heated at 56 °C for 30 min to denature complement system proteins and diluted (1:20) in Eagle's Minimum Essential Medium (MEM) (GIBCO®, USA). Samples were added to the same volume (1:1) of a solution containing approximately 100 plaque forming units (PFU) of YFV (strain BeH 17DD, lot 980FPO662) diluted in FBS-free MEM. The final solution (virus/serum) was homogenized and incubated for 1 h at 37 °C. Six-well plates containing VERO cell (ATCC no. CCL-81) monolayers with 80% of confluence were inoculated with virus/serum solution and incubated at 37 °C

for 1 h in an atmosphere supplemented with 5% of CO₂. Furthermore, 2 mL of semi-solid medium (carboxymethyl cellulose 1%, SYNTH®, Brazil) and 199 2× Medium (1:1) (CULTILAB, Brazil) with 2% FBS was added to each well and plates were incubated for 5 days at 37 °C in an atmosphere supplemented with 5% of CO₂. VERO monolayers were then fixed with formalin (SYNTH®, Brazil) at 10% and stained with crystal violet solution (SYNTH®, Brazil) at 1%. All samples were tested in triplicate. Positive samples were defined as the highest dilution that inhibited ≥70% of virus plaques compared with negative controls. The value was obtained by dividing 1 mL by the volume of virus/serum solution inoculated and multiplying it by the last positive dilution value.

Total RNA was isolated from fragments of 30 mg of the liver samples by using RNeasy Mini Kit (Qiagen, USA), and from 140 µL of serum samples by using QIAmp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, USA). Capybaras stool samples were processed according to the protocol described by Dutra and colleagues [26]. An amount of 20 mg of capybara stool was diluted 1:10 w/v in buffered saline solution (PBS), followed by centrifugation at 15.000×g for 10 min. The supernatant was filtered with 0.45 mm

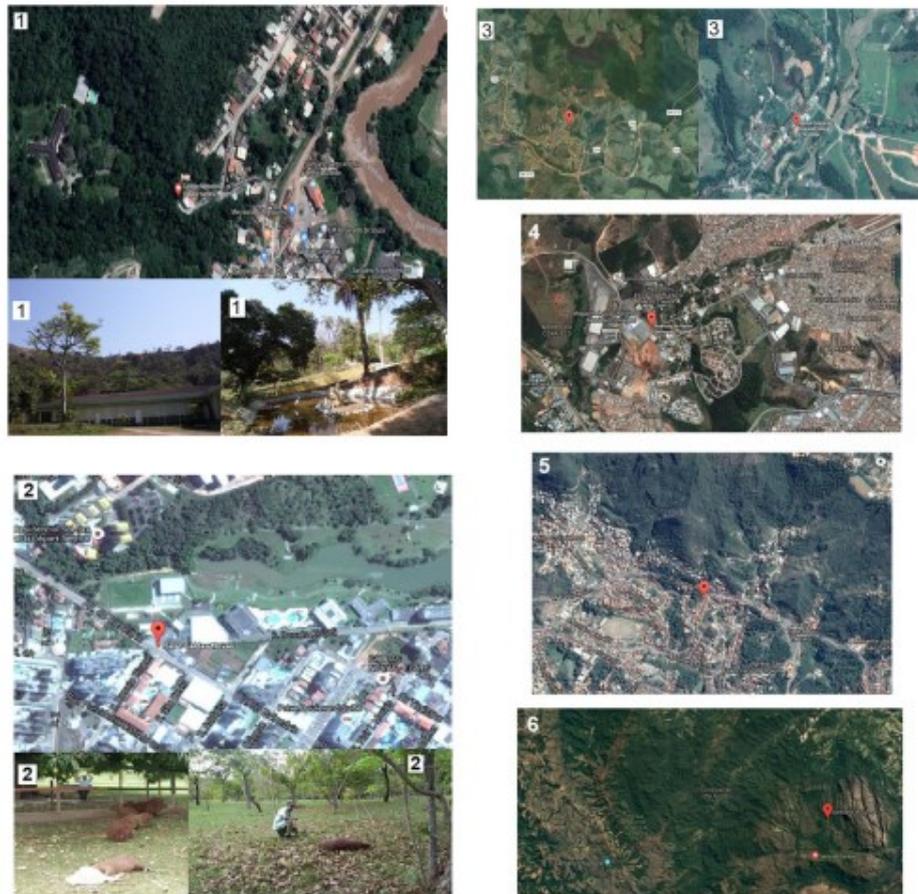


Fig. 2 Landscape overview of the studied areas. **1** Sabará, located in the Metropolitan Region of Belo Horizonte (Capital of Minas Gerais State), represents a transition environment between the Atlantic Forest and the Savannah biomes, having also great anthropogenic influence; **2** Caldas Novas (Goiás State) has a predominant Savannah biome. The sampling site is located in an urban area, surrounded by fragments of forest; **3** Serro, located in the Jequitinhonha Valley, central region of Minas Gerais State, in a transition area between the Atlantic Forest and the Savannah biomes; **4** Contagem, also part of the Metropolitan Region of Belo Horizonte, in a transition environ-

ment between the Atlantic Forest and the Savannah biomes similar to Sabará, suffering from anthropogenic influence; **5** Ouro Preto, a historic city of Minas Gerais State, located in Serra do Espinhaço, Atlantic forest biome. It is located in the metallurgical zone of the State, where the economy is based mainly on mining activities; **6** Serra do Caraça, a tourist site classified as a private reserve of natural heritage, also located in Serra do Espinhaço. The Serra do Caraça has predominant vegetation from Atlantic Forest, with areas of Savannah and elevation fields

filters (Millipore) to remove bacteria and other larger particles. Samples were screened using a real-time PCR (qRT-PCR) targeting the highly conserved NS5 gene for flaviviruses [27]. The viral RNA was used for cDNA synthesis by using Moloney murine leukemia virus (MMLV) reverse transcriptase (Promega, Corp., Madison, WI) and random primers (Thermo Fisher Scientific Corporation). The resulted cDNA was used as template for molecular assays. The qPCR was performed with a commercial mix (SYBR® Green PCR Master Mix, Life Technologies, Carlsbad, USA). Briefly, a denaturation cycle at 95 °C for 10 min was followed by 45 cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min, and finally, a dissociation curve with heating from 65 to 95 °C. We further used conventional

RT-PCR targeting the core-pre-membrane (CprM) region [28]. The molecular assays were performed in serum and liver samples from all rodents.

Table 1 displays the species of wildlife rodents captured during the study, distributed according to the different locations. Most of sampled animals belong to the species *Necromis lasiurus* ($n = 41$; 27.3%), followed by *Akodon cursor* ($n = 33$; 22.0%). Other species are described in Table 2, as well as their ecological characteristics. All animals tested by both serological and molecular techniques were negative for the presence of neutralizing antibodies against YFV and YFV RNA.

In this study, we investigated YFV circulation in wildlife rodents belonging to different species, captured in

Fig. 3 A work flow chart highlighting the steps and methods employed in this study

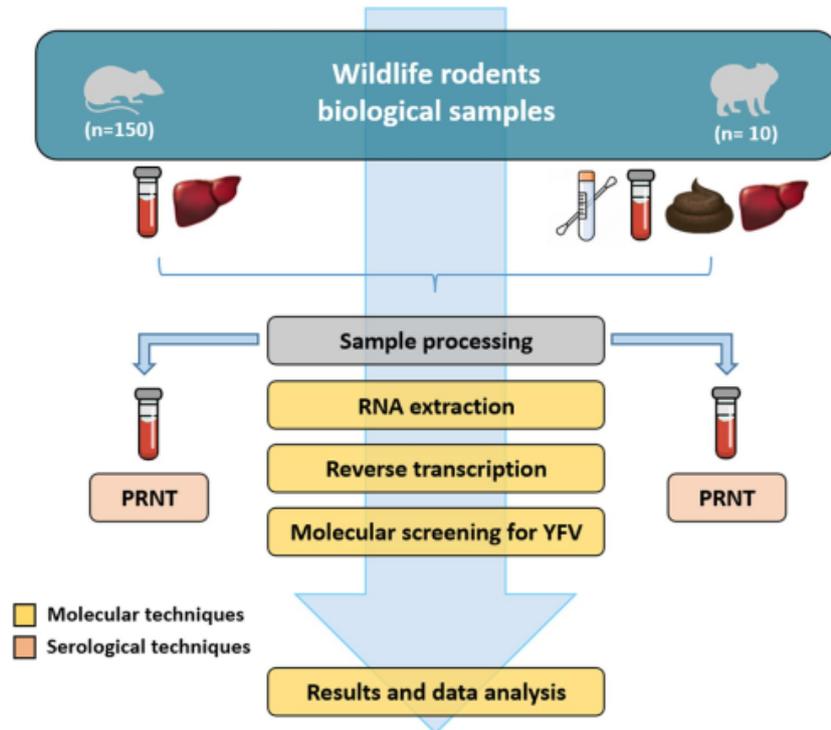


Table 2 Ecological characteristics of wildlife rodents and capybaras analyzed in this study

Family	Genus	Locomotion	Diet	Distribution in the Brazilian biomes
<i>Cricetidae</i>	<i>Cerradomys</i>	Terrestrial	Frugivorous, granivorous	Atlantic forest, Savannah, Caatinga, Pantanal
<i>Cricetidae</i>	<i>Necomys</i>	Terrestrial	Frugivorous, omnivorous	Amazon, Atlantic forest, Savannah, Caatinga, Pantanal, Pampa
<i>Cricetidae</i>	<i>Nectomys</i>	Semi-aquatic	Omnivorous	Amazon, Atlantic forest
<i>Muridae</i>	<i>Mus</i>	Terrestrial	Omnivorous	Amazon, Atlantic forest, Savannah, Caatinga, Pantanal, Pampa
<i>Cricetidae</i>	<i>Oligoryzomys</i>	Scansorial	Frugivorous, granivorous	Atlantic forest, Savannah, Caatinga, Pantanal, Pampa
<i>Cricetidae</i>	<i>Oxymycterus</i>	Semi-fossorial	Insectivorous	Atlantic forest
<i>Echymidae</i>	<i>Trinomys</i>	Terrestrial	Frugivorous, granivorous	Atlantic forest, Savannah, Caatinga
<i>Cricetidae</i>	<i>Calomys</i>	Terrestrial	Frugivorous, granivorous	Atlantic forest, Savannah, Caatinga, Pampa
<i>Cricetidae</i>	<i>Oecomys</i>	Arboreal	Frugivorous, seed predator	Atlantic forest, Savannah, Caatinga, Pantanal
<i>Cricetidae</i>	<i>Akodon</i>	Terrestrial	Insectivorous, omnivorous	Atlantic forest, Savannah, Caatinga, Pantanal, Pampa
<i>Sciuridae</i>	<i>Guerlinguetus</i>	Scansorial	Frugivorous, granivorous, omnivorous	Amazon, Atlantic forest, Savannah, Caatinga, Pampa
<i>Caviidae</i>	<i>Hydrochoerus</i>	Terrestrial and semi-aquatic	Herbivore	Amazon, Atlantic forest, Savannah, Caatinga, Pantanal, Pampa

different environments, and our results show no serological or molecular evidence for YFV circulation among them, suggesting no enzootic transmission of YFV in the sampled regions during 2011–2016. However, negative results cannot exclude the chance of viral circulation in specific areas, and this result may be related to the non-epidemic period.

Indeed, the wildlife rodents studied here were captured during 2011–2015 in Serro, Ouro Preto, Serra do Caraça, Sabará, and Contagem, out of the epidemic period. Furthermore, it is important to highlight that the lower levels of residual viremia at the time of sample collection or even the non-susceptibility of the analyzed species could contribute

to the negative results. Another possible explanation for the absence of YFV circulation is that some animals might have been exposed to YFV but were not captured during our time frame.

Our findings also raise some hypotheses that can be considered in explaining the lack of evidence for YFV circulation in wild mammals in Cerrado and Atlantic Forest biomes from Brazil. The lack of detection of YFV in the wildlife animals by molecular techniques could be due to the non-viremia at the time of sample collection or even due to the non-susceptibility of the sampled species. It is also important to note that due to the short viremic period generally observed in arboviruses, the detection of YFV in healthy wild animals and in non-epizootic periods is difficult to be performed [29, 30]. Furthermore, it is important to highlight that the PCR approach proposed by Patel and colleagues [27] uses a Panflavivirus type reaction, being capable of detecting multiple flaviviruses including not only YFV, but dengue virus (DENV) and Zika virus (ZIKV), which are also endemic in Brazil. Therefore, this screening strategy allowed us to carry out a second evaluation for the circulation of other important arboviruses in the wildlife mammals that proved negative. On the other hand, the majority of animals tested here are terrestrial and very few species are arboreal (Table 1), which means they would not be close enough to YFV vectors at the treetops.

Nevertheless, our results contrast with previous studies highlighting the importance of wild animals (including rodents) as flavivirus carriers [6, 17, 18, 31, 32]. Besides non-human primates, neutralizing anti-YFV antibodies have been found in wild mammals such as agouti and porcupine (Rodents), peccary (Artiodactyl), tayra (Carnivore), two-toed and three-toed sloths, and anteater (Xenarthrans) [17]. These data reinforce that other mammal species, not only humans and NHP, can be potential hosts or reservoirs for YFV.

On the other hand, our results are consistent with similar studies that have also found no evidence of flavivirus circulation in mammalian hosts different from those already described in the sylvatic cycles [30, 33–35]. Considering that rodents are the largest order of mammals and are described as zoonotic reservoirs for several pathogens [36, 37], the survey of Sotomayor-Bonilla and co-workers [34], carried out in Mexico, investigated mosquito-borne flaviviruses using serological and molecular assays in 14 rodent and 21 bat species. However, similar to our results, they showed no evidence of flavivirus circulation in these mammals.

Although we found no evidences of YFV circulation in wildlife in some regions of Cerrado and Atlantic Forest biomes of Brazil, our results cannot rule out the possibility of rodents and other mammals' species to potentially act as YFV hosts. Another explanation for the absence of YFV

detection in this study could be the extremely low number of small mammals and capybaras sampled.

Understanding the geographic distribution of YFV would be helpful for environmental public health interventions not only in Brazil but worldwide. Furthermore, the continued surveillance for evidence of YFV infection in the wildlife can contribute in identifying areas of potential risk for viral circulation, in addition to preventing the spillover of wild to urban cycles or spillback and helping the control and prevention of future epidemics. Considering the fact that YF is a zoonosis and cannot be easily eradicated, the monitoring of YFV in wildlife species is an important factor that could be used as a surveillance tool, helping public health authorities and decision makers, especially considering the increased proximity of human populations to viral circulation areas. It is also important to emphasize the importance of ecological studies aiming to elucidate the role of other wild mammals in the viral epidemiological cycle. Moreover, the entomological surveillance of possible vectors is an additional approach to further be explored.

Acknowledgements We thank colleagues from the Laboratório de Vírus (ICB-UFMG) for their excellent technical support. We also thank Iara Apolinário Borges for all the support during the field expeditions. EG Kroon, BP Drumond, AP Paglia, and GS Trindade are researchers from CNPq.

Funding Financial support was provided by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/MCTI) grant number 440593/2016–6, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) Yellow Fever grant 2018, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/MEC), Departamento de Ciência e Tecnologia (DECIT), Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde (SCTIE), and Ministério da Saúde and Pró-Reitoria de Pesquisa/UFMG (PRPq-UFMG).

Declarations

Conflict of interest The authors declare no competing interests.

References

1. Lindenbach BD, Murray CL, Thiel HJ, Rice CM (2013) Flaviviridae. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virol* 6:747–794
2. Douam F, Ploss A (2018) Yellow fever virus: knowledge gaps impeding the fight against an old foe. *Trends Microbiol* 26:913–928
3. Klitting R, Gould EA, Paupy C, De Lamballerie X (2018) What does the future hold for yellow fever virus? (I). *Genes* 9:291
4. Sacchetto L, Silva NIO, Rezende IM, Arruda MS, Costa TA, de Mello ÉM, Oliveira GFG, Alves PA, de Mendonça VE, Stumpp RGAV, Prado AIA, Paglia AP, Perini FA, Lacerda Nogueira M, 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
5. Silva NIO, Sacchetto L, Rezende IM, Trindade GS, LaBeaud AD, Thoisy B, Drumond BP (2020) Recent sylvatic yellow fever virus transmission in Brazil: the news from an old disease. *Vir J* 17:9
 6. Barrett ADT, Higgs S (2007) Yellow fever: a disease that has yet to be conquered. *Annu Rev Entomol* 52:209–229
 7. Pandit OS, Doyle MM, Smart KM, Young CCW, Drape GW, Johnson CK (2018) Predicting wildlife reservoirs and global vulnerability to zoonotic *Flaviviruses*. *Nat Commun* 9:5425
 8. Pinheiro GG, Rocha MN, Oliveira MA, Moreira LA, Andrade Filho JD (2019) Detection of yellow fever virus in sylvatic mosquitoes during disease outbreaks of 2017–2018 in Minas Gerais state, Brazil. *Insects* 10:136
 9. de Oliveira FP, Stoffella-Dutra AG, Barbosa Costa G, Silva de Oliveira J, Dourado Amaral C, Duarte Santos J, Soares Rocha KL, Araújo Júnior JP, Lacerda Nogueira M, Zazá Borges MA, Pereira Paglia A, Desiree LaBeaud A, Santos Abrahão J, Geessien Kroon E, Bretas de Oliveira D, Paiva Drumond B, de Souza Trindade G (2020) Re-emergence of yellow fever in Brazil during 2016–2019: challenges, lessons learned, and perspectives. *Viruses* 12:E1233
 10. 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
 11. Gardner CL, Ryman KD (2010) Yellow fever: a reemerging threat. *Clin Lab Med* 30:237–260
 12. Possas C, Lourenço-de-Oliveira R, Tauil PL, Pinheiro FP, Pissinatti A, Cunha RV, Freire M, Martins RM, Homma A (2018) Yellow fever outbreak in Brazil: the puzzle of rapid viral spread and challenges for immunisation. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 113:e180278
 13. Brasil, Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde (2019) *Febre Amarela: Guia para profissionais da saúde*. Brasília, DF. 1ª edição atualizada, 1ª reimpressão
 14. Brasil, Ministério da Saúde (2018) *Monitoramento do Período Sazonal da Febre Amarela Brasil, 2017/2018*; Informe nº27, Ministério da Saúde, CGDT/DEVIT/SVS/MS: Brasília, Brazil. Available at: <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/outubro/08/Informe-FA.pdf>
 15. de Thoisy B, Silva NIO, Sacchetto L, de Souza TG, Drumond BP (2020) Spatial epidemiology of yellow fever: identification of determinants of the 2016–2018 epidemics and at-risk areas in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis* 14:e0008691
 16. Faria NR, Kraemer MUG, Hill SC, Jesus JG, Aguiar RS, Iani FCM, Xavier J, Quick J, du Plessis L, Dellicour S, Thézé J, Carvalho RDO, Baele G, Wu CH, Silveira PP, Arruda MB, Pereira MA, Pereira GC, Lourenço J et al (2018) Genomic and epidemiological monitoring of yellow fever virus transmission potential. *Science* 361:894–899
 17. Thoisy B, Dussart P, Kazanji M (2004) Wild terrestrial rainforest mammals as potential reservoirs for flaviviruses (yellow fever, dengue 2 and St Louis encephalitis viruses) in French Guiana. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 98(7):409–412
 18. Thoisy B, Lacoste V, Germain A, Muñoz-Jordán J, Colón C, Mauffrey JF, Delaval M, Catzeffis F, Kazanji M, Matheus S, Dussart P, Morvan J, Setién AA, Deparis X, Lavergne A (2009) Dengue infection in neotropical forest mammals. *Vector Borne and Zoonotic Dis* 9:157–170
 19. Rezende IM, Sacchetto L, Munhoz de Mello É, Alves PA, Iani FCM, Adelino TÉR, Duarte MM, Cury ALF, Bernardes AFL, Santos TA, Pereira LS, Dutra MRT, Ramalho DB, de Thoisy B, Kroon EG, Trindade GS, Drumond BP (2018) Persistence of yellow fever virus outside the Amazon Basin, causing epidemics in Southeast Brazil, from 2016 to 2018. *PLoS Negl Trop Dis* 12:e0006538
 20. Abreu FVS, Delatorre E, Dos Santos AAC, Ferreira-de-Brito A, de Castro MG, Ribeiro IP, Furtado ND, Vargas WP, Ribeiro MS, Meneguete P, Bonaldo MC, Bello G, Lourenço-de-Oliveira R (2019) Combination of surveillance tools reveals that yellow fever virus can remain in the same Atlantic Forest area at least for three transmission seasons. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 114:e190076
 21. Brasil, Ministério da Saúde (2015) *Reemergência da febre amarela silvestre no Brasil, 2014/2015: situação epidemiológica e a importância da vacinação preventiva e da vigilância intensificada no período sazonal*. Boletim Epidemiológico 46(29). Available at <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2015/outubro/19/2015-032%2D%2D-FA-ok.pdf>
 22. Mills JN, Yates TL, Childs JE, Parmenter RR, Ksiazek TG, Rolli PE (1995) Guidelines for working with rodents potentially infected with hantavirus. *Wildlife Disease and Zoonotics* 76:716–722
 23. World Health Organization (2007) *Guidelines for plaque reduction neutralization testing of human antibodies to dengue viruses*. Department of Immunization, Vaccines and Biologicals
 24. Maeda A, Maeda J (2013) Review of diagnostic plaque reduction neutralization tests for flavivirus infection. *Vet J* 195:33–40
 25. Barbosa Costa G, Marinho PES, Vilela APP, Saraiva-Silva AT, Crispim AC, Borges IA, Dutra AGS, Lobato ZIP, Dos Reis JKP, de Oliveira DB, Drumond BP, Kroon EG, Trindade GS (2019) Silent circulation of Saint Louis encephalitis virus among humans and equids, Southeast Brazil. *Viruses* 11:1029
 26. Dutra LAL, Almeida GMF, Oliveira GP, Abrahão JS, Kroon EG, Trindade GS (2017) Molecular evidence of orthopoxvirus DNA in capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) stool samples. *Arch Virol* 162:439–448
 27. 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. *Vir J* 10:58
 28. Jorge TR, Mosimann ALP, Noronha L, Maron A, dos Santos CND (2017) Isolation and characterization of a Brazilian strain of yellow fever virus from an epizootic outbreak in 2009. *Acta Trop* 166:114–120
 29. Kerkhof K, Falconi-Agapito F, Van Esbroeck M, Talledo M, Arién KK (2019) Reliable serological diagnostic tests for arboviruses: feasible or utopia? *Trends Microbiol* 28:276–292
 30. Pauvolid-Corrêa A, Gonçalves Dias H, Marina Siqueira Maia L, Porfírio G, Oliveira Morgado T, Sabino-Santos G, Helena Santa Rita P, Teixeira Gomes Barreto W, Carvalho de Macedo G, Marinho Torres J, Arruda Gimenes Nantes W, Martins Santos F, Oliveira de Assis W, Castro Rucco A, Mamoru Dos Santos Yui R, Bosco Vilela Campos J, Rodrigues Leandro E Silva R, da Silva Ferreira R, Aparecido da Silva Neves N, Charlles de Souza Costa M, Ramos Martins L, Marques de Souza E, Dos Santos Carvalho M, Gonçalves Lima M, de Cássia Gonçalves Alves F, Humberto Guimarães Riquelme-Junior L, Luiz Batista Figueiró L, Fernandes Gomes de Santana M, Gustavo Rodrigues Oliveira Santos L, Serra Medeiros S, Lopes Seino L, Hime Miranda E, Henrique Rezende Linhares J, de Oliveira Santos V, Almeida da Silva S, Araújo Lúcio K, Silva Gomes V, de Araújo Oliveira A, Dos Santos Silva J, de Almeida Marques W, Schafer Marques M, Junior França de Barros J, Campos L, Couto-Lima D, Coutinho Netto C, Strüssmann C, Panella N, Hannon E, Cristina de Macedo B, Ramos de Almeida J, Ramos Ribeiro K, Carolina Barros de Castro M, Pratta Campos L, Paula Rosa Dos Santos A, Marino de Souza I, de Assis Bianchini M, Helena Ramiro Correia S, Ordonez Baptista Luz R, Dos Santos Vieira A, Maria de Oliveira Pinto L, Azeredo E, Tadeu Moraes Figueiredo L, Augusto Fonseca Alencar J, Maria Barbosa de Lima S, Miraglia Herrera H, Dezengrini Shlessarenko R, Barreto Dos Santos F, Maria Bispo de Filippis A,

- Salzer S, Montgomery J, Komar N (2019) Zika virus surveillance at the human–animal interface in west-Central Brazil, 2017–2018. *Viruses* 11:E1164
31. Thompson NN, Auguste AJ, Coombs D, Blitvich BJ, Carrington CV, da Rosa AP, Wang E, Chadee DD, Drebot MA, Tesh RB, Weaver SC, Adesiyun AA (2012) Serological evidence of flaviviruses and alphaviruses in livestock and wildlife in Trinidad. *Vector Borne and Zoonotic Dis* 12:969–978
 32. Jalal S, Jha B, Kim CM, Yun NR, Kim YS, Park JW, Chung JK (2019) Molecular detection of viruses causing hemorrhagic fevers in rodents in the south-west of Korea. *J Neuro-Oncol* 25:239–247
 33. Cabrera-Romo S, Max Ramirez C, Recio-Tótoro B, Tolentino-Chi J, Lanz H, Del Ángel RM, Sánchez-Cordero V, Rodríguez-Moreno Á, Ludert JE (2016) No evidence of dengue virus infections in several species of bats captured in central and southern Mexico. *Zoonoses Public Health* 63:579–583
 34. Sotomayor-Bonilla J, García-Suárez O, Cigarroa-Toledo N, Cetina-Trejo RC, Espinosa-García AC, Sarmiento-Silva RE, Machain-Williams C, Santiago-Alarcón D, Mazari-Hiriart M, Suzán G (2018) Survey of mosquito-borne flaviviruses in the Cuitzmala River basin, Mexico: do they circulate in rodents and bats? *Trop Med Health* 46:35
 35. Bittar C, Machado RRG, Comelis MT, Bueno LM, Morielle-Versute E, Beguelini MR, de Souza RP, Nogueira ML, Rahal P (2018) Lack of serological and molecular evidence of arbovirus infections in bats from Brazil. *PLoS One* 13:e0207010
 36. Drewes S, Straková P, Drexler JF, Jacob J, Ulrich R (2017) Assessing the diversity of rodent-borne viruses: exploring of high-throughput sequencing and classical amplification/sequencing approaches. *Adv Virus Res* 99:61–108
 37. Olival KJ, Hosseini PR, Zambrana-Torrel C, Ross N, Bogich TL, Daszak P (2017) Host and viral traits predict zoonotic spillover from mammals. *Nature* 546:646–650

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



RAPID COMMUNICATION

Transboundary and Emerging Diseases

WILEY

Circulation of vaccinia virus in southern and south-eastern wildlife, Brazil

Pedro Starling Pereira Martins da Costa¹ | Jaqueline Silva Oliveira¹ | Iago José da Silva Domingos¹ | Pedro Henrique Bastos e Silva¹ | Ana Gabriella Stoffella Dutra¹ | Carolina Dourado Amaral¹ | Jônatas Santos Abrahão¹ | Virgínia Bodelão Richini Pereira² | Erna Geessien Kroon¹ | Galileu Barbosa Costa³ | Giliane de Souza Trindade¹

¹Laboratório de Vírus, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. Av Antônio Carlos, Pampulha, Belo Horizonte, Brazil

²Bauru II Regional Laboratory Center, Adolfo Lutz Institute, Bauru, São Paulo, Brazil

³Department of Pediatrics, Washington University School of Medicine, Saint Louis, MO, USA

Correspondence

Giliane de Souza Trindade, Laboratório de Vírus, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. Av Antônio Carlos, nº 6627, Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais, CEP: 31270-901, Brazil.
Email: giliane@icb.ufmg.br

Funding information

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais; Pró-Reitoria de Pesquisa/UFMG (PRPq-UFMG)

Abstract

We evaluated 345 wild animals from southern and south-eastern Brazil to understand their role in vaccinia virus (VACV) transmission cycle. VACV DNA was detected in rodents, marsupials, chiroptera and cingulate, expanding the knowledge of VACV host range in wildlife that could potentially act as source of infection in rural and urban areas.

KEYWORDS

ecological maintenance, molecular detection, vaccinia virus, VACV epidemiology, wildlife

1 | INTRODUCTION

Vaccinia virus (VACV) is a zoonotic agent of wide geographic distribution in several countries of South America, especially in Brazil where it is responsible for a disease called bovine vaccinia (BV) (Oliveira et al., 2017). BV has been predominantly reported in rural areas, affecting mainly dairy cattle and humans, being a burden

to public health and local dairy economies (Oliveira et al., 2017). Additionally, VACV has also been detected in other species present in the rural environment (equids and buffaloes) (Lima et al., 2019) and domestic animals in urban areas (dogs and cats) (Costa et al., 2018; Oliveira et al., 2017). However, VACV natural history and circulation in wildlife are still poorly explored (Miranda et al., 2017; Oliveira et al., 2017).

Pedro Starling Pereira Martins da Costa and Jaqueline Silva Oliveira contributed equally to this study.

Few studies have documented the circulation of VACV in synanthropic and wild rodents (Abrahão et al., 2009; Miranda et al., 2017), and also in other sylvatic animals such as primates, marsupials and coatis (Abrahão et al., 2009; Costa et al., 2018; Lima et al., 2019; Miranda et al., 2017; Oliveira et al., 2017). Aiming to include the wildlife in the VACV transmission cycle, ecological models have been proposed (Costa et al., 2017, 2018; Lima et al., 2019; Oliveira et al., 2017). According to the models, sylvatic animals could potentially act in VACV transmission between rural, wild and even urban environments (Abrahão et al., 2009; Costa et al., 2018; Lima et al., 2019; Oliveira et al., 2017). Furthermore, VACV could also circulate silently in areas with very few cattle herd and anthropogenic disturbance (Kurth et al., 2008). Hence, studies focused on VACV circulation in wildlife could add information regarding its ecoepidemiology, assessing the risks of VACV spreading from the wild to rural and urban areas, as well documented for Cowpox virus in Europe (Essbauer, Pfeffer, & Meyer, 2010; Kroon et al., 2016).

2 | MATERIALS AND METHODS

We retrospectively analysed a total of 345 DNA samples extracted from the liver of wild animals captured during 2007–2011 in southern and south-eastern areas of Brazil (Figure 1). In these sampled areas, VACV outbreaks are frequently reported in São Paulo state and Rio Grande do Sul state. This study was approved by the Animal Ethics Committee of the Instituto Adolfo Lutz (protocol no. 2/2015 and

2/2017) and Animal Ethics Committee of the Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (protocol no. 211/2008). Moreover, it is in accordance with the Brazilian Institute of Environment and Renewable Natural Resources' (IBAMA) normative statement n. 119 of 11 October 2006, chapter VI, art 0.26. Liver samples were manually fractionated with disposable surgical blades or scalpels and processed mechanically by using Mini-Beadbeater-24 BioVortexer™ homogenizer (Biospec Products, Bartlesville, USA). Samples were submitted for DNA extraction using the Illustra Tissue & Cells genomic Prep Mini Spin kit (GE Healthcare, Chicago, USA) in Instituto Adolfo Lutz and send to Laboratório de Vírus at Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). To detect VACV DNA, we performed a semi-nested PCR targeting the C11R gene (viral growth factor; vgf) and a real-time PCR to A56R gene (hemagglutinin) has been used in genetic analyses for VACV differentiation (Kroon et al., 2016; Peres et al., 2018).

We directly sequenced the amplified fragments in both orientations and in duplicate by using the ABI3130 platform (Applied Biosystems—Thermo Fisher Scientific, Foster City, USA). Sequences were aligned with other reference sequences from GenBank by using MEGA 7.0 software.

3 | RESULTS AND DISCUSSION

A large diversity of wild animals such as rodents, non-human primates, marsupials, carnivores, chiropterans, placental mammals, lagomorph, cingulate and artiodactyl mammals were screened

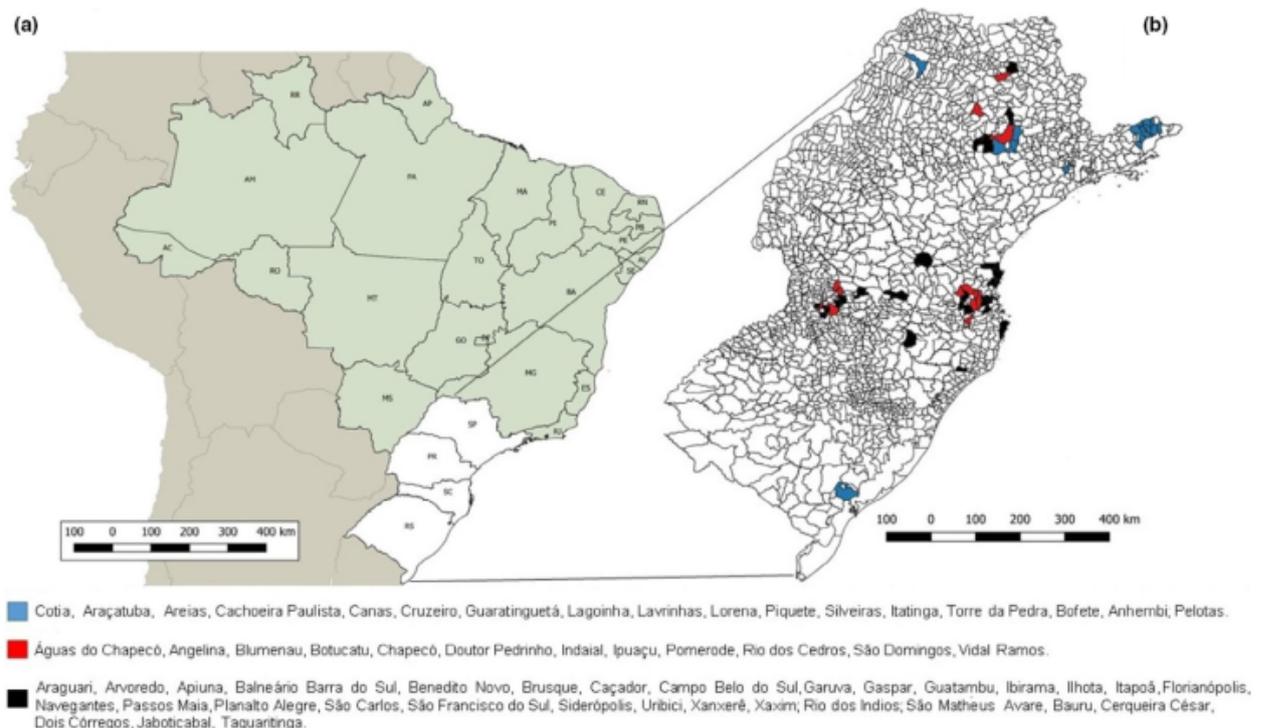


FIGURE 1 (a) Area of vaccinia virus study in wild animals, Brazil. States of southern and south-eastern regions of Brazil where samples were collected. (b) The municipalities sampled present a black colour. Red indicates municipalities where animals were positive

(Table 1). A total of 12 animals (3.5%) being rodents, non-human primates, marsupials and cingulate tested positive for C11R gene, in which *Euphractus sexcintus* and *Akodon* sp. had amplicons sequenced. Alignment of the C11R fragments showed highly similarity (90%–100%) to the homologous gene of orthopoxviruses, including VACV strains isolated from Brazil (Figure 2). Additionally, 18 animals (5.2%) tested positive for A56R gene. Of these, we detected the VACV in two bats (*Molossus rufus* and *Eumops perotis* species), both sampled in Botucatu city, São Paulo state. The VACV circulation in bats has never been explored in Brazil before. Alignment of the amplified A56R fragments showed 100% similarity to the homologous gene of VACV isolates from Brazil (Figure 3) and the presence of an

18-nt signature deletion, which is present in sequences of mouse non-virulent Brazilian-VACV strains (group 1 Brazilian VACV).

These findings reinforce the hypothesis that VACV can widely circulate in wild environments in Brazil, potentially infecting a wide range of hosts. The detection of VACV in *Akodon montensis*, a species with generalist habits, corroborates the participation of rodents in VACV epidemiological cycle as previously described (Abrahão et al., 2009; Miranda et al., 2017). Furthermore, the detection of VACV in *Molossus rufus*, a forest bat that also possesses synanthropic habits, reinforces the hypothesis that these wild animals could act as sources of transmission of wildlife viruses (Abrahão et al., 2009; Costa et al., 2018). It is important to emphasize that the wildlife animals included

TABLE 1 Molecular detection of vaccinia virus in wildlife in southern and south-eastern Brazil

Order	Families	Species	No. of tested animals	No. of positive animals	
				C11R	A56R
Artiodactyla	Cervidae		1	0	0
Carnivora	Felidae	<i>Cerdocyon thous</i> , <i>Procyon cancrivorus</i> , <i>Nasua nasua</i> ,	23	0	0
	Canidae	<i>Galictis cuja</i>			
	Mustelidae	<i>Leopardus trigrinus</i> , <i>Puma yagouaroundi</i>			
	Procyonidae	<i>Leopardus wiedii</i> , <i>Puma concolor</i> <i>Lontra longicaudis</i>			
Chiroptera	Molossidae	<i>Eumops perotis</i> , <i>Tadarida brasiliensis</i>	20	0	2
	Phyllostomidae	<i>Molossus molossus</i> , <i>Molossus rufus</i> , <i>Eumops glaucinus</i> , <i>Artibeus obscurus</i> , <i>Artibeus lituratus</i>			
Cingulata	Dasypodidae	<i>Euphractus sexcintus</i> , <i>Dasypus novemcinctus</i>	3	1	0
Didelphimorphia	Didelphidae	<i>Didelphis albiventris</i> , <i>Monodelphis</i> sp.	31	2	3
	Marmosidae	<i>Micoureus paraguayanus</i> <i>Philander frenatus</i> , <i>Didelphis aurita</i> <i>Gracilinanus microtarsus</i> , <i>Lutreolina crassicaudata</i>			
Lagomorpha	Leporidae	<i>Lepus europaeus</i>	5	0	1
Pilosa	Myrmecophagidae	<i>Tamandua tetradactyla</i> , <i>Myrmecophaga tridactyla</i>	12	0	0
Primates	Cebidae	<i>Saimiri sciureus</i> , <i>Alouatta guariba</i>	47	1	1
	Atelidae	<i>Callithrix</i> sp., <i>Alouatta belzebul</i>			
	Callitrichidae	<i>Alouatta seniculus</i> , <i>Ateles chamek</i>			
	Cercopithecidae	<i>Ateles marginatus</i> , <i>Ateles paniscus</i> <i>Cebus albifrons</i> , <i>Erythrocebus patas</i>			
		<i>Lagothrix lagotricha</i> , <i>Alouatta caraya</i> <i>Mandrillus sphinx</i> , <i>Alouatta fusca</i> <i>Papio hamandryas</i> , <i>Papio papio</i>			
Rodentia	Echimyidae	<i>Nectomys</i> sp., <i>Akodon montensis</i>	203	8	11
	Muridae	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>			
	Cricetidae	<i>Oligoryzomys nigripes</i> , <i>Cavia aperea</i>			
	Caviidae	<i>Thaptomys nigrita</i> , <i>Delomys</i> sp., <i>Oxymycterus</i> sp., <i>Scapteromys</i> sp.			
		Sciuridae			
	Erethizontidae	<i>Sooretamys angouya</i> <i>Guerlinguetus aestuans</i> <i>Sooretamys angouya</i> <i>Nectomys squamipes</i>			
		<i>Sphiggurus spinosus</i> , <i>Rattus rattus</i>			

Note: †: Positive species in molecular screening

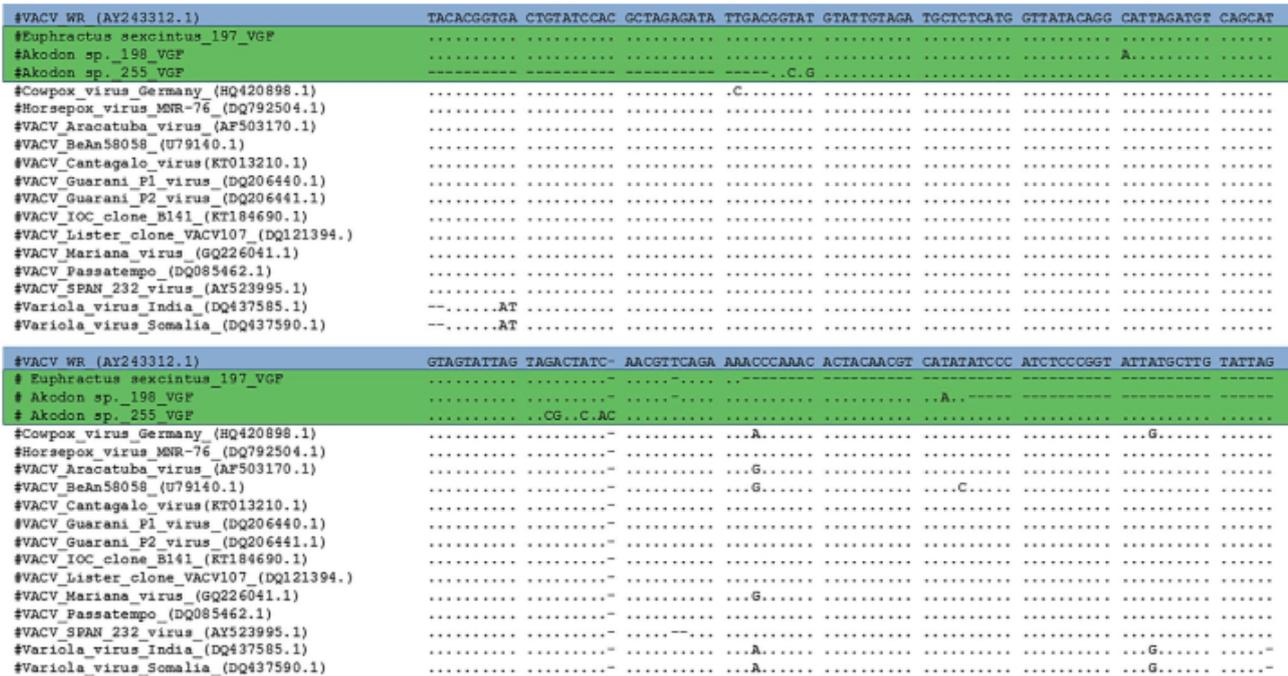


FIGURE 2 Green indicates nucleotide sequence of the vaccinia virus C11R gene found in two rodents (*Akodon* sp.) and one cingulate (*Euphractus sexcintus*) and in blue the sequence of VACV-WR compared with homologous sequences of several other orthopoxviruses

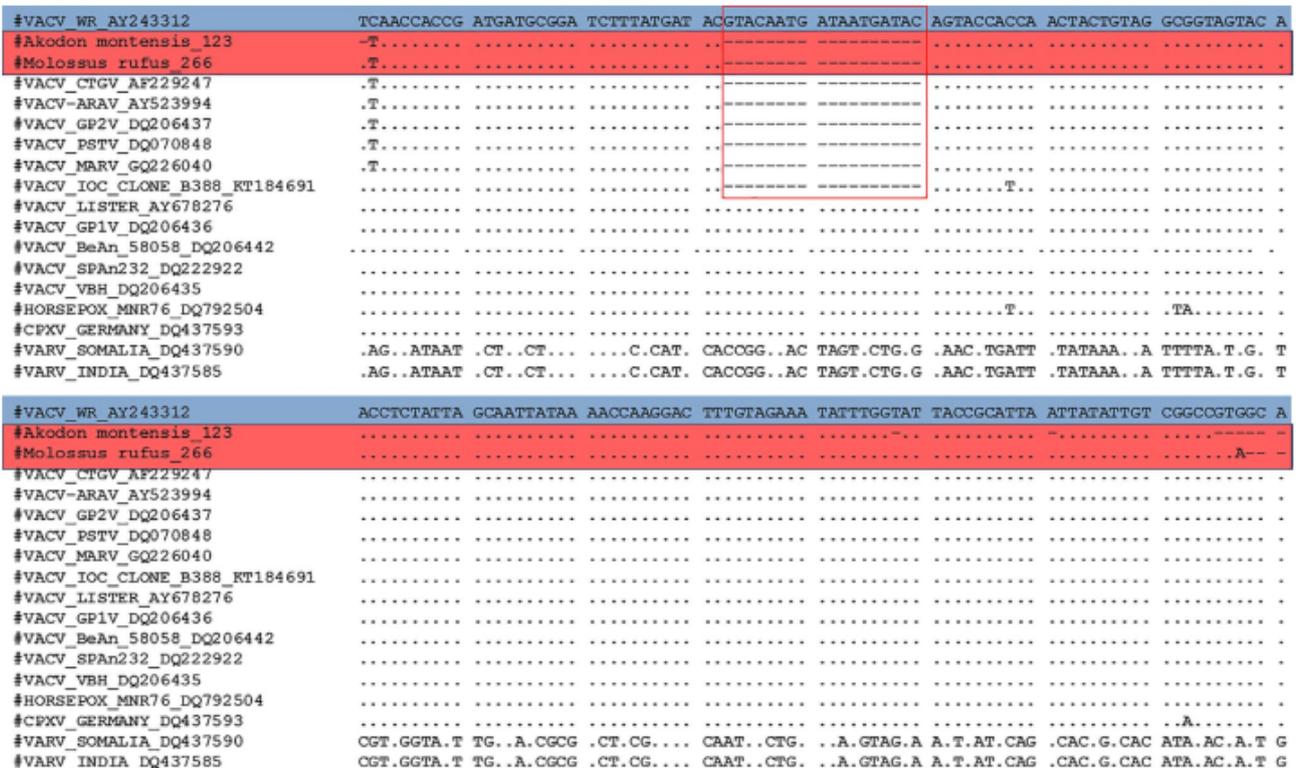


FIGURE 3 Red indicates nucleotide sequence of the vaccinia virus A56R (hemagglutinin) gene found in *Akodon montensis* and *Molossus rufus* species of the marsupials and chiropterans, respectively, compared with homologous sequences of several other orthopoxviruses. Strains containing the conserved deletion region (red) were grouped with other vaccinia viruses (groups 1 and 2) isolated in Brazil

in this study were sampled in areas with ecosystem alterations due to anthropic actions, such as agricultural activity and hydroelectric dam plant construction. These factors could enhance the occurrence of generalist and/or peridomestic species, whose VACV circulation has already been described (Miranda et al., 2017), as well as bringing other wild animals closer to rural and urban areas, thereby expanding their potential to act as sources of VACV exposure to humans and domestic animals. A similar dynamic is well established about the natural circulation of Cowpox virus (CPXV) in Europe. The dynamic comprise wild rodents identified as natural hosts and felids act as intermediate hosts enabling the transmission of CPXV to other animals and even humans (Essbauer et al., 2010; Kurth et al., 2008).

Limitations of our study include lack of clinical information from the sampled animals aiming to evaluate the presence of clinical signs suggestive of VACV infection, absence of serum samples that could allow us estimate the seroprevalence in the wildlife and the absence of viable clinical material for virus isolation. However, our findings provide important information regarding the circulation of VACV in wild environments, contributing to understand the VACV maintenance in the wildlife in the absence of outbreaks. Additional studies should investigate the potential of transmission of specific groups of wild animals (other than rodents) to fully elucidate their role in VACV epidemiological cycle.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank colleagues from the Laboratório de Vírus (ICB-UFMG) for their excellent technical support. Financial support was provided by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) and Pró-Reitoria de Pesquisa/UFMG (PRPq-UFMG). EG Kroon, JS Abrahão and GS Trindade are researchers from CNPq.

CONFLICT OF INTEREST

None to declare.

ORCID

Erna Geessien Kroon  <https://orcid.org/0000-0003-2721-3826>
Galileu Barbosa Costa  <https://orcid.org/0000-0001-7360-6722>
Giliane de Souza Trindade  <https://orcid.org/0000-0003-0785-4298>

REFERENCES

- Abrahão, J. S., Guedes, M. I. M., Trindade, G. S., Fonseca, F. G., Campos, R. K., Mota, B. F. ... Kroon, E. G. (2009). One more piece in the VACV ecological puzzle: Could peridomestic rodents be the link between wildlife and bovine vaccinia outbreaks in Brazil? *PLoS ONE*, 4(10), e7428.
- Costa, G. B., Almeida, L. R., Cerqueira, A. G. R., Mesquita, W. U., de Oliveira, J. S., Miranda, J. B. ... Trindade, G. S. (2018). Vaccinia virus among domestic dogs and wild coatis, Brazil, 2013–2015. *Emerging Infectious Diseases*, 24, 2338–2342.
- Costa, G. B., Laverne, A., Darcissac, E., Lacoste, V., Drumond, B. P., Abrahão, J. S. ... de Souza Trindade, G. (2017). Absence of Vaccinia virus detection in a remote region of the Northern Amazon forests, 2005–2015. *Archives of Virology*, 162, 2369–2378. <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3353-x>
- Essbauer, S., Pfeffer, M., & Meyer, H. (2010). Zoonotic poxviruses. *Veterinary Microbiology*, 140, 229–236.
- Kroon, E. G., Abrahão, J. S., Trindade, G. S., Oliveira, G. P., Franco-Luiz, A. P. M., Costa, G. B. ... Drumond, B. P. (2016). Natural Vaccinia virus infection: Diagnosis, isolation, and characterization. *Current Protocols in Microbiology*, 42:14A.5.1–14A.5.43.
- Kurth, A., Wibbelt, G., Gerber, H. P., Petschaelis, A., Pauli, G., & Nitsche, A. (2008). Rat-to-elephant-to-human transmission of Cowpox virus. *Emerging Infectious Diseases*, 14, 670–671.
- Lima, M. T., Oliveira, G. P., Afonso, J. A. B., Souto, R. J. C., de Mendonça, C. L., Dantas, A. F. M. ... Kroon, E. G. (2019). An update on the known host range of the Brazilian vaccinia virus: An outbreak in buffalo calves. *Frontiers in Microbiology*, 9, 3327.
- Miranda, J. B., Borges, I. A., Campos, S. P. S., Vieira, F. N., de Ázara, T. M. F., Marques, F. A. ... Trindade, G. S. (2017). Serologic and molecular evidence of vaccinia virus circulation among small mammals from different biomes, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, 6, 931–938.
- Oliveira, J. S., Figueiredo, P. O., Costa, G. B., Assis, F. L., Drumond, B. P., da Fonseca, F. G. ... Trindade, G. S. (2017). Vaccinia virus natural infections in Brazil: The good, the bad, and the ugly. *Viruses*, 9, 340.
- Peres, M. G., Bacchiaga, T. S., Appolinário, C. M., Vicente, A. F., Mioni, M. D. S. R., Ribeiro, B. L. D. ... Megid, J. (2018). Vaccinia virus in blood samples of humans, domestic and wild mammals in Brazil. *Viruses*, 10, 42.

How to cite this article: Martins da Costa PSP, Oliveira JS, Domingos IJDS, et al. Circulation of vaccinia virus in southern and south-eastern wildlife, Brazil. *Transbound Emerg Dis*. 2020;00:1–5. <https://doi.org/10.1111/tbed.13537>



Contents lists available at ScienceDirect

Vaccine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vaccine

Absence of YF-neutralizing antibodies in vulnerable populations of Brazil: A warning for epidemiological surveillance and the potential risks for future outbreaks



Ana Gabriella Stoffella-Dutra^{a,*}, Jaqueline Silva de Oliveira^a, Galileu Barbosa Costa^b, Erna Geessien Kroon^a, Jônatas Santos Abrahão^a, Angelle Desiree LaBeaud^c, Betânia Paiva Drumond^a, Danilo Bretas de Oliveira^d, Giliane de Souza Trindade^a

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

^b Núcleo de Epidemiologia e Bioestatística, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fiocruz, Salvador, Brazil

^c Department of Pediatrics, Stanford University School of Medicine, Stanford, CA, USA

^d Faculdade de Medicina, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, Minas Gerais, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 May 2020

Received in revised form 30 July 2020

Accepted 31 July 2020

Available online 9 August 2020

Keywords:

Yellow fever virus

YF-neutralizing antibodies

Epidemiological surveillance

Serological survey

Public health

ABSTRACT

Yellow Fever (YF) is an acute febrile illness caused by yellow fever virus (YFV), a mosquito-borne flavivirus transmitted to humans and non-human primates. In Brazil, YF is a public health threat and may cause recurrent epidemics, even with the availability of a vaccine. We evaluated the sero-status for YFV in 581 individuals living in a risk area for YF in Brazil. The area presents history of cases and is located in the southeast region of country where outbreaks of YF have been reported since 2016. Through, a PRNT assay, we found 25.8% of individuals lacking YF-neutralizing antibodies. Furthermore, neutralizing antibodies were not detected in 10 individuals with proven vaccination. Our findings reinforce the importance of surveillance systems and the need of an urgent intensification of immunization programs in regions with YFV circulation. Monitoring susceptible individuals that could act as potential disseminators for YFV in risk areas should also be considered.

© 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Yellow fever (YF) is a hemorrhagic fever caused by the yellow fever virus (YFV), an arbovirus (arthropod-borne virus) that belongs to the family Flaviviridae, genus Flavivirus [1,2]. YFV is endemic in tropical regions of African and South American countries, where the virus is maintained in wild transmission cycles involving arboreal vector mosquitoes and non-human primates (NHP) [1,3,4]. In South America, the enzootic cycle involves the vectors of genera *Haemagogus* and *Sabethes*, that accidentally may transmit the virus to humans [1,3,5].

Besides the sylvatic cycle, an urban transmission cycle also occurs, characterized by YFV transmission to humans via the *Aedes aegypti* vector [1,6]. In the urban cycle, humans are the primary

host and factors such as immunological susceptibility, high population density in urban centers, high vector density, and climate conditions may favor the transmission of YFV [6,7,8]. The occurrence of urban cycles highlight the potential for viral spread, and the risk of re-urbanization of the disease [7]. Therefore, the vaccination against YFV is the most effective preventive measure, so the development and distribution of the 17D vaccine in the 1930s has been correlated with a reduction of the disease in endemic areas [4,6,9]. In Brazil, the 17DD vaccine sub-lineage is used since 1937, which may have contributed to the elimination of the YF urban cycle in the country (no urban YF cases have been reported since 1942) [4,10,11]. To reduce the risk of outbreaks and the re-urbanization of YF, as well as guarantee the protection of the population, vaccination coverage must reach the $\geq 95\%$ level recommended by the Brazilian Ministry of Health [12].

In 2016, one of the most significant reported epidemics of sylvatic YF began in Brazil and according to the Ministry of Health, 2,115 human cases were confirmed from July 2016 to June 2018 [13]. The outbreaks were mainly concentrated in the states of Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro and Espírito Santo, regions of southeastern Brazil that historically had low circulation of YFV

* Corresponding author at: Laboratório de Vírus, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, Campus Pampulha, CEP: 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

E-mail addresses: anagstoffella@gmail.com (A.G. Stoffella-Dutra), giliane@icb.ufmg.br (G. de Souza Trindade).

<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.07.077>

0264-410X/© 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

in recent years [8,13]. During YFV re-emergence, an expansion in the viral circulation area has been observed. YFV has moved from the Brazilian Amazon, spreading throughout the Cerrado biome, and reaching areas of the Atlantic Forest, which has a high diversity of NHP species and sylvatic vectors [7,11]. Additionally, the south-east region is located within the Atlantic Forest biome, concentrating the most populous urban centers in the country, and several municipalities from this region had low medium vaccination coverage by the time the 2016 outbreak started [7,13,14,15].

Epidemics of YF are a burden for public health and economy, and moreover YFV presents a high potential for dispersion. Therefore, this disease should be considered a potential threat and be actively monitored [8,16,17]. In Brazil, there are few seroprevalence data for YF, and this lack of knowledge represents a gap in understanding the burden of at-risk populations in the country. Seroepidemiological studies contribute to enhance public health actions and strategies that aim to control viral dispersion and to reduce the occurrence of new epidemics in risk areas. Taking into account the re-emergence of YF in the Southeast Brazil and the need of vaccination in risk areas, this study aimed to evaluate the sero-status for YFV in a population located in an area with proven viral circulation.

2. Material and methods

2.1. Study area

This study was carried out in Serro city (18° 36' 17" S 43° 22' 46" W), north-central region of Minas Gerais State, Brazil. Serro city has a population of 20,835 inhabitants, of which 12,895 are urban residents [18]. The local economy is mainly based on agricultural and dairy activities. The area has vegetation covered by Cerrado and Atlantic Forest, with extensive fragmented or mosaic areas due to anthropic action [19–21] (Supplementary Fig. 1).

2.2. Population and study measures

This cross-sectional study was conducted on a random sample of individuals from the urban area of Serro during 2015, 2017, and 2018. Individuals from all neighborhoods were enrolled. Participation in the study was voluntary, no exclusion criteria were used, and individuals of all age groups were enrolled. We additionally included the rural population of Serro sampled during 2012–2013 [22].

For both populations, urban and rural, a semi-structured and pre-coded questionnaire was applied to elicit demographic data. Demographic data included age, gender, self-reported race/ethnicity, occupation, income, and educational level. For samples collected during the YF outbreaks (2017 and 2018), YF exposure/risk factors for the presence of YF-neutralizing antibodies questions were also collected. These factors focused on behavioral habits such as access to forest areas and rural properties, the presence of NHP near to the household, history of vaccination against YF, and past infection with YFV, dengue virus, and Zika virus.

The sample size for the urban population was calculated by using Open-Epi version 3.01 (<https://www.openepi.com>), using an expected prevalence of 50%, alpha error of 5%, accuracy of 10% around the estimate and design effect of 1.0.

2.3. Plaque reduction neutralization test

Serum samples were collected from each participant and stored at -20°C . To assess the presence of YF-neutralizing antibodies we used a plaque reduction seroneutralization test (PRNT), considered the gold standard for the differential diagnosis of flavivirus

infections [23–26]. Initially, the sera were heated at 56°C for 30 min to denature the complement system proteins. Samples were then diluted in Eagle's Minimum Essential Medium (MEM) (GIBCO®, USA) free of fetal bovine sera (FBS) in a proportion of 1:20. Diluted samples were added to a solution (1:1) containing approximately 150 plaque-forming units (PFU) of YFV 17DD (lot 980FPO662). The final solution was homogenized and incubated for 1 h at 37°C , in a 5% CO_2 atmosphere. Six-well plates containing VERO cells (ATCC no. CCL-81) monolayers (80% confluence) were inoculated with virus/serum solutions, and incubated at 37°C for 1 h in 5% of CO_2 atmosphere. Two ml of semi-solid medium (Carboxymethyl cellulose 1% (SYNTH®, Brazil) and 199 2X Medium (CULTILAB, Brazil) with 2% FBS) was added to each well, cell monolayers were incubated for 5 days at 37°C in 5% of CO_2 atmosphere. Vero monolayers were fixed with formalin (10%) (SYNTH®, Brazil) and stained with crystal violet solution (1%) (SYNTH®, Brazil). Each six-well plate included one well reserved for cell control, and all samples were tested in duplicate. A sample was considered positive when the average number of PFUs was lower than half of the PFUs counted in the virus control (at least a 50% reduction in PFUs). The virus control, also known as the negative serum control, was made by using only FBS instead of sera; and submitted to the same protocol.

2.4. Statistical analysis

A descriptive analysis of the results was carried out and comparisons between those participants with and without neutralizing antibodies against YFV using a 2-tailed Fisher's exact test with significance level of 5% ($p \leq 0.05$) by using EPI-INFO software version 7.2 (<http://www.cdc.gov/epiinfo/>). Odds relative and confidence intervals of 95% were also calculated. All those variables that showed a significance level of 5% in the univariate analysis were tested again in a multiple logistic regression model.

2.5. Ethical considerations

This study was approved by the Research Ethics Committee of Universidade Federal de Minas Gerais under the registration protocols FR-413704 and 1.974.249, CAAE-65332216.9. 0000.5149. Informed consent was obtained from all participants. In the case of minors, consent was signed by parents or guardians.

3. Results

3.1. Demographic profile of the study population

A total of 581 individuals were enrolled in this study. Women represented 51.5% of total participants whereas men were 48.5%. The average age of respondents were 38.4 years (ranging from 5 to 94 years), and the majority of them (62.0%) self-reported mixed skin color.

In the urban area, 363 individuals were included, being 54.0% women, the average age of participants was 40.9 years (ranging from 9 to 94 years). Most individuals 63.0% self-reported mixed skin color, 52.0% had completed elementary school, and 38.8% reported received between one and two minimum wages. The most common occupations were general service providers (25.0%) and rural workers (8.8%) (Table 1).

In the rural area, 218 participants were included, being most of them men (52.8%). The median age was 38 years (ranging from 5 to 90 years). Of these, 60.0% self-reported mixed skin color. The majority of participants (74.3%) reported a monthly family income of minimum wage or less, and completed only elementary school (63.7%). The most common reported occupations were rural workers (52.3%) and housewives (25.6%) (Table 2).

Table 1
Demographic characteristics of the 363 surveyed individuals from urban area of Serro city, 2015–2018.

Demographics	N (%) ^a	PRNT ₅₀ pos. (%)	PRNT ₅₀ neg. (%)	P value	OR (95% CI)
Gender					
Female	196 (54,0)	141 (52,8)	55 (57,3)	0.5	1.2 (0.7–1.9)
Male	167 (46,0)	126 (47,2)	41 (42,7)		
Age (years)					
5–11	13 (3,6)	4 (31,0)	9 (69,0)	Reference	
12–18	43 (11,8)	32 (74,4)	11 (25,6)	0.007	6.5 (1.7–25.5)
≥19	307 (84,6)	231 (75,2)	76 (24,8)	0.001	6.8 (2.1–22.8)
Self-reported skin color					
Mixed	232 (64,1)	169 (63,5)	63 (65,6)	Reference	
Black	63 (17,4)	48 (18,0)	15 (15,6)	0.6	0.8 (0.4–1.6)
White	67 (18,5)	49 (18,4)	18 (18,8)	1.0	1.0 (0.5–1.9)
Education					
Have never gone to school	17 (4,7)	12 (4,5)	5 (5,2)	Reference	
Elementary school or less	188 (52,1)	137 (51,5)	51 (53,7)	0.8	1.1 (0.3–3.2)
High school	127 (35,2)	95 (35,7)	32 (33,7)	0.7	1.2 (0.3–3.7)
Higher (college)	29 (8,0)	22 (8,3)	7 (7,4)	0.7	1.3 (0.3–5.1)
Income					
≤ 1 min wage	90 (30,8)	63 (70,0)	27 (30,0)	0.4	0.7 (0.4–1.3)
> 1 min wage	202 (69,2)	152 (75,3)	50 (24,7)		
Occupation					
Rural worker	30 (8,5)	26 (86,7)	4 (13,3)	Reference	
Housewives	67 (18,9)	47 (70,1)	20 (29,9)	0.08	2.7 (0.9–10.2)
Students	56 (15,8)	36 (64,3)	20 (35,7)	0.02	0.3 (0.07–0.9)
Healthcare	20 (5,6)	17 (85,0)	3 (15,0)	<0.001	0.03 (0.005–0.14)
Others [†]	181 (51,1)	113 (73,5)	48 (26,5)	0.06	2.7 (0.9–9.6)

Income value in Brazilian currency in 2018 = R\$ 954.00 (US\$ 1.00 = R\$ 4.09 approximately).

^a Calculated by using T-test

^b Totals may not add up to 100% due to missing data

[†] Others: Lawyer, Announcer, Banking, Notary, Engineer, Businesswoman, Civil Servant, Social Worker, Musician, Teacher and Artist.

Table 2
Characteristics of the 218 surveyed individuals from rural areas of Serro city, 2012–2013.

Variables	N (%) ^a	PRNT ₅₀ pos. (%)	PRNT ₅₀ neg. (%)	P value	OR (95% CI)
Gender					
Female	103 (47,2)	74 (45,1)	29 (53,7)	0.3	1.4 (0.7–2.6)
Male	115 (52,8)	90 (54,9)	25 (46,3)		
Age (years)					
5–11	17 (7,8)	1 (5,9)	16 (94,1)	Reference	
12–18	17 (7,8)	17 (100,0)	0	1	1 (0.06–17.4)
≥19	184 (84,4)	146 (79,3)	38 (20,7)	0.1	0.2 (0.03–1.9)
Self-reported skin color					
Mixed	131 (60,1)	101 (61,6)	30 (55,5)	Reference	
Black	52 (23,8)	43 (26,2)	9 (16,7)	0.4	0.7 (0.3–1.6)
White	35 (16,1)	20 (12,2)	15 (27,8)	0.02	0.4 (0.2–0.9)
Education					
Have never gone to school	22 (10,1)	20 (12,2)	2 (3,7)	Reference	
Elementary school or less	139 (63,8)	103 (62,8)	36 (66,7)	0.08	3.4 (0.9–23.0)
High school or more	57 (26,1)	41 (25,0)	16 (29,6)	0.07	3.8 (0.9–26.9)
Income					
≤ 1 min wage	162 (74,3)	129 (79,6)	33 (20,4)	1.0	0.8 (0.2–2.9)
> 1 min wage	17 (7,8)	14 (82,3)	3 (17,7)		
Occupation					
Rural worker	114 (52,3)	19 (16,7)	95 (83,3)	Reference	
Housewives	56 (25,7)	14 (25,0)	42 (75,0)	0.2	0.6 (0.2–1.3)
Students	32 (14,7)	16 (50,0)	16 (50,0)	0.0002	0.2 (0.08–0.4)
Others [†]	16 (7,3)	5 (31,2)	11 (68,8)	0.2	0.4 (0.1–1.5)
Contact with wildlife					
Yes	107 (49,1)	34 (63,0)	73 (44,5)	0.02	2.1 (1.1–4.0)
No	111 (50,9)	20 (37,0)	91 (55,5)		

Income value in Brazilian currency in 2013 = R\$ 678.00 (US\$ 1.00 = R\$ 4.09 approximately).

^a Calculated by using T-test

^b Totals may not add up to 100% due to missing data

[†] Others: Bricklayer, driver, civil servant and zootechnist.

3.2. Prevalence of YF-neutralizing antibodies

YF-neutralizing antibodies were detected in 431 individuals, representing an overall prevalence rate of 74.2% (CI95%=67.4–

81.4). In the rural population, 164 individuals had YF-neutralizing antibodies, prevalence rate of 75.2% (CI95%=64.4–87.4), while the overall prevalence rate in the urban population was 73.5% (CI95%=65.0–82.9). The prevalence varied by year

among the urban population, 76.9% in 2015, 68.5% in 2017, and 83.16% in 2018 (Supplementary figure 2).

3.3. Individuals susceptible to YFV infection according to the absence of neutralizing antibodies

Fig. 1 displays the distribution of individuals presenting or not YFV-neutralizing antibodies. Considering both rural and urban populations, a total of 25.8% individuals had no detectable neutralizing antibodies against YFV ($n = 150/581$). A total of 54 individuals from rural area (24.8%) were seronegative for YFV-specific neutralizing antibodies. The average age of seronegative individuals was 27.9 years, and 66% of these individuals ($n = 36$) fell into the risk group for YFV infection (19–59 years old). In the urban population, 26.5% of the individuals did not show neutralizing antibodies ($n = 96$). The average age of the seronegative individuals was 39 years, and 58% ($n = 56$) of these individuals belonged to the risk group for YFV infection (19–59 years old).

For the urban population inserted in the YF epidemic period (2017–2018), no individual reported a proven history of YF or Zika, although 0.96% ($n = 3$) reported prior infection with DENV. At the time of collection, none of the participants from the two populations declared clinical alterations.

Considering the two populations, 30 children (5–11 years old) were included in the study, in which 13 from the urban area and 17 were from the rural area. Anti-YF neutralizing antibodies were detected in four children from the urban area, while only one from the rural area had positive serology.

A total of 297 of participants (95.6%) sampled during 2017–2018 reported a history of vaccination against YF. However, only 52 (16.8%) participants validated this information through a

vaccination card, and 59.6% ($n = 31$) has received one dose of YFV-17DD vaccine, 38.5% ($n = 20$) two doses and 1.9% ($n = 1$) three doses. Of those with validated vaccination cards, 10 individuals (19.2%) did not have detectable YFV-neutralizing antibodies. This group consisted of four men and six women, of which the age range varied from 9 years to 62 years. It should be noted, a 18 years old male that tested negative for the presence of neutralizing antibodies and without history of comorbidities had three vaccine doses registered on his vaccination card. Additional information is presented in Table 3. A study population flowchart by collection area and by year is provided in the Supplementary Material.

3.4. Potential risk factors significantly linked to YFV seroprevalence

Potential risk factors related to the YFV exposure are shown in Table 4. For the urban population, only occupation was associated with the presence of YFV-neutralizing antibodies (Table 1). Students and healthcare workers were less likely to present antibodies compared to rural workers ($p = 0.02$, OR = 0.3, 95%CI = 0.07–0.9, and $p = <0.001$, OR = 0.03, 95%CI = 0.005–0.14, respectively).

For the urban population, teenagers (12–18 years) and adults (≥ 19 years) were more likely to present YFV-neutralizing antibodies compared to children (5–11 years) ($p = 0.007$, OR = 6.5, 95%CI = 1.7–25.5 and $p = 0.001$, OR = 6.8, 95%CI = 2.1–22.8, respectively). Individuals who self-declared white skin color were less likely to present antibodies than individuals who self-reported mixed skin color ($p = 0.02$, OR = 0.4, 95%CI = 0.2–0.9). Moreover, students from rural areas were also less likely to present antibodies compared to rural workers ($p = 0.0002$, OR = 0.2, 95%CI = 0.08–0.4). On the other hand, individuals who reported having contact with wild environment were more likely to present YFV-neutralizing antibodies

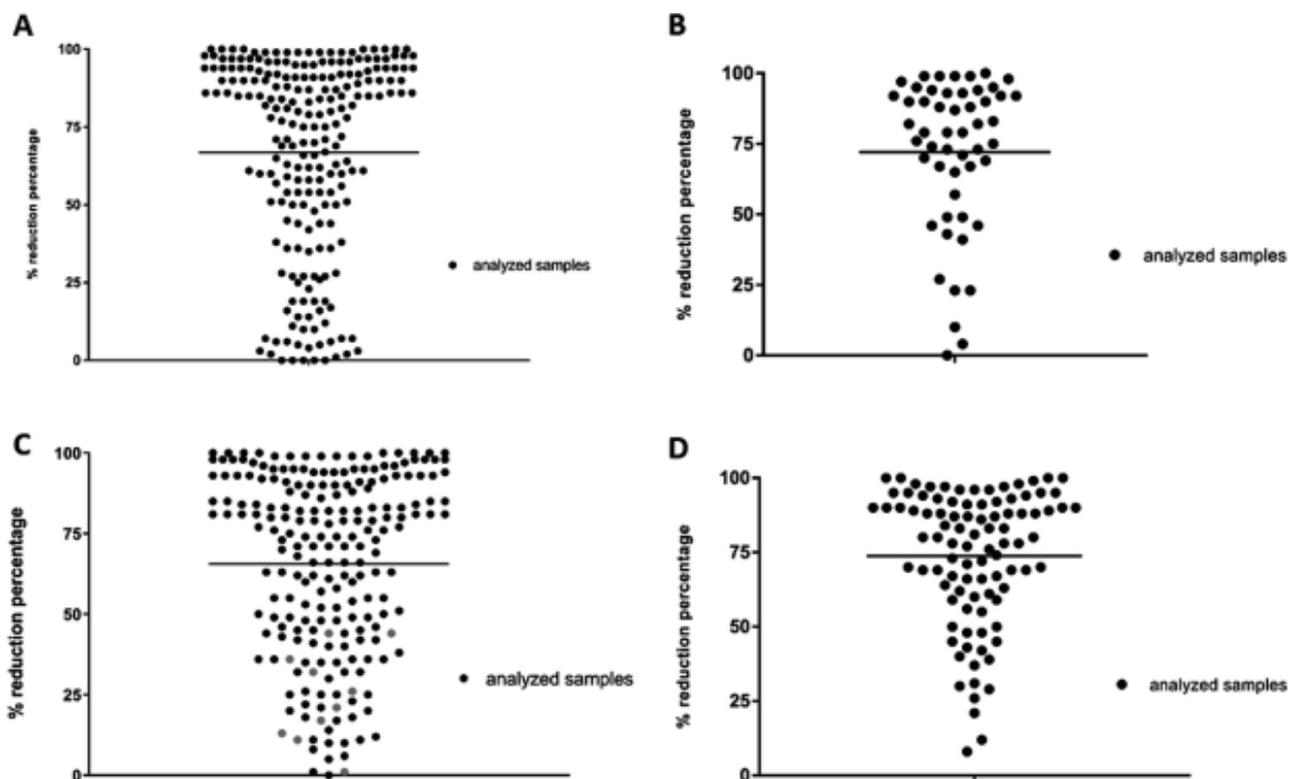


Fig. 1. Scatter plot of percentage reduction of serum samples in relation to virus control. Yellow Fever neutralizing antibodies measured by 50% Plate Reduction Neutralization Test (PRNT). The highlighted line represents the average reduction percentage of all samples. A: Rural Population (2012–2013, $n = 218$); B: Urban Population (2015, $n = 52$); and C: Urban Population (2017, $n = 216$). The red dots are the 10 individuals with validated vaccination cards that did not have detectable neutralizing antibodies. D: Urban Population, (2018, $n = 95$). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Table 3
Participants that had proven YFV vaccination history through vaccination cards and did not show detectable YF-neutralizing antibodies.

Serro area	Collection year	Sample number	Sex	Age	Chronic disease	YF vaccination record dates	PRNT ₅₀
Urban	2017	9	F	51	diabetes and bronchitis	2003–2013	negative
Urban	2017	38	M	9	no	2009–2015	negative
Urban	2017	65	M	62	no	2001	negative
Urban	2017	87	F	15	no	2003	negative
Urban	2017	90	F	12	no	2006	negative
Urban	2017	91	M	10	no	2009–2016	negative
Urban	2017	92	M	18	no	2001 – 2003 – 2011	negative
Urban	2017	108	F	10	no	2008	negative
Urban	2017	113	F	29	no	2003–2015	negative
Urban	2017	117	F	17	no	2001	negative

Table 4
Exposure factors to Yellow Fever virus assessed in 363 surveyed individuals from urban areas of Serro city, 2015–2018.

Exposure factors	N (%) ^a	PRNT ₅₀ pos. (%)	PRNT ₅₀ neg. (%)	P value	OR (95% CI)
Have you visited forest areas?					
Yes	178 (57.2)	134 (43.1)	44 (14.2)	0.3	1.3 (0.8–2.1)
No	131 (42.2)	92 (29.6)	39 (12.5)		
Have you visited rural areas?					
Yes	197 (63.4)	146 (47.0)	51 (16.4)	0.6	1.1 (0.75–1.9)
No	113 (36.3)	81 (26.0)	32 (10.3)		
There were any primates near to the locations you visited?					
Yes	101 (32.5)	75 (24.1)	26 (8.3)	0.7	1.1 (0.6–1.9)
No	200 (64.3)	145(46.6)	55 (17.7)		
Have you received YF vaccine?					
Yes	297 (95.6)	220 (70.7)	77 (24.7)	0.3	2.1 (0.4–10.5)
No	7 (2.2)	4 (1.3)	3 (1.0)		
How many doses of the YF vaccine did you receive?					
1	62 (20.9)	44 (14.8)	18 (6.1)	Reference	
2	125 (42.1)	91 (30.6)	34 (11.4)		
3	14 (4.7)	11 (3.7)	3 (1.0)		

^a Totals may not add up to 100% due to missing data.

compared to those individuals that had no contact with wild environments ($p = 0.02$, $OR = 2.1$, $95\%CI = 1.1–4.0$).

In the multivariate logistic regression model, variables independently associated with neutralizing antibodies were age and contact with wild environment. Older individuals were 5% more likely to present neutralizing antibodies compared to younger individuals ($OR = 1.05$; $CI\ 95\% = 1.03–1.07$). Furthermore, those individuals who reported to have contact with the wild environment were 2.5 more likely to present neutralizing antibodies ($OR = 2.5$, $95\%CI\ 1.2–5.2$) than those who did not have contact with wild environment.

4. Discussion

Significant events of YF re-emergence in southeastern Brazil during 2016–2018 signal that YFV is no longer limited to forest areas and/or Amazon region, but instead that transmission in the enzootic cycle is occurring near and within large urban centers [7,13,27]. The viral spread close to large unvaccinated populations and also individuals who failed to seroconvert shows that the YF burden could be underestimated. The current scenario of YF epidemics reflects the growing concern about re-urbanization of YF [4,7,8].

Here, we demonstrated that a quarter of the population from both the rural and urban areas of Serro city, located at the epicenter of the recent YF epidemic period, showed no protective immunity against YFV. Until 2002, no evidence of YFV circulation was reported in Serro micro-region [20]. However, from December 2002 to march 2003 an YF outbreak was reported, in which Serro recorded 40% of confirmed cases [20,28].

Since the beginning of YF outbreaks in Brazil, vaccination campaigns were intensified, mainly in the southeast region, the

epicenter of the outbreaks, that reported thousands of human cases [13,27]. However, the estimated number of unvaccinated individuals remains high in Minas Gerais state (2,726,228 million) and the recent overall vaccination coverage is only 92.7% [29]. In recent years (during 2007–2019), accumulated vaccination coverage in Serro has improved from 84.3% to 98.7% [30]. Our data showed that similar proportions of urban and rural population are protected from YFV. Importantly, the seroprevalence rates fall far below the accumulated vaccination coverage for Serro during 2007–2019 and below the target of 95% established by the Ministry of Health.

Our findings also demonstrated that older individuals were more likely to present YF-neutralizing antibodies. This result could be linked to the fact that these individuals may have received more doses of the 17DD vaccine throughout their lives compared to younger individuals. These data could in part explain the wild outbreak patterns, where the vast majority of cases are observed in male patients, young adults of economically active age who may not have been vaccinated [13].

Rural workers were more likely to have antibodies than other categories related to occupation, which could be explained by the fact that they were more exposed in the rural and probably wild environments where wild viruses circulate naturally [7,8]. It's important to note that the estimated percentage of YF asymptomatic cases is around 40–65% [31]. However, this fact can also be related to well established vaccination campaigns to this population that historically is known to be at risk of YF disease [7,32]. Considering what we discussed for the rural workers, as expected, individuals that reported contact with the wild environment were also more likely to present YF-neutralizing antibodies.

We have detected a high proportion of seronegative individuals from both urban and rural areas. These data may indicate that

there may be a deficit in vaccination in the municipality, which could result in a large percentage of the population vulnerable to YFV infection. Indeed, in this study we detected a high percentage of individuals (27%) from urban area that did not show YF-neutralizing antibodies during 2017 and 2018. This data suggests that individuals in urban area were susceptible to YFV infection during an ongoing outbreak in Minas Gerais, which could favor the viral spreading in different urban areas and the emergence of new cases.

In summary, we expected a higher seroprevalence of YFV for both rural and urban populations in Serro, which is located in an area at risk for YF and has intensified the vaccination campaigns against YF during the 2017 epidemic. Although accumulated vaccination coverage in Serro has improved since 2007, the current coverage is still not enough, which warns of the need for better surveillance and vaccination campaigns [14,30].

Teenagers and adults were more likely to present YF-neutralizing antibodies compared to children in urban area. We can attribute this correlation to a bias related to the small size of the children (5–11 years) population sampled ($n = 13$). However, the seroprevalence of 16.7% in children for both populations, can be correlated with the differences in immune response observed with age, where seroconversion rates are generally lower in children.

Previous studies have already shown that the seroconversion rate is generally lower in children, with the 17D and 17DD vaccines varying from 67 to 94%, and 89.7–98.2% for adults. This difference may be related to the immaturity of the immune system, which can contribute to less robust immune responses, the presence of maternal antibodies, and simultaneous infections that can interfere or decrease the immune response [33–36].

Our results highlight the need for booster doses of the 17DD vaccine in Brazilian endemic areas to guarantee long lasting protecting immunity, especially for children living in areas at risk for YF transmission. However, it is important to emphasize that the methods used in this study do not allow us to assess the differences in seroprevalence observed regarding age.

Interestingly, we also found that almost 20% of seronegative individuals had proven YFV vaccination history (10/52) which almost two times more than compared to findings reported by Miyaji and colleagues [37]. The rate of seroconversion for the vaccines 17D and 17DD range from 89.7% to 98.2% in adults and from 67% to 94% in children [33]. Other studies have also reported cases of previously vaccinated individuals who developed natural infection [27,38].

According to the literature, some comorbidities can affect the immune response induced by vaccines [39]. So, in our study, there was only one report of comorbidity, being a 51-year-old woman with diabetes and bronchitis, but this result cannot be conclusive. Nevertheless, these data highlight the susceptibility of a group of previously vaccinated individuals to a disease that exhibits a high mortality rate and has no treatment, and reinforces the recommendation for the adoption of vaccine booster doses in Brazil to avoid risk [40]. In the light of these results, the recommendation of the World Health Organization (WHO) for the adoption of only one dose of the vaccine, especially in endemic areas should be reconsidered [40–45].

The 17DD attenuated vaccine has an efficacy of 90%–98%, but not all vaccinated individuals maintain lifelong protection [4,40]. So, the decline of protective immunity by specific neutralizing antibodies over time is a concern. After primary YFV vaccination, the neutralizing antibody levels may decrease significantly in subsequent years [40,44,45]. Unfortunately, further investigation of this hypothesis could not be performed in this study due to the fact that the individuals included in the study did not provide details for their vaccination history.

Outside of epidemic periods, the adoption of at least three doses of 17DD vaccine at a 10-year interval provide a better induction of long-term immunity [40]. Therefore, our findings reinforce the need for re-vaccination of individuals residing in YF endemic areas, since the absence of YF-neutralizing antibodies can indicate waning immunity over time or even failure of vaccination.

Serro is located in a transition area between the biomes of Cerrado and Atlantic Forest, with considerable anthropic actions mainly due to mining, agricultural, and livestock activities [19,20,46]. Thus, the presence of fragmented forest areas and a large part of the population living in rural areas are risk factors that may be related to the emergence of YF cases [7,21]. However, the risk of urban YFV transmission by the *Aedes aegypti* vector in Serro is currently low (0.4% rate of vector infestation), which is considered satisfactory [47].

Few studies are focused on assessing the seroprevalence of Brazilian populations against YF [37,48]. Besides that, vaccine coverage estimates do not always reflect the reality of immune protection of a population; therefore, seroprevalence studies are useful tools to validate these estimates, especially in poorly epidemiologically monitored regions [49,50]. Through the tracking of populations immunity for vaccination against various diseases, these studies help to alert to the existence of immunization failures and susceptible populations [50].

The YF vaccine is able to induce both a strong activation of the humoral response, with the production of neutralizing antibodies, and the immune cellular response [33,51]. Thus, in addition to antibodies, the cellular response also plays an important role in the protection triggered by the YF vaccine, and both types of immune responses can be used as protective markers [40,45]. However, neutralizing antibodies still remain the main correlate of protection against YFV, being the titer of neutralizing antibodies considered the standard to check for postvaccination immunity. Furthermore, studies with animal model also suggest that neutralizing antibodies are efficient against challenge with virulent strains of YFV [51,40].

In addition, our study highlights a gap between calculated vaccine coverage and immune protection. Failure to report possible YF cases to health agencies may contribute to underestimating the magnitude of epidemics and, consequently, the extent of susceptible individuals residing in areas at high risk for viral transmission.

Our study has limitations. We were unable to establish a longitudinal study with the participants, which could provide more information and help to better monitoring immunity to YF in this population. We were also unable to evaluate cross-reactivity between other flaviviruses. However, there was a low incidence of dengue infections during 2007–2012 in the study area, and only nine cases of dengue fever were reported in Serro according to DATASUS (Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde do Brasil) [52,53]. Furthermore, data and timing of vaccination for YF were not collected from all participants and, therefore, our data does not allow a more robust analysis of the conditions that lead to the absence of detectable antibodies after a vaccination.

5. Conclusions

In conclusion, we demonstrated that one-quarter of individuals located in areas of high risk for YF in Brazil do not have immunity against YFV and a high proportion of individuals with prior vaccination history still remain at risk with contraction of disease. This data concerns for the possibility of an increasing number of YF human cases in this area at high risk for both the sylvatic and urban cycles of the disease. Our findings emphasize the importance of an active epidemiological surveillance and draws attention for

continued vaccination campaigns aiming $\geq 95\%$ of coverage. Our data also provide useful information that could assist local, national, and international health authorities to develop future vaccination strategies, especially in areas at great risk of viral transmission and with a considerable number of non-vaccinated individuals. Considering that in different regions of Brazil seroprevalence studies aiming to assess whether YFV vaccination coverage really reached levels $\geq 95\%$ are scarce, and we found a seronegativity of 25.8% for rural and urban populations, future YF vaccination campaigns and further specific tests to evaluate immunity in the populations are needed. In summary, we reinforce the importance of seroepidemiological studies which can help direct public health policies to decrease the occurrence of YF epidemics in areas at risk and contain viral dispersion.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

We thank colleagues from the Laboratório de Vírus (ICB-UFMG) for their excellent technical support. Financial support was provided by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/MCTI) grant number 440593/2016-6, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/MEC), Departamento de Ciência e Tecnologia (DECIT), Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde (SCTIE), Ministério da Saúde and Pró-Reitoria de Pesquisa/UFMG (PRPq-UFMG). EG Kroon, JS Abrahão, BP Drummond, and GS Trindade are researchers from CNPq.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.07.077>.

References

- Barrett ADT, Higgs S. Yellow Fever: A Disease that Has Yet to be Conquered. *The Annual Review of Entomology* 2007;52:209–29. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.52.110405.091454>.
- Lindenbach, B.D, Murray CL, Thiel HJ, Rice CM. Flaviviridae. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*; 2013.
- Gardner CL, Ryman KD. Yellow Fever: A Reemerging Threat. *Clin Lab Med* 2010;30:237–60. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2010.01.001>.
- Brasil. Febre Amarela. Guia para profissionais da saúde. Brasília, DF. 1ª edição atualizada, 1ª reimpressão. Secretaria de atenção à saúde, Ministério da Saúde, 2019.
- Monath TP. Yellow fever: an update. *Lancet Infect Dis* 2001;1(1):11–20. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(01\)00016-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(01)00016-0).
- WHO. Yellow fever, fact sheets. World Health Organization, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/yellow-fever>; 2019. [accessed 07 november 2019].
- Possas, C. et al. Yellow fever outbreak in Brazil: the puzzle of rapid viral spread and challenges for immunisation. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 113 (10): e180278, 2018. doi: 10.1590/0074-02760180278.
- Douam F, Ploss A. Yellow Fever Virus: Knowledge Gaps Impeding the Fight Against an Old Foe. *Trends Microbiol* 2018;26(11):913–28. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.05.012>.
- Theiler M, Smith HH. Use of yellow fever virus modified by in vitro cultivation for human immunization. *J Exp Med.* 1937;65:787–800. <https://doi.org/10.1084/jem.65.6.787>.
- Soper FL. Yellow Fever in the Americas, 1938–1942. *Febre Amarela Panam.* 1938;a:1942.
- Silva Natalia Ingrid Oliveira, Sacchetto Livia, de Rezende Izabela Maurício, Trindade Giliane de Souza, LaBeaud Angelle Desiree, de Thoisy Benoit, Drummond Betânia Paiva. Recent sylvatic yellow fever virus transmission in Brazil: the news from an old disease. *Virology* 2020;17(1). <https://doi.org/10.1186/s12985-019-1277-7>.
- Ministério Da Saúde. Monitoramento de Febre Amarela, Brasil, 2019. Informe nº 18, Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. CGDT/DEVIT/SVS/MS. Atualização 04/06/2019. <https://www.saude.gov.br/images/pdf/2019/junho/13/Informe-de-Monitoramento-de-Febre-Amarela-Brasil-n-18.pdf> [accessed 06 march 2020].
- Ministério Da Saúde. Monitoramento do período sazonal da febre amarela Brasil, 2017/2018. Informe nº 27, Ministério da Saúde. CGDT/DEVIT/SVS/MS. <https://www.saude.gov.br/images/pdf/2018/outubro/08/Informe-FA.pdf>, 04/10/2018, [accessed 06 march 2020].
- Figueiredo PO, Silva ATS, Oliveira JS, et al. Detection and Molecular Characterization of Yellow Fever Virus, 2017, Brazil. *EcoHealth* 2018;15:864. <https://doi.org/10.1007/s10393-018-1364-z>.
- Romano APM et al. Yellow Fever in Brazil: Recommendations for Surveillance, Prevention and Control. *Epidemiol. Serv. Saúde, Brasília* 2011;20(1):101–6. <https://doi.org/10.5123/S1679-49742011000100011>.
- Christian Kira A, Iuliano A Danielle, Uyeki Timothy M, Mintz Eric D, Nichol Stuart T, Rollin Pierre, Staples J Erin, Arthur Ray R. What We Are Watching—Top Global Infectious Disease Threats, 2013–2016: An Update from CDC's Global Disease Detection Operations Center. *Health Security* 2017;15(5):453–62. <https://doi.org/10.1089/hs.2017.0004>.
- WHO. A Global Strategy to Eliminate Yellow Fever Epidemics (EYE) 2017–2026. World Health Organization, version 1, august, 2017.
- IBGE. Censo demográfico 2010. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/mg/serro/pesquisa/23/252077?indikator=25199;2010> [accessed 04 november 2019].
- COSTA, Z.G.A. Estudo das características epidemiológicas da Febre Amarela no Brasil, nas áreas fora da Amazônia legal, no período de 1999 a 2003. Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Brasília, Distrito Federal, 2005.
- SVS. Epidemia de febre amarela silvestre na região da bacia do rio doce – minas gerais. Dezembro de 2002 a março de 2003. Secretaria de Vigilância em Saúde. *Boletim Eletrônico Epidemiológico.* Ano 03 - nº 06, 2003.
- Amaral CD, Costa GB, de Souza WM, et al. Silent Orthohantavirus Circulation Among Humans and Small Mammals from Central Minas Gerais, Brazil. *EcoHealth* 2018;15:577. <https://doi.org/10.1007/s10393-018-1353-z>.
- Costa GB et al. Seroprevalence of Orthopoxvirus in rural Brazil: insights into anti-OPV immunity status and its implications for emergent zoonotic OPV. *Virology Journal* 2016;13(121). <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0575-6>.
- WHO. Guidelines for plaque reduction neutralization testing of human antibodies to dengue viruses. World Health Organization. Department of Immunization, Vaccines and Biologicals, 2007.
- Maeda A, Maeda J. Review of diagnostic plaque reduction neutralization tests for flavivirus infection. *Vet J* 2013;195:33–40. <https://doi.org/10.1016/j.vetj.2012.08.019>.
- Domingo C et al. Yellow fever in the diagnostics laboratory. *Emerging Microbes Infect* 2018;7(129). <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0128-8>.
- Barbosa Costa G et al. Silent Circulation of the Saint Louis Encephalitis Virus among Humans and Equids, Southeast Brazil. *Viruses* 2019;11:1029.
- 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 MV F, 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, Komninkakis SCV, Azevedo V, Chieppe AO, Araujo ESM, Mendonça MCL, dos Santos CC, dos Santos CD, Mares-Guia AM, Nogueira RMR, Sequeira PC, Abreu RG, Garcia MHO, Abreu AL, Okumoto O, Kroon EG, de Albuquerque CFC, Lewandowski K, Pullan ST, Carroll M, de Oliveira T, Sabino EC, Souza RP, Suchard MA, Lemey P, Trindade GS, Drummond BP, Filippis AMB, Loman NJ, Cauchemez S, Alcantara LCJ, Pybus OG. Genomic and epidemiological monitoring of yellow fever virus transmission potential. *Science* 2018;361(6405):894–9. <https://doi.org/10.1126/science.aat7115>.
- Ribeiro M, Antunes CMF. Febre amarela: estudo de um surto. *Rev Soc Bras Med Trop* 2009;42(5):523–31. <https://doi.org/10.1590/S0037-85822009000500009>. set-out.
- SES/MG. Informe Epidemiológico da Febre Amarela. Febre Amarela Silvestre em Minas Gerais (19/02). Secretaria do Estado de Saúde de Minas Gerais, Subsecretaria de Vigilância e Proteção à Saúde, http://www.saude.mg.gov.br/images/noticias_e_eventos/000_2019/jane_fev_mar/febre_Amarela/Boletim_atualiza%C3%A7%C3%A3o_FA_12-02-2019.pdf; 2019. [accessed 06 march 2020].
- SES/MG. Dados de Cobertura Vacinal em Minas Gerais. Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais. Atualização em 13/02/2019. <http://www.saude.mg.gov.br/febreamarela>, 2019. [accessed 06 march 2020].
- Vasconcelos Pedro Fernando da Costa. Febre amarela. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2003;36(2):275–93. <https://doi.org/10.1590/S0037-85822003000200012>.
- WHO. World health organization. Yellow fever: International travel and health, <https://www.who.int/ith/diseases/yf/en/>; 2020. [accessed 28 february 2020].
- Ferreira CDC et al. The 17D–204 and 17DD yellow fever vaccines: an overview of major similarities and subtle differences. *Expert review of vaccines* 2018. <https://doi.org/10.1080/14760584.2018.1406800>.
- Luiza-Silva M, Campi-Azevedo AC, Batista MA, et al. Cytokine signatures of innate and adaptive immunity in 17DD yellow fever vaccinated children and

- its association with the level of neutralizing antibody. *J Infect Dis*. 2011;204(6):873–83. <https://doi.org/10.1093/infdis/jir439>.
- [35] Staples JE, Barrett ADT, Wilder-Smith A, et al. Review of data and knowledge gaps regarding yellow fever vaccine-induced immunity and duration of protection. *npj Vaccines* 2020;5:54. <https://doi.org/10.1038/s41541-020-0205-6>.
- [36] Muyanja E et al. Immune activation alters cellular and humoral responses to yellow fever 17D vaccine. *J. Clin. Investig.* 2014;124:3147–58.
- [37] Miyaji KT et al. Prevalence and titers of yellow fever virus neutralizing antibodies in previously vaccinated adults. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 2017;59:. <https://doi.org/10.1590/s1678-9946201759002e2>.
- [38] Tuboi SH et al. Clinical and epidemiological characteristics of yellow fever in Brazil: analysis of reported cases 1998–2002. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2007;101:169–75. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2006.04.001>.
- [39] Zimmermann Petra, Curtis Nigel. Factors That Influence the Immune Response to Vaccination. *Clin Microbiol Reviews* 2019;32(2). <https://doi.org/10.1128/CMB.00084-18>.
- [40] Campi-Azevedo AC et al. 17DD Yellow Fever Revaccination and Heightened Long-Term Immunity in Populations of Disease-Endemic Areas, Brazil. *Emerg Infect Dis* August 2019;25(8). <https://doi.org/10.3201/eid2508.181432>.
- [41] WHO. Weekly epidemiological record. Vaccines and vaccination against yellow fever. World Health Organization, Position Paper – June 2013. No. 27, 2013, 88, 269–284. <https://www.who.int/wer/2013/wer8827.pdf?ua=1>. [accessed 28 february 2020].
- [42] Vasconcelos PF. Single shot of 17D vaccine may not confer life-long protection against yellow fever. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2018;113(2):135–7. <https://doi.org/10.1590/0074-02760170347>.
- [43] Estofolite CF, Nogueira ML. Is a dose of 17D vaccine in the current context of Yellow Fever enough?. *Brazilian Journal of Microbiology*. Jul-Sep 2018;49(3):683–4. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2018.02.003>.
- [44] Caldas IR, Camacho LA, Freire MS, Torres CR, Martins RM, Homma A, et al. Duration of post-vaccination immunity against yellow fever in adults. *Vaccine* 2014;32:4977–84. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.07.021>.
- [45] Campi-Azevedo AC et al. Booster dose after 10 years is recommended following 17DD-YF primary vaccination. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 2016;12(2):491–502. <https://doi.org/10.1080/21645515.2015.1082693>.
- [46] IBF. Bioma Mata Atlântica. Instituto Brasileiro de Florestas, <https://www.ibflorestas.org.br/bioma-mata-atlantica.html>; 2018. [accessed 06 march 2020].
- [47] LIRAA. Levantamento de Índice Rápido para Aedes aegypti (LIRAA). SES-MG, Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais, janeiro de 2019, <http://www.saude.mg.gov.br/aedes> [accessed 09 march 2020].
- [48] Machado VW et al. Serologic assessment of yellow fever immunity in the rural population of a yellow fever-endemic area in Central Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2013;46(2):166–71. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0007-2012>.
- [49] Cutts Felicity T, Claquin Pierre, Danovaro-Holliday M Carolina, Rhoda Dale A. Monitoring vaccination coverage: Defining the role of surveys. *Vaccine* 2016;34(35):4103–9. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.06.053>.
- [50] Dimech W, Mulders MN. A 16-year review of seroprevalence studies on measles and rubella. *Vaccine* 2016;34:4110–8. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.06.002>.
- [51] Watson AM, Klimstra WB. T Cell-Mediated Immunity towards Yellow Fever Virus and Useful Animal Models. *Viruses*. 2017;9(4):77. <https://doi.org/10.3390/v9040077>.
- [52] Moura LC et al. Dengue na região do Alto do Jequitinhonha: análise das notificações. *Revista Vozes dos Vales: Publicações Acadêmicas. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Reg.* 2016;120.2.095:UFVJM.
- [53] SES/MG. Boletim epidemiológico de monitoramento dos casos de Dengue, Chikungunya e Zika, nº 116. Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais, SES/MG https://www.saude.mg.gov.br/imagens/documentos/Boletim_Aedes_11-12-2018_AREA_TECNICA.pdf, 10/12/2018 [accessed 09 march 2020].



Article

Silent Circulation of the Saint Louis Encephalitis Virus among Humans and Equids, Southeast Brazil

Galileu Barbosa Costa ^{1,†,‡,*} , Paula Eillany Silva Marinho ^{1,†}, Ana Paula Pessoa Vilela ¹ , Ana Teresa Saraiva-Silva ¹ , Ana Paula Correia Crispim ¹, Iara Apolinário Borges ¹, Ana Gabriella Stoffella Dutra ¹, Zélia Inês Portela Lobato ², Jenner Karlison Pimenta dos Reis ³, Danilo Bretas de Oliveira ⁴, Betania Paiva Drumond ¹, Erna Geessien Kroon ¹ , and Giliane de Souza Trindade ^{1,*}

¹ Laboratório de Vírus, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. Avenida Presidente Antônio Carlos, 6627, Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais 31270901, Brazil; ei_lanny@hotmail.com (P.E.S.M.); pessoavilela58@gmail.com (A.P.P.V.); anateresasaraivasilva@gmail.com (A.T.S.-S.); anapbio2@gmail.com (A.P.C.C.); borges2805@gmail.com (I.A.B.); anagstoffella@gmail.com (A.G.S.D.); betaniadrmond@gmail.com (B.P.D.); ernagkroon@gmail.com (E.G.K.)

² Laboratório de Pesquisa em Virologia Animal, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais 31270901, Brazil; ziplobato@gmail.com

³ Laboratório de Retrovírus, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais 31270901, Brazil; jennerkpr@gmail.com

⁴ Faculdade de Medicina, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina 39100000, Brazil; danilobretas@yahoo.com.br

* Correspondence: galileu@wustl.edu or galileuk1@gmail.com (G.B.C.); gittrindade@yahoo.com.br or giliane@icb.ufmg.br (G.d.S.T.); Tel: +55-31-3409-2747 (G.d.S.T.); Fax: +55-31-3443-6482 (G.d.S.T.)

† These authors have contributed equally to this work.

‡ Present address: Department of Pediatrics, Washington University School of Medicine, St Louis, MO 63110, USA.

Received: 15 September 2019; Accepted: 2 November 2019; Published: 5 November 2019



Abstract: Saint Louis encephalitis virus (SLEV) is a mosquito-borne flavivirus that occurs throughout the Americas, and is considered a public health threat. In Brazil, SLEV has been detected from human cases associated with dengue-like disease, but no neurological symptoms were reported. Furthermore, the epidemiology of SLEV in human populations is still poorly explored in the country. We reported serological and molecular detection of SLEV in a healthy population of equids and humans from rural areas in Southeast Brazil. A plaque reduction neutralization test was applied, and neutralizing antibodies were detected in 11 individuals (4.6%) and 60 horses (21.5%). A qPCR targeting the 5'UTR region and reverse transcription-PCR (RT-PCR) targeting the non-structural protein (NS5) gene were performed and three individuals tested positive in both assays. Subsequent phylogenetic analysis confirmed SLEV circulation and its findings suggest the occurrence of an asymptomatic or subclinical presence in human and animal cases, correlating with the risks for outbreaks and consequently burden of SLEV infections to public health. Preventive strategies should include improved surveillance in regions with a high probability of SLEV occurrence, improvement in diagnostic methods, and evaluation of exposure/risk factors that can favor SLEV emergence.

Keywords: Saint Louis encephalitis virus; seroprevalence; epidemiology; asymptomatic cases; public health burden

1. Introduction

Saint Louis encephalitis virus (SLEV) is a mosquito-borne virus that causes human and animal encephalitis in the Western hemisphere [1]. SLEV is a member of the *Flavivirus* genus (*Flaviviridae* family), which include West Nile virus, Japanese encephalitis virus, Dengue virus, and Yellow fever virus [2].

SLEV is maintained in a zoonotic cycle, where birds are the natural amplifying host, with other vertebrates (involving equids and humans) considered accidental hosts. Human infections with SLEV are mostly asymptomatic in which infected individuals present mild malaise or flu-like symptoms. Severe cases are clinically characterized by high fever, neurological dysfunction, altered consciousness, and headaches, which are accompanied by encephalitis or meningoencephalitis [3,4].

In Brazil, SLEV circulation has been reported in Southeast and Midwest regions in the past 13 years, mostly presenting mild symptoms, related to suspected dengue cases, and most infections being misdiagnosed [5–10]. Serological studies showed SLEV circulation among horses from different regions of Brazil [11,12] and furthermore, SLEV was isolated from a horse with neurological disease in the state of Minas Gerais, Southeast Brazil. This data altogether highlights the potential spread and the risk of possible outbreaks caused by SLEV in Brazil [13]. Hence, the primary objective of this study was to investigate whether equids and humans from rural areas in Southeast Brazil have had evidence of exposure to SLEV.

2. Materials and Methods

We retrospectively analyzed 279 equid serum samples collected between 2003–2004, and 2011–2012 in the Southeast region of Brazil. The equids samples were obtained from a large study related to the investigation of the incidence of Orthopoxvirus in Minas Gerais [14]. Sera samples were collected from different regions (mesoregions) around Minas Gerais such as (1) Triângulo Mineiro and Alto Parnaíba (70 samples); (2) Central Mineira and Centro-Oeste de Minas (71 samples); (3) Campo das Vertentes and Zona da Mata (49 samples); (4) Vale do Rio Doce (14 samples); (5) Vale do Jequitinhonha and Mucuri (75 samples). Equids from rural areas of Serro city were sampled in October 2012, during the rainy season. Equids from the other mesoregions were sampled during both dry and rainy seasons.

An epidemiological questionnaire was carried out during the sampling through an on-farm interview with the owners, in order to obtain data related to the animals (Table 1). The explanatory variables collected were age, gender, breed, and region. We further decided to evaluate 240 human serum samples from one of the areas (Serro region, Figure 1). The human samples were also obtained from a study carried out to investigate the prevalence of Orthopoxvirus in that region [15]. Individuals from rural areas of Serro city were enrolled during September 2012 to March 2013, which is the rainy season. A structured questionnaire was applied to collect the following demographic information: age, gender, self-reported skin color, income, and educational level. Information on contact with equids and wild environment were also included (Table 2).

It is important to emphasize that Minas Gerais is in three different biomes: The Cerrado (South American Savannah), covering 50% of the State; Atlantic Forest, and Caatinga (desert vegetation) located in the North part of the State [16,17]. Serro city is characterized by a transition area between the Cerrado and Atlantic Forest, with a subtropical climate and two well-defined seasons, a dry season (between May and September) and a rainy season (between October and April) [16,17].

Although there is no data describing the occurrence or abundance of *Culex* species in the study area so far, studies conducted in the Amazon area highlighted *Culex* species (*Culex coronator* and *Culex declarator*) frequently found infected with SLEV [18,19], which suggests these vectors could play an important role in wild transmission cycle of SLEV. It is also important to say that SLEV was already isolated from *Culex quinquefasciatus* in Argentina, suggesting this mosquito may play an important role as a vector in the urban transmission cycle of SLEV [20,21].

Table 1. Characteristics of equid population related to neutralizing antibodies against Saint Louis encephalitis virus, Minas Gerais, Brazil, 2011–2012.

Variables	Equid Population <i>n</i> = 279 (%)	Seropositive <i>n</i> = 60 (%)	Seronegative <i>n</i> = 219 (%)	Odds Ratio 95% CI	<i>p</i> Value
Sex					
Female	104 (37.3)	28 (46.7)	76 (34.7)		Reference
Male	175 (62.7)	32 (53.3)	143 (65.3)	1.6 (0.9–3.0)	0.1
Age (years)					
≤3	56 (20.1)	6 (10.0)	50 (22.8)		Reference
4–8	137 (49.1)	35 (58.3)	102 (46.6)	2.9 (1.1–7.2)	0.03
>8	86 (30.8)	19 (31.7)	67 (30.6)	0.4 (0.1–1.1)	0.1
Breed					
<i>Equus caballus</i> *	258 (92.5)	54 (90.0)	204 (93.2)		Reference
Híbridos **	21 (7.5)	6 (10.0)	15 (6.8)	0.7 (0.2–1.8)	0.6
Region †					
MR1	70 (25.1)	13 (21.7)	57 (26.0)	5.8 (1.7–19.8)	0.01
MR2	71 (25.4)	12 (20.0)	59 (26.9)	6.5 (1.9–22.4)	0.006
MR3	49 (17.6)	18 (30.0)	31 (14.1)	2.3 (0.7–7.7)	0.03
MR4	14 (5.0)	8 (13.3)	6 (2.7)	9.8 (2.7–34.7)	0.001
MR5	75 (26.9)	9 (15.0)	66 (30.1)		Reference

* *Equus caballus* = stallions and mares. ** Híbridos = mules. † MR1 = Triângulo Mineiro and Alto Parnaíba; MR2 = Central Mineira and Centro-Oeste de Minas; MR3 = Campo das Vertentes and Zona da Mata; MR4 = Vale do Rio Doce; MR5 = Vale do Jequitinhonha and Mucuri.

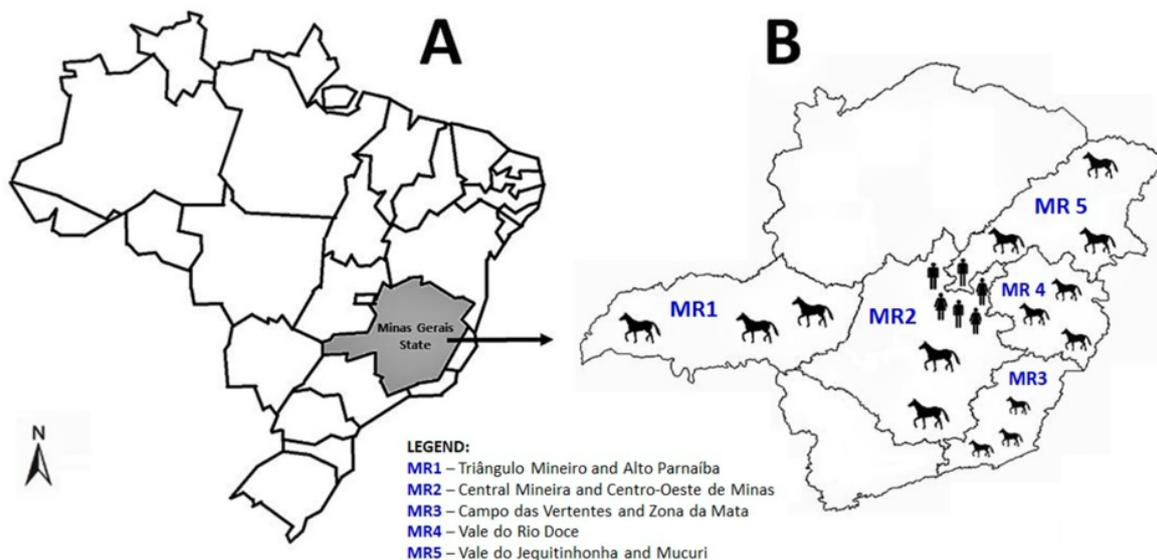


Figure 1. An overview of the studied area. (A) Map of Brazil highlighting the state of Minas Gerais in grey, Southeast region of the country. (B) A detailed map of Minas Gerais showing the regions where equids and humans were sampled in this study. The regions are divided in seven subregions (meroregions (MR)) according to the animal defense bureau of Minas Gerais.

To determine the presence of neutralizing antibodies in equid sera samples, we used the plaque reduction neutralization test (PRNT) [22]. Serum samples were initially heated in a water bath at 56 °C for 30 min to denature complement system proteins and subsequently diluted in Eagle’s minimum essential medium (MEM) free of fetal bovine sera (FBS) to a screening ratio of 1:20. Samples were added to the same volume (1:1) of a solution containing approximately 100 plaque forming units (PFU) of SLEV (strain BeH 355964) diluted in FBS free MEM. The final solution (virus/serum) was homogenized and incubated for 1 h at 37 °C. Six-well plates containing VERO cells monolayers with 100% confluence were inoculated with virus/serum solution and incubated at 37 °C for 1 h in

an atmosphere supplemented with 5% of CO₂. Later, MEM supplemented with 2% FBS and 1.5% carboxymethyl cellulose was added to each well and plates were incubated for five days at 37 °C in atmosphere supplemented with 5% of CO₂. VERO monolayers were then fixed with formalin at 10% and stained with crystal violet solution at 1%. All samples were tested in duplicate. Positive samples were defined as the highest dilution that inhibited ≥90% of virus plaques compared with negative controls. All positive samples were titrated according to the PRNT protocol described above, and the last dilution in which ≥90% PFU reduction was observed was used as a reference to calculate the value of neutralizing units per milliliter. The value was obtained by dividing 1 mL by the volume of virus/serum solution inoculated and multiplying it by the last positive dilution value.

Table 2. Characteristics of the human population related to neutralizing antibodies against Saint Louis encephalitis virus, Minas Gerais, Brazil, 2011–2012.

Variables	Human Population n = 240 (%) *	Seropositive n = 11 (%)	Seronegative n = 229 (%)	Odds Ratio 95% CI	P Value
Gender					
Female	113 (47.1)	4 (36.4)	106 (46.3)	0.67	Reference
Male	127 (52.9)	7 (63.6)	123 (53.7)	(0.19–2.32)	0.7
Age (years)					
≤18	40 (16.7)	2 (18.2)	38 (16.6)		Reference
19–30	40 (16.7)	0	40 (17.5)	***	0.7
31–50	97 (40.4)	4 (36.4)	93 (40.6)		0.99
>50	63 (26.2)	5 (45.4)	58 (25.3)		0.9
Years of schooling completed					
None	24 (10.0)	0	24 (10.5)		Reference
≤6	156 (65.0)	9 (81.8)	147 (64.2)	***	0.99
7–12	57 (23.8)	2 (18.2)	55 (24.0)		0.99
>12	3 (1.2)	0	3 (1.3)		0.99
Income **					
≤1 min wage	178 (74.2)	11 (100.0)	167 (72.9)	2.5	Reference
>1 min wage	19 (7.9)	0	19 (8.3)	(0.14–44.3)	0.99
Contact with equids					
Yes	141 (58.8)	7 (63.6)	134 (58.5)	1.2	0.99
No	96 (41.2)	4 (36.4)	92 (41.5)	(0.3–4.2)	Reference
Contact with wild environment					
Yes	117 (48.8)	8 (72.7)	109 (47.6)	2.9	0.2
No	123 (51.2)	3 (27.3)	120 (52.4)	(0.75–11.3)	Reference

* Total may not add up to 100% due to missing information. ** Income value in Brazilian currency in 2012 = R\$ 622.00 (R\$ 1.00 = US\$ 2.08 approximately). ***Odds Ratio not calculated.

To investigate the presence of SLEV RNA in sera samples, we performed qPCR targeting the 5'UTR region and a multiplex nested reverse transcription-PCR (RT-PCR) targeting the non-structural protein (NS5) gene [23]. The qPCR was performed with a commercial mix (SYBR[®] Green PCR Master Mix, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Briefly, a denaturation cycle at 95 °C for 10 min, followed by 45 cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min. Finally, a dissociation curve with heating from 65 °C to 95 °C. A specific amplification with a melting temperature of 79.5 °C was also included. The primers used for amplification were forward 5'–CAGGGAATTACCCAATGTCTAAAAA–3', and reverse 5'–AGCATATTGACAACCCGGTTTC–3'.

We directly sequenced the RT-PCR amplified fragments in both orientations and in duplicate by using the ABI3130 platform (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA). We used ClustalW (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>) and MEGA7 software (<http://megasoftware.net/>) to align nucleotide sequences and construct a phylogenetic tree by using the maximum-likelihood method.

The Pearson Chi-squared and Fisher's exact tests with a significance level of 5% using Epi Info[™] software, version 7.2.1.0. (www.cdc.gov/epiinfo) were applied to verify the statistical significance

between the serological results and studied variables that could be related to SLEV circulation. Relative odds ratios and 95% confidence intervals were calculated when applied.

This study was approved by the Research Ethics Committee on Animal Experimentation under the protocol 131/2010, and by the Human Research Ethics Committee of Universidade Federal de Minas Gerais under the protocol FR-413704.

3. Results

We detected anti-SLEV neutralizing antibodies in 60 equids (prevalence rate of 21.5%; 95% CI: 17.1–26.7%) (Table 1), with antibodies titers ranging from 100 to 300 neutralizing units (NU)/mL. Interestingly, most seropositive equids ($n = 33$, 55%) were sampled during 2003–2004. A total of 17 seropositive equids were sampled in 2011 ($n = 17$, 28.3%) and 10 (16.7%) in 2012. Equids aged between 4–8 years old were almost three times more likely to have neutralizing antibodies than younger equids. Moreover, equids from Triângulo Mineiro and Alto Parnaíba (MR1), Central Mineira and Centro-Oeste de Minas (MR2), and Vale do Jequitinhonha and Mucuri (MR5) were more likely to have neutralizing antibodies compared to equids from Campo das Vertentes and Zona da Mata (MR3) and Vale do Rio Doce (MR4) (Table 1).

We also detected 11 seropositive individuals (prevalence rate of 4.6%; 95% CI: 2.5–8.1%) (Table 2), with antibodies titers also ranging from 100 to 300 NU/mL. No variables related to the human population were significantly associated with the presence of neutralizing antibodies (Table 2). However, it is important to highlight that 141 individuals (58.8%) reported contact with equids.

As the studied area has a high risk for Yellow Fever occurrence and vaccination is strongly recommended [24], a complementary $\geq 90\%$ PRNT assay was performed against Yellow Fever virus (YFV) strain 17D to rule out any cross-reactive antibody response with the yellow fever vaccine. A total of seven human serum samples that exhibited $\geq 90\%$ of reduction in virus plaques for SLEV had neutralizing antibodies against YFV with reduction ranging from 3% to 62% (Figure 2). However, it was not possible to test neutralizing antibodies against YFV in four of eleven samples. We also performed another complementary $\geq 90\%$ PRNT assay against Dengue virus serotype 4 (DENV-4), and the 11 human serum samples had neutralizing antibodies with reduction ranging from 13.7% to 70% (Figure 2).

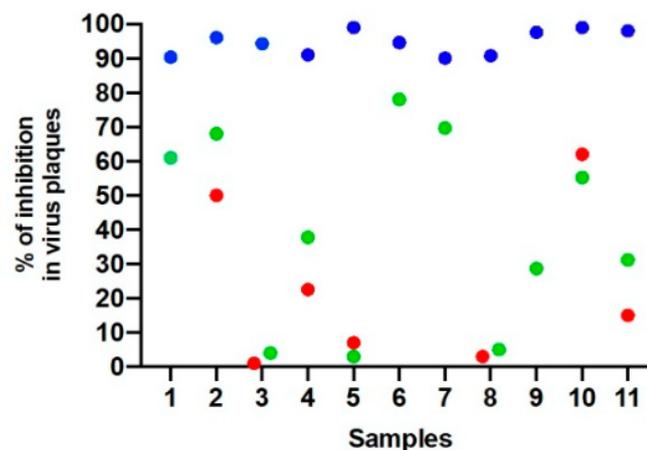


Figure 2. Relationship among neutralizing antibodies against Saint Louis encephalitis virus (SLEV), YFV, and Dengue virus serotype 4 (DENV-4) detected in 11 human serum samples from the state of Minas Gerais, Brazil, 2011–2012. Blue dots: Serum samples that exhibited $\geq 90\%$ reduction in virus plaques for SLEV; Green dots: serum samples that exhibited 3–62% reduction in virus plaques for YFV. Red dots: serum samples that exhibited 3.7–70% reduction in virus plaques for DENV4. Samples 1, 6, 7, and 9 were not tested for neutralizing antibodies against YFV.

Overall, three human serum samples tested positive for the 5'UTR region in qPCR and NS5 gene in RT-PCR, yielding a nucleic acid detection rate of 1.25%. Sequences were grouped with SLEV isolates from Brazil, USA, and South America (Figures 3 and 4). Upon phylogenetic analysis, the detected SLEV strain clustered within a group that included SLEV strains detected in South and Central America (Figures 3 and 4). To rule out infection with Dengue virus, a complementary RT-PCR was also performed [23], and the tested human serum samples had negative results.

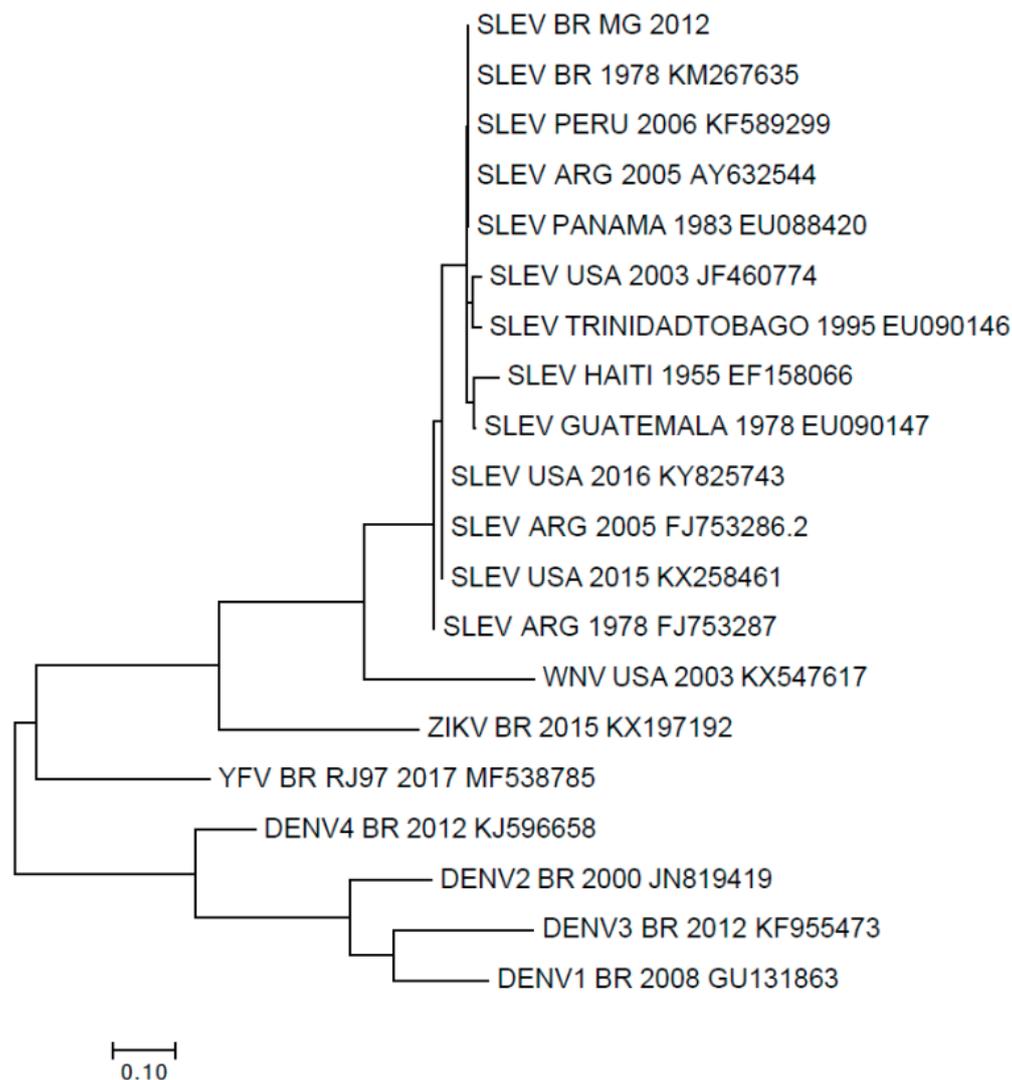


Figure 3. Phylogenetic tree based on nucleotide sequences of the 5'UTR region of Flaviviruses. The evolutionary history was inferred by using the maximum likelihood method based on the Tamura-Nei model. The tree with the highest log likelihood (-712.38) is shown. Initial tree(s) for the heuristic search were obtained automatically by applying neighbor-join and BioNJ algorithms to a matrix of pairwise distances estimated using the maximum composite likelihood (MCL) approach, and then selecting the topology with superior log likelihood value. The tree is drawn to scale, with branch lengths measured in the number of substitutions per site. The analysis involved 20 nucleotide sequences. Codon positions included were 1st + 2nd + 3rd + Noncoding. All positions containing gaps and missing data were eliminated. There was a total of 79 positions in the final dataset.

SLEV_BR_MG_2012	TCC AGG AAC TCC ACA CAT GAG ATG TAC TGG GTT AGT GGG GCG GCT GGA AAC ATC ATA CAT
SLEV_BR_1978_KM267635.1AG
SLEV_PERU_2006_KF589299AA
SLEV_USA_2003_JF460774AA
SLEV_ARG_1978_FJ753287AGAA
SLEV_HAITI_1955_EF158066.1	..T ..AGAAT
SLEV_USA_2015_KX258461AGAA
SLEV_USA_2016_KY825743AGAA
SLEV_ARG_2005_AY632544AGAA
SLEV_ARG_2005_FJ753286.2AGAA
SLEV_TRINIDADTOBAGO_1955_EU090146.1	-----
SLEV_GUATEMALA_1978_EU090147.1	-----
SLEV_PANAMA_1983_EU088420.1	-----
WNV_USA_2003_KX547617.1	..A C.. ..TG ..CTG ... C.A ..T T.A ..C ..T G.G G.. ...
ZIKV_BR_2015_KX197192C.CTC TC. ..A ... AAA A.CC. ... A.A
DENV_3_BR_2002_KF955473.1	..A C.AG ..C ..AA.A TCC AAT ..GC A.A ..TT G.C GC.
DENV_4_BR_2012_KJ596658.1C.CCG TCA ..A ... T.GG.G AGC
DENV_2_BR_2000_JN819419.1	..A C.AGTA TC. AAT ..C A.C ..GA G.G TCA
DENV_1_BR_2008_GU131863.1	..A ..A ..TCATCA T.T ..GA A.AT G.G TCG
SLEV_BR_MG_2012	GCC GTC AGC ATG ACT AGC CAA GTG CTC ATG GGG AGG ATG GAC AAA CAG AAC AG
SLEV_BR_1978_KM267635.1
SLEV_PERU_2006_KF589299
SLEV_USA_2003_JF460774T
SLEV_ARG_1978_FJ753287TGA
SLEV_HAITI_1955_EF158066.1	A..G ..A
SLEV_USA_2015_KX258461TA
SLEV_USA_2016_KY825743TA
SLEV_ARG_2005_AY632544TA
SLEV_ARG_2005_FJ753286.2TA
SLEV_TRINIDADTOBAGO_1955_EU090146.1A
SLEV_GUATEMALA_1978_EU090147.1G
SLEV_PANAMA_1983_EU088420.1
WNV_USA_2003_KX547617.1	T.A ..G .ATCGC.A ..A ..AA ..G AG. ..C. T.
ZIKV_BR_2015_KX197192	AGT ..G TC. ..CC ..GG C.CC.CG.GG .CT .G--
DENV_3_BR_2002_KF955473.1	T.AATGTA TCT AG. C.. ..A C.. AAC ... T.C ACG ..TG ACA C.. ..
DENV_4_BR_2012_KJ596658.1	T.T ..G .A. ..CA ..A TCA A.G A.. T.G T.. AAC ... T.C ACA ..C. AG. C.T ..
DENV_2_BR_2000_JN819419.1	T.A ..G .A.T. TCA AGG A.. T.G ..T AAC ..A T.C ACA ..TG A.A C.. ..A
DENV_1_BR_2008_GU131863.1	..A ..G .A.A TC. AG. A.. T.A C.. AAC C.A T.C ACA ..TG GCT C.. ..

Figure 4. Nucleotide sequence of the SLEV 5'UTR region detected in humans (green) compared with homologous sequences of several other SLEV strains detected in North and Latin America. The sequenced sample showed two polymorphisms (G–A and C–G) in comparison with other SLEV isolates.

4. Discussion

In the present study, we assessed SLEV exposure among equids and humans from Southeast Brazil. During recent decades, a considerable number of arboviruses have been detected in the country [10,12]. Taking into account the emergence and reemergence of medically important arboviruses such as *Dengue*, *Chikungunya*, *Yellow fever*, and *Zika viruses*, the active surveillance and epidemiological characterization of other circulating arboviruses into the country is necessary, due to the nature of infection and associated outcomes.

The seroprevalence of SLEV in equine populations has been already described in Brazil, which ranges from 12.3% to 22.6% [11,12]. Our findings revealed a higher seroprevalence during 2003–2004, although no SLEV outbreaks or occurrence have been reported around that time. However, the seroprevalence dropped on equids sampled during 2011–2012, corroborating results from Silva and colleagues who found 20.0% of seropositive equids from the same region we studied [11].

Regarding the seroprevalence of SLEV in human populations, according to the literature it ranges from 3.1% to 7.1% [25,26], which is not far from our findings (4.6%), but lower than the seroprevalence in Argentina, ~14.0% [27,28]. Considering that SLEV infections are probably not rare in Brazil (especially in the Southeast region and neighbor states), and cases could remain undiagnosed or misinterpreted, the enhancement of a surveillance system and diagnostic tools are needed. Furthermore, the human population included in this study could represent asymptomatic cases, reinforcing the hypothesis of silent SLEV circulation in the Southeast area of Brazil.

Although flavivirus infections produce short-lived viremia in serum (up to 7 days post onset of symptoms), and the detection in clinically unwell patients is difficult, we were able to detect three of 240 positive human serum samples in RT-PCR and qPCR assays. Further sequencing of 5'UTR amplicons confirmed the presence of a SLEV strain similar to other strains previously detected in Brazil. Recently, Rivalora and colleagues showed that Swiss albino mice infected with a SLEV strain isolated during an epidemic period in Argentina produced higher viremia levels when compared to

infected mice with a non-epidemic strain [29]. This study also corroborates a study conducted by Monath et al. (1980) that also detected higher viremia levels in Swiss albino mice infected with an epidemic SLEV strain [30]. Furthermore, it is important to emphasize that the host immune system could also contribute to the rapid elimination of viral particles.

Our study has limitations. We were unable to establish a comparative titer for Brazilian flaviviruses other than YFV and DENV-4 due to the insufficient volume of serum samples. However, the PRNT is the gold standard test for serological diagnosis and confirmation due to its high sensitivity and specificity for distinguishing any of the arthropod-borne flaviviruses [31,32]. A PRNT test with $\geq 90\%$ inhibition of virus plaques presents better distinction due to the low cross-reactivity level when compared with a PRNT with 50% inhibition [31,32]. As the human samples were collected to understand the seroprevalence of Orthopoxvirus in the Serro region, we did not undertake specific questions or characteristics of the population that are associated with Flavivirus occurrence, which could have introduced bias to this study. In addition, the equid samples were not fully tested in the molecular assays due to the serum samples being stored at a minimum of -20°C , therefore compromising the RNA preservation and consequently its detection. Due to this complication, we were not able to obtain a greater sequence and the sequenced fragment was not enough to determine phylogenetic inferences. However, the data presented here contributes to the knowledge of SLEV epidemiology in previously unstudied areas, showing a broader distribution in rural areas of Brazil.

5. Conclusions

In conclusion, the data presented here demonstrates a possible silent SLEV circulation in Brazil, with potential asymptomatic cases remaining undiagnosed. Additionally, the epidemiology of SLEV among human and animal populations is still poorly explored, highlighting the importance of an effective surveillance. As suggested by Figueiredo, protocols for the molecular diagnostics of flavivirus infections including SLEV should be addressed [10]. Further research is necessary to have a better understanding of the epidemiology of SLEV in Brazil, monitoring its transmission, and helping professionals in the field with early interventions to reduce the burden of related cases.

Author Contributions: G.B.C.—Data curation, Formal analysis, Investigation, Writing—original draft, Writing—review & editing; P.E.S.M.—Data curation, Formal analysis, Investigation, Writing—original draft, Writing—review & editing; A.P.P.V.—Data curation, Formal analysis, Writing—review & editing; A.T.S.-S.—Data curation, Formal analysis, Writing—review & editing; A.P.C.C.—Formal analysis, Writing—review & editing; I.A.B.—Data curation, Resources, Writing—review & editing; A.G.S.D.—Formal analysis, Writing—review & editing; Z.I.P.L.—Resources, Writing—review & editing; J.K.P.d.R.—Resources, Writing—review & editing; D.B.d.O.—Methodology, Writing—review & editing; B.P.D.—Writing—review & editing; E.G.K.—Supervision, Funding acquisition, Resources, Writing—review & editing; G.d.S.T.—Conceptualization, Supervision, Funding acquisition, Project administration, Resources, Validation, Writing—review & editing.

Acknowledgments: We thank colleagues from the Laboratório de Vírus (ICB-UFMG) for their excellent technical support. Financial support was provided by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) grant number 440593/2016-6, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Departamento de Ciência e Tecnologia (DECIT), Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde (SCTIE), Ministério da Saúde, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), and Pró-Reitoria de Pesquisa/UFMG (PRPq). Z.I.P. Lobato, J. K. P. Reis, E.G. Kroon, B.P. Drumond and G.S. Trindade are researchers from CNPq.

Conflicts of Interest: The authors declare that there is no conflict of interest.

References

1. Diaz, A.; Coffey, L.L.; Burkett-Cadena, N.; Day, J.F. Reemergence of St. Louis Encephalitis Virus in the Americas. *Emerg. Infect. Dis.* **2018**, *24*, 2150–2157. [CrossRef] [PubMed]
2. Centers for Disease Control and Prevention. Saint Louis Encephalitis. Available online: <https://www.cdc.gov/sle/index.html> (accessed on 23 August 2019).
3. Reisen, W.K. Epidemiology of St. Louis encephalitis virus. *Adv. Virus Res.* **2003**, *61*, 139–183. [PubMed]

4. Pierson, T.C.; Diamond, M.S. Flaviviruses. In *Fields Virology*; Knipe, D.M., Howley, P.P., Eds.; Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, USA, 2013; pp. 747–794.
5. Mondini, A.; Bronzoni, R.V.; Cardeal, I.L.; dos Santos, T.M.; Lázaro, E.; Nunes, S.H.; Nogueira, M.L. Simultaneous infection by DENV-3 and SLEV in Brazil. *J. Clin. Virol.* **2007**, *40*, 84–86. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Mondini, A.; Cardeal, I.L.; Lázaro, E.; Nunes, S.H.; Moreira, C.C.; Rahal, P.; Nogueira, M.L. Saint Louis encephalitis virus, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* **2007**, *13*, 176–178. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Terzian, C.; Mondini, A.; Bronzoni, R.V.; Drumond, B.P.; Ferro, B.P.; Cabrera, E.M.; Figueiredo, L.T.; Chiaravalloti-Neto, F.; Nogueira, M.L. Detection of Saint Louis encephalitis virus in dengue-suspected cases during a dengue 3 outbreak. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **2011**, *11*, 291–300. [[CrossRef](#)]
8. Heinen, L.B.; Zuchi, N.; Serra, O.P.; Cardoso, B.F.; Gondim, B.H.; Dos Santos, M.A.; Souto, F.J.; Paula, D.A.; Dutra, V.; Dezengrini-Slhessarenko, R. Saint Louis encephalitis virus in Mato Grosso, Central-Western, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* **2015**, *57*, 215–220. [[CrossRef](#)]
9. Díaz, L.A.; Linás, G.A.; Vázquez, A.; Tenorio, A.; Contigiani, M.S. Silent Circulation of St. Louis Encephalitis Virus Prior to an Encephalitis Outbreak in Cordoba, Argentina (2005). *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2012**, *6*, e1489. [[CrossRef](#)]
10. Figueiredo, L.T. Saint louis encephalitis virus and other arboviroses in the differential diagnosis for dengue. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **2014**, *47*, 541–542. [[CrossRef](#)]
11. Silva, J.R.; Romeiro, M.F.; Souza, W.N.; Munhoz, T.D.; Borges, G.P.; Soares, O.A.; Campos, C.H.; Machado, R.Z.; Silva, M.L.; Faria, J.L.; et al. A Saint Louis encephalitis and Rocio virus serosurvey in Brazilian horses. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **2014**, *47*, 414–417. [[CrossRef](#)]
12. Pauvolid-Corrêa, A.; Campos, Z.; Juliano, R.; Velez, J.; Nogueira, R.M.; Komar, N. Serological evidence of widespread circulation of West Nile and other flaviviruses in equines of the Pantanal, Brazil. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2014**, *8*, e2706. [[CrossRef](#)]
13. Rosa, R.; Costa, E.A.; Marques, R.E.; Oliveira, T.S.; Furtini, R.; Bonfim, M.R.; Teixeira, M.M.; Paixão, T.A.; Santos, R.L. Isolation of saint louis encephalitis virus from a horse with neurological disease in Brazil. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2013**, *7*, e2537. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Borges, I.A.; Reynolds, M.G.; McCollum, A.M.; Figueiredo, P.O.; Ambrosio, L.L.D.; Vieira, F.N.; Costa, G.B.; Matos, A.C.D.; de Andrade Almeida, V.M.; Ferreira, P.C.P.; et al. Serological Evidence of *Orthopoxvirus* Circulation Among Equids, Southeast Brazil. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 402. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Costa, G.B.; Augusto, L.T.; Leite, J.A.; Ferreira, P.C.; Bonjardim, C.A.; Abrahão, J.S.; Kroon, E.G.; Moreno, E.C.; Trindade, G.S. Seroprevalence of Orthopoxvirus in rural Brazil: Insights into anti-OPV immunity status and its implications for emergent zoonotic OPV. *Virol. J.* **2016**, *13*, 121. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Companhia de Tecnologia da Informação do Estado de Minas Gerais, Brasil. Clima, Vegetação, e Relevô. Available online: <http://www.mg.gov.br/conteudo/conheca-minas/geografia/clima-vegetacao-e-relevô> (accessed on 15 October 2019).
17. Instituto Estadual de Florestas (IEF). Cobertura Vegetal de Minas Gerais. Available online: <http://www.ief.mg.gov.br/florestas> (accessed on 15 October 2019).
18. Vasconcelos, P.F.C.; Travassos-da-Rosa, J.F.S.; Travassos-da-Rosa, A.P.A.; Dégallier, N.; Pinheiros, F.P.; Sá Filho, G.C. Epidemiologia das encefalites por arbovírus na Amazônia brasileira. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* **1991**, *33*, 465–476. [[CrossRef](#)]
19. Vasconcelos, P.F.C.; Travassos-da-Rosa, A.P.A.; Pinheiro, F.P.; Shope, R.E.; Travassos-da-Rosa, J.F.S.; Rodrigues, S.G.; Dégallier, N.; Travassos-da-Rosa, E.S. Arboviruses pathogenic for man in Brazil. In *An Overview of Arbovirology in Brazil and Neighbouring Countries*; Travassos-da-Rosa, A.P.A., Vasconcelos, P.F.C., Travassos-da-Rosa, J.F.S., Eds.; Instituto Evandro Chagas: Belém, Brazil, 1998; pp. 72–99.
20. Díaz, L.A.; Almirón, W.R.; Almeida, L.F.; Spinsanti, L.I.; Contigiani, M. Vigilancia del virus Encefalitis de San Luis y mosquitos (Diptera: Culicidae) en la Provincia de Córdoba, Argentina. *Entomol Vectores.* **2003**, *10*, 551–566.
21. Díaz, L.A.; Ré, V.; Almirón, W.R.; Fariás, A.; Vázquez, A.; Sanchez-Seco, M.P.; Aguilar, J.; Spinsanti, L.; Konigheim, B.; Visintin, A.; et al. Genotype III Saint Louis Encephalitis Virus Outbreak, Argentina, 2005. *Emerg. Infect. Dis.* **2006**, *12*, 1752–1754. [[CrossRef](#)]
22. Maeda, A.; Maeda, J. Review of diagnostic plaque reduction neutralization tests for flavivirus infection. *Vet. J.* **2013**, *195*, 33–40. [[CrossRef](#)]

23. De Moraes Bronzoni, R.V.; Baleotti, F.G.; Ribeiro Nogueira, R.M.; Nunes, M.; Figueiredo, L.T.M. Duplex reverse transcription-PCR followed by nested PCR assays for detection and identification of Brazilian alphaviruses and flaviviruses. *J. Clin. Microbiol.* **2005**, *43*, 696–702. [[CrossRef](#)]
24. Rezende, I.M.; Sacchetto, L.; Munhoz de Mello, É.; Alves, P.A.; Iani, F.C.M.; Adelino, T.É.R.; Duarte, M.M.; Cury, A.L.F.; Bernardes, A.F.L.; Santos, T.A.; et al. Persistence of Yellow fever virus outside the Amazon Basin, causing epidemics in Southeast Brazil, from 2016 to 2018. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2018**, *12*, e0006538. [[CrossRef](#)]
25. Tavares-Neto, J.; Travassos da Rosa, A.P.A.; Vasconcelos, P.F.C.; Costa, J.M.L.; Travassos da Rosa, J.F.S.; Marsden, P.D. Research of antibodies to arbovirus in the serum of residents of the village of Corte da Pedra, Valença, Bahia. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **1986**, *81*, 351–358. [[CrossRef](#)]
26. Romano-Lieber, N.S.; Iversson, L.B. Serological survey on arbovirus infection in residents of ecological reserve. *Rev. Saúde Pública.* **2000**, *34*, 236–242. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Spinsanti, L.I.; Farias, A.; Aguilar, J.; Díaz, M.P.; Ghisiglieri, S.; Bustos, M.A.; Vilches, N.; González, B.; Contigiani, M. Risk factors associated with St. Louis encephalitis seroprevalence in two populations from Córdoba, Argentina. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2007**, *101*, 1248–1252. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Spinsanti, L.I.; Ré, V.E.; Díaz, M.P.; Contigiani, M.S. Age-related seroprevalence study for St. Louis encephalitis in a population from Córdoba, Argentina. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* **2002**, *44*, 59–62. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Rivarola, M.E.; Albriou-Llinás, G.; Pisano, M.B.; Tauro, L.B.; Gorosito-Serrán, M.; Beccaria, C.G.; Díaz, L.A.; Vásquez, A.; Quaglia, A.; López, C.; et al. Tissue tropism of Saint Louis encephalitis virus: Histopathology triggered by epidemic and non-epidemic strains isolated in Argentina. *Virology* **2017**, *505*, 181–192. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Monath, T.P.; Cropp, C.B.; Bowen, G.S.; Kemp, G.E.; Mitchell, C.J.; Gardner, J.J. Variation in virulence for mice and rhesus monkeys among St. Louis encephalitis virus strains of different origin. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1980**, *29*, 948–962. [[CrossRef](#)]
31. Pupo, M.; Guzmán, M.G.; Fernández, R.; Llop, A.; Dickinson, F.O.; Pérez, D.; Cruz, R.; González, T.; Estévez, G.; González, H.; et al. West Nile Virus Infection in Humans and Horses, Cuba. *Emerg. Infect. Dis.* **2006**, *12*, 1022–1024. [[CrossRef](#)]
32. Johnson, B.W.; Kosoy, O.; Hunsperger, E.; Beltran, M.; Delorey, M.; Guirakhoo, F.; Monath, T. Evaluation of Chimeric Japanese Encephalitis and Dengue Viruses for Use in Diagnostic Plaque Reduction Neutralization Tests. *Clin. Vaccine Immunol.* **2009**, *16*, 1052–1059. [[CrossRef](#)]

